

# Produktion von pharmakologischen Sekundärmetaboliten

Am Beispiel von mikrobiellen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und pflanzlichen Triterpenen

Dem Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik  
der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)**

genehmigte

**Dissertation**

Von

Herrn

**Dipl.-Biotech. Christoph Benjamin Ludwig**

aus Siegen

Datum der mündlichen Prüfung  
Dekan  
Prüfungsvorsitzender  
Berichterstatter

25.11.2014  
Prof. Dr.-Ing. C. Schindler  
Prof. Dr.-Ing. R. Müller  
Prof. Dr. rer. nat. R. Ulber  
Prof. Dr. rer. nat. T. Bley

Kaiserslautern, 2015

D 386







“We shall not cease from exploration  
And the end of all our exploring  
Will be to arrive where we started  
And know the place for the first time.  
Through the unknown, unremembered gate  
When the last of earth left to discover  
Is that which was the beginning.”

[T. S. Eliot, *Four Quartets*, 1943]



## **Danksagung:**

Meinen besonderen Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Roland Ulber, der mir finanziell als auch durch die Bereitstellungen der modernen Systeme die Promotion ermöglichte und mir die abwechslungsreichen Themen zur Verfügung gestellt hat. Für die zahlreichen Anregungen, Denkanstöße und Hilfestellungen bei der wissenschaftlichen Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ebenfalls ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Bley, für die Unterstützung der Arbeit durch die praktischen Versuche an seinem Lehrstuhl und die Bereiterklärung, als Berichterstatter zu fungieren. Zudem möchte ich mich bei seiner Mitarbeiterin Christiane Haas für den wissenschaftlichen Austausch und die gemeinsamen Versuche in Dresden auf diesem Wege bedanken.

Auch möchte ich mich auf diesem Wege bei Herrn Dr. Burghard König vom Unternehmen Sandoz für die Bereitstellung des ersten Dissertationsthemas als auch für die Betreuung der Kultivierungsversuche bedanken.

Des Weiteren geht mein Dank an meine Arbeitskollegen/innen, den Mitarbeitern des Lehrgebietes Bioverfahrenstechnik, welche meinen Arbeitstag bereicherten und mir immer moralisch und wissenschaftlich zur Seite standen. Da ich nicht Gefahr laufen möchte, jemanden bei der Aufzählung zu vergessen, reduziere ich das Benennen auf ein paar ausgewählte Mitarbeiter, mit denen ich meinen intensivsten Gedankenaustausch während der letzten Jahre hatte. Alle anderen waren auch ein sehr wichtiger Bestandteil meiner Zeit am Lehrgebiet, die ich nicht missen möchte.

Speziell erwähnen möchte ich meinen betreuenden Post-Doc (nun Prof.) Dr.-Ing. Kai Muffler, mit dem ich meine wissenschaftlichen als auch persönlichen Probleme zu jeder Zeit diskutieren konnte und der mir hilfreiche Lösungsansätze bot. Als Fundament der Arbeitsgruppe und auch für mich persönlich wichtige Kollegin, möchte ich mich bei Frau Doris Geib für die Unterstützung und die gemeinsame Zeit in der Analytik bedanken. Ich hoffe, sie weiß, wie wichtig sie uns allen ist und wie gern wir sie haben! Von meinen Arbeitskollegen möchte ich mich vor allem bei der „Brötchenfraktion“ Aline Pasteur, Tim Sieker, Thomas Hahn und Ralf Stadtmüller für das freundschaftliche Verhältnis während meiner Promotion und den Pausen bedanken. Vor allem bei Tim Sieker, mit dem ich so manche technische und moralische Herausforderung meisterte. Für die gelungene „Doktorprüfung“ möchte ich mich auch bei Alexander Thiel, Dorina Strieth, Thomas Hering und besonders bei Jasmine Roth bedanken. Allen Mitarbeitern wünsche ich viel Erfolg bei Ihren anstehenden Prüfungen!

Letztendlich sind diejenigen zu nennen, die auch praktisch zum Verfassen dieser Dissertationsschrift beigetragen haben und mir durch Ihren unermüdlichen Einsatz und Fleiß einen

Teil der zeitaufwendigen und anspruchsvollen Arbeit abgenommen haben. Damit beziehe ich mich auf die Studienarbeiter und Praktikanten, denen ich hoffentlich meine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermitteln konnte.

Für die moralische Unterstützung, aber auch für das Korrekturlesen möchte ich bei meiner Mutter, meiner Schwester und ihrer Familie bedanken, die trotz der Entfernung ein offenes Ohr für mich hatten. Auch geht mein Dank an meine Freunde aus meiner Studienzeit - vor allem Ann-Christin Gaupel, die immer für mich erreichbar war.

Zuletzt, aber dennoch am wichtigsten für mich, möchte ich mich bei meiner Frau Susanne bedanken, die mich immer unterstützte und die Betreuung unserer Tochter übernahm, damit ich diese Arbeit verfassen konnte. Ich kann nicht beschreiben, wie wichtig du, Susanne, für mich während dieser Zeit warst! Vor allem, weil ich manchmal an mir und an dieser Arbeit am Verzweifeln war und du mich immer wieder ansporntest! Du wirst dich sicherlich mehr über die Fertigstellung dieser Arbeit freuen als ich.



## Kurzzusammenfassung

Durch das Entstehen von neuen Infektionskrankheiten und das Auftreten von Resistenzen können bisher verwendete Medikamente ihren pharmazeutischen Nutzen verlieren. Daher ist eine konstante Weiterentwicklung von bioaktiven Pharmazeutika lebensrettend. Viele pflanzliche und mikrobielle Sekundärmetabolite besitzen gesundheitsfördernde Wirkungen und können als Ressourcen für die Entwicklung neuer Arzneimittel herangezogen werden. Da Pflanzen und Mikroorganismen ein sehr umfangreiches Repertoire an pharmazeutisch-interessanten Intermediaten besitzen, soll im Rahmen dieser Arbeit die Produktbildung von pflanzlichen und mikrobiellen Sekundärmetaboliten vorgestellt werden, die für weiterführende medizinische Studien von Interesse sind.

Die in dieser Arbeit präsentierten mikrobiellen Sekundärmetabolite sind  $\beta$ -Lactam Antibiotika der Gruppe der OA-6129 und besitzen antibakterielle Eigenschaften gegen grampositive als auch gramnegative Mikroorganismen. Durch die Kultivierung des filamentösen Actinobakteriums *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 können diese sehr wirksamen Antibiotika gebildet werden. Für eine erfolgreiche Produktbildung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zweistufiger Prozess im Bioreaktor etabliert, der sich über einen Zeitraum von neun Tagen erstreckt. Durch Optimierung und Variation des Mediums, sowie durch die Veränderung der Rührergeometrie, kann die maximale Antibiotikakonzentration um 385 % gesteigert werden. Neben der zu optimierenden Produktbildung ist auch die Stabilität der Antibiotika im wässrigen Milieu von Interesse. Die Untersuchungen erfolgten am Produktanalogon Imipenem. Es zeigte sich, dass durch Interaktionen der Imipenemmoleküle der Zerfall mit steigender Antibiotikakonzentration beschleunigt wird. Ein dazugehöriger Zerfallsweg des Imipenems in deionisiertem Wasser bei pH 7 konnte durch die Auswertung der HPLC und Massenspektrometrie-Analytik beschrieben werden. Bioaktive Zerfallsprodukte, wie das sehr aktive  $\beta$ -Lactam Thienamycin, können aus dieser Zerfallsreaktion resultieren. Auch im Fermentationsmedium kann ein konzentrationsabhängiger Zerfall nachgewiesen werden, was für eine wirtschaftliche, fermentative Herstellung problematisch wäre. Durch die Verwendung von Morpholinosulfonsäurepuffern ist eine Stabilisierung des Antibiotikums im Wasser und im Fermentationsmedium realisierbar. Eine Steigerung der Halbwertszeit von über dem 10fachen gegenüber einer reinen Imipenemlösung im Wasser kann durch die Verwendung dieser Puffersubstanzen erzielt werden.

Bei den zweiten, in dieser Arbeit behandelten Sekundärmetaboliten, handelt es sich um die pflanzlichen Triterpene Oleanol- und Ursolsäure, von denen antibakterielle, antivirale, entzündungshemmende und Krebs vorbeugende Aktivitäten bekannt sind. Neben anderen Pflanzen bilden Spezie von Salbei und Basilikum diese interessanten Sekundärmetabolite.

Da bei einer Freilandkultivierung die Produktkonzentrationen jährlichen Schwankungen durch abiotischen und biotischen Faktoren unterliegen, kann durch eine *in situ* Kultivierung eine reproduzierbare Produktbildung erzielt werden. Im Zuge der Arbeit wurden Kalluskulturen von *Salvia officinalis* und *Ocimum basilicum* in verschiedenen Reaktortypen und mit verschiedenen Prozessstrategien eingesetzt und betreffend ihrer Produktbildung untersucht. Eine Oleanol- und Ursolsäurebildung durch eine Kalluskultur von *Ocimum basilicum* konnte durch diese Arbeit zum ersten Mal präsentiert werden.

Im Vergleich zu Kultivierungen in Erlenmeyerkolben fördert eine Kultivierung im Wavebag-Reaktor das Wachstum und die Produktbildung, sodass die maximale Triterpenkonzentration um 210 % gesteigert werden kann. Durch Variation der batch-Prozessstrategie in ein repeated-batch-Verfahren kann eine signifikante Steigerung der Oleanolsäurebildung um das 16fache und der Ursolsäurebildung um das 35fache erzielt werden. Es wird angenommen, dass auftretende Substratlimitierung zu einer Steigerung der Produktbildung führt.

Durch eine nachfolgende Biotransformation ist es möglich, die beiden Triterpene zu modifizieren. Eine Derivatisierung kann neben einer Verbesserung der Wasserlöslichkeit der Triterpene auch in einer Erhöhung der pharmazeutisch-interessanten Aktivitäten resultieren. Aus diesem Grunde wurden neun Organismen betreffend ihrer biokatalytischen Aktivität untersucht. Mittels des Actinobakteriums *Nocardia iowensis* werden die Oleanol- und Ursolsäure zunächst in ihre korrespondierenden Methylester transformiert. Des Weiteren entstehen bei der Biotransformation von Oleanolsäure zwei weitere, bisher unbekannter Derivate, welche durch HPLC, HPLC-ESI-MS und HPLC-<sup>1</sup>H-NMR charakterisiert werden konnten. Anhand dieser Resultate kann ein neuer Biosyntheseweg für eine Oleanolsäuretransformation mittels *Nocardia iowensis* beschrieben werden.

Um die Abtrennung der Biotransformationskultur von Medium zu vereinfachen und die Wirtschaftlichkeit zu fördern, kann *N. iowensis* in Natriumalginat immobilisiert werden. Während kein signifikanter Unterschied zwischen immobilisierten und freien Bakterienzellen betreffend der Substrataufnahme detektiert wird, wird durch die Immobilisierung die Produktbildung reprimiert. Dabei besitzt die Matrixdichte, die aus der Behandlung der Natriumalginatpartikel mit der Calciumchloridlösung resultiert, einen entscheidenden Einfluss auf die Biotransformationseffizienz.

Auch eine Zusammenführung von Pflanzenzellkultivierung und Biotransformation in einem Gesamtprozess wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Durch den direkten Einsatz der immobilisierten Biotransformationskultur im verdünnten Zellysate umgeht man eine Aufarbeitung der Produkttriterpene aus dem Pflanzenzellysate, was die Wirtschaftlichkeit des Prozesses erheblich verbessert. Bis zu einem Mischverhältnis von 50 % Referenzmedium und Zellysate kann keine Inhibierung oder Reprimierung der Biotransformation durch vorhandene Pflanzenzellbestandteile, wie z. B. Phenole, detektiert werden.

## Abstract

With the emergence of new infectious diseases and new resistance, applied drugs lose their pharmaceutical benefit. Therefore, a permanent development of bioactive pharmaceuticals is life saving. As a source of a development of new drugs, many plants and microbial secondary metabolites have several health beneficial effects. Because plants and microorganisms have a very extensive repertoire of pharmaceutically interesting intermediates, a product formation on basis of two groups of secondary metabolites, which are of interest for leading medical studies, will be presented in this work.

The first presented secondary metabolites are  $\beta$ -lactam antibiotics of the group of OA-6129, which have antibacterial properties against gram-positive and gram-negative microorganisms. These very effective antibiotics can be produced by cultivating the filamentous actinobacteria *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501. In this work, a two-step cultivation process was established over a period of nine days. The maximum antibiotic concentration was improved on 385 % by optimizing and variation of the culture media and variation of the stirrer geometry.

Besides, of the product formation the stability of antibiotics in an aqueous milieu is of particular interest. The tests were performed with the antibiotic analogue Imipenem. Interactions between molecules of Imipenem lead to a decay. Increasing the antibiotic concentration a decay will be accelerated. A corresponding decay pathway of Imipenem in water was determined by HPLC and mass spectrometry analysis. Bioactive products such as the very active  $\beta$ -lactam Thienamycin can result from this decay. In addition, a concentration-dependent decay in the fermentation broth can be detected, which might be problematic for a production. A stabilization of Imipenem in water and in the fermentation broth can be implemented by using morpholino sulfonic acid buffers. These buffering agents can achieve an increase of the half-life by 10 times compared with a pure Imipenem solution in water.

The second source of secondary metabolites dealt with in this in this work are the plant-derived triterpenes oleanolic and ursolic acid, which are known for their antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and antitumor activities. Among other plant species, sage and basil are able to produce these interesting secondary metabolites. Because the production concentration of triterpenes by field-grown plants is liable to annual fluctuations by abiotic and biotic factors, a reproducible product formation can be achieved by an *in situ* cultivation. In this work callus cultures of *Salvia officinalis* sp. and *Ocimum basilicum* were used in various reactor types and with various process strategies and investigated for their product formation. The formation of ursolic and oleanolic acid by callus cultures of *Ocimum basilicum* is presented by this work for the first time.

In comparison to a cultivation in shake flasks, a cultivation in a Wavebag bioreactor promotes the growth and product formation, so the final triterpene concentration can be increased by 210 %. Through varying the batch process strategy to a repeated-batch process a 16-fold increase of oleanolic acid and 35-fold increase of ursolic acid concentrations were detected. It is assumed that a substrate limitation resulted in an increase of productivity.

By a subsequent biotransformation, it is possible to modify triterpenes acids. A modification can result in an improvement of water solubility of the triterpenes and an increase of the pharmaceutical-interesting activities. Therefore, nine microorganisms were tested for their biocatalytic activity. The actinobacteria *Nocardia iowensis* foremost transformed oleanolic and ursolic acid to their corresponding methyl esters. Furthermore, a biotransformation of oleanolic acid resulted in two unknown derivatives, which were characterized by HPLC, HPLC-ESI-MS and HPLC-<sup>1</sup>H-NMR. Based on these results, a new biosynthetic pathway of oleanolic acid by *Nocardia iowensis* is proposed.

To simplify a separation of the biotransformation culture and media and to improve economic efficiency, an immobilization of *N. iowensis* in sodium alginate was established. The substrate-uptake of free and immobilized cells was similar, whereas the relative concentration of the products of the immobilized cells was repressed by the immobilization. It could be shown that the matrix density, which resulted by treating sodium alginate with a calcium chloride solution, has a large influence on a loss of productivity.

A pooling of plant cell cultivation and biotransformation into a single process was investigated in this work, too. Through a direct use of a immobilized culture in the diluted cell lysate a purification of the products from the plant cell lysate can be avoided, which improve the economic viability of the process. Up to a mixing ratio of 50 % of the reference medium and the cell lysate no inhibition or repression by existing plant constituents, such as phenols, are detected.

## Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
CaCO <sub>3</sub>	Calciumcarbonat
D-Ala	Alanin
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ESI	Elektrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , lateinisch für „und andere“
EtAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Gly	Glycerin
GYM	Glucose, Hefe und Malz-Medium
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HGMS	Hochgradienten-Magnetseparation
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus-1
HPLC	Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie
HS	Hochschule
HST	Hauptstufe
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogensulfat
lag-Phase	Latenzphase
LS	Linsmaier and Skoog
MeOH	Methanol
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat

MOBS	4-(N-morpholino)buthansulfonsäure
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
MOPSO	3-(4-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
<i>N. iowensis</i>	<i>Nocardia iowensis</i>
Na	Natrium
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Kernspinresonanz
NTG	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OS	Oleanolsäure
OSC	Oxidosqualenzyklasen
OSME	Oleanolsäuremethylester
OTR	Sauerstofftransportrate
OUR	Sauerstoffaufnahme
PBP	Penicillin-bindenden-Proteine
PDA	Photodiodenzeile
PES	Polyethersulfon
pO <sub>2</sub>	Gelöstsauerstoffkonzentration
PTFE	Polytetrafluorethylen
RI	Brechungsindex ( <i>refractive index</i> )
RK	Rührkesselreaktor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RP-HPLC	Reversed Phase-HPLC
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions pro Minute
RT	Raumtemperatur
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
<i>S. fulvoviridis</i>	<i>Streptomyces fulvoviridis</i>
<i>S. officinalis</i>	<i>Salvia officinalis</i>
SAHC	S-adenosyl-L-homocystein
SAM	S-adenosyl-L-methionin
SK	Schüttelkolben

sp.	Spezies
Tab.	Tabelle
UNS	Ursonsäure
upm	Umdrehungen pro Minute
US	Ursolsäure
USME	Ursolsäuremethylester
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen- zu Volumentanteil
VE	vollentsalzt
VST	Vorstufe
w/v	Gewicht- zu Volumenanteil
WR	Wavebagreaktor
$\lambda_{\max}$	maximale Absorption bei der Wellenlänge

## Formelzeichen

$c$	Konzentration
$c_a^0$	Konzentration des Substrates A zum Zeitpunkt $t_0$
$c_{O_2}^*$	Sättigungssauerstoffkonzentration
$c_{O_2}$	IST-Sauerstoffkonzentration im Medium
$\gamma_{N_2}^\alpha$	eingehende Konzentration an $N_2$
$\gamma_{N_2}^\omega$	austretende Konzentration an $N_2$
$d$	Küvettschichtdicke
$D_R$	Rührerdurchmesser
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizienten
$Ex$	Absorptionswertes bei 340 nm
$f$	Anzahl der Freiheitsgrade
$k$	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
$k_r$	Rocking Geschwindigkeit
$k_{L,a}$	volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten
$1/k$	Relative Ergebnisunsicherheit zur Charakterisierung der Bestimmungsgrenze
$\lambda$	Wellenlänge
$M$	Momentum
$m$	Anzahl der Messungen an der Analysenprobe
$M_{O_2}$	Molare Masse für $O_2$
$n$	Anzahl der Kalibrierproben
$n_R$	Rührerdrehzahl
$n_S$	Schüttelfrequenz
$Ne$	Newtonzahl
$P$	Produktmenge
$P/V$	spezifischer Leistungseintrag
$p_{ges}$	Druck
$Q_x$	Summe der Abweichungsquadrate von $x$



$Q_{O_2}$	Sauerstoffaufnahme
$r$	Reaktionsgeschwindigkeit
$R$	Universelle Gaskonstante
$Re$	Reynoldszahl
$S$	Substratmenge
$s_{y,x}$	Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung
$s_{x0}$	Verfahrensstandardabweichung
$T$	Temperatur
$t_{f;\alpha}$	Quantil der t-Verteilung bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 1. Art
$t_{f;\beta}$	Quantil der t-Verteilung bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 2. Art
$t_{1,2}$	Halbwertszeit
$t_D$	Verdopplungszeit
$\mu_{max}$	maximale, spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
$V_M$	molare Volumen
$V_F$	Volumen
$\dot{V}_G^\alpha$	eingehender Gasvolumenstrom
$\dot{V}_G^\omega$	austretender Gasvolumenstrom
$V_{R,L}$	Reaktorvolumen
$W$	Arbeit
$X$	gebildeten Biomasse
$\bar{x}$	Arithmetisches Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben
$x_{BG}$	Bestimmungsgrenze
$x_{EG}$	Erfassungsgrenze
$x_i$	Gehaltsgröße
$x_{NG}$	Nachweisgrenze
$y_i$	Messwert
$\hat{y}_i$	Geschätzter Funktionswert bei der Kalibrierung
$Y_{X/O}$	Sauerstoffausbeutekoeffizient
$Y_{X/S}$	Substratausbeutekoeffizient

$\varphi$  Bewegungswinkel

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. PRODUKTION DER CARBAPENEME OA-6129</b>	<b>3</b>
<b>2.1 EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.2 ZIELSETZUNG</b>	<b>4</b>
<b>2.3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>6</b>
2.3.1 EINTEILUNG DER SEKUNDÄRMETABOLITEN NACH GADEN	6
2.3.2 ZUR GATTUNG <i>STREPTOMYCES</i>	7
2.3.3 STAMMBESCHREIBUNGEN DER VERWENDETEN <i>STREPTOMYCES SP.</i>	7
2.3.4 BETA-LACTAM-ANTIBIOTIKA	8
2.3.5 BIOSYNTHESE DER OA-6129-DERIVATE	10
<b>2.4 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
2.4.1 ANTIBIOTIKABESTIMMUNG MITTELS AGAR-DIFFUSIONSTEST	15
2.4.2 ANTIBIOTIKABESTIMMUNG MITTELS HPLC	16
2.4.3 HPLC-MS ANALYTIK	17
2.4.4 SPEZIFIKATIONEN DER EINGESETZTEN RÜHRKESSELREAKTOR-KASKADE R-ALF, BIOENGINEERING	17
2.4.5 KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN UND PROZESSPARAMETER	21
2.4.6 BERECHNUNG VON ERTRAGSKOEFFIZIENTEN	22
2.4.7 BESTIMMUNG DER SAUERSTOFFAUFNAHMERATE (OUR) DURCH DIE ABLUFTANALYTIK	23
2.4.8 CHARAKTERISIERUNG DER REAKTIONSKINETIK	25
<b>2.5 BESTIMMUNG DER ERFASSUNGS-, NACHWEIS-, UND BESTIMMUNGSGRENZEN DER HPLC-ANALYTIK</b>	<b>27</b>
<b>2.6 ERGEBNISSE ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG DER B-LACTAME OA-6129</b>	<b>30</b>
2.6.1 VALIDIERUNG DER SCHÜTTELKOLBENVERSUCHE	30
2.6.2 ZUGABE VON WASSERSTOFFPEROXID ZUR STEIGERUNG DER SAUERSTOFFVERSORGUNG DER ZELLEN IM BIOREAKTOR	32
2.6.3 VARIABLE RÜHRERGESCHWINDIGKEIT ZUR ERHÖHUNG DER GELÖSTSauerstoffkonzentration im BIOREAKTOR	34
2.6.4 VARIATION DES FERMENTATIONSMEDIUMS	36
2.6.5 KULTIVIERUNG MIT HALBER STICKSTOFFKONZENTRATION IM PRODUKTIONSMEDIUM	41
2.6.6 KULTIVIERUNG VON <i>STREPTOMYCES SP.</i> MIT ZUSÄTZLICHER BEGASUNG MIT REINEM SAUERSTOFF	43
2.6.7 VARIATION DER RÜHRERGEOMETRIE	46

2.6.8	FERMENTATION MIT REDUZIERTER GLYCERINKONZENTRATION IM KULTURMEDIUM	48
2.6.9	SYNOPSIS	51
<b>2.7</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR DESTABILISIERUNG VON IMIPENEM IM WÄSSRIGEN MILIEU</b>	<b>55</b>
2.7.1	IMIPENEM-DESTABILISIERUNG IM WÄSSRIGEN MILIEU	55
2.7.2	FRAGMENTIERUNG VON IMIPENEM DURCH DIE ELEKTROSPRAY IONISIERUNG	60
2.7.3	ZERFALL VON IMIPENEM ZU THIENAMYCIN	61
2.7.4	DESTABILISIERUNG DES IMIPENEMS IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN BESTEHEND AUS FERMENTATIONSMEDIENBESTANDTEILEN	65
2.7.5	DESTABILISIERUNG DES IMIPENEMS IM STERILEN MEDIUM	68
2.7.6	DESTABILISIERUNG DES IMIPENEMS IN ZELLFREIEN ÜBERSTANDSPROBEN	69
2.7.7	DESTABILISIERUNG DES IMIPENEMS IM LAUFENDEN FERMENTATIONSPROZESS	71
2.7.8	STABILISIERUNG VON IMIPENEM IN WÄSSRIGER LÖSUNG	74
2.7.9	SYNOPSIS	82
<b>2.8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>85</b>
<b>3.</b>	<b>PRODUKTION UND BIOTRANSFORMATION VON URSOL- UND OLEANOLSÄURE</b>	<b>88</b>
<b>3.1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>88</b>
<b>3.2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>90</b>
<b>3.3</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>93</b>
3.3.1	BIOSYNTHESE VON OLEANOL- UND URSOLSÄURE	93
3.3.2	BEDEUTUNG VON TERPENEN IN PFLANZEN	97
3.3.3	<i>IN VITRO</i> -KULTIVIERUNG VON PFLANZENZELLEN	98
3.3.4	KRYOKONSERVIERUNG VON PFLANZENZELLEN	100
3.3.5	MIKROBIELLE BIOTRANSFORMATION VON TRITERPENEN	103
3.3.6	KLASSIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON <i>NOCARDIA IOWENSIS</i> ZUR BIOTRANSFORMATION VON TRITERPENEN	104
3.3.7	IMMOBILISIERUNG VON ORGANISMEN	105
<b>3.4</b>	<b>ANGEWANDTE METHODEN</b>	<b>107</b>
3.4.1	BESTIMMUNG DER TROCKENBIOMASSE VON PFLANZENZELLEN UNTER VERWENDUNG EINER GEFRIERTROCKNUNGSANLAGE	107
3.4.2	MECHANISCHER ZELLAUFSCHLUSS VON PFLANZENZELLEN	107
3.4.3	RP-HPLC-ANALYTIK VON TRITERPENEN	108
3.4.4	HPLC-MS-ANALYTIK VON TRITERPENEN	109

3.4.5	HPLC- <sup>1</sup> H-NMR-ANALYTIK VON TRITERPENEN	109
3.4.6	HERSTELLUNG VON KRYOKULTUREN	110
3.4.7	KULTIVIERUNG VON <i>NOCARDIA IOWENSIS</i> UND ANSCHLIEßENDE BIOTRANSFORMATION	110
3.4.8	IMMOBILISIERUNG VON <i>NOCARDIA IOWENSIS</i>	113
3.4.9	SPEZIFIKATIONEN DES EINGESETZTEN BIOSTAT-CULTIBAG RM, SARTORIUS	113
3.4.10	AUFARBEITUNG DER AUS DER BIOTRANSFORMATION ERHALTENEN PROBEN	114
3.4.11	EXTRAKTION VON PFLANZENZELLEN FÜR EINE ANSCHLIEßENDE BIOTRANSFORMATION	115
3.4.12	BESTIMMUNG DER ZUCKERKONZENTRATION MITTELS HPLC	116
<b>3.5</b>	<b>BESTIMMUNG DER ERFASSUNGS-, NACHWEIS- UND BESTIMMUNGSGRENZEN DER HPLC-ANALYTIK</b>	<b>117</b>
<b>3.6</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR PRODUKTION VON URSOL- UND OLEANOLSÄURE</b>	<b>119</b>
3.6.1	KRYOKONSERVIERUNG VON <i>SALBEI OFFICINALIS</i>	119
3.6.2	KULTIVIERUNG VON PFLANZENZELLKULTUREN IM BATCH-VERFAHREN	122
3.6.2.1	KULTIVIERUNG DES KLONS <i>SALBEI OFFICINALIS</i> VAR. <i>EXTRAKTA</i> SUC1-4	123
3.6.2.2	KULTIVIERUNG DES KLONS <i>SALBEI OFFICINALIS</i> VAR. <i>EXTRAKTA</i> SUC1-1	127
3.6.2.3	KULTIVIERUNG VON <i>OCIMUM BASILICUM</i>	130
3.6.3	KULTIVIERUNG VON PFLANZENKULTUREN IM REPEATED-BATCH-VERFAHREN	132
3.6.4	SYNOPSIS	134
<b>3.7</b>	<b>ERGEBNISSE ZUR BIOTRANSFORMATION VON OLEANOL- UND URSOLSÄURE</b>	<b>136</b>
3.7.1	BIOTRANSFORMATION VON TRITERPENEN DURCH MIKROORGANISMEN	136
3.7.2	IMMOBILISIERUNG VON <i>NOCARDIA IOWENSIS</i> DURCH NATRIUMALGINAT UND POLYVINYLALKOHOL	138
3.7.3	BIOTRANSFORMATION VON OLEANOLSÄURE DURCH FREIE UND IMMOBILISIERTEN ZELLEN VON <i>NOCARDIA IOWENSIS</i>	144
3.7.4	SYNOPSIS	153
<b>3.8</b>	<b>DESIGN EINES GESAMTPROZESSES EINER KULTIVIERUNG VON SALBEIZELLEN MIT ANSCHLIEßENDER BIOTRANSFORMATION DURCH IMMOBILISIERTE <i>NOCARDIA IOWENSIS</i> ZELLEN</b>	<b>155</b>
<b>3.9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>162</b>
<b>4.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>166</b>
<hr/>		
<b>ANHANG</b>		<b>184</b>
<hr/>		
<b>ANHANG A</b>	<b>VERWENDETE CHEMIKALIEN UND STAMMHALTUNG</b>	<b>184</b>
ANHANG A.1	CHEMIKALIENLISTE	184
ANHANG A.2	EINGESETZTE MIKROORGANISMEN UND PFLANZENZELLINIEN	188

<b>ANHANG B</b>	<b>VERWENDETE LÖSUNGEN UND MEDIEN</b>	<b>189</b>
ANHANG B.1	VERWENDETE LÖSUNGEN	189
ANHANG B.2	ZUSAMMENSETZUNG DER KULTIVIERUNGSMEDIEN	190
<b>ANHANG C</b>	<b>EINGESETZTE GERÄTE</b>	<b>194</b>
<b>ANHANG D</b>	<b>VERSUCHSPROTOKOLLE, BERECHNUNGEN UND ASSAYS</b>	<b>197</b>
ANHANG D.1	GRAVIMETRISCHE BESTIMMUNG DER TROCKENMASSE BZW. DES SEDIMENTVOLUMENS	197
ANHANG D.2	GLYCERIN-ASSAY	197
ANHANG D.3	BESTIMMUNG DES VOLUMETRISCHEN STOFFÜBERGANGSKOEFFIZIENTEN ( $k_{LA}$ )	198
ANHANG D.4	ISOLIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER KONTAMINANTEN BEI DER MIKROBIELLEN BIOTRANSFORMATION VON TRITERPENEN	199
ANHANG D.5	BESTIMMUNG DER LEISTUNGSEINTRÄGE DER VERWENDETEN RÜHRERKESSELREAKTOREN, DES CULTI- BAG®-SYSTEMS UND DER 2 L-ERLENMEYER-SCHÜTTELKOLBEN OHNE SCHIKANE	200
<b>ANHANG E</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>204</b>
<b>ANHANG F</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>214</b>
<b>ANHANG G</b>	<b>ANGABEN ZUR PERSON</b>	<b>217</b>
ANHANG G.1	BETREUTE FORSCHUNGS- UND STUDIENARBEITEN	217
ANHANG G.2	VERÖFFENTLICHUNGEN	217
ANHANG G.3	TAGUNGSBEITRÄGE	218
ANHANG G.4	LEBENS LAUF	220

## 1. Einleitung

Seit der Entdeckung von Penicillin durch Alexander Fleming ist die Behandlung mit einem Antibiotikum eins der wichtigsten Mittel zur Bekämpfung einer bakteriellen Infektion. Dabei existieren außer den mikrobiellen Antibiotika pflanzliche, bioaktive Substanzen, die einer bakteriellen Infektion vorbeugen und sie gegebenenfalls bekämpfen. Was diese Substanzen trotz der unterschiedlichen Organismen und damit außer ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise gemein haben, ist, dass sie zur Gruppe der Sekundärmetaboliten gehören. Der Begriff Sekundärmetabolit leitet sich aus einer einfachen Definition ab: Es sind Substanzen, die nicht direkt beim Wachstum, der Entwicklung oder der Fortpflanzung notwendig sind [1]. Sie besitzen häufig eine geringe Molekülmasse, wechselwirkend mit unterschiedlichen Zellbestandteilen und werden meist durch eine Transformation der Primärmetaboliten gebildet [2]. Die Sekundärmetaboliten sind jedoch für das weitere Bestehen des Organismus weitaus wichtiger, als ihr Name impliziert. Einige bioaktive Metabolite, wie die Antibiotika, sichern dem Organismus das Überleben gegenüber Konkurrenten, während andere als Botenstoffe und damit als Regulatoren für die Zellbiosynthese fungieren. Auch bei Menschen und Tieren sind solche Substanzen bekannt: So führen Stresshormone der Catecholamine, wie das Adrenalin, bei ihrer Ausschüttung zu einer schnellen Bereitstellung von Energiereserven, die situationsbedingt überlebenswichtig sein können. Gleichzeitig haben diese Hormone auch einen wachstumsfördernden Einfluss auf Mikroorganismen, wie Freestone *et al.* nachweisen konnte [3]. Damit sind diese bioaktiven Sekundärmetabolite nicht nur Organismus-spezifisch, sondern verfügen auch über spezifische Wechselwirkungen mit anderen Organismen, was sie für eine mögliche pharmazeutische Anwendung interessant macht.

In dieser Arbeit sollen zwei Arten von bioaktiven Sekundärmetaboliten vorgestellt werden, die von pharmazeutischem Interesse sind und sich für eine biotechnologische Produktion eignen. Die in Abschnitt 1 vorgestellten mikrobiellen Sekundärmetaboliten sind  $\beta$ -Lactam-Antibiotika der Gruppe der Carbapeneme und werden durch das Bakterium *Streptomyces* sp. gebildet. Aufgrund ihrer Wirkungsweise mit bakteriellen Membranproteinen sind diese Breitbandantibiotika für Menschen sehr verträglich. Das Ziel in diesem Abschnitt ist es, einen fermentativen Prozess zu etablieren, mit dem man die neuen Antibiotika produzieren kann. Dafür werden einige wichtige Prozessparameter wie Zusammensetzung des Mediums, Rührergeometrie sowie die Sauerstoffversorgung untersucht. Da bei Carbapenem ein Zerfall im wässrigen Milieu bekannt ist, soll die Stabilität der Antibiotika detaillierter untersucht werden. Zusätzlich sollen Substanzen verwendet werden, die eine Stabilisierung induzieren können.

In Abschnitt 2 wird die Bildung von pflanzlichen Sekundärmetaboliten der Klasse Triterpene – speziell die Biosynthese von Ursol- und Oleanolsäure – über eine *in-vitro* Kultivierung von Salbei- und Basilikumzellen vorgestellt. Hierfür werden unterschiedliche Reaktordesigns,

Prozessstrategien als auch triterpen-produzierende Spezies verwendet, um die Produktbildung zu maximieren. Durch eine anschließende mikrobielle Biotransformation sollen die entstandenen Triterpene modifiziert werden, um neue Derivate zu erhalten und die antibakteriellen, antiviralen und antitumoralen Aktivitäten zu verbessern. Um eine kontinuierliche Prozessführung zu ermöglichen, wird die Biotransformationskultur immobilisiert. Final wird eine Zusammenführung der Produktbildung über die Kultivierung von Pflanzenzellen und der anschließenden Biotransformation angestrebt. Dabei soll untersucht werden, ob Zellbestandteile der Pflanzen die Biotransformation inhibieren.



## 2. Produktion der Carbapeneme OA-6129

Das Ziel dieses Abschnittes ist die fermentative Produktbildung von Antibiotika der Carbapeneme OA-6129 sowie die Hydrolyse von Imipenem. Zunächst erfolgt eine Einleitung betreffend der Geschichte sowie der Unterteilung der Antibiotika. Nachdem die Zielsetzung genauer spezifiziert worden ist, werden weitere theoretische Grundlagen zu den Zielantibiotika und den produzierenden *Streptomyces* Kulturen vorgestellt. Nach der Präsentation der angewandten Materialien und Methoden werden die Ergebnisse ausführlich dargestellt und diskutiert. Die jeweiligen Untersuchungen betreffend der Produktion und der Hydrolyse werden mit einer Synopse zusammengefasst, damit der Zusammenhang der Ergebnisse vereinfacht und verdeutlicht wird. Die finale Zusammenfassung und der Ausblick sollen das Potenzial für weiterführende Untersuchungen hervorheben und folgen am Ende des Abschnitts.

### 2.1 Einleitung

Jahrtausende lang konnte bei einer Behandlung einer bakteriellen Infektion nicht sichergestellt werden, ob und wie der Patient sein Leben weiterführen konnte. Doch mit der Entdeckung der pathologischen Mikroorganismen im 19. Jahrhundert, begann man mit der Erforschung von antibiotischen (vom griechischen *anti-* „gegen“ und *bios* „Leben“) Substanzen, welche Mikroorganismen hemmen (Bakteriostatika) oder abtöten (Bakterizide). Einer dieser Forscher war der spätere Nobelpreisträger Alexander Flemming. Ob es nun Glück, ein unprofessioneller Umgang mit Organismen oder auch beides war, durch eine Kontamination einer *Staphylococcus aureus* Kulturplatte durch den Pilz *Penicillium rubrum* [4], später durch Thom als *Penicillium notatum* (*Penicillium chrysogenum*) identifiziert, [5] entdeckte Flemming vor fast 100 Jahren eines der wichtigsten Pharmazeutika der modernen Medizin. Die Substanz, die seiner Meinung zur Hemmung der *Staphylococcus aureus* und *Bacillus influenzae* führte, bezeichnete er aufgrund des Pilzes als Penicillin [4]. Doch allein durch die weiterführenden Arbeiten von den Nobelpreisträgern Howard Florey und Ernst Chain konnte der erste industrielle Prozess eines von Mikroorganismen produzierten Antibiotikums während des Zweiten Weltkrieges etabliert werden [6]. Der daraus resultierende Erfolg war so richtunggebend, dass selbst aktuell, weltweit nach neuen antibiotischen Substanzen geforscht wird, um sich weiterhin potenten Antibiotika bedienen zu können. Ab 1956 folgte das erste rein chemisch synthetisierte Antibiotikum Penicillin V durch John Sheehan [6]. Heutzutage existiert neben diesen zwei Produktionsarten der Antibiotika (biologisch und synthetisch) noch eine Zwischenform, dass halbsynthetische, bei dem ein fermentativ hergestelltes Antibiotikum chemisch modifiziert wird. Des Weiteren sind Struktur-verwandte Inhibitoren bekannt, welche zwar keine eigene antibiotische Wirkung aufweisen, jedoch die Antibiotika-abbauenden Enzyme, wie die sogenannten  $\beta$ -Lactamasen, hemmen [7]. Damit kann durch

Zugabe eines  $\beta$ -Lactamase-Inhibitors die Wirkungsweise eines Antibiotikums bei gleicher Konzentration wesentlich erhöht werden [8].

Doch die Allzweckwunderwaffe hat auch seine Kehrseite: Durch einen überhöhten, teilweise fragwürdigen Einsatz im Gesundheitswesen, in der Landwirtschaft und bei der Fischzucht, werden Gewässer, Böden, Tiere und final der Mensch mit dem Hightech-Produkt Antibiotika konstant versorgt. Dies hat zur Folge, dass pathogene Mikroorganismen schon vor einer Infizierung eines Menschen mit einem oder mehreren Wirkstoffen in Kontakt treten und somit zu früh einem Selektionsdruck unterliegen. Es entstehen multiresistente Keime, die eine weiterführende Erforschung von neuen und eine Modifizierung der bekannten Antibiotika notwendig machen. Die bisher bekannten, jedoch bislang nicht als Pharmazeutikum verwendeten OA-6129-Antibiotika werden in dieser Arbeit vorgestellt. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Antibiotika, welche Intermediate der Epithienamycin-Synthese sind. Diese Gruppe besteht aus vier verschiedenen OA-6129-Derivaten (OA-6129-A, B1, B2 und C), die durch die Biosynthese miteinander verknüpft sind. Durch Mutationen konnte diese Synthese gestört werden, sodass die Zellen anstelle des Epithienamycins diese stabileren Antibiotika bilden. Eine detailliertere Beschreibung wird in Abschnitt 2.3.4 präsentiert.

## 2.2 Zielsetzung

In diesem Kapitel soll eine erfolgreiche, fermentative Produktion der Carbapeneme der Gruppe OA-6129 etabliert werden. Dies erfolgt in Zusammenarbeit mit einem industriellen Projektpartner, der die Kulturen und industrielle Berichte dem Lehrstuhl zur Verfügung gestellt hat. Dabei ist von sekundärer Bedeutung, welches OA-6129-Derivat mit welcher Mutante zunächst erzeugt wird (siehe dazu Kapitel 2.3.3). Da die Produktivität neben einer erfolgreichen Fermentation auch von der Stabilität des Antibiotikums in wässriger Lösung abhängig ist, gliedert sich dieser Abschnitt in mehrere Teilzielsetzungen auf.

Zum einen sollen die Ergebnisse der Kultivierung des *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 aus den industriellen Berichten validiert werden. Des Weiteren werden anschließende Optimierungen der Medienzusammensetzung, der Sauerstoffversorgung und der Rührergeometrie in Zusammenarbeit mit dem Industriepartner durchgeführt, um die Produktivität zu erhöhen und um die Wirtschaftlichkeit des Prozesses zu fördern.

Carbapeneme, wie das sehr potente und verwandte Thienamycin, unterliegen einer Destabilisierung im wässrigen Milieu. Dies resultiert in der Öffnung des  $\beta$ -Lactamrings, womit das Antibiotikum seine antibakterielle Eigenschaft verliert. Daher ist ein weiteres Ziel die Bestimmung von Zerfallskinetiken der Antibiotika in der Kulturbrühe und im sterilen Medium. Resultate der Versuche könnten Aufschluss geben, ob die gebildeten Antibiotika durch Prozesspa-

parameter oder durch die Zellen und deren Enzyme degeneriert werden. Da kein Standard der OA-6129-Derivate verfügbar ist, wird das strukturähnliche Imipenem als Referenz eingesetzt, welches vom Industriepartner bereitgestellt wurde. Final soll durch Einsatz von Stabilisierungssubstanzen der Zerfall des Imipenems im Kulturmedium reduziert werden. Durch eine Analytik des Zerfallsweges soll überprüft werden, ob bei der Destabilisierung von Imipenem das Carbapenem Thienamycin produziert wird. Thienamycin gilt als eins der potentesten  $\beta$ -Lactams Antibiotika [9], kann aber aufgrund der geringen Produktivität der Mikroorganismen nicht wirtschaftlich hergestellt werden. Auch eine chemische Synthese ist bisher nicht möglich, weshalb der Zerfall des synthetisch-hergestellten Imipenems (N-Formimidoyl-thienamycin) zu Thienamycin untersucht werden soll.

Eine genaue Aufgabenstellung der jeweiligen Arbeitspakete ist wie folgt gegeben:

1. Fermentative Herstellung des Carbapenems OA-6129A mittels des Produktionsstammes *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501, insbesondere bei
  - Verwendung eines neuen Mediums
  - Variation des Sauerstoffgehaltes im Medium
  - Variation der Medienbestandteile (Variation der N- und C-Quellenkonzentration)
  - Nutzung verschiedener Rührergeometrien
2. Bestimmung der destabilisierenden Eigenschaften des Mediums und der Kultur auf das Antibiotikum – als Analogon wird das Antibiotikum Imipenem verwendet. Dabei umfassen die Teilziele die
  - Hydrolyse des Imipenems in Abhängigkeit von dessen Konzentration in wässriger Lösung
  - Untersuchung der Wechselwirkungen von Imipenem mit bestimmten Medienbestandteilen in wässrigen Lösungen bei pH 7
  - Bestimmung einer Imipenemabbaukinetik im sterilen Medium mit/ohne stabilisierende Puffersubstanzen
  - Stabilisierung des Imipenems durch Additive
3. Analytik und Zerfallswege von Imipenem, betreffend der
  - Identifizierung des „Thienamycin-Peaks“ als Produkt der Imipenem-Hydrolyse
  - Darstellung der Fragmentationswege von Imipenem durch die ESI-MS-Analytik

## 2.3 Theoretische Grundlagen

Im Folgenden werden theoretische, relevante Grundlagen zum Verständnis für eine Produktion der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika präsentiert. Zunächst erfolgen eine allgemeine Einteilung der Sekundärmetabolite nach Gaden und eine Darstellung der Gattung *Streptomyces*, die in einer spezifischeren Stammbeschreibung der Produktionsstämme endet. Nach einer kleinen Einführung über diverse  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erfolgt eine Präsentation der spezifischen Biosynthese der für die Arbeit relevanten OA-6129-Derivate.

### 2.3.1 Einteilung der Sekundärmetaboliten nach Gaden

Eine erste Differenzierung von pflanzlichen Metaboliten erfolgte 1882 von Sachs jedoch nicht als Primär- oder Sekundärmetaboliten, sondern als Rest- und Speicherprodukte [10; 11]. 1891 veröffentlichte Albrecht Kossel eine modernere Einteilung der Metaboliten: „Ich schlage vor, diesen wesentlichen Bestandteilen der Zelle als primäre zu bezeichnen, hingegen diejenigen, welche nicht in jeder entwicklungsfähigen Zelle gefunden werden als sekundäre“ [11]. Jedoch waren diese Begriffe nur auf die Bildung von pflanzlichen Metaboliten beschränkt. Bei der Bildung von diversen mikrobiellen Produkten, die in den darauffolgenden Jahrzehnten untersucht wurden und die bei Substratvariation und Limitierung auftraten, nahm man an, es handele sich einfach um Produkte aus einem alternativen Medium, beziehungsweise Stressprodukte, die aufgrund des „Leidens“ des Organismus auftreten [11]. So wurden diese neuen Produkte als weitere Primärmetaboliten identifiziert. Erst 1944 stellte Tatum fest, dass verschiedene Zellprodukte aus einer sekundären Reaktion von primären Metaboliten hervorgehen. Als Beispiel nannte er die bakterielle Transformation von p-Aminobenzoesäure zu einem „pigmentierten Produkt“, dass eine solche sekundäre Reaktion veranschaulichen würde [12]. Noch bevor 1961 die Begriffe für Primär- und Sekundärmetaboliten durch Bu'Lock in die Mikrobiologie eingeführt wurden, klassifizierte Gaden die Sekundärmetabolite in Abhängigkeit zum allgemeinen Stoffwechselweg in drei verschiedene Gruppen [11; 13; 14]. Gruppe 1 umfasst die Produkte, die direkt durch die Oxidation der Substratkohlenhydrate erzeugt werden. Als Beispiel nannte Gaden die Bildung von Ethanol und Milchsäure. Produkte, die durch weitere Reaktionen der aus der Oxidation der Kohlenhydrate resultierenden Produkte entstehen, bezeichnete Gaden als Produkte des Typs 2. Die Bildung von Zitronensäure sowie Itakonsäure seien demnach solche Produkte. Produkte der 3. Gruppe würden unabhängig vom Energiestoffwechsel gebildet. Sie bestünden zwar aus aufgenommenen Kohlenstoff- und Stickstoffatomen, welche nun Bestandteile der neuen Produktmoleküle seien, aber ließen sich nicht auf eine Ausgangssubstratverbindung zurückführen. Als Beispiel kann die Bildung des Penicillins, der Vitamine und Fettsäuren angesehen werden, welche unabhängig vom Wachstum als auch von der Substrataufnahme von den Zellen gebildet werden.

Auch heute noch ist diese Einteilung der Sekundärmetaboliten aktuell. Durch Identifikation des Typs des Sekundärmetaboliten kann die Prozessstrategie angepasst werden, um eine möglichst hohe Produktivität zu erzielen.

### 2.3.2 Zur Gattung *Streptomyces*

Die Gattung *Streptomyces* gehört zu den sogenannten Gram-positiven *Actinobacteria* [15]. Typisch für diese Gattung ist das filamentöse Wachstum, welches aufgrund verschiedener Prozessbedingungen zu ähnlichen morphologischen Differenzierungen neigt wie das Wachstum der Pilze [16]. Unterschiedliche Morphologien führen zu Varianzen bei der Bildung der Sekundärmetaboliten [17], weshalb sie immer in Bezug zu den erzielten Produktausbeuten stehen.

Beginnend mit dem Wachstum der *Conidia*, den Sporen der *Streptomyceten*, entwickeln sich diese zu fadenförmigen Strukturen (Hyphen), die sich an den Enden auch verzweigen können. Einzelne oder auch mehrere Hyphen lagern sich zu einem Geflecht zusammen und bilden dann das sogenannte *Mycelium*. Mit Eintritt der Reproduktionsphase bildet der Organismus spezifische Hyphen aus, die aus dem Medium in die Luft wachsen und in *Conidien* zerfallen [15]. Wie die filamentösen Pilze besitzen *Streptomyceten* ihre ökologische Nische in Erdböden. Ein Indikator dafür ist das während des Wachstums gebildete Geosmin, welches als erdiger Geruch wahrgenommen werden kann [18]. Da sie aber auch Pflanzen und Tiere bewachsen können, gelten sie als Pathogene [16]. 50 % der Arten der *Streptomyces* Gattung gelten als Antibiotika-Produzenten. Bekannte, kommerziell erhältliche Antibiotika sind u.a. das Kanamycin (*Streptomyces kanamyceticus*), Nystatin (*Streptomyces noursei*) und das Streptomycin (*Streptomyces griseus*) [15].

### 2.3.3 Stammbeschreibungen der verwendeten *Streptomyces* sp.

Die vom Industriepartner bereitgestellten Stämme sind Mutanten des *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501-Stammes, der 1987 von der Sanraku Incorporated (Tokio, Japan) erstmals vorgestellt wurde. Dieser Parentalstamm besitzt eine fehlerhafte Acylase A933, so dass keine Depantothelierungsreaktion in der Epithienamycinsynthese erfolgen kann. Final werden dadurch die OA-Derivate produziert. Ausgehend von dem Parentalstamm wurden Sporenlösungen durch Zugabe von *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) mutiert [19]. Aus den herbeigeführten Mutationen sind durch verschiedene Arbeiten die Stämme 4N 3607 und 4N 1181 hervorgegangen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Wie man aus der Abbildung 1 entnehmen kann, synthetisieren die Stämme verschiedene OA-Derivate.

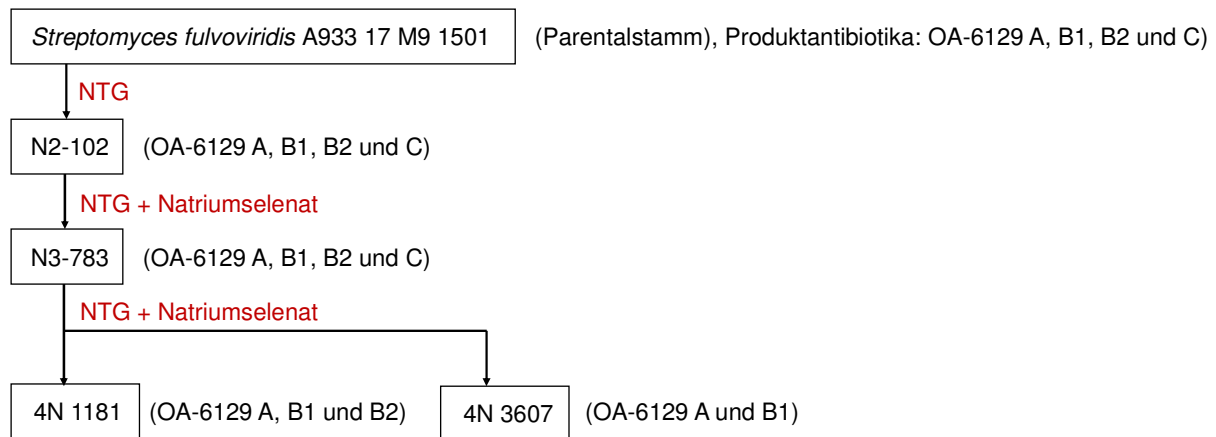


Abb. 1: Darstellung des verwendeten *Streptomyces*-Stammbaums nach Kubo *et al.*. Durch Zugabe von *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) und Natriumselenat (rot) wurden neue Stämme aus dem Parentalstamm erzeugt, die ein geringeres Produktspektrum der OA-Derivate besaßen. Die in der Arbeit verwendeten Stämme sind N3-783, 4N 1181 und 4N 3607 [19].

### 2.3.4 Beta-Lactam-Antibiotika

Das durch Alexander Flemming entdeckte Penicillin gehört zur Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Sie gelten als für den Menschen sehr verträglich, da sie ausschließlich die Zellwandsynthese von grampositiven als auch gramnegativen Bakterien hemmen [20]. Dabei wird die für die Quervernetzung notwendige Transpeptidase irreversibel gebunden [21]. Es folgt die Destabilisierung des Membrannetzwerks durch die Hydrolyse der Transpeptidase am D-Ala-D-Ala-Signalende [22]. Die Bindung ist irreversibel, sodass die Lyse der Zelle eingeleitet wird. Dabei wird auch das  $\beta$ -Lactam zerstört.

Trotz der hohen Anzahl von unterschiedlichen Strukturen, teilen sich alle  $\beta$ -Lactame den namensgebenden typischen  $\beta$ -Lactamring, der das aktive Zentrum bei der Transpeptidasenbindung irreversibel bindet. Beispiele für verschiedene  $\beta$ -Lactame sind in Abbildung 2 gegeben.

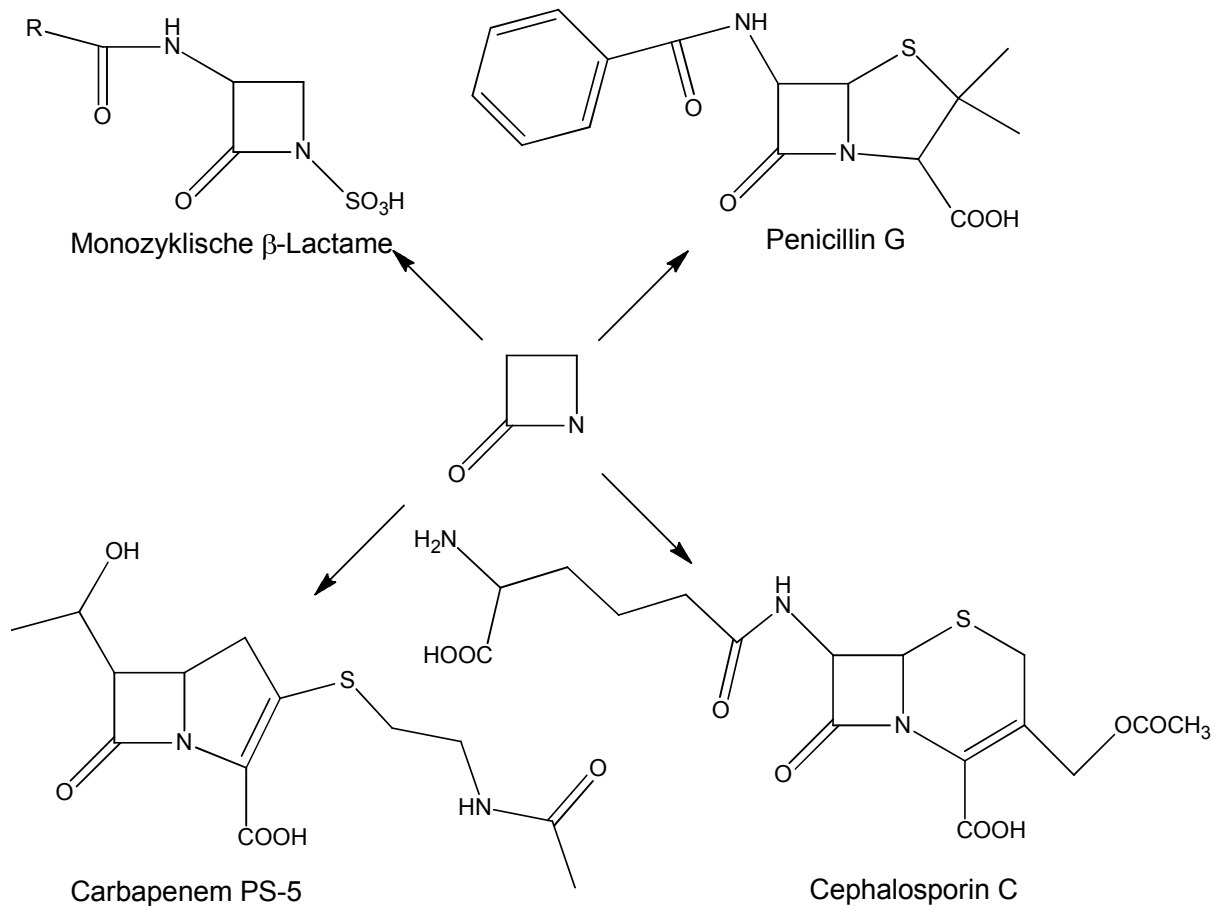


Abb. 2: Strukturdiversität der  $\beta$ -Lactame am Beispiel der monozyklische  $\beta$ -Lactamen, der bekannten Penicilline (hier Penicillin G), der Cephalosporine (hier das Cephalosporin C) und der Carbapeneme (hier PS-5)

Die in dieser Arbeit produzierten  $\beta$ -Lactame gehören zur Gruppe der Carbapeneme. Aufgrund ihres Breitbandspektrums an antibiotischer Aktivität gegen viele pathogene Mikroorganismen gelten sie derzeit auch als Hoffnungsträger einer Antibiotikatherapie gegen Cephalosporin-resistente Stämme [23]. In der Natur werden sie von vier verschiedenen Spezies synthetisiert: *Streptomyces* sp., *Erwinia* sp., *Kitasatosporia* sp. und *Serratia* sp. [24]. In den späten 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden die Carbapeneme durch zwei unabhängige Pharmakonzerne – Beecham Pharmaceuticals und Merck – entdeckt, die die ersten zwei Carbapeneme aus *Streptomyces olivaceus* und aus *Streptomyces cattleya* isolieren und nachweisen konnten: Olivansäure und Thienamycin. 1999 bezeichnete Demain das Thienamycin als das potenteste, bekannte Antibiotikum. Es ist sowohl gegen aerobe, anaerobe, grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien bioaktiv [9]. Jedoch ist die Produktion von Thienamycin durch *Streptomyces cattleya* NRRL 8057 and *Streptomyces penemifaciens* ATCC 31599 sehr schwierig, weil es durch *Streptomyces* nur in geringen Konzentrationen produziert wird und sehr instabil in wässrigen Lösungen ist [25]. Daher erfolgten in den späten siebziger Jahren verschiedene Ansätze zur Identifikation und Transformation von Thienamycinderivaten, um ein stabileres Antibiotikum zu erhalten, das die Verwendung im medizinischen Bereich erlaubt. Eins dieser Derivate ist das bekannte N-

formimidoyl-Derivat Imipenem, welches 1979 von Leanza *et al.* beschrieben wurde [26]. Im Gegensatz zum Thienamycin besitzt Imipenem ein Formamidin-Rest, sodass allein durch das Fehlen der primären Amide eine Stabilisierung erzielt werden konnte [27].

Die Gruppe der Carbapeneme der OA-6129-Derivate, welche Gegenstand der aktuellen Arbeit sind, sind auf der Grundstruktur des Epithienamycins basierende Antibiotika, die erstmals im Oktober 1982 durch Okabe *et al.* beschrieben wurden [28]. Sie besitzen keine primären Aminstrukturen, die zu einer gegenseitigen Destabilisierung von zwei Antibiotikamolekülen führen könnten, wie sie bei Thienamycin bekannt sind [29].

### 2.3.5 Biosynthese der OA-6129-Derivate

Betreffend der mikrobiellen Synthese der OA-6129-Derivate, welche Intermediate der  $\beta$ -Lactamsynthese von PS-5, Epithienamycin A und C and MM 17880 sind [30], konnte keine zutreffende Literaturstelle identifiziert werden. Aufgrund der Strukturanalogie zwischen den  $\beta$ -Lactamen PS-5 und Epithienamycin aus *Streptomyces fulvoviridis* und Thienamycin aus *Streptomyces cattleya* ist jedoch eine näherungsweise Darstellung der OA-6129-Biosynthese anhand der beschriebenen Thienamycinsynthese von Núñez *et al.* und Williamson *et al.* möglich [31; 32]. Diesbezüglich vermuteten Williamson *et al.* auch eine Transformation der OA-Derivate zu Thienamycin, konnte jedoch keine direkte Synthese nachweisen.

Zunächst ist in Abbildung 3 die Synthese bis zur Anbindung des Pantetheins grafisch zusammengefasst [25, 31]. Die daraus resultierenden OA-Derivate sind in Abbildung 4 dargestellt.

Als Ausgangssubstrat für die OA-6129-Synthese wird  $\gamma$ -Glutamylphosphat benötigt, das selbst ein Intermediat der L-Prolin-Aminosäuresynthese ist. Dieses wird durch das Enzym ThnE oder einem spezifischen Analogon mit Acetyl-Coenzym A fusioniert. Dabei wird der Pyrolidinring gebildet und Phosphat und Wasser abgespalten. Die Enzyme ThnK, ThnL und ThnP besitzen signifikante Ähnlichkeiten zu Methyltransferasen und führen dazu, dass der Kohlenstoff am C6 methyliert wird. Zwar erfolgt in der von Williamson *et al.* beschriebenen Synthese erst die Bildung der C2-Seitenkette und erst im Anschluss daran die Erweiterung der C6-Seitenkette, jedoch besitzen die OA-Derivate schon vor der Anbindung des Panteheins die Methylgruppe C9, weshalb eine weitere Methylierung am C8 durch S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) bei gleichzeitiger Reduktion zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAHC) erfolgen muss. Nachfolgend entsteht der  $\beta$ -Lactamringschluss durch die Reaktion mit der  $\beta$ -Lactamsynthetase ThnM bei gleichzeitiger Abspaltung des Coenzym A.



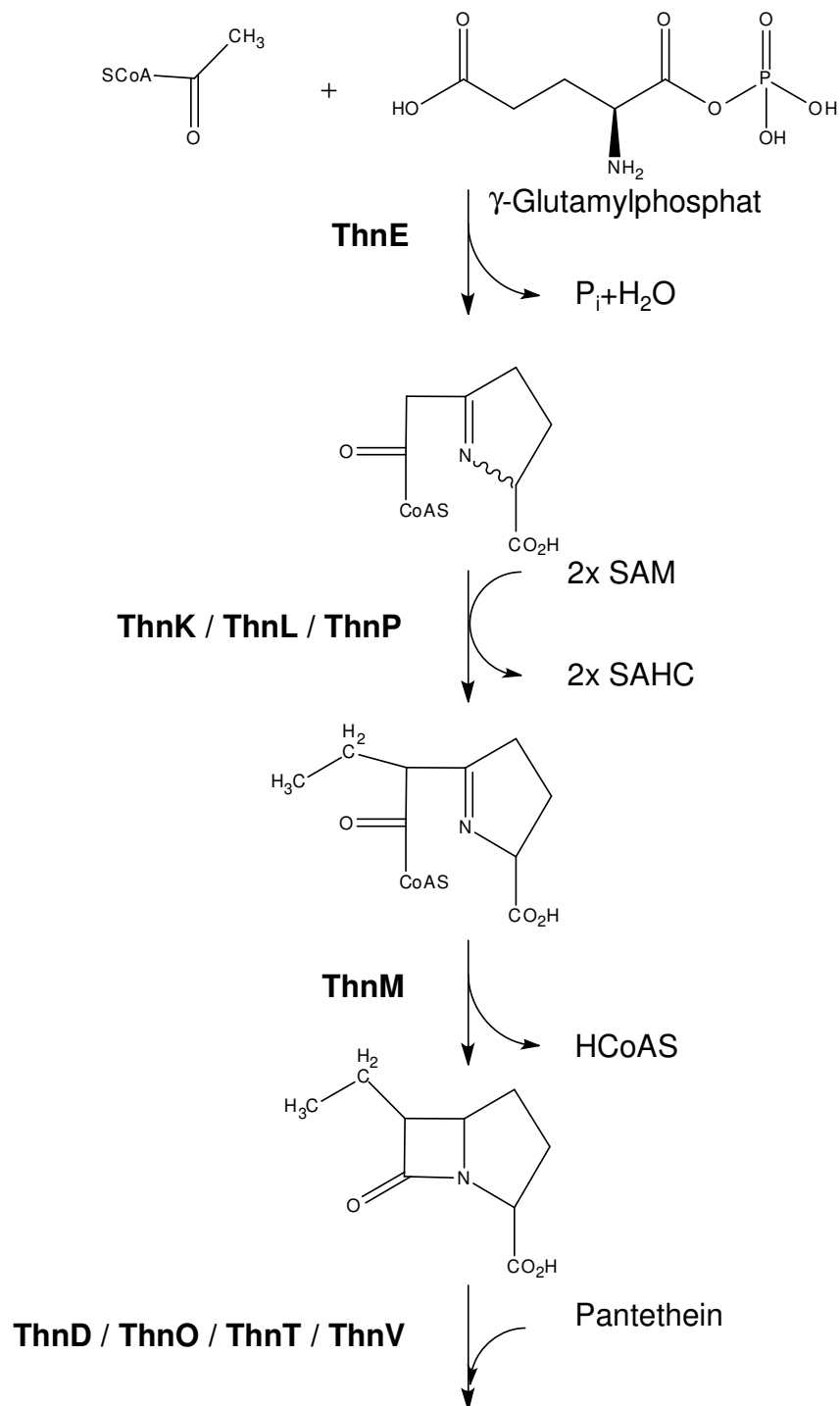


Abb. 3: Thienamycinsynthese nach Núñez und Williamson bis zur Anbindung Pantetheins: Fusionierung des Co-Enzyms A und des  $\gamma$ -Glutamylphosphat zur Pyroglutaminringbildung durch ThnE, Methylierung des C6 durch die Enzyme ThnK, ThnL und ThnP, Bildung des  $\beta$ -Lactamrings mittels ThnM, Oxidation am C2-C3 durch ThnD und ThnO und Pantetheinanbindung am C3 durch die Enzyme ThnT und ThnV [31; 32]. Verwendete Co-Substrate sind Coenzym A (CoAS) und S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), das zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAHC) reduziert wird.

Die für die Stabilisierung des  $\beta$ -Lactams notwendige Oxidation zwischen C2 und C3, die durch die Enzyme ThnD und ThnO katalysiert wird, ist für die Synthese der OA-Derivate nicht beschrieben. Es ist jedoch anzunehmen, dass dieser Syntheseschritt vor Anbindung

des Pantetheins erfolgt, da die produzierten OA-Derivate die notwendige Doppelbindung besitzen. Bei Núñez *et al.* wird beschrieben, wie bei der Thienamycinsynthese bei *Streptomyces cattleya* am C2 eine Cysteaminanbindung durch die Enzyme ThnT und ThnV erfolgt. Bei *Streptomyces fulvoviridis* wird das Cysteamin durch ein  $\beta$ -Alanin- und Pantoinsäurerest erweitert, bevor das Pantethein am C2 gebunden wird [33]. Ob zu ThnT und ThnV homologe Enzyme existieren, die die Anbindung des Pantetheins katalysieren, ist in der Literatur nicht beschrieben. Das durch die Pantetheinanbindung resultierende Konstrukt ist das Antibiotikum OA-6129A (Abbildung 4). Nachfolgend wird das Derivat weiter transformiert: Das C8 wird hydroxyliert (OA-6129B1), anschließend wird die Konformation am Kohlenstoff C6 verändert (OA-6129B2) und schließlich das C8 sulfatiert (OA-6129C) [34]. Dabei wird das C6 wieder in die Ausgangskonformation verschoben. Schließlich wird das Pantethein durch die Acylase A933 hinter dem ersten Stickstoff und der darauffolgenden Acetylgruppe der Seitenkette gespalten. Es folgen darauf weitere Syntheseschritte, die in dieser Arbeit nicht von Interesse sind.

Wird die Funktion der Acylase durch Zugabe von Kobaltionen und *p*-Chloromercuribenzoat inhibiert, wird die Depantothelierungsreaktion gehemmt [35]. Im Jahre 1984 gelang es Fukagawa *et al.* eine Mutante von *Streptomyces fulvoviridis* mittels N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) zu erzeugen, bei der die Acylase A933 verändert wurde [30]. Die depantothelierende Aktivität, die das Enzym besitzt, wurde soweit gestört, dass anstelle der PS-5, Epithienamycin A und C oder des MM17880 die Intermediate der OA-6129-Gruppe konzentriert nachgewiesen werden konnten [19]. Damit ist die Abspaltung des Pantothers eine entscheidende Reaktion bei der Thienamycinsynthese und führt bei einer Störung zur Produktbildung der OA-6129-Derivate. Die Strukturen der OA-6129-Derivate sind in Abbildung 4 dargestellt.

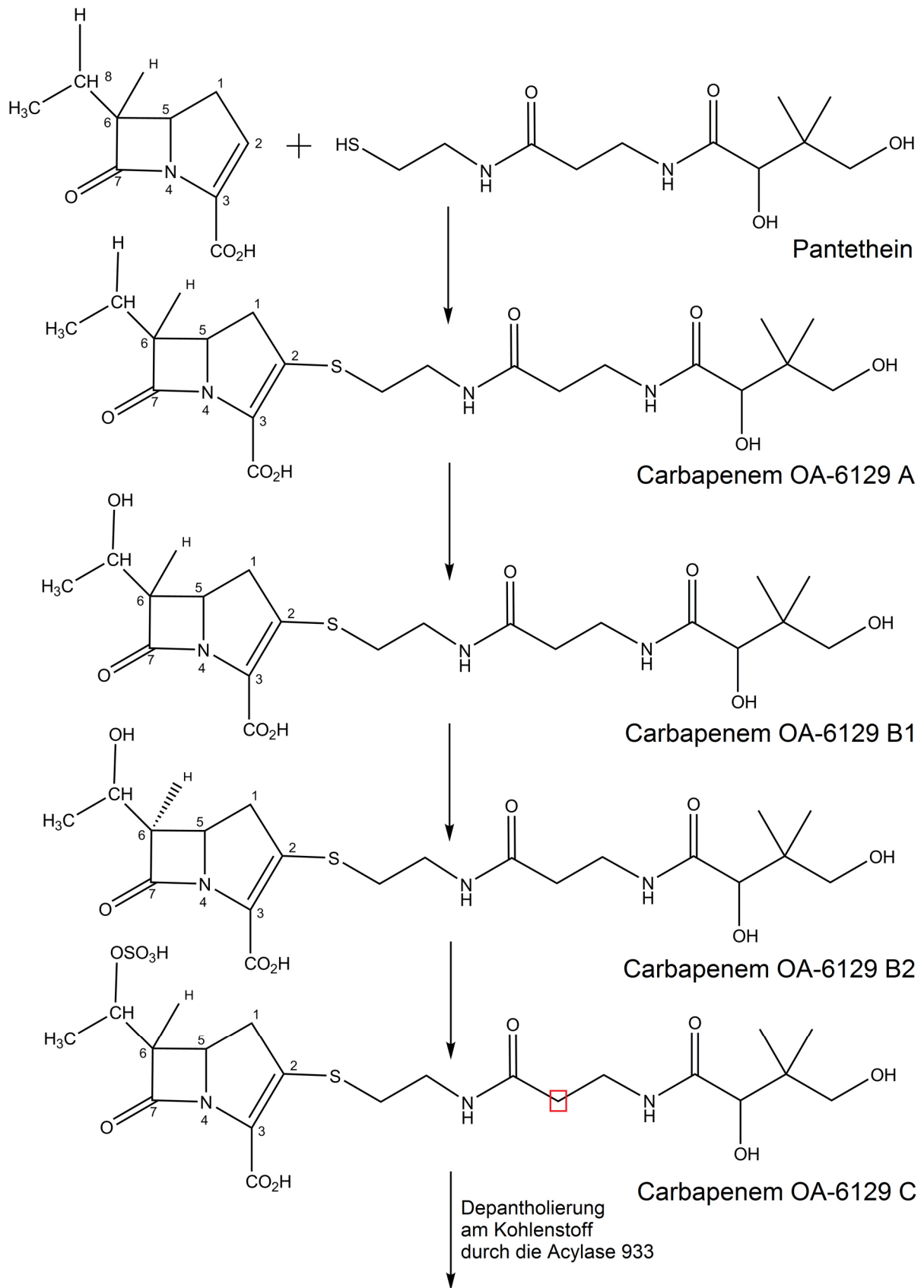


Abb. 4: Thienamycinsynthese der OA-Derivate (A, B1, B2, C) im Anschluss an die Anbindung des Pantetheins [30]. Die Abspaltung des Panthoteins durch die Acylase A933 erfolgt am rot markierten Kohlenstoff.

Außer *Streptomyces* sp. bilden auch weitere Organismen, wie *Erwinia* sp. oder *Serratia* sp., Carbapeneme [24]. Die dazugehörige Synthese verläuft ähnlich, sodass zwischen vielen entscheidenden Enzymen, die aus der allgemeineren Carbapenemsynthese und der spezifischeren Thienamycinsynthese bekannt sind, Homologie besteht [36–41]. Der Hauptunterschied, der auch für die OA-Synthese entscheidend ist, ist die fehlende Pantetheinanbindung bei allen Nicht-*Streptomyceten* [32].

Durch weiterführende Arbeiten durch die Arbeitsgruppen um Okabe, Fukagawa und Ishikura in den Jahren 1982 bis 1988 wurden die OA-Derivate genauer untersucht und Patente zur Produktion, Aufarbeitung und Analytik veröffentlicht [42–48]. Unter anderem werden für die OA-Derivate die UV-Maxima bei 300 nm und im Infrarotspektrum typische  $\beta$ -Lactam-Banden bei 1750-1760 ( $\beta$ -Lactam-carbonyl), 1660 (Amid-carbonyl) und  $1600\text{ cm}^{-1}$  (Carboxylate-anion) beschrieben.

Zudem machten Okabe *et al.* erste Stabilitätstests des OA-6129A-Derivates bei 28 °C in 0,05 M Phosphatpuffer. Die höchste Halbwertszeit lag hier bei pH 8 bei 130 h und war damit um den Faktor 2 besser als das des sehr aktiven Carbapenems und sich nur durch die C3-Seitenkette unterscheidende PS-5 [28]. Die Arbeitsgruppe geht aufgrund der Strukturähnlichkeit der Restgruppen davon aus, dass jedes Derivat ähnliche Halbwertszeiten besitzt. Die antibiotische Aktivität gegen grampositive als auch gramnegative wurde durch die Seitenkette negativ beeinflusst. Das Derivat OA-6129B1 besitzt aufgrund seiner Konformationsänderung am C6 als einziges OA-Derivat ähnliche gute antibakterielle Eigenschaften wie das PS-5 [49]. Durch eine Phosphorylierung der C2-Seitenkette kann die Aktivität gegen einige grampositive Mikroorganismen reduziert und gleichzeitig die Aktivität gegen gramnegative Mikroorganismen gesteigert werden [50; 48].

Um die einzelnen Derivate untersuchen zu können, wurden in der Studie von Okabe *et al.* erfolgreich erste Isolierungen und Aufkonzentrierungen mittels der Chromatophiesäulen Diaion HP 20 (Mitsubishi Chemical, Tokio, Japan), Diaion PA 306S (Mitsubishi Chemical, Tokio, Japan), Bio-Gel P-2 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), QAE-Sephadex A-25 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland), und Diaion HP 20AG (Mitsubishi Chemical, Tokio, Japan) durchgeführt. Die Produktausbeuten der Kultivierungen lagen hier bei OA-6129A bei  $0,21\text{ mg L}^{-1}$ , für OA-6129B1 bei  $0,08\text{ mg L}^{-1}$  und für OA-6129B2 bei  $0,23\text{ mg L}^{-1}$  [28].

Des Weiteren konnten 1983 die Derivate OA-6129 D und E nachgewiesen werden. Diese unterscheiden sich im Vergleich zu den anderen OA-6129-Derivaten durch eine Hydroxylgruppe am C8, der fehlenden Doppelbindung zwischen C2 und C3, sowie eines Wasserstoffs bzw. einer Methylgruppe als Restgruppe am C8 [47]. Im Vergleich zu den anderen OA-Derivaten besitzen die Nitrobenzylester von OA-6129 D und E nur eine sehr schwache Wirksamkeit gegen *Comamonas terrigena*.

## 2.4 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden werden in diesem Kapitel kurz zusammengefasst. Etablierte Methoden, wie die gravimetrische Bestimmung der Trockenmasse bzw. des Sedimentvolumens und die Glycerinbestimmung mittels Enzymassay 10 148 270 035 der Firma R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland), die nicht spezifisch an die Produktion der OA-6129 Derivate angepasst wurden, befinden sich im Anhang, Kapitel D.

### 2.4.1 Antibiotikabestimmung mittels Agar-Diffusionstest

Eine aus der Literatur klassische Bestimmung von Antibiotika ist der Hemmhofnachweis oder auch Agar-Diffusionstest. Dafür wird eine betreffend des Antibiotikums relevante Bakterienkultur im Flüssigmedium kultiviert und auf einem geeigneten Nährboden übertragen. Bevor diese Platten inkubiert werden, werden auf diese Filterblättchen mit getränkter Antibiotikallösung aufgelegt. Aus dem Filterpapier diffundiert das Antibiotikum in den Agar und verhindert das Wachstum der Zellen. Dieser Test eignet sich ebenfalls zur quantitativen Analytik von Fermenterproben gegen einen bekannten Kulturstamm. Die Größe des Hemmhofes ist bei gleichem Volumen auf dem Testblättchen von der Empfindlichkeit des Keimes, von der Konzentration des Antibiotikums in der Probelösung und von den Diffusionseigenschaften des Antibiotikums abhängig.

Okabe et al zeigten, dass *Bacillus subtilis* sehr sensitiv auf eine vorliegende Konzentration an OA-Derivate reagierte, weshalb in dieser Arbeit als Gegenkultur *Bacillus subtilis* verwendet wurde [45]. Die *B. subtilis* Kultur wurde bei 37 °C bei 110 upm im Inkubator für 4 h kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 1 erreicht wurde. Dies ermöglichte eine nahezu konstante Zelldichte bei allen durchgeführten Versuchen. Anschließend wurden 100 µL der *Bacillus subtilis* Kultur auf LB-Kulturplatten übertragen. Ein 0,5 cm großes Filterpapier, das aus 597½ Faltenfilter (10 311 844, 4-7 µm) der Firma Whatman (Maidstone, UK) gestanzt wurde, wurde mit 10 µL Kulturüberstand aus den *Streptomyces*-Fermentationen befeuchtet und auf die beimpften LB-Platten gelegt. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Ausmessung der Hemmhöfe erfolgte mittels Schieblehre. Aufgrund des unterschiedlichen Anwachsens der Gegenkultur wurde bei jeder Hemmhofanalytik eine Standardreihe an Imipenemkonzentrationen analysiert. Eine Kalibriergerade, die die Reproduzierbarkeit und die quantitative Aussage des Hemmhoftests darstellt, ist in Abbildung 5 zu sehen. Der Fehler dieser Methode resultierte aus der Bestimmung der nicht vollkommen runden Hemmhöfe.

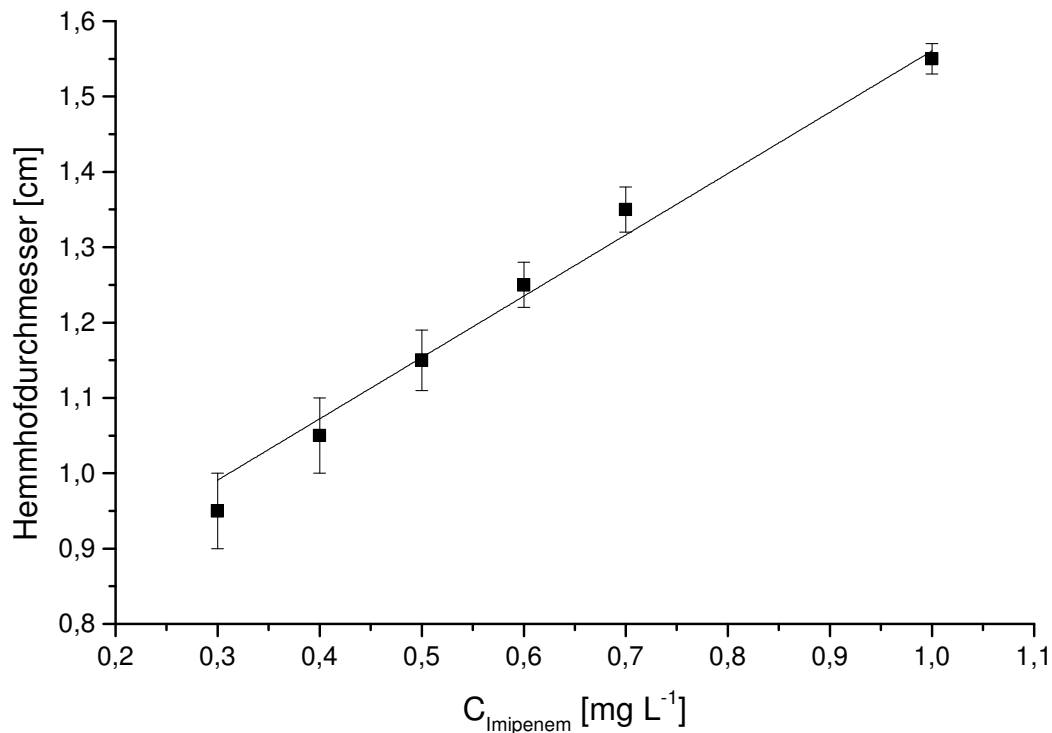


Abb. 5: Hemmhof-Kalibriergerade von Imipenem gegen *Bacillus subtilis* nach einer Kultivierung von 24 h bei 37 °C ( $R^2 = 0,99$ ).

#### 2.4.2 Antibiotikabestimmung mittels HPLC

Die Bestimmung von Imipenem und dessen Abbauprodukten erfolgte über eine Reversed Phase HPLC-Methode (Alliance 2695 mit Säulenofen, PDA Detektor 2998 und Probenraumthermostatisierung, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland). Hierzu wurde eine ReproSil 100 C18, 5  $\mu\text{m}$  Säule (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Deutschland) mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Länge von 250 mm (mit 5 x 4 mm Vorsäule – ReproSil 100 C 18, 5  $\mu\text{m}$ , Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Deutschland) bei einer Säulenofentemperatur von 30 °C verwendet, die Probentemperatur im Autosampler betrug 4 °C. Das Laufmittel wurde analog zu Decristoforo *et al.* hergestellt und bestand aus einem Formiatpuffer (0,25 M Ameisensäure mit 25 % Ammoniaklösung auf pH 8,5 eingestellt; Eluent A) und Methanol (Eluent B) [51].

Folgendes Gradientenprogramm wurde verwendet: 0 % B auf 35 % B in 10 min, 35 % B isokratisch (10 min), 35 % B auf 0 % B in 5 min, 0 % B isokratisch (5 min) bei einem Fluss von 0,5 ml  $\text{min}^{-1}$ . Die Gesamtlaufzeit einer Analyse war 30 Minuten. Das Injektionsvolumen für alle Proben betrug 20  $\mu\text{L}$ . Die Detektion der Komponenten erfolgte bei 300 nm [28]. Zusätzlich wurden UV/Vis Spektren mittels Diodenarraydetektor in dem Bereich von 200 – 700 nm aufgenommen, um auch Hydrolyseprodukte betreffend ihrer Absorption zu detektieren.

### 2.4.3 HPLC-MS Analytik

Die HPLC-MS Analysen erfolgten mit einem Micromass QuattroLC TripleQuad Massenspektrometer (Waters Corporation, Milford Massachusetts, USA) mit Electrospray Ionisation und positiver Ionisierung bei einem Scan von 100 bis 1000 amu (Nebulizer 88l/h, Desolvation Gas 921 L h<sup>-1</sup>, Desolvation Temperatur 250 °C, Capillary 3 kV, Cone 36 V, Extractor 3 V), angeschlossen an dem Waters HPLC-System (Alliance 2695 mit Säulenthermostat, PDA Detektor 2998 und Probenraumthermostatisierung (Waters Corporation, Milford Massachusetts, USA)). Hierzu wurde eine Eurospher II 100-5 C18 Aqua Säule mit integrierter Vorsäule (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland) mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Länge von 250 mm bei einer Säulenofentemperatur von 25 °C verwendet, die Probenraumtemperatur betrug 4 °C. Als Laufmittel dienten ein Formiatpuffer (0,25 M Ameisensäure mit 25 % Ammoniaklösung, pH 8,0) und Acetonitril im Verhältnis (v/v) 99:1 bei einem Fluss von 1 mL min<sup>-1</sup> (isokratisch) mit Splitter. Zusätzlich wurden UV/Vis Spektren in dem Bereich von 200 – 500 nm aufgenommen.

### 2.4.4 Spezifikationen der eingesetzten Rührkesselreaktor-Kaskade R-ALF, Bioengineering

Die Kultivierungen im Reaktormaßstab erfolgten in 2 L bzw. 6,7 L-Bioreaktoren des RALF-Plus Quartetts des Unternehmens Bioengineering (Wald, Schweiz). Über das dazugehörige Prozessleitsystem lassen sich alle Prozessparameter *online* regeln und steuern. Die Reaktoren wurden zunächst mittels Scheibenrührer bestückt und besaßen jeweils vier Strombrecher. In jedem Reaktor waren pH, pO<sub>2</sub> und Temperatursonden zur Prozessüberwachung integriert. Die Temperierung der Reaktoren erfolgte über einen Doppelmantel. Die Abgasanalytik wurde durch das modulare System BCpreFerm von BlueSens (Herten, Deutschland) betrieben. Mittels des Prozessleitsystems ließ sich eine Ansteuerung von mehreren Prozessparametern über die Vorgabe eines Sollwertes realisieren, sodass die Rührergeschwindigkeit durch die *in situ* –vorliegende Gelöstsauerstoffkonzentration gesteuert wurde.

Eine graphische Darstellung der Bioreaktoren ist in Abbildung 6 zu sehen.

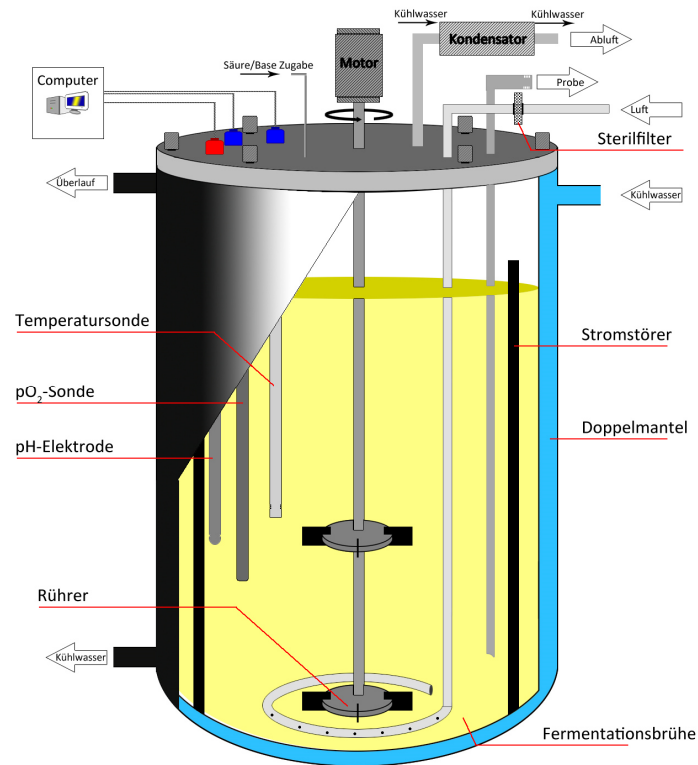


Abb. 6: Aufbau der verwendeten Bioengineering-Bioreaktoren (Rührkesselkaskade R-ALF, bestehend aus 2x 2 L und 2x 6,7 L-Rührkesseln der Firma Bioengineering (Wald, Schweiz).

Die für den Prozess notwendigen Kenndaten der eingesetzten Bioreaktoren und den Rührern sind in der folgenden Tabelle 1 aufgelistet.

Tab. 1: Reaktormaße des RALF-Plus Systems

	Reaktor 1+2	Reaktor 3+4
Totalvolumen [L]	2	6,7
Arbeitsvolumen		
max. [L]	1,30	4,50
min. [L]	0,65	2,25
Reaktordurchmesser [mm]	100	150
Höhe [mm]	300	400
Scheibenrührer	2	2
Höhe [mm]	8	12
Durchmesser [mm]	40	60
Intermig		2
Höhe [mm]		24
Durchmesser [mm]		80



Um den Scherstress von Mikroorganismen und Pflanzenzellen zu reduzieren, wurden im späteren Verlauf Internig-Rührer verwendet, die von Bioengineering speziell für die Anwendungen angefertigt wurden. Die verwendeten Rührertypen werden in der Abbildung 7 präsentiert:

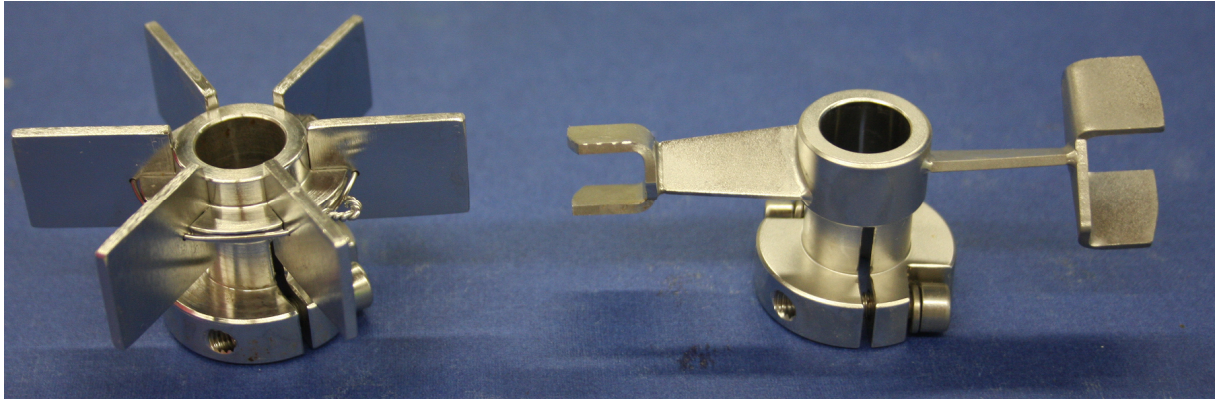


Abb. 7: Rührer, die in den 6,7 L-Bioreaktoren der Firma Bioengineering (Wald, Schweiz) eingesetzt wurden. Links: 6-Blatt-Scheibenrührer ( $D_R = 60$  mm); Rechts: Internigrührer ( $D_R = 80$  mm). Pro Reaktor wurden jeweils zwei Rührer verwendet.

Durch die Variation der Rührergeometrie und des Rührer-Reaktordurchmesser-Verhältnisses wurde auch die Sauerstofftransportrate beeinflusst. Die Veränderung konnte durch die Bestimmung des volumetrischen Sauerstoffkoeffizienten ( $k_{La}$ ) dargestellt werden. In der folgenden Abbildung 8 werden die volumetrischen Stofftransportkoeffizienten für die Rührergeschwindigkeiten von 200 bis 900 upm für die Rührergeometrien Scheibenrührer und Internigrührer präsentiert, die über die im Anhang, Kapitel D.3 verwendeten Methoden bestimmt wurden.

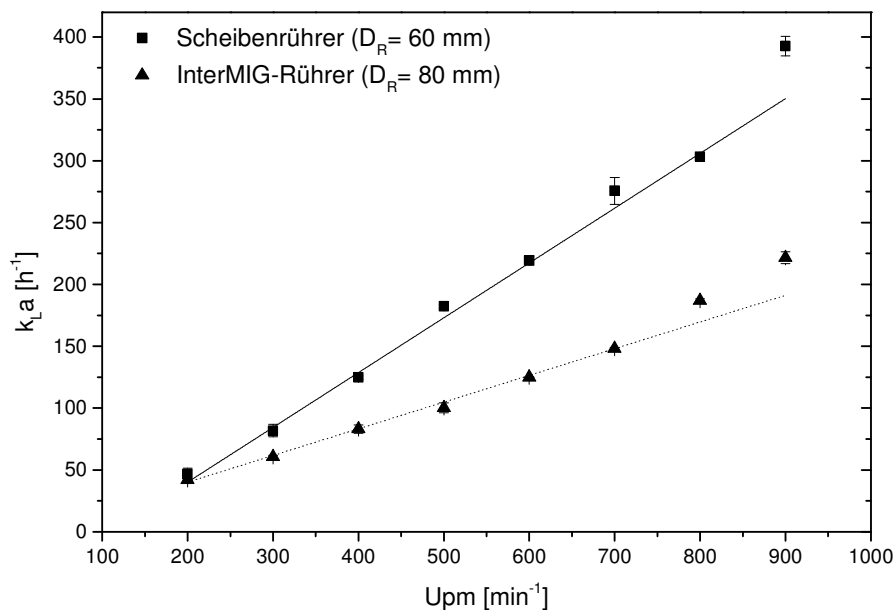


Abb. 8: Bestimmung der  $k_{La}$ -Werte zu den Umdrehungsgeschwindigkeiten der Rührergeometrien: Scheibenrührer ( $D_R = 60$  mm) und Internigrührer ( $D_R = 80$  mm) mittels Ausgasen des Wassers mit Stickstoff bei 28 °C und anschließender Belüftung mit Raumluft.

Bei Rührgeschwindigkeiten ab 900 upm wurde eine Trombenbildung deutlich, welche die Bestimmung des Rührergeometrie-abhängigen, volumetrischen Sauerstoffkoeffizienten signifikant beeinträchtigte. Aus diesem Grund wurde kein Sauerstoffkoeffizient für die höheren Rührerdrehzahlen bestimmt.

Ein weiterer interessanter Prozessparameter ist der spezifische Leistungseintrag ( $P/V$ ) eines Bioreaktors. Er gibt an, wie viel Leistung durch den Rührer bzw. Rührung in einen Reaktor bezogen auf das Fermentationsvolumen eingebracht wurde. Die Leistungsdichte eines Rührkesselreaktors kann über die folgende Gleichung charakterisiert werden:

$$\frac{P}{V} = \frac{Ne \cdot \rho \cdot n^3 \cdot D_R^5}{V} \quad (1)$$

$Ne$  ist dabei die Newtonzahl [-],  $\rho$  die Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ], die  $n$  Rührerdrehzahl [ $\text{s}^{-1}$ ], der  $D_R$  Rührerdurchmesser [m] und  $V$  das Arbeitsvolumen [L].

Die für die Ermittlung des Leistungseintrages notwendige Newtonzahl kann über die Bestimmung der Reynoldszahl ( $Re$ ) hergeleitet werden. Die Berechnung ist im Anhang D, Kapitel D.5 dargestellt. In dem vorliegenden Beispiel wird für die Scheibenrührer eine Newtonzahl von 6 verwendet, auch wenn der Einfluss des begasteten Systems mathematisch nicht mit einbezogen wurde.

Die Bestimmung der Newtonzahl für das Intermig-Rührsystem erfolgte analog. Als Newtonzahl wurde für die Intermigrührer 0,9 angenommen. Im Gegensatz zur radialen Durchmischung mittels der Scheibenrührer erfuhr das Medium eine axiale Durchmischung bei der Verwendung des Intermig-Rührsystems. Die Ausrichtung der Intermig-Rührelemente beeinflusste das Strömungsprofil [52], weshalb die beiden Intermig-Rührelemente um 90 zueinander angebracht wurden. Mittels Formel (1) ließen sich folgende Leistungseinträge für die beiden Rührergeometrien bei unterschiedlichen Rührergeschwindigkeiten bestimmen:

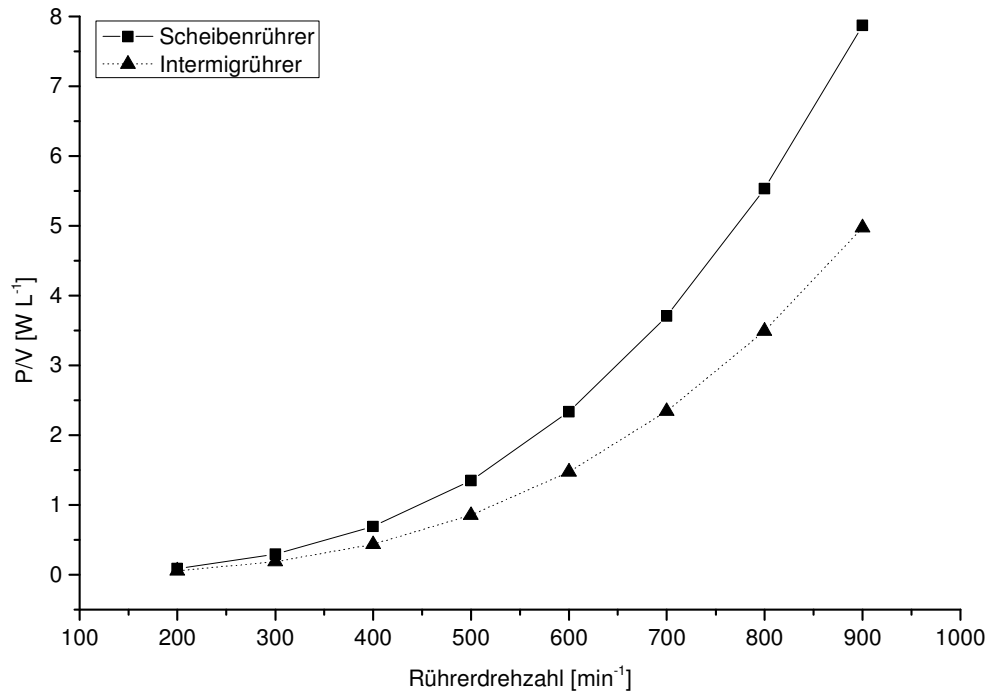


Abb. 9: Grafische Darstellung des Leistungseintrages der verwendeten Rührergeometrien: Scheibenrührer ( $D_R = 60$  mm) und Intermig-Rührer ( $D_R = 80$  mm).

Trotz des größeren Durchmessers der Intermig-Rührer ( $D_R = 80$  mm) konnte keine äquivalente Leistungsdichte bei gleicher Rührergeschwindigkeit im Vergleich zu den Scheibenrührern ( $D_R = 60$  mm) erreicht werden. Eine mathematisch gleiche Leistungsdichte wäre mit Intermig-Rührern mit einem Durchmesser von 88 mm möglich gewesen, jedoch konnten diese nicht im Bioreaktor eingesetzt werden.

#### 2.4.5 Kultivierungsbedingungen und Prozessparameter

Alle Kultivierungen erfolgten als zweistufiger Prozess. Für die Vorstufe (VST) wurden 750 mL (im 2 L-Bioreaktor) oder 50 mL (im 500 mL-Schüttelkolben) Vorstufen-Komplexmedium (Anhang B, Tab. B.2.1 und B.2.2) mit einer Konzentration von  $2 \text{ mL L}^{-1}$  einer vom Projektpartner bereitgestellten Sporensuspension beimpft und 44-48 h bei  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  und 200 upm inkubiert. Als Hauptkohlenstoffquelle diente Glucose, welche getrennt vom Medium bei  $123 \text{ }^\circ\text{C}$  autoklaviert wurde. Die Rührergeschwindigkeit von 200 upm bei der Kultivierung der Vorkultur als Minimalgeschwindigkeit war notwendig, da sich nach dem Sterilisationsprozess im Autoklav Medienbestandteile absetzten. Erfolgte im Anschluss bis zum Inokulieren keine aktive Rührung, gelatinieren die Medienbestandteile. Diese ließen sich nicht mehr unter Kultivierungsbedingungen rüchlösen. Es konnte durch weitergehende Versuche nachgewiesen werden, dass es sich dabei um die Kartoffelstärke handelt, die bei der Hitzesterilisation gelatinisiert (siehe Abbildung 10).



Abb. 10: Das aus der verwendeten Kartoffelstärke gelantierte Vorstufenmedium.

Die Hauptstufenfermentation (HST) erfolgte im 2 L-Bioreaktor bzw. aufgrund mangelnder Anschlussmöglichkeiten im Deckel des 2 L-Reaktors im 6,7 L-Bioreaktor (Bioengineering, Wald, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von anfangs 1 L, bzw. 4 L.

Nachdem der Reaktor mit dem Hauptstufenmedium (Anhang, Tab. B.2.3 und B.2.4) befüllt und autoklaviert wurde, wurde er im direkten Anschluss an den Sterilisationsprozess gerührt und mit Luft begast. Dies verhinderte, dass ungelöste Medienbestandteile das Begasungsrohr blockierten. Kurz vor der Inokulation mit 3 % (v/v) der Vorkultur wurde das Medium noch zusätzlich mit einer Spurenlösung und Vitamin B12 versetzt (Anhang B, Tab. B.2.5). Als Hauptkohlenstoffquelle wurde in dieser Stufe Glycerin verwendet. Die Inkubationsparameter sind 28 °C und eine Anfangsrührergeschwindigkeit von 250 upm. Die Hauptstufenkultivierung erfolgte, soweit nicht anders dargestellt, über einen Zeitraum von vier Tagen. Um eine ausreichende Sauerstoffkonzentration im Medium zu gewährleisten, wurde die Rührergeschwindigkeit an die Gelöstsauerstoffkonzentration angepasst, damit sowohl ein  $pO_2$ -Sollwert von 40 % eingehalten und gleichzeitig der Scherstress minimal gehalten werden konnte.

Die Analytik der Kultivierungen erfolgte sowohl im Bioreaktor als auch im Schüttelkolben gemäß Hemhottest, RP-HPLC, Glycerin-Assay sowie durch gravimetrische Bestimmung der Biomasse. Des Weiteren wurde jeder Versuch durch mikroskopische Analyse des Mediums überwacht, um Kontaminationen und Veränderungen im Wachstum zu identifizieren. Die pH,  $pO_2$  und die Abgasanalytik wurden im Bioreaktor online überwacht, während die pH-Messung des Kulturmediums im Schüttelkolben offline erfolgte.

#### 2.4.6 Berechnung von Ertragskoeffizienten

Unterliegen die Mikroorganismen dem Primärstoffwechsel, kann der sogenannte Substratausbeutekoeffizient ( $Y_{X/S}$ ) ermittelt werden, der sich aus dem Quotienten der gebildeten Biomasse ( $\Delta X$ ) und der verbrauchten Substratmenge ( $\Delta S$ ) berechnen ließ. Üblicherweise

wird die C-Quelle als Substratmenge zur Berechnung herangezogen, welche im vorliegenden Prozess auf die Glycerinkonzentration bezogen wurde.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (2)$$

Da der im Medium vorliegende Sauerstoff auch als Substratquelle angesehen werden kann, lässt sich mittels der Sauerstoffaufnahme- und Sauerstoffausbeutekoeffizient ( $Y_{X/O}$ ) bestimmen.

$$Y_{X/O} = \frac{\Delta X}{V_{R,L} \cdot \sum OUR(t) \cdot \Delta t} \quad (3)$$

Für die Bestimmung des  $\sum OUR(t) \cdot \Delta t$  wird der OUR mittels Abluftanalytik bestimmt und der Graph integriert.  $V_{R,L}$  ist das verwendete Reaktorvolumen. Sollte bei der Bestimmung des OUR das verwendete Reaktorvolumen nicht berücksichtigt sein, wird es bei der Auswertung des Sauerstoffausbeutekoeffizienten einbezogen.

Ist das Ziel nicht die Biomassenbildung, sondern ein spezifisches Produkt, kann die Berechnung auch auf die Produktmenge

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (4)$$

$$Y_{P/O} = \frac{\Delta P}{V_{R,L} \cdot \sum OUR(t) \cdot \Delta t} \quad (5)$$

bezogen werden.

#### 2.4.7 Bestimmung der Sauerstoffaufnahme- und Sauerstoffausbeutekoeffizient durch die Abluftanalytik

Im Laufe der Fermentationszeit nehmen aerobe Mikroorganismen Sauerstoff auf und geben Kohlenstoffdioxid ans Medium ab. Ist eine Online-Messung der Abluftanalytik möglich, wird dies durch das Steigen der volumetrischen Kohlenstoffdioxidkonzentration bzw. durch das Fallen der volumetrischen Sauerstoffkonzentration in der Abluft erkennbar. Da es im Fermenter jedoch keine stationären Zustände gibt, werden Bilanzierungen differenziell auf kleine Zeitbereiche ausgerichtet und somit als quasi-stationär angenommen. Bei der Korrelation der Sauerstoffaufnahme- und Sauerstoffausbeutekoeffizient über die quasi-stationäre Inertgasbilanzierung sind zusätzlich zur differenziellen Betrachtung auch andere Annahmen wichtig:

- Die Luft besteht nur aus drei Komponenten:  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$  (1. Annahme)
- Das Gasgemisch zeigt ideales Gasverhalten. (2. Annahme)
- Der Zuluftvolumenstrom  $\dot{V}_G$  ist konstant und bekannt. (3. Annahme)
- $N_2$  passiert den Fermenter als inerter Bestandteil: (4. Annahme)

$$\dot{V}_G^\omega \gamma_{N_2}^\omega = \dot{V}_G^\alpha \gamma_{N_2}^\alpha \quad (6)$$

Mit  $\dot{V}_G^\alpha$  = eingehender Gasvolumenstrom [ $L \cdot \text{min}^{-1}$ ]

$\dot{V}_G^\omega$  = austretender Gasvolumenstrom [ $L \cdot \text{min}^{-1}$ ]

$\gamma_{N_2}^\alpha$  = eingehende Konzentration an  $N_2$  [%]

$\gamma_{N_2}^\omega$  = austretende Konzentration an  $N_2$  [%]

$\gamma_{CO_2}^\alpha$  = eingehende Konzentration an  $CO_2$  [%]

$\gamma_{CO_2}^\omega$  = austretende Konzentration an  $CO_2$  [%]

$\gamma_{O_2}^\alpha$  = eingehende Konzentration an  $O_2$  [%]

$\gamma_{O_2}^\omega$  = austretende Konzentration an  $O_2$  [%]

Da wegen der 1. Annahme alle drei Gase Bestandteile der Luft sind, gilt

$$1 = \gamma_{N_2}^\alpha + \gamma_{O_2}^\alpha + \gamma_{CO_2}^\alpha \quad \text{für die eingehende Luft} \quad (7)$$

und  $1 = \gamma_{N_2}^\omega + \gamma_{O_2}^\omega + \gamma_{CO_2}^\omega$  für die austretende Luft (8)

Stellt man diese Formeln nach  $\gamma_{N_2}^\alpha$  und  $\gamma_{N_2}^\omega$  um und setzt diese in (6) ein, so erhält man:

$$\dot{V}_G^\omega = \dot{V}_G^\alpha \left( \frac{1 - \gamma_{O_2}^\alpha - \gamma_{CO_2}^\alpha}{1 - \gamma_{O_2}^\omega - \gamma_{CO_2}^\omega} \right) \quad (9)$$

Im Zusammenhang zur Berechnung der volumenbezogenen Sauerstoffaufnahme über die ein- und austretenden Gasvolumenströme

$$Q_{O_2} V_F = \dot{V}_G^\alpha (c_{O_2}^\alpha)_G - \dot{V}_G^\omega (c_{O_2}^\omega)_G \quad (10)$$

ergibt sich bei der Anwendung des idealen Gasgesetzes  $(c_{O_2})_G = \frac{\gamma_{O_2} \cdot p_{ges}}{RT}$  (11)

$$Q_{O_2} V_F = \dot{V}_G^\alpha \left( \frac{\gamma_{O_2}^\alpha \cdot p_{ges}}{RT} \right) - \dot{V}_G^\omega \left( \frac{\gamma_{O_2}^\omega \cdot p_{ges}}{RT} \right) \quad (12)$$

Wird  $\dot{V}_G^\omega$  ersetzt, lässt sich  $Q_{O_2} V_F = \frac{\dot{V}_G^\alpha \cdot p_{ges}}{RT} \cdot \left( \gamma_{O_2}^\alpha - \frac{1 - \gamma_{O_2}^\alpha - \gamma_{CO_2}^\alpha}{1 - \gamma_{O_2}^\omega - \gamma_{CO_2}^\omega} \cdot \gamma_{O_2}^\omega \right)$  (13)

Schreiben. Das molare Volumen  $V_M$  eines idealen Gases beträgt circa  $22,41 L \cdot \text{mol}^{-1}$  und wird durch  $V_M = \frac{RT}{p_{ges}}$  hergeleitet. Damit ergibt sich letztendlich für die volumenbezogene Sauerstoffaufnahme:

$$OUR = Q_{O_2} \left[ \frac{\text{mol}}{L \cdot \text{min}} \right] = \frac{\dot{V}_G^\alpha}{V_F \cdot V_M} \cdot \left( \gamma_{O_2}^\alpha - \frac{(1 - \gamma_{O_2}^\alpha - \gamma_{CO_2}^\alpha)}{(1 - \gamma_{O_2}^\omega - \gamma_{CO_2}^\omega)} \cdot \gamma_{O_2}^\omega \right) \quad (14)$$

mit  $Q_{O_2} \left[ \frac{g}{L \cdot h} \right] = Q_{O_2} \left[ \frac{\text{mol}}{L \cdot \text{min}} \right] \cdot 60 \cdot M_{O_2}$

Mit  $Q_{O_2}$  = Sauerstoffaufnahme

$V_F$  = Volumen [L]

$p_{ges}$  = Druck [Pa]

$R$  = Universelle Gaskonstante [ $J \cdot (\text{mol} \cdot K)^{-1}$ ]

$T$  = Temperatur [K]

$M_{O_2}$  = Molare Masse für  $O_2$  [ $g \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

### 2.4.8 Charakterisierung der Reaktionskinetik

Mittels der Reaktionskinetik lässt sich die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion als Funktion der Reaktionsbedingungen darstellen [53]. Entscheidend für eine Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit sind u.a. Druck, Temperatur und Konzentrationen der Substanzen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeit von Imipenem in wässrigen Lösungen. Temperatur und Druck wurden in allen Versuchen konstant gehalten. Die Bildung der spezifischen Produkte variierte mit der vorliegenden Substratkonzentration, weshalb eine vereinfachte Betrachtung anhand der Zerfallsgeschwindigkeit erfolgte:



Ist die Zerfallsgeschwindigkeit unabhängig von der vorliegenden Konzentration  $c_a$ , so spricht man von einer Reaktionskinetik nullter Ordnung. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  [ $\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] ist in diesem Fall konstant und bestimmt die Reaktionsgeschwindigkeit  $r$ :

$$r = k = \frac{c_a^0 - c_a^t}{t} \quad (16)$$

Mit  $c_a^0$  = Konzentration des Substrates A [ $\text{mol L}^{-1}$ ] zum Zeitpunkt  $t_0$

$c_a^t$  = Konzentration des Substrates A [ $\text{mol L}^{-1}$ ] zum Zeitpunkt  $t$

Mittels der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten lässt sich die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des Substrates  $c_a^0$  folgendermaßen bestimmen:

$$t_{1/2} = \frac{c_a^0}{2k} \quad (17)$$

Ist die Zerfallsgeschwindigkeit abhängig von der vorliegenden Konzentration des Substrates  $a$ , so ist die Zerfallsgeschwindigkeit eine Funktion aus Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und Substratkonzentration mit

$$r = kc_a = -\frac{dc}{dt} \quad (18)$$

Daraus resultiert die allgemeine Beschreibung einer Reaktionskinetik 1. Ordnung:

$$\int_{c_a^0}^{c_a^t} \frac{dc}{c} = -k \int_{t_0}^t dt \quad (19)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante lässt sich nun ermitteln aus:

$$k = -\frac{\ln \frac{c_a^t}{c_a^0}}{t} \quad (20)$$

Die Gleichung zur Bestimmung der Halbwertszeit ist demnach:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (21)$$

Eine grafische und mathematische Auswertung der ermittelten Funktionen und Halbwertszeiten ist durch das Softwaretool Kinetik möglich [54]. Dazu werden die experimentell bestimmten Konzentrationen und Zeitpunkte in das Programm geladen, welches eine Funktion für die

Zerfallsreaktion simuliert. Auch Kinetiken höherer Ordnung, sowie Umkehr- und Folgereaktionen lassen sich so darstellen.



## 2.5 Bestimmung der Erfassungs-, Nachweis-, und Bestimmungsgrenzen der HPLC-Analytik

Zur Bestimmung der Quantität eines Antibiotikums in einer Fermentationsprobe mittels RP-HPLC-Analytik war es notwendig, die minimale noch zu erfassende Antibiotikakonzentration zu bestimmen. Dabei musste gleichzeitig eine statistische Absicherung der Relation zwischen Gehaltswert und Signalwert erfolgen, um Abweichungen von der realen Konzentration bei der Detektion der Substanzen auszuschließen. Aus diesem Grunde wurden für das verwendete Referenzantibiotikum Imipenem nach DIN 32645 (2008-11) die Nachweisgrenze, die Erfassungsgrenze und die Bestimmungsgrenze der in Kapitel 2.4.2 beschriebenen HPLC-Methode bestimmt [55]. Dabei gab die ermittelte Nachweisgrenze an, bei welcher Konzentration der Analyt noch detektiert werden konnte. Jedoch war eine Aussage der Nachweisgrenze rein qualitativ, weil die Irrtumswahrscheinlichkeit (Fehler 1. Art  $\alpha = 0,05$ , und Fehler 2. Art  $\beta = 0,50$ ) recht groß war. Hingegen konnte durch die Erfassungsgrenze der Mindestgehalt der Probe angegeben werden, bei der mit relativer Sicherheit (95 %, Fehler 1. Art und Fehler 2. Art  $\alpha = \beta = 0,05$ ) der Analyt nachgewiesen werden konnte. Die Ermittlung der Quantile der t-Verteilung  $t_{f,\alpha}$  und  $t_{f,\beta}$  erfolgte mittels der TINV-Funktion der Software Excel von Microsoft® und gab die Wahrscheinlichkeitsdichte an, die repräsentativ bei unbekannter Varianz zur Ermittlung der Grenzen verwendet wurde. Für die Bestimmungsgrenze musste ein Vertrauensbereich vom Verwender vorgegeben werden, der als sogenannter k-Faktor in die Auswertung mit einfluss (hier  $k=3$ ). Konzentrationen, die oberhalb dieser Bestimmungsgrenze detektiert wurden, wurden als quantitativ richtig bewertet.

Für die Aufnahme der Kalibrierkurve wurde eine Imipenem Stammlösung ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  in  $6 \text{ mM MOPS}$ ) mit einer  $6 \text{ mM MOPS}$  Lösung verdünnt und in vier Konzentrationsstufen gemessen ( $12,5/25/50$  und  $75 \text{ mg L}^{-1}$ ). Um die Bestimmungs-, Erfassungs- und Nachweisgrenzen zu ermitteln, wurden statistische Kenngrößen experimentell bestimmt (Tabelle 2).

Tab. 2: Statistische Kenngrößen zur Bestimmung der Erfassung-, Bestimmungs- und Nachweisgrenze.

Bedeutung	Definition	Ergebnis
Arithmetisches Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben	$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$	$\bar{x} = 40,625 \text{ mg L}^{-1}$
Summe der Abweichungsquadrate von $\bar{x}$ bei der Kalibrierung	$Q_x = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$	$Q_x = 2304 \text{ mg}^2 \text{ L}^{-2}$
Geschätzter Funktionswert bei der Kalibrierung	$\hat{y}_i = a + b \cdot x_i$	$a = 34009$ $b = 62799 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$
Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung	$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2}}$	$s_{y,x} = 20308$
Verfahrensstandardabweichung	$s_{x_0} = \frac{s_{y,x}}{b}$	$s_{x_0} = 0,3234 \text{ mg L}^{-1}$

Dabei war  $i$  die Laufzahl der Kalibrierproben;  $x_i$  die Gehaltsgröße;  $y_i$  der Messwert der Kalibrierprobe;  $m$  die Anzahl der Messungen an der Analysenprobe ( $m = 1$ );  $n$  die Anzahl der Kalibrierproben ( $n = 4$ );  $f$  die Anzahl der Freiheitsgrade ( $f = n - 2 = 2$ );  $t_{f,\alpha}$  das Quantil der  $t$ -Verteilung bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 1. Art;  $t_{f,\beta}$  das Quantil der  $t$ -Verteilung bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 2. Art;  $1/k$  die relative Ergebnisunsicherheit zur Charakterisierung der Bestimmungsgrenze, welche auf 33 % festgelegt wurde ( $k=3$ ).

Die Nachweisgrenze  $x_{NG}$  berechnete sich daraus wie folgt:

$$\begin{aligned}
 x_{NG} &= s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \\
 &= 3,16 \text{ mg L}^{-1}
 \end{aligned} \tag{22}$$

Die Erfassungsgrenze  $x_{EG}$  war demnach:

$$\begin{aligned}
 x_{EG} &= x_{NG} + s_{x_0} \cdot t_{f,\beta} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \\
 &= 6,32 \text{ mg L}^{-1}
 \end{aligned} \tag{23}$$

Die Bestimmungsgrenze  $x_{BG}$  ergab damit:

$$\begin{aligned}
 x_{BG} &= k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f,\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(k \cdot x_{NG} - \bar{x})^2}{Q_x}} \\
 &= 12,45 \text{ mg L}^{-1}
 \end{aligned} \tag{24}$$

Bei Konzentrationen, die geringer als  $6,32 \text{ mg L}^{-1}$  waren, war eine Auswertung mittels HPLC spekulativ. Ab  $6,32 \text{ mg L}^{-1}$  war eine qualitative Aussage zulässig, doch erst ab einer Konzentration von  $12,45 \text{ mg L}^{-1}$  konnten die detektierten Konzentrationen als zuverlässig angesehen werden. Aufgrund der richtigen Abschätzung des  $1/k$  Faktors lag die berechnete Bestimmungsgrenze über der ermittelten Erfassungsgrenze.

Für die Detektion der Zerfallsprodukte aus Imipenem konnte die HPLC-Methode herangezogen werden. Eine Auswertung der geringeren Antibiotikakonzentrationen, die aus den Kultivierungen von *Streptomyces* sp. hervorgingen, konnte hingegen nur durch den sensitiveren Agar-Diffusionstest (Kapitel 2.4.1) ermöglicht werden.

## 2.6 Ergebnisse zur fermentativen Herstellung der $\beta$ -Lactame OA-6129

Dieses Kapitel präsentiert alle Ergebnisse zu den Kultivierungs- und Optimierungsversuchen, die betreffend einer fermentativen Herstellung der  $\beta$ -Lactame OA 6129 mittels *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 durchgeführt wurden.

### 2.6.1 Validierung der Schüttelkolbenversuche

Der Dissertation lagen die Versuchsberichte betreffend der Kultivierung von *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 zugrunde. Die dort beschriebenen Versuche wurden größtenteils im Labormaßstab in Schüttelkolben durchgeführt. Zwar war in den Berichten ein Fermentationsverlauf angegeben, doch waren die enthaltenen Produktausbeuten widersprüchlich. Zudem lagen zwischen den industriell durchgeführten Versuchen und der aktuellen Arbeit fast 25 Jahre, weshalb zunächst eine Validierung der damaligen Ergebnisse vorgenommen wurde. Die aus diesen Validierungsversuchen erhaltenen Daten sollten im Anschluss in den Bioreaktor übernommen und dort weiterführend optimiert werden. Die Kultivierung wurde gemäß des Protokolls in einem zweistufigen Ansatz durchgeführt, wie es in Kapitel 2.4.5 beschrieben wird. Die erste Stufe diente als Vorkultivierung (bzw. Vorstufe) zur Bildung der Biomasse, während das zweite Medium für eine Antibiotikabildung optimiert wurde. Ein aus der zweiten Stufe, der sogenannten Hauptstufe, resultierender Kultivierungsverlauf ist in Abbildung 11 dargestellt.

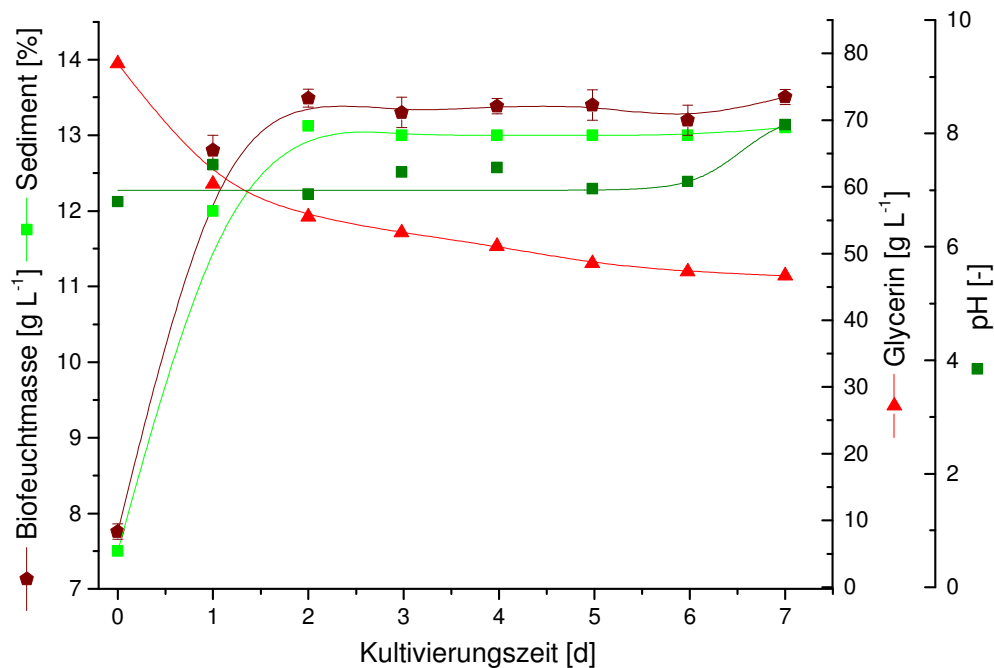


Abb. 11: Hauptstufen-Fermentation des Stammes 4N 3607 im 500 mL-Schüttelkolben (ohne Schikane) mit 20 mL Arbeitsvolumen bei 28 °C und 240 upm. Die Prozessbetrachtung erfolgt anhand Biofeuchtmasse / Sedimentvolumen, Glycerinkonzentration und pH-Verlauf.

Wie anhand der Bestimmung der Biofeuchtmasse und des Sediments aus Abbildung 11 deutlich wird, hatte die Biomassenbildung nach zwei Tagen im Schüttelkolben ihr Maximum erreicht. Innerhalb dieses Zeitraums verringerte sich die Glycerinkonzentration von anfangs  $78 \text{ g L}^{-1}$  auf  $55 \text{ g L}^{-1}$ . Daraus resultierte ein Substratausbeutekoeffizient von  $Y_{X/S}=0,247$  für den Zeitraum der ersten beiden Kultivierungstage. Im Anschluss kam es wahrscheinlich zu einer Limitierung der Gelöstsauerstoffkonzentration, weshalb keine weitere Biomassenbildung stattfand. Ähnliche Verläufe zwischen Glycerin und Sediment waren auch in den Vorberichten zu finden [56]. Dort kam es noch nach den ersten zwei Tagen zu einer leichten Erhöhung der Biomasse, diese stand aber nicht im direkten Zusammenhang zur konstanten Abnahme des Glycerins. Mögliche Ursache für den Glycerinverbrauch wäre die Bildung von Sekundärmetaboliten bzw. der Erhaltungstoffwechsel, wie sie folglich auch in Abbildung 11 zu sehen ist. Der pH-Wert schwankte in den ersten sechs Kultivierungstagen nur leicht, ab dem siebten Tag stieg er schließlich auf pH 8 an, was auf ein Absterben der Zellen hindeutet.

Dieser Kultivierungsverlauf konnte bei allen Stämmen (siehe Anhang, Kapitel A.2) im Schüttelkolben nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Kleine Unterschiede waren im Bereich des pH-Verlaufes zu finden, wo einige Kulturen nach drei Tagen pH 8 erreichten und zum fünften Tag wieder auf pH 7 zurückfielen. Auch das Wachstum der Zellen war stellenweise erst nach drei Tagen abgeschlossen.

Des Weiteren konnte mit den eingesetzten, analytischen Systemen keine Antibiotikakonzentration im Schüttelkolben detektiert werden. Eine mögliche Ursache wäre eine Fragmentierung des Myceliums, wie sie bei der Antibiotikabildung von *Streptomyces hastedii* SF-1993 durch Shomura *et al.* 1979 beobachtet wurde [57]. Dort bildeten die Submerskulturen im Vergleich zu einer Kultivierung auf Agaroseplatten kein Antibiotikum. Die fragmentierten Kulturen produzierten anstelle des Antibiotikums Biomasse und unterlagen somit dem reinen Primärstoffwechsel. Bei Shomura *et al.* konnte allein die Biomassenkonzentration durch die Submerskultivierung um 250 % gesteigert werden. Die Kulturen der aktuellen Studie waren unter dem Mikroskop als feines Netzwerk erkennbar. Die fortschreitende Glycerinabnahme lässt vermuten, dass der sekundäre Stoffwechsel nach dem zweiten Tag begann. Ob trotzdem eine Fragmentierung der Zellmembran vorlag, die auch die Bildung der Sekundärmetabolite beeinflusste, war unter dem Mikroskop nicht ersichtlich. Aus diesem Grund und um mittels genauerer *online* Prozessüberwachung die Kultivierung zu charakterisieren, erfolgte daraufhin die Kultivierung im 2 L-Bioreaktor (Bioengineering, Wald, Schweiz).

### 2.6.2 Zugabe von Wasserstoffperoxid zur Steigerung der Sauerstoffversorgung der Zellen im Bioreaktor

Bei konstanter Rührgeschwindigkeit (250 upm) konnte auch im Bioreaktor kein Antibiotikum produziert werden (Daten sind nicht gezeigt). Da der Verlauf fast identisch zum Schüttelkolben war, wurden Literaturdaten herangezogen [6], um entscheidende Prozessparameter bei der Produktion von Antibiotika zu identifizieren. So ist bei der Herstellung von Penicillin eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen notwendig. Ein Sauerstoffpartialdruck von 40 % wird von Henriksen *et al.* als Sollwert empfohlen, um keine Inhibierung der Produktbildung zu induzieren [58]. Bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 0,019 mM (entspricht einem  $pO_2$  von 7 %) kann eine intensive Reprimierung der Penicillinbildung detektiert werden [58]. Eine Erhöhung der Rührergeschwindigkeit wäre die einfachste Methode, die Sauerstoffversorgung zu verbessern, führte aber gleichzeitig zu einem höheren Scherstress und zur Schädigung der Zellen. Alternativ zu einer Begasung mit Sauerstoff/Luft, wo der Sauerstoff die Phasengrenze überwinden muss, kann eine Sauerstoffversorgung auch durch das Hinzugeben von Additiven, wie die reaktiven sauerstoffhaltigen Substanzen (ROS = Reactive Oxygen Species), erfolgen [59]. Diese reaktiven Substanzen entstehen auch bei der interzellulären Atmung und würden innerhalb der Zelle Proteine und DNA denaturieren [60]. Durch zelleigene Katalasen kann eine Bakterienzelle diese Substanzen umwandeln [61]. Besitzt ein Organismus auch extrazelluläre Katalasen, können ROS-Substanzen wie Wasserstoffperoxid in Wasser und gelösten Sauerstoff umgewandelt werden. Der freiwerdende Sauerstoff kann anschließend direkt von den Zellen aufgenommen werden. *Streptomyces* sp. besitzen extrazelluläre Katalasen, weshalb eine alternative Sauerstoffversorgung prinzipiell möglich war. In der Literatur wurden Zellen mit 20 mM  $H_2O_2$  pro Liter Fermentationsvolumen und Stunde behandelt [62]. Aufgrund dessen wurde diese Konzentration im folgenden Versuch (Abbildung 12) dem Fermentationsmedium hinzugegeben, als der Sauerstoffpartialdruck unterhalb des Sollwerts von 40 % fiel.

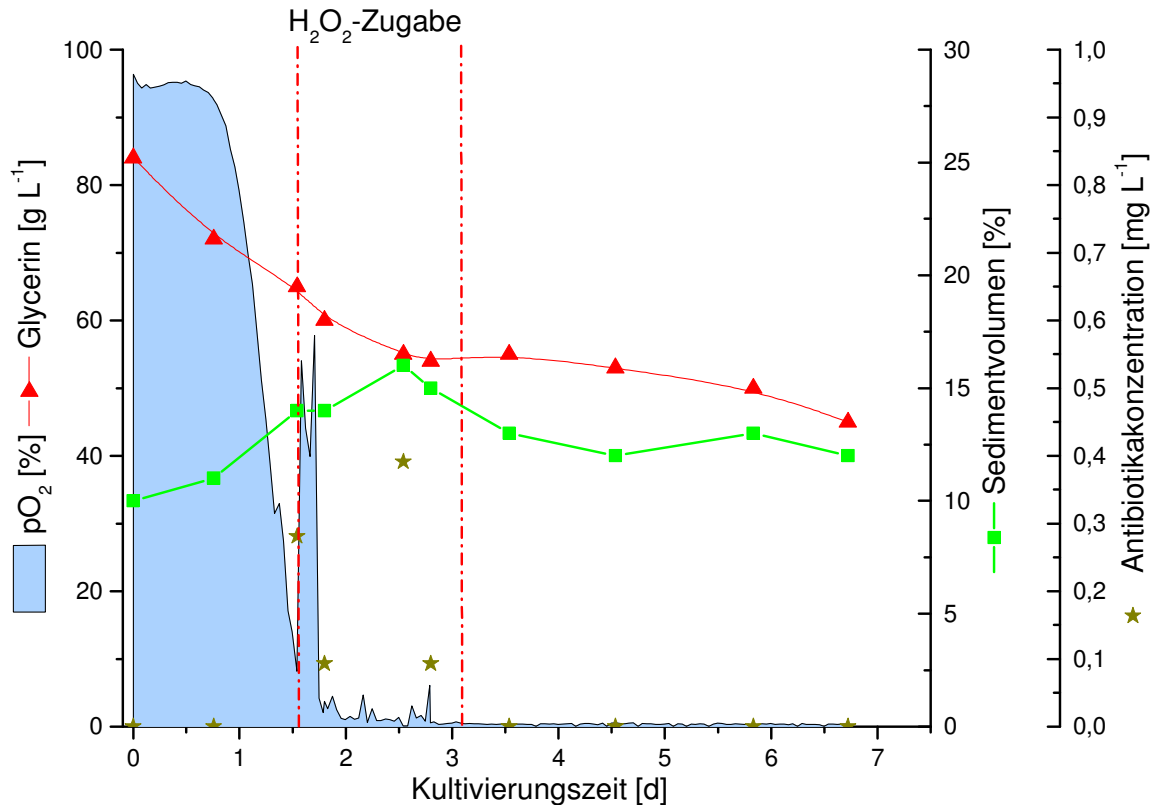


Abb. 12: Fermentation im 6 L-Bioreaktor (Bioengineering, Schweiz) des Stammes 4N 1181 bei 28 °C, 250 upm und 3 L Arbeitsvolumen. Zwischen der 38. und 76. h wurden 20 mM L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Wasserstoffperoxid dem Medium zugegeben. Prozessbetrachtung erfolgt anhand Sedimentvolumen, Glycerinkonzentration, Sauerstoffpartialdruck im Medium und Antibiotikakonzentration.

Wie der Abbildung 12 zu entnehmen ist, erfolgte die Zugabe von Wasserstoffperoxid zwischen der 38. und der 76. Stunde. Aufgrund der Erhöhung des Arbeitsvolumens von anfangs 3 L auf 4 L musste die Zugabe des Additivs beendet werden. Anhand des Partialdruckes konnte man erkennen, dass die Gelöstsauerstoffkonzentration für fünf Stunden erhöht werden konnte. Dies resultierte entweder aus dem Absterben der Zellen durch eine Wechselwirkung mit dem Wasserstoffperoxid oder durch eine weitere Biomassenbildung, die durch den aus der katalytischen Reaktion freiwerdenden Sauerstoff induziert wurde. Aufgrund der Erhöhung des Sedimentvolumens sind die Spaltung und die Aufnahme des Sauerstoffs wahrscheinlicher. Nach diesen fünf Stunden fiel der Sauerstoffpartialdruck auf nahezu 0 %. Die Biomassenbildung war nun Sauerstoff limitiert. Da diese Limitierung am Ende der der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe durch das Fehlen des katalytisch-frei werdenden Sauerstoffs intensiviert wurde, lag die Glycerinaufnahmerate der Zellen bei wenigen Gramm pro Liter und Tag und es kam zur Zelllyse, die man anhand des Sedimentvolumens nachvollziehen konnte.

Eine zusätzliche Sauerstoffversorgung bei der Kultivierung von *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 4N 1181 konnte durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erreicht werden. Das Produktmaximum lag bei 0,39 mg L<sup>-1</sup> nach zweieinhalb Tagen. Der Substratkoeffizient betrug in dieser Zeitspanne 0,016. Im Vergleich zu den industriell angefertigten Berichten konnte keine

Endkonzentration von  $110 \text{ mg L}^{-1}$  erzielt werden [56]. Zudem konnte während der Zugabe des Wasserstoffperoxids keine konstante Antibiotikakonzentration im Medium nachgewiesen werden, was auf eine Wechselwirkung mit dem Wasserstoffperoxid hindeutete [63]. Alternativ könnte auch eine Denaturierung des Produktantibiotikums durch das wässrige Milieu vorgelegen haben. Um den Einfluss des Wasserstoffperoxids auf die im Medium vorliegende Antibiotikakonzentration zu untersuchen und auch die Sauerstoffversorgung zu verbessern, erfolgte daraufhin eine Kultivierung mit variabler Rührergeschwindigkeit.

### 2.6.3 Variable Rührergeschwindigkeit zur Erhöhung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Bioreaktor

Zwar konnte durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid die Produktbildung induziert werden, für einen Produktionsmaßstab wäre diese Methode unwirtschaftlich. Auch Nebenreaktionen des Additivs mit den gebildeten Antibiotika wären möglich, weshalb daher ein ausreichender Sauerstoffeintrag über eine konstante Begasungsrate und einen konstanten Druck, jedoch bei einer variablen Rührerdrehzahl etabliert wurde. Ein Sauerstoffpartialdruck von 40 % wurde wie bei der Zugabe von Wasserstoffperoxid als Sollwert vorgegeben, den das System mit Rührerdrehzahlen von 250 bis 1000 upm gewährleisten sollte. Der Prozess ist in der folgenden Abbildung 13 anhand der Gelöstsauerstoff-, Antibiotika- und Glycerinkonzentration dargestellt. Die Bildung der Biomasse wurde anhand des Sedimentvolumens detektiert.

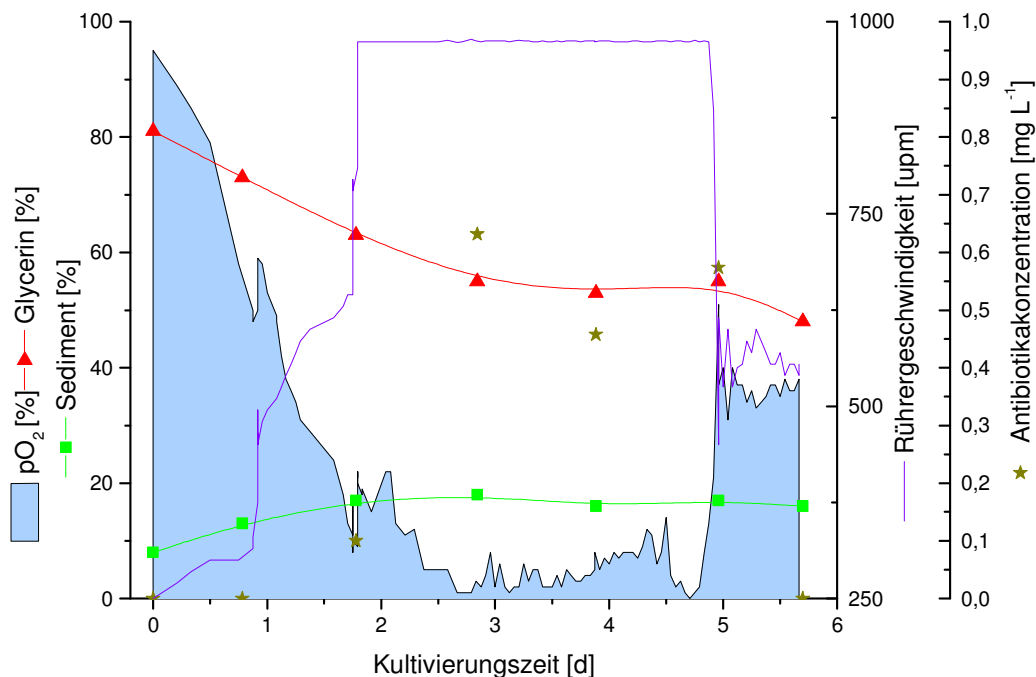


Abb. 13: Fermentation des Stammes 4N 1181 bei 28 °C und 1 L Arbeitsvolumen. Variable Rührerdrehzahl, die durch die aktuelle Gelöstsauerstoffkonzentration reguliert wird. Die Prozessbetrachtung erfolgt anhand Sedimentvolumen, Glycerinkonzentration, Sauerstoffpartialdruck im Medium, Rührergeschwindigkeit und Antibiotikakonzentration.



Wie in der Abbildung 13 anhand des Sedimentvolumens zu entnehmen ist, wurde in den ersten 48 Stunden die Biomasse gebildet und blieb ab dann nahezu konstant bei 17 %. Die Glycerinkonzentration im Medium fiel in dieser Zeit auf  $60 \text{ g L}^{-1}$ . Während der Kultivierung trat eine Sauerstofflimitierung auf, die erst nach fünf Tagen durch die variable Rührerdrehzahlregelung auf über 40 % gehalten werden konnte. Nach zwei Tagen konnte trotz dieser Limitierung eine antibiotische Wirkung des Überstandes gegen *Bacillus subtilis* mittels Diffusionstest nachgewiesen werden. Die maximale Antibiotikakonzentration lag bei  $0,63 \text{ mg L}^{-1}$  und wurde nach 70 h erreicht. Der Substratkoeffizient betrug zu dieser Zeit 0,029. Eine mögliche Ursache wäre die Sauerstofflimitierung des Mediums. Trotz der variablen Rührgeschwindigkeit konnte in dem vorliegenden Versuch keine konstante Gelöstsauerstoffkonzentration von über 40 % erzielt werden. Es wird angenommen, dass die Biomassenbildung die Produktbildung reprimiert, weshalb die Sauerstoffversorgung verbessert und/oder das Wachstum der Zellen während der Hauptstufenfermentation reduziert werden sollten, um eine höhere Produktbildung zu erzielen.

Weitere Optimierungen der Gelöstsauerstoffkonzentration wären durch Variation von verschiedenen Prozessparametern möglich. Zum einen wäre eine Veränderung der Rührergeometrie realisierbar, die die Sauerstofftransportrate verbessern könnte. Auch könnte durch den Einsatz von reinem Sauerstoff, als Begasungsgas, die Sauerstoffkonzentration seitens der Luftphase erhöht und damit der Sauerstofftransport in die wässrige Phase optimiert werden. Durch eine Optimierung des Mediums, vor allem einer Reduktion der Salzkonzentrationen, könnte die Gelöstsauerstoffkonzentration zusätzlich verbessert werden [64; 65].

Am Ende der Kultivierung konnte in der vorliegenden Studie keine konstante Produktkonzentration im Medium nachgewiesen werden. Eine wasserstoffperoxidabhängige Denaturierung aus dem vorangegangenen Versuch konnte somit ausgeschlossen werden, auch wenn die Denaturierung weiterhin detektiert wurde. Neben einer möglichen, geringen Stabilität der OA-Derivate in wässriger Lösung könnte auch eine stammeigene  $\beta$ -Lactamase zur Denaturierung der Antibiotika geführt haben, wie sie bei *Streptomyces* sp. CN229 bekannt war [66]. Zur Überprüfung dieses theoretischen Ansatzes wurde Clavulansäure dem Medium hinzugegeben, um die  $\beta$ -Lactamasen zu inhibieren. Es wurden jedoch weiterhin starke Schwankungen in den Produktkonzentrationen detektiert (Daten sind nicht gezeigt), weshalb der Einfluss einer stammeigene  $\beta$ -Lactamase ausgeschlossen werden konnte. Alternativ könnten auch die Zielantibiotika durch das umgebende, wässrige Milieu destabilisiert worden sein. Spezifische Untersuchungen zur Hydrolyse wurden am OA-6129-Analogon Imipenem durchgeführt und werden im folgenden Kapitel 2.7 präsentiert.

#### 2.6.4 Variation des Fermentationsmediums

Komplexmedienbestandteile können die Biosynthese von *Streptomyces* erheblich beeinflussen [67]. Spezifisch ist bei der Avermectinbildung durch *Streptomyces avermitilis* bekannt, dass die Art der Stickstoffquelle einen sehr intensiven Einfluss auf die Produktbildung besitzt. Ein Wechsel von Hefeextrakt zu Hefemehl induzierte bei Yin *et al.* die gewünschte Avermectinbildung und reduzierte gleichzeitig das Wachstum der Zellen [68]. Auch konnte allein durch den Wechsel der Stickstoffquelle eine konstante Gelöstsauerstoffkonzentration von über 40 % erhalten werden [68]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die bisher etablierten Medien (Vorstufenmedium-1 (VST-1) und Hauptstufenmedium-1 (HST-1), Anhang, Tab. B.2.1 und B.2.3) durch alternative Medien (Vorstufenmedium-2 (VST-2) und Hauptstufenmedium-2 (HST-2), Anhang, Tab. B.2.2 und B.2.4) ersetzt, und während einer parallelen Fermentation miteinander verglichen. Das bisher in der Vorstufe verwendete Fleischextrakt wurde durch Baumwollsaatmehl (Pharmamedia) ersetzt, was bei Choi *et al.* zu einer geringeren Freisetzung von Glutaminsäure, in einem geringeren Wachstum und damit einhergehend zu einer geringeren Viskosität führte [69]. Dies verbesserte die Sauerstoffversorgung der Zellen, was bei der Antibiotikabildung wünschenswert wäre. Im Hauptstufenmedium wurde das Sojain T 50 durch Sojamehl ausgetauscht. Diesbezüglich waren keine Angaben über etwaige Einflüsse auf die Morphologie oder Bildungsrate in der Literatur zu finden. Die Kultivierungsdauer wurde für den Vergleich der Prozesse zunächst auf 72 Stunden reduziert, um die Auswirkungen auf die Gelöstsauerstoffkonzentration zu analysieren. Aufgrund der höheren Konzentrationen an Komplexmedienbestandteilen wurde anstelle des Sedimentvolumens die Gesamttrockenmasse zur Charakterisierung des Wachstums herangezogen. Eine Bestimmung der exakten Biotrockenmassen und des Einflusses auf die Morphologie mittels Flachbettscanner [70] oder durch spektrometrische Nachweismethoden wies aufgrund der Assimilierung der Medienbestandteile hohe Varianzen auf. Hierfür hätten die Zellen von den Feststoffanteilen getrennt werden müssen, ohne dass diese gleichzeitig zerstört werden. Da jedoch die Medienbestandteile vollkommen von Zellstrukturen umgeben waren, war diese Trennung nicht möglich. Die folgenden Abbildung 14 soll diese Problematik der Integration von Medienbestandteilen in das Zellnetzwerk verdeutlichen. Im Hauptstufenmedium war der Anteil des assimilierten Mediums im Mycelium aufgrund der hohen Konzentration an Komplexmedium weitaus größer.

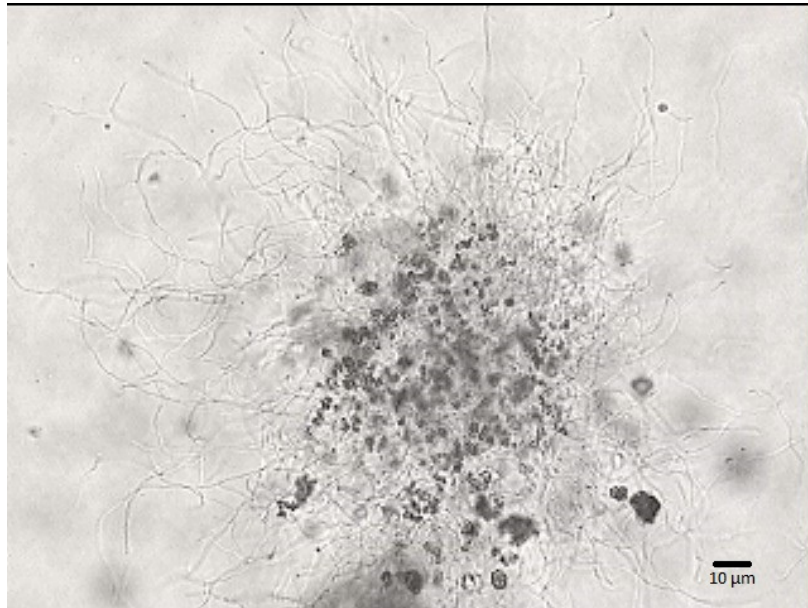


Abb. 14: Mikroskopischer Nachweis über die Assimilation der Medienbestandteile (schwarze, runde Strukturen) innerhalb des wachsenden *Streptomyces* Mycelium nach einer Kultivierungszeit von 48 Stunden (Lichtmikroskop bei 400x Vergrößerung) im Vorstufenmedium.

Beim Einsatz des Vorstufenmedium-1 (Anhang B, Tab. B.2.1) kam es zu unerwarteten Problemen mit dem Wachstum der Zellen. Es konnten im Bioreaktor nur wenige Pellets und diese erst nach 72 Stunden nachgewiesen werden. Auch im Schüttelkolbenmaßstab konnte, anders als bei den vorherigen Versuchen, kein Wachstum erzielt werden. Wie sich herausstellte, wurde das zur Verfügung gestellte Sojamin T 50 anstelle von *Degussa/Evonik* nun durch den Hersteller Cargill produziert. Aufgrund einer anderen Zusammensetzung oder Körnung reprimiert das neue Sojamin T 50 das Wachstum der *Streptomyces*-Kulturen. Da Sojamin T 50 nicht im neuen Vorstufenmedium-2 (Anhang B, Tab. B.2.2) vorhanden war, wurde es als Vorstufenmedium für beide Hauptstufen-Prozesse verwendet. Ein direkter Vergleich der Vorstufenmedien war daher nicht möglich. Die beiden Hauptstufenfermentationsläufe (HST-1 und HST-2) konnten wie geplant durchgeführt werden und sind in den folgenden Diagrammen (Abbildung 15 und 16) dargestellt.

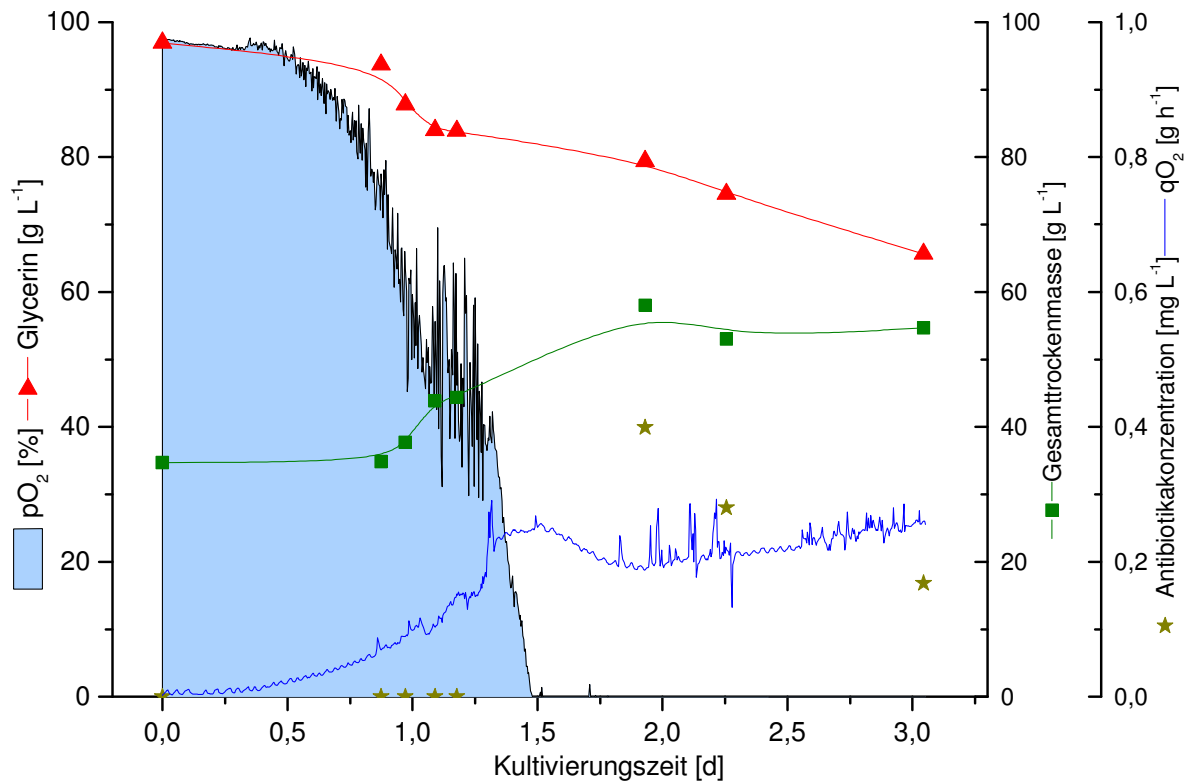


Abb. 15: Hauptstufenfermentation mit dem HST-1-Medium. Prozessparameter:  $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 %  $p\text{O}_2$ ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Prozessbetrachtung anhand der absoluten Trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $p\text{O}_2$ ), der Antibiotikakonzentration und der aufgenommenen Sauerstoffmenge ( $q\text{O}_2$ ) über der Zeit.

In Abbildung 15 ist die Hauptstufenfermentation im unveränderten Medium zu sehen. Nach einer Anlaufphase von 24 Stunden konnte ein Anstieg der absoluten Trockenmasse bestimmt werden. Trotz der nach 36 Stunden auftretenden Sauerstofflimitierung lag der Maximalwert bei  $58\text{ g L}^{-1}$  nach zwei Tagen Kultivierungszeit. Am Ende der Kultivierung konnte eine finale, absolute Trockenmasse von  $55\text{ g L}^{-1}$  bestimmt werden. Einen ähnlichen Verlauf war anhand der Produktbildungen der OA-Derivate zu erkennen. Die maximale Konzentration des Antibiotikums von  $0,4\text{ mg L}^{-1}$  wurde nach 48 Stunden durch den Agar-Diffusionstest ermittelt. Anschließend war die Produktbildungsrate nur noch gering, sodass aufgrund des Zerfalls weniger Antibiotikum im Medium nachgewiesen werden konnte. Die Glycerinkonzentration lag zu Beginn der Kultivierung bei  $98\text{ g L}^{-1}$  und erreichte eine Endkonzentration von  $64\text{ g L}^{-1}$ . Die Limitierung der Gelöstsauerstoffkonzentration führte zum Erreichen eines Maximums der Sauerstoffaufnahme. Nachdem sich die Zellen an die Limitierung angepasst hatten, konnte wieder ein leichter Anstieg der Sauerstoffaufnahme durch die Abgasanalytik bestimmt werden. Das Maximum der Sauerstoffaufnahme lag hier bei  $0,28\text{ kg h}^{-1}$ . Die Auswertungen für den Substrat- und den Sauerstoffkoeffizienten zum Zeitpunkt der maximalen Antibiotikakonzentration ergaben ein  $Y_{P/S} = 0,023$  und  $Y_{P/O} = 0,234$ .

Zum Hauptstufenmedium-2 ist neben dem Wechsel von Sojamin T50 zu Sojamehl anzumerken, dass die Feststoffkonzentrationen des neuen Mediums größer waren als im HST-1-Medium. Daher lag zu Beginn der Fermentation die absolute Trockenmasse im HST-2-Medium schon bei  $55 \text{ g L}^{-1}$ , während es im Hauptstufenmedium-1  $34 \text{ g L}^{-1}$  waren. Dies und die Reaktorarchitektur führten dazu, dass das HST-2-Medium direkt nach dem Sterilisationsprozess im Autoklav gerührt und begast werden musste, weil ansonsten die Gefahr bestand, dass das Begasungsrohr verblockte. Optimaler wäre eine Sterilisation mit gleichzeitiger Rührung gewesen, damit eine gleichmäßigere Hitzeverteilung gegeben ist. Jedoch konnte dies nicht während der Projektlaufzeit realisiert werden.

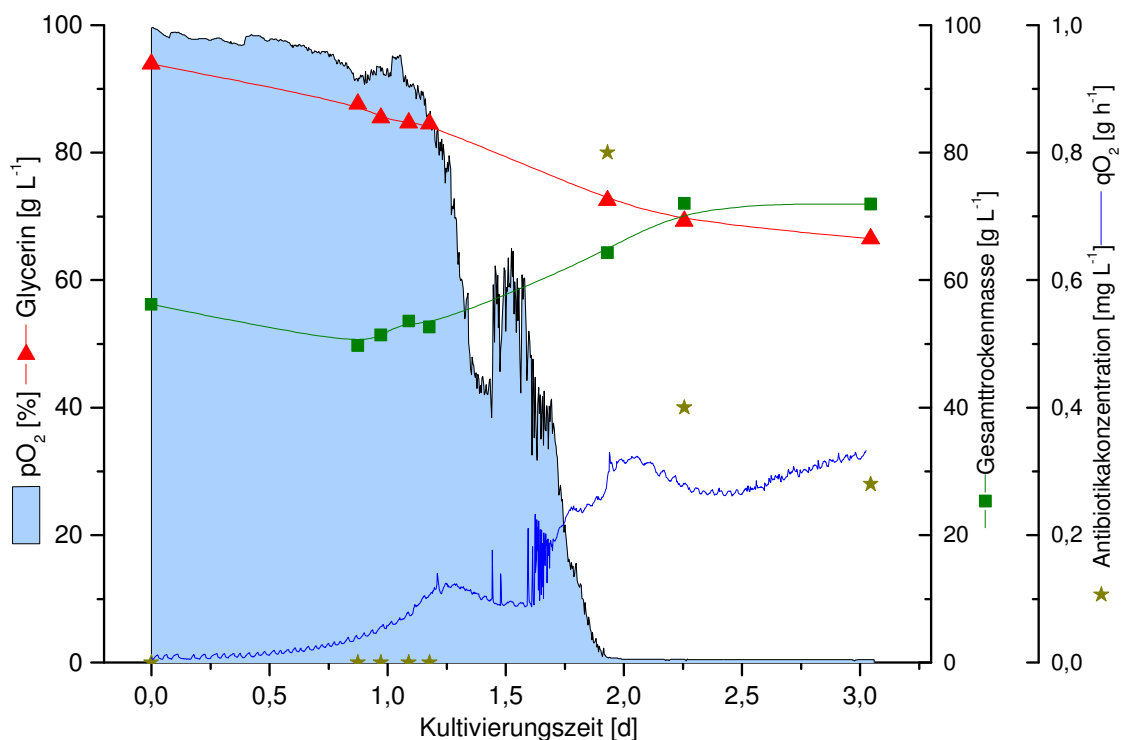


Abb. 16: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2-Medium. Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 %  $pO_2$ ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Prozessbetrachtung anhand der absoluten Trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ), der Antibiotikakonzentration und der aufgenommenen Sauerstoffmenge ( $qO_2$ ) über der Zeit.

Betrachtet man Abbildung 16, so ist zunächst die Trockenmasse ab der 21. Stunde und die Skalierung der Diagrammachse zu beachten. In dieser Zeit wurde weniger Trockenmasse bestimmt als zu Beginn der Fermentation. Dies war auf den Feststoffanteil im Medium zurückzuführen, der im Laufe der Fermentation durch die extrazellulären Enzyme der Kultur zersetzt wurde. Durch weitere Versuche mit dem Hauptstufenmedium-2 konnte diese Beobachtung bestätigt werden, sodass von finalen, höheren Biomassenkonzentrationen ausgegangen werden konnte, die aufgrund der Problematik bei der Bestimmung der Biotrockenmasse nicht erfasst wurden. Im direkten Vergleich der komplexen Medienbestandteile (Hefeextrakt, Sojamin /Sojamehl) der beiden Hauptstufenmedien (Anhang B, Tab B.2.3,

B.2.4) wurde deutlich, dass der Anteil beim Übergang von HST-1 zu HST-2 um bis zu 68 % erhöht wurde. Dies könnte erklären, wieso bisher nur ein sehr geringes Absinken der Gesamttrockenmasse bei einer Fermentation mit dem HST-1 zu beobachten war. Das Maximum an Gesamttrockenmasse lag bei der Fermentation mit dem HST-2-Medium bei  $72 \text{ g L}^{-1}$  nach 54 Stunden. Der Zuwachs an Gesamttrockenmasse ist im Vergleich zur Kultivierung im HST-1-Medium etwas geringer (HST-1 21 g zu HST-2 17 g). Eine Sauerstofflimitierung trat bei dieser Fermentation erst nach 48 Stunden auf, was auf eine im Vergleich zu einer Fermentation im HST-1-Medium längere Lag-Phase schließen ließ.

Ein weiterer Unterschied des Kultivierungsverlaufs wurde durch die maximalen Sauerstoffaufnahme-raten der Versuche erkennbar. Betrachtet man diese im HST-1-Medium, so wurde die Gelöstsauerstofflimitierung durch das darauffolgende Maximum der Sauerstoffaufnahme-rate nach 36 Stunden deutlich. Die Limitierung führte dazu, dass die Zellbiosynthese vom primären Zellstoffwechsel zum sekundären überging. Daraus resultierten eine Anpassungsphase und eine reduzierte Aktivität der Zellen, was neben dem Trockenmassemaximum auch durch einen Abfall des OURs erkennbar wurde. Im Hauptstufenmedium-2 konnte nach 30 Stunden ein lokales Maximum bestimmt werden, welches zum Zeitpunkt der fallenden Gelöstsauerstoffkonzentration und der Erhöhung der Rührerdrehzahl eintrat. Ausgehend davon, dass das Wachstum der Streptomycceten ähnlich von filamentösen Pilzen war [16], könnte es durch die erhöhte Rührerdrehzahl zur Schädigung des vegetativen Myceliums gekommen sein [71], was durch die direkt auftretende reprimierte Sauerstoffaufnahme-rate deutlich wurde. Dies war auch bei Pilzen bekannt und führte neben einer Veränderung der Morphologie und des Wachstums der Zellen auch zu einer veränderten Produktbildung [72]. Nach weiteren 18 Stunden trat die erwartete Sauerstofflimitierung auf und führte zu einer maximalen Sauerstoffaufnahme-rate von  $0,30 \text{ g h}^{-1}$ . Dies entsprach dem  $\text{OUR}_{\text{max}}$  aus dem Versuch mit dem HST-1 Medium.

Die maximale Produktkonzentration des Antibiotikums wurde mittels Agar-Diffusionstest erfasst und lag im HST-2 Medium bei  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  nach 46 Stunden. Geht man davon aus, dass die Umwandlung von Feststoffmedienbestandteilen in beiden Fermentationsmedien gleich war, führte eine Fermentation mit dem HST-2-Medium zu einer höheren Produktbildung bei ähnlicher Biomassebildung. Dies wurde auch durch die Auswertung der Substrat- und Sauerstoffkoeffizienten deutlich. Mit  $Y_{P/S} = 0,037$  und  $Y_{P/O} = 0,668$  war die Produktbildung betreffend des Glycerins im HST-2 Medium um den Faktor 1,6 und betreffend der aufgenommenen Sauerstoffmenge um den Faktor 2,9 besser als im HST-1 Medium. In beiden Fermentationen limitierte die Gelöstsauerstoffkonzentration die Antibiotikabildung. Da in beiden Prozessen ein Maximum bzw. eine Antibiotikabildung erst nach Erreichen einer Sauerstofflimitierung eintrat, könnte auch die Sauerstofflimitierung eine Art Trigger sein, die zur

Produktbildung führte. Um die Sauerstofflimitierung als möglichen notwendigen Trigger zu umgehen, könnte auch eine hervorgerufene N- bzw. C-Quellenlimitierung eine Produktbildung induzieren, wie Shapiro *et al.* berichteten [67]. Bisher besaß das Medium jedoch einen sehr hohen Anteil an beiden Nährstoffquellen, weshalb in darauffolgenden Versuchen die Stickstoff- bzw. Kohlenstoffanteile reduziert wurden, um das Wachstum der Zellen und den daraus resultierenden Sauerstoffbedarf zu reduzieren.

### 2.6.5 Kultivierung mit halber Stickstoffkonzentration im Produktionsmedium

Der hohe Anteil an Feststoff-Komplexmedienbestandteilen führte bisher zu verfahrenstechnischen Problemen, wie der ungleichmäßigen Sterilisation im Feststoffanteil und der Verstopfung der Zuluftleitung durch Feststoffbestandteile. Da sich die Medienbestandteile auch negativ auf die Sauerstofflöslichkeit auswirken, wurde untersucht, ob für eine erfolgreiche, produktivere Fermentation eine Reduzierung der Medienbestandteile möglich wäre. Gleichzeitig wurde analysiert, ob eine Erhöhung der Gelöstsauerstoffkonzentration über den kritischen Wert von 40 % induziert wird, wenn die Biomassebildung durch die halbe Stickstoffkonzentration reduziert wurde. Aus diesem Grunde wurden die Konzentrationen an Hefeextrakt und Sojamehl halbiert. Da durch die industriellen Berichte zur Bildung der OA-Derivate ein Produktmedium seitens des Industriepartners vorgegeben war, dass eine hohe Produktivität ermöglichen sollte, wurde das Medium zunächst nicht auch betreffend des Glyceringehaltes reduziert. Für eine bessere Auswertung wurde gleichzeitig die Kultivierungszeit auf 160 Stunden verlängert, was eine bessere Bewertung der Medienvariation auf die Produktbildung ermöglichte.

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse folgte nach der Vorstufenfermentation im unveränderten VST-2 Medium die Hauptstufenfermentation im stickstoffreduzierten HST-2-Medium (Abbildung 17), was nachfolgend als HST-2S bezeichnet wurde. Vor Inokulation lag die Gesamttrockenmasse bei  $20 \text{ g L}^{-1}$ .

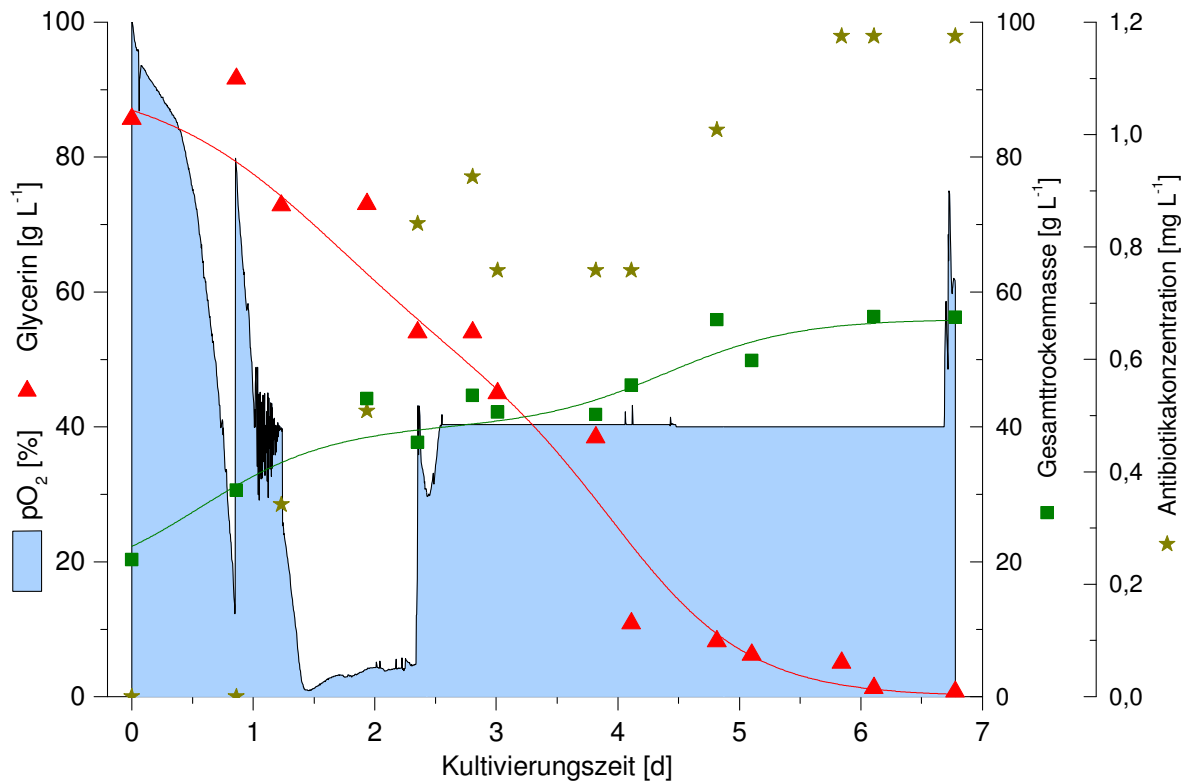


Abb. 17: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium und halber Stickstoffkonzentration. Prozessparameter:  $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 %  $p\text{O}_2$ ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Prozessbetrachtung anhand der Biotrockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $p\text{O}_2$ ), der Antibiotikakonzentration in Abhängigkeit von der Zeit.

Wie aus dem Kultivierungsverlauf zu erkennen ist, begann die Biomassebildung mit dem Kultivierungsbeginn und führte zur Limitierung der Gelöstsauerstoffkonzentration innerhalb der ersten 24 Stunden. Durch eine an die Gelöstsauerstoffkonzentration angepasste Rührergeschwindigkeit konnte der  $p\text{O}_2$  über den kritischen Wert von 40 % für die nachfolgenden 10 Stunden gehalten werden, jedoch fiel die Gelöstsauerstoffkonzentration nach Erreichen der maximalen Rührergeschwindigkeit auf annähernd 0 %. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen stieg nach weiteren 25 Stunden die Gelöstsauerstoffkonzentration über einen Wert von 40 % an und konnte durch die angepasste Rührergeschwindigkeit gehalten werden. Die maximale Biomasse von  $55\text{ g L}^{-1}$  wurde nach 120 Stunden erreicht und lag damit  $17\text{ g L}^{-1}$  unter dem Maximalwert bei der Kultivierung mit vollem Stickstoffanteil. Zeitgleich konnte eine maximale Antibiotikakonzentration von  $1,2\text{ mg L}^{-1}$  nachgewiesen werden. Im Vergleich zum HST-2 Medium konnte die Produktbildung so um 50 % erhöht werden. Der Substratkoeffizient zum Zeitpunkt der maximalen Produktkonzentration aus den Vorversuchen (nach etwa 46 Stunden) ergab einen Wert von  $Y_{P/S} = 0,031$ , der damit dem Wert einer Fermentation mit vollem Stickstoffanteil entsprach. Im weiteren Kultivierungsverlauf wurde zwar mehr Produkt gebildet, jedoch führte die verbesserte Sauerstoffversorgung primär zur



Bildung der Biomasse, sodass ein finaler Substratkoeffizient von  $Y_{P/S} = 0,017$  nach 6,8 Tagen erzielt wurde.

Betrachtet man die Verläufe von Biomasse und Produktbildung, so erkennt man eine konstante Zunahme an Biomasse und Antibiotikum, nachdem sich die Gelöstsauerstoffkonzentration wieder auf 40 % eingestellt hatte. Zudem wird ein ähnlicher Kurvenverlauf von Biomasse und Produktbildung deutlich, was für eine Antibiotikaproduktion eigentlich nicht zu erwarten wäre. Eine von der Biomassebildung abhängige Produktbildung – und damit eine Einteilung des Produkts als Typ I nach Gaden – wurde bislang in allen Kultivierungen ersichtlich. Die Reduzierung des Stickstoffs auf  $5,56 \text{ g L}^{-1}$  Stickstoff hatte damit das Wachstum der Zellen nicht reprimieren können. In der Literatur konnte die Beobachtung bei der Fermentation von *Streptomyces tendae* durch King gemacht werden, dass durch eine Stickstofflimitierung die Biomassebildung limitiert wurde, jedoch das Produkt Nikkomycin stetig gebildet wurde. Die eingesetzte Stickstoffkonzentration betrug bei King zu Prozessbeginn nur  $0,56 \text{ g L}^{-1}$  [73]. Da das verwendete Medium im durchgeführten Versuch zu Anfang die zehnfache Konzentration an Stickstoff enthielt, und die Trockenmasse bis zur Glycerinlimitierung stetig zunahm -ausgenommen während der Zeit der Sauerstofflimitierung-, trat vermutlich keine gewünschte Stickstofflimitierung auf. Sowohl die Produkt- als auch die Biomassenbildung wurde bis zum Erreichen der Glycerinlimitierung fortgesetzt, weshalb bei der Kultivierung mit HST-2S-Medium keine signifikanten Unterschiede zu einer Kultivierung im HST-2-Medium detektiert wurden. Eine weitere Reduzierung des Stickstoffanteils könnte das Wachstum reprimieren und gleichzeitig die Bildung der OA-Derivate als Sekundärmetabolite induzieren [67], jedoch wurde von einer weiteren Stickstoffreduzierung seitens des Projektpartners abgesehen, weil das bestehende Problem der Sauerstofflimitierung reduziert werden konnte. Wie bei den vorangegangenen Untersuchungen wurde auch in der Kultivierung mit dem HST-2S-Medium eine Produktbildung mit gleichzeitigem Auftreten der Sauerstofflimitierung detektiert, weshalb im Weiteren nachgewiesen wurde, ob es sich um eine Art Trigger handelte, die zur OA-Derivatbildung führte.

#### **2.6.6 Kultivierung von *Streptomyces* sp. mit zusätzlicher Begasung mit reinem Sauerstoff**

Laut Literatur führt eine Sauerstofflimitierung bei *Penicillium* sp. gleichzeitig zu einer Inhibierung der Antibiotikabildung, weshalb die Gelöstsauerstoffkonzentration über einen kritischen Wert von 40 % gehalten werden sollte [58]. Jedoch konnte beobachtet werden, dass die Bildung der OA-6129-Produktantibiotika erst dann auftrat, wenn eine Sauerstofflimitierung vorhanden war. Daher sollte durch eine Begasung mit reinem Sauerstoff die im Versuch mit HST-2-S Mediums erzielte 24-stündige Sauerstofflimitierung überbrückt werden, um die

These des sauerstoffabhängigen Produktbildungstriggers zu verifizieren oder auszuschließen. Träte trotz zusätzlicher Begasung eine Produktbildung auf, wäre noch zu untersuchen gewesen, ob diese zu unveränderten Produktausbeuten führten oder ob man durch die Verwendung von reinem Sauerstoff –und damit höheren Partialdruck des Sauerstoffs im Medium– höhere Produktkonzentrationen erhielte.

Für den Versuch wurde zunächst mit Druckluft begast und ab dem Zeitpunkt der Limitierung eine Sauerstoff-Gasflasche (50 L, 200 bar) mit einem Sauerstoffgehalt von 99,5 % verwendet. Bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 40 % und einer konstanten Anfangsrührergeschwindigkeit von 250 upm, wurde die Begasung über die Gasflasche gestartet. Als die Begasung eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 40 % nicht mehr gewährleisten konnte, wurde zusätzlich die Rührerdrehzahl angepasst. Der Verlauf dieser Fermentation ist in Abbildung 18 dargestellt.

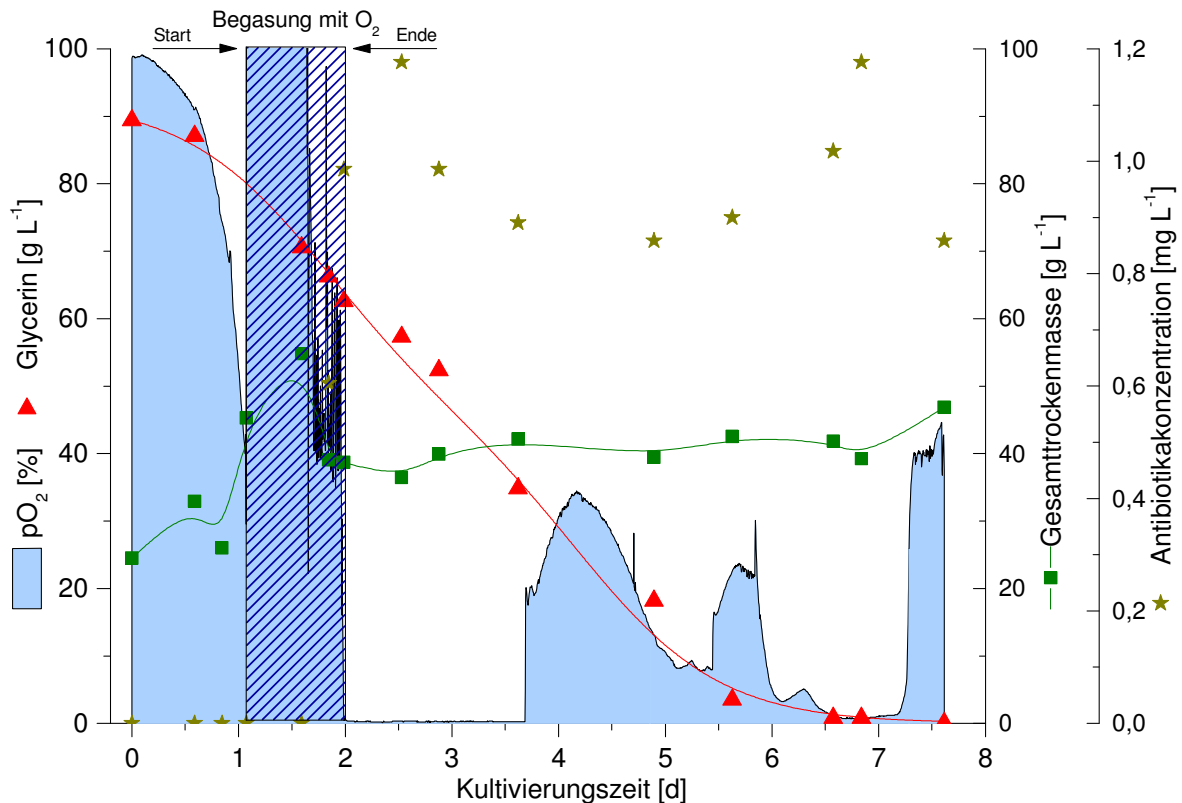


Abb. 18: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium. Prozessparameter: T = 28 °C, Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 % pO<sub>2</sub>), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm) bis zum Erreichen der 40 %, anschließend Fermentation mit reinem Sauerstoff (99,5 %). Nach Entleerung der Gasflasche wird wieder mit Luft begast. Prozessbetrachtung anhand der Trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration (pO<sub>2</sub>) und der Antibiotikakonzentration.

Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, erfolgte eine Begasung mittels der bereitgestellten Sauerstoffgasflasche ab der 26. Stunde. Nach der 40. Stunde fiel die gelöste Sauerstoffkonzentration im Fermenter unter den Sollwert von 40 %. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Rührerdrehzahl an den Sollwert angepasst, damit der kritische pO<sub>2</sub>-Sollwert erhalten werden

konnte. Nach weiteren 8 Stunden war die Gasflasche aufgebraucht. Eine weitere Begasung erfolgte wieder mit der hausinternen Luftzuleitung. Wie bereits beobachtet, nahm die Sauerstoffkonzentration im Medium zu, blieb aber unter dem eingestellten  $pO_2$ -Sollwert von 40 %, nachdem die Sauerstoffflasche aufgebraucht war. Dies ist auf das Wachstum der Zellen zurückzuführen, die durch den Wechsel von reinem Sauerstoff zu Druckluft der Sauerstofflimitierung und damit der Zellyse unterlagen. Nachdem wieder Sauerstoff im Medium zur Verfügung stand, konnte ein geringes Wachstum der Zellen detektiert werden. Erst zur 175. Stunde führte die C-Quellen-Limitierung zum Ansteigen der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium.

Die Trockenmasse erreichte nach einer Kultivierungszeit von 36 Stunden ein frühes Maximum von  $54 \text{ g L}^{-1}$ . Mit Ende der reinen Sauerstoffbegasung und Beginn der Sauerstofflimitierung unterlag der Mikroorganismus einer Zellyse, weshalb die Trockenmasse auf eine Konzentration von  $40 \text{ g L}^{-1}$  fiel. Im weiteren Verlauf verblieb die absolute Trockenmasse konstant. Eine recht frühe Zunahme der Trockenmasse und eine darauffolgende Limitierung, die durch den Wechsel von reinem Sauerstoff zu Druckluft verstärkt wurden, führten zu einer insgesamt schlechteren Biomassebildung, als jene bei einer konstanten Begasung mit Luft.

Die Bildung des Antibiotikums begann während der Begasung mit reinem Sauerstoff in der 47. Stunde. Zwar wurde zu diesem Zeitpunkt mit einer angepassten Rührergeschwindigkeit fermentiert, die Gelöstsauerstoffkonzentration lag aber über dem kritischen Wert von 40 %. Auch wenn es in der Mikroumgebung zur Unterschreitung der 40 % des  $pO_2$  gekommen sein könnte, wäre damit nachgewiesen, dass die Sauerstofflimitierung nicht ein erforderlicher Trigger ist, um die Antibiotikabildung zu induzieren. Die maximale Produktkonzentration von  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  wurde zunächst nach 60 Stunden erreicht, als die Gelöstsauerstofflimitierung auftrat. Der Substratkoeffizient lag zu diesem Zeitpunkt bei  $Y_{P/S} = 0,45$  und damit um den Faktor 2 höher als im halben Hauptstufenmedium mit variabler Rührerdrehzahl ohne zusätzliche Sauerstoffbegasung. Anschließend sank die Antibiotikakonzentration auf  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ab. Zum Schluss der Fermentation wurde der maximale Antibiotikatiter wieder erreicht. Da diese Konzentration während der späten Phase der Fermentation auch stellenweise vorlag, war die auftretende Sauerstofflimitierung weiterhin der entscheidende Faktor, der die Produktbildung reduziert. Bei wahrscheinlich gleichzeitiger Hydrolyse des Antibiotikums im Medium konnte somit keine höhere Produktkonzentration erzielt werden. Eine Abhängigkeit von Biomasse und Antibiotikabildung trat auch in diesem Versuch hervor. Wie im Schüttelkolben könnte eine mögliche Ursache für die stetige Biomassenbildung und der reduzierten Produktbildung bei einer Fragmentierung des Myceliums durch den vorliegenden Scherstress im Medium gelegen haben, wie es Shomura *et al.* berichteten [57]. Daher wurden im Nachfolgenden

alternative Rührer verwendet, die eine von der Biomassenbildung unabhängige Produktbildung nachweisen sollten.

### 2.6.7 Variation der Rührergeometrie

Ein entscheidender Prozessparameter bei einer Kultivierung eines filamentösen *Streptomyces* sp. war die Morphologie der Zellen. Die Zellen lagen sowohl als freie Hyphen als auch als komplexere Myceliumstrukturen im Medium vor. Abhängig von dieser Morphologie der Zellen war auch die Produktbildung [74; 75], was die bisherige, geringere Antibiotikabildung erklären konnte. Beeinflusst wurde die Morphologie durch verschiedene Prozessparameter, wie Rührergeschwindigkeit [76], Medienbestandteile [69; 74] und Sporenkonzentration [77; 78]. Auch die Rührergeometrie besaß einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie der Zellen [79]. Da das verwendete RALF-Plus-System vom Hersteller (Bioengineering, Wald, Schweiz) mit Scheibenrührern ausgestattet war, und diese einen hohen Scherstress verursachen [76], wurde ein entsprechender Intermig-Konstruktionsauftrag an Bioengineering (Wald, Schweiz) übermittelt. Die speziell angefertigten Intermig-Rührer verbesserten das Durchmesser Verhältnis von Rührer zu Bioreaktor von 0,40 auf 0,53 (siehe Kapitel 2.4.4), was bei gleichbleibendem Leistungseintrag schon zu einer Verringerung des Scherstress führte [76]. Zudem konnte durch Jüsten *et al.* festgestellt werden, dass allein durch die Verwendung eines anderen Rührertyps sich die Morphologie von *Penicillium chrysogenum* veränderte.

Durch die Verwendung des neuen Intermig-Rührertyps wurde so die Strömung von radial zu axial/Gegenstrom verschoben [64; 76]. Dies führte bei der Bestimmung des volumetrischen Sauerstoffkoeffizienten ( $k_{La}$ ) bei unterschiedlichen Rührergeschwindigkeiten des Intermig zu einer Minderung gegenüber des volumetrischen Sauerstoffkoeffizienten mit Scheibenrührern. Im Schnitt lag der  $k_{La}$ -Wert bei 64,3 % im Vergleich zu den kleineren Scheibenrührern. Eine ausführlichere Darstellung und die Bestimmung des  $k_{La}$ -Wertes sind im Kapitel 2.4.4 und im Anhang D, Kapitel D.3 zu finden. Weil die bisherigen Scheibenrührer im Vergleich zu den Intermigrührer einen höheren spezifischen Leistungseintrag besaßen (Faktor 1,58 gegenüber dem Leistungseintrag der Intermig-Rührer), konnte der  $k_{La}$ -Wert bei der Verwendung des neuen Rührertyps nicht durch das größere Durchmesser Verhältnis von Rührer zu Bioreaktor erhalten werden. Es war daher zu überprüfen, ob die Produktivität der Zellen gesteigert werden konnte, wenn der Scherstress -gemessen am Leistungseintrag- bei gleichzeitiger Reduktion der Sauerstoffversorgung verringert wurde. Die Kultivierung im Hauptstufenmedium mit den neuen Intermig-Rührern ist in der folgenden Abbildung 19 dargestellt.

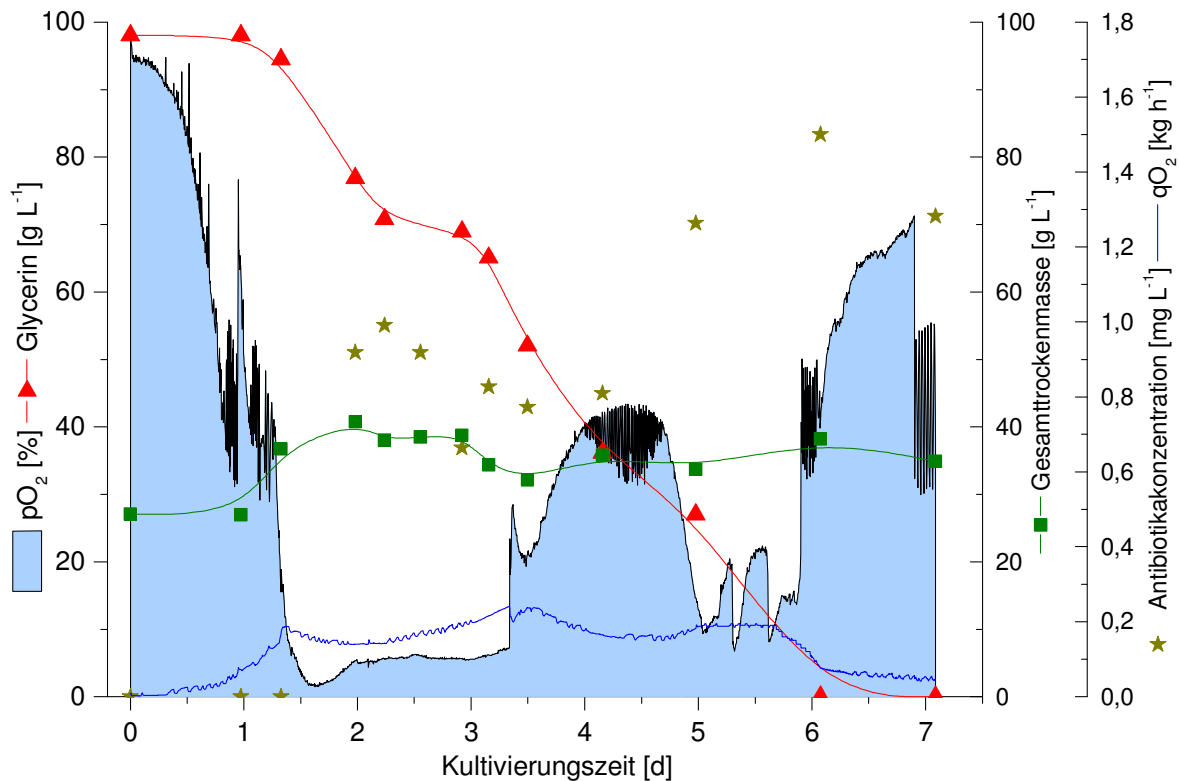


Abb. 19: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium. Prozessparameter:  $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Internig mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 %  $p\text{O}_2$ ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Prozessbetrachtung anhand der Biotrockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $p\text{O}_2$ ) und der Antibiotikakonzentration.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, fiel die Gelöstsauerstoffkonzentration nach 24 Stunden nach Inokulation des Reaktors auf eine Konzentration von 40 %. Diese konnte durch die angepasste Rührerdrehzahl für 12 Stunden erhalten werden, bis die maximale Rührerdrehzahl erreicht wurde. Ab diesem Zeitpunkt trat eine Limitierung des Gelöstsauerstoffs auf, welche für die nächsten 50 Stunden bestehen blieb. Ab der 80. Stunde konnte eine Zunahme des  $p\text{O}_2$ s auf einen Wert von 40 % detektiert werden. Dieser konnte zunächst für 30 Stunden konstant gehalten werden. Anschließend trat eine erneute Limitierung der Sauerstoffkonzentration im Medium für weitere 24 Stunden auf, die ab der 140. Stunde wieder in einem Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration überging.

Die maximale Trockenmasse von  $40\text{ g L}^{-1}$  wurde in den ersten 50 Stunden erreicht. Anschließend reduzierte sich die Masse aufgrund der auftretenden Sauerstofflimitierung und blieb im weiteren Verlauf bei nahezu  $38\text{ g L}^{-1}$  konstant. Der Verlauf der Produktkonzentration der OA-Derivate im Medium ähnelte dem Verlauf der Biotrockenmasse. Jedoch wurde nach 55 Stunden nur ein lokales Maximum von  $1\text{ mg L}^{-1}$  erreicht. Das absolute Maximum konnte nach 145 Stunden bestimmt werden. Die Konzentration an OA-6129 lag hier bei  $1,5\text{ mg L}^{-1}$ . Während das lokale Maximum Koeffizienten von  $Y_{P/S} = 0,057$  und  $Y_{P/O} = 0,838$  aufweist, können zum Zeitpunkt des maximalen Produkttiters nur noch Substrat- und Sauerstoffkoeffizien-

ten von  $Y_{P/S} = 0,016$  und  $Y_{P/O} = 0,282$  bestimmt werden. Die Zellen müssen daher das Substrat und den Sauerstoff in weitere Produkte umwandeln, als in Biomasse oder Antibiotikum.

Im Vergleich zu einer Fermentation mit Scheibenrührern bei gleichen Prozessparametern konnte bei einer Kultivierung mit Intermig-Rührern die Produktbildung um 30 % gesteigert werden. Obwohl der volumetrische Stofftransportkoeffizient durch die Verwendung der Intermig-Rührer reduziert wurde, war der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration nicht signifikant anders als die Verläufe der Fermentationen mit Scheibenrührern. Aufgrund des größeren Durchmesserverhältnisses von Rührer zu Bioreaktor schien eine Durchmischung des Mediums wichtiger zu sein als das Dispergieren der Luftblasen im Medium, wie es auch von Rau *et al.* berichtet wurde [80]. Betreffend einer Veränderung der Morphologie konnte im vorliegenden Prozess keine definitive Aussage getroffen werden. Sowohl Mycel als auch Hyphenstrukturen waren im Medium vorhanden. Jedoch inhibierte das wiederholte Auftreten der Sauerstofflimitierung das Wachstum der Zellen, weshalb von einer effektiveren Produktbildung der Zellen im Vergleich zu Kapitel 2.6.5 auszugehen ist.

### **2.6.8 Fermentation mit reduzierter Glycerinkonzentration im Kulturmedium**

In diesem Experiment wurde die Konzentration der C-Quelle reduziert ( $20 \text{ g L}^{-1}$  Glycerin), um die Abhängigkeit zwischen C-Quelle, Wachstum- und Produktbildung zu untersuchen (Abbildung 20). Bislang ergaben die Glycerinauswertungen der vorangegangenen Fermentationen, dass sich am Ende einer 80-stündigen Fermentation noch immer  $35\text{-}40 \text{ g L}^{-1}$  Glycerin im Medium befanden, beziehungsweise der Glyceringehalt im Medium erst um die 150. Stunde aufgebraucht worden war.

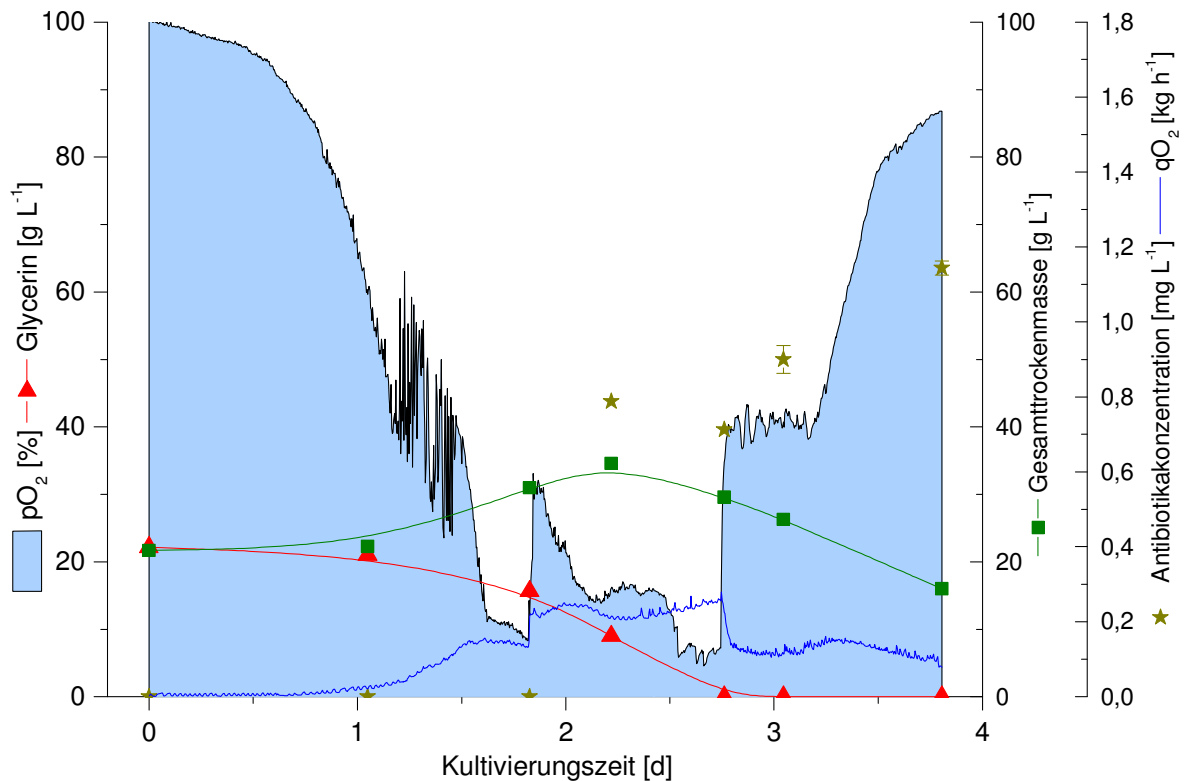


Abb. 20: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium. Prozessparameter:  $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Internig-Rührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 %  $p\text{O}_2$ ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Prozessbetrachtung anhand der Biotrockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $p\text{O}_2$ ), Glycerinkonzentration und der Antibiotikakonzentration.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass sich der Prozess innerhalb der ersten 50 Stunden analog zu den bisherigen Kultivierungen verhielt. In der 53. Stunde wurde ein Maximum der Trockenmasse von  $35\text{ g L}^{-1}$  erreicht. Nach circa 60 Stunden war das Glycerin im Medium aufgebraucht und es kam zu einer Abnahme der Trockenmasse, obwohl andere Kohlenstoffquellen in den Komplexmedien vorhanden waren. Gleichzeitig konnte ein sprunghafter Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration detektiert werden.

Die Antibiotikabildung begann bei dieser Kultivierung nach 50 Prozessstunden. Das Maximum an Antibiotikum von  $1,13\text{ mg L}^{-1}$  konnte zum Prozessende (93. Stunde) bestimmt werden. Der Prozessverlauf war abgesehen von der Limitierung und der daraus resultierenden Abnahme an Trockenmasse sowie dem Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration fast identisch mit den vorangegangenen Kultivierungen. Unterschiedlich war nur die um 10 Stunden spätere Produktbildung, die aber auch aus den verschiedenen Vorkulturen resultieren könnte. Obwohl die Glycerinkonzentration auf ein Viertel der vorangegangenen Versuche reduziert worden war, betrug der Sauerstoffkoeffizient  $Y_{P/O} = 0,442$  und der Substratkoeffizient  $Y_{P/S} = 0,052$ . Dies könnte vor allem auf die hohen Glycerinkonzentrationen in den vorangegangenen Kultivierungen zurückzuführen sein. So reprimierte Glycerin die Aktivität von mehreren Enzymen in der Actinomycinsynthese und auch Enzyme in der Cephalosporin-

Synthese wurden durch Art und Konzentration der C-Quelle inhibiert [67]. Ein negativer Einfluss der Glycerinkonzentration auf Enzyme der OA-6129-Synthese wäre daher auch im vorliegenden Prozess wahrscheinlich. Dies betreffend müssten jedoch weitergehende Versuche mit alternativen Kohlenstoffquellen durchgeführt werden.

Die Ergebnisse lassen die Rückschlüsse zu, dass zum einen die Antibiotikabildung unabhängig zur Biomassenbildung war, zum anderen eine Glycerinkonzentration von  $80 \text{ g L}^{-1}$  nicht notwendig war, um eine Produktkonzentration zu erreichen (Typ III nach Gaden). Eine Weiterentwicklung des Batch-Verfahrens zu einem Fed-Batch-Verfahren könnte damit die Produktivität der Zellen signifikant verbessern.



### 2.6.9 Synopse

Ziel des Teilkapitels war die Etablierung eines fermentativen Prozesses, um die  $\beta$ -Lactame OA-6129 mittels *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 zu produzieren. Dies konnte in den verwendeten Bioreaktoren durch Variation der Prozessparameter erreicht werden. Dabei wurden drei für den Prozess entscheidende Parameter identifiziert, die einen großen Einfluss auf die Antibiotikabildung besitzen: die Sauerstoffsättigung des Mediums (siehe Abbildung 21), die prozessoptimierte Medienzusammensetzung (siehe Abbildung 22), sowie die Rührergeometrie (siehe Abbildung 23).

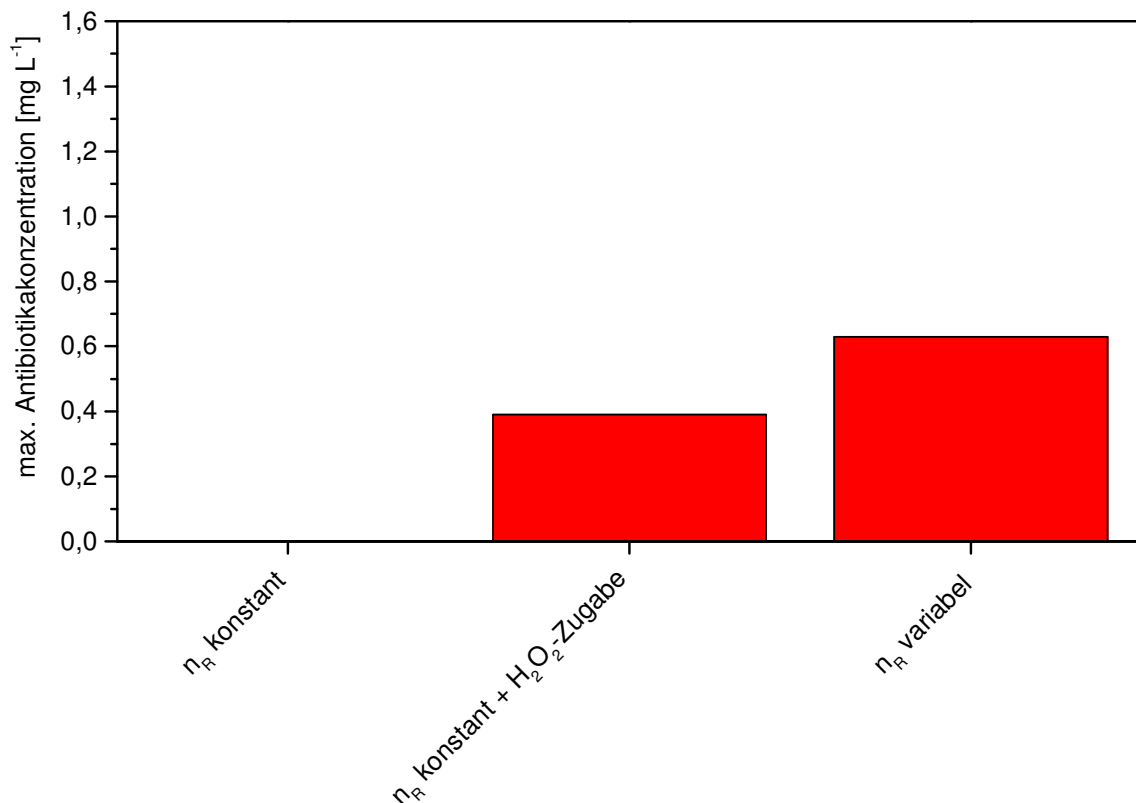


Abb. 21: Vergleich der maximal produzierten Antibiotikakonzentrationen im Fokus auf die Sauerstoffsättigung des Mediums bei der Kultivierung von *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 im Bioreaktor. Die Kultivierungen erfolgten bei 28 °C und 240 upm, sofern die Rührergeschwindigkeit ( $n_R$ ) mit den Scheibenrührern konstant blieb. Als Medium wurde das Hauptstufenmedium 1 verwendet.

Wie der Abbildung 21 zu entnehmen ist, war eine ausreichende Sauerstoffsättigung ein fundamentaler Prozessparameter für die Bildung der Antibiotika, da bei konstantem Sauerstoffmangel (Gelöstsauerstoffkonzentration  $<10\%$ ) kein Antibiotikum produziert werden konnte. Erst durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid, welches von den Zellen zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wurde, wurde Antibiotikum detektiert. Eine angepasste Rührergeschwindigkeit ermöglichte auch ohne eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe die Produktbildung, die sogar um 50 % gesteigert werden konnte. Eine konstante, minimale Gelöstsauerstoffkonzentration von 40 %, wie sie in der Literatur empfohlen wurde [58], konnte in keinem Prozess realisiert werden.

Um sich dieser Vorgabe weiter anzunähern, wurden weitere Prozessparameter variiert. Zunächst erfolgte eine Optimierung des Hauptstufenmediums (Abbildung 22).

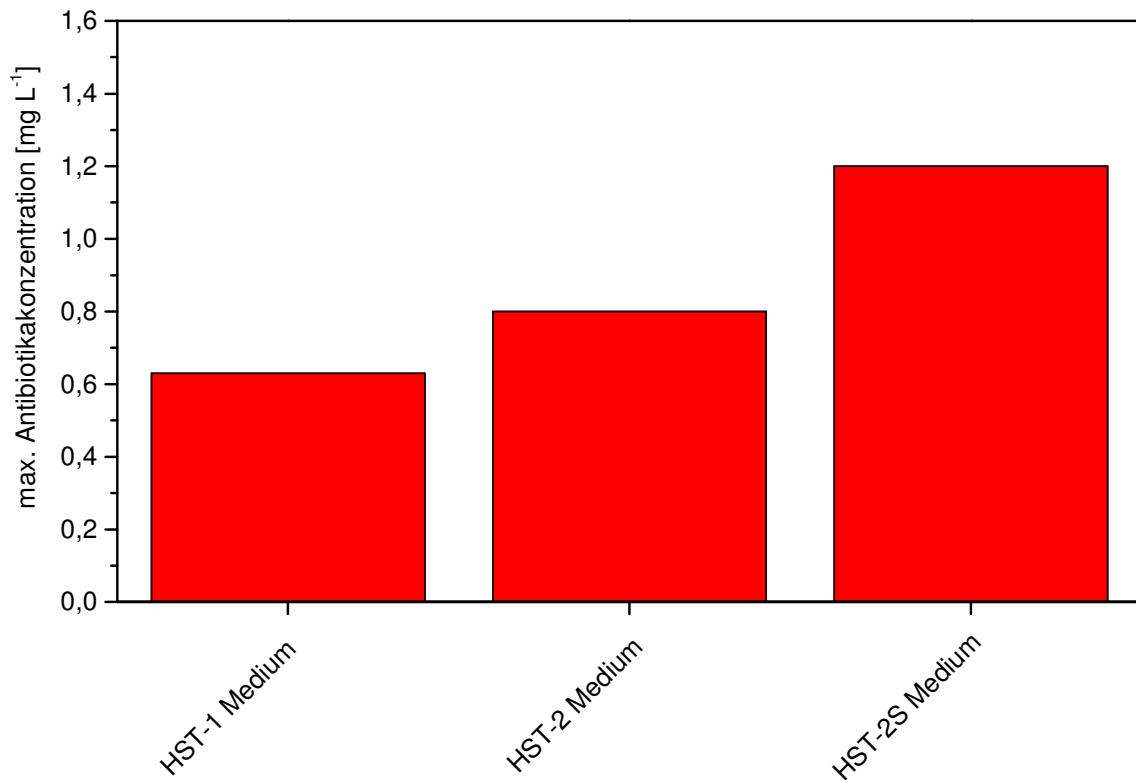


Abb. 22: Vergleich der maximal produzierten Antibiotikakonzentrationen im Zusammenhang mit den variierten Medien bei der Kultivierung von *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 im Bioreaktor. Die Kultivierungen erfolgten bei 28 °C und variabler Rührergeschwindigkeit mit den Scheibenrührern. Während das HST-1 Medium Sojamin als Stickstoffquelle enthält, ist im HST-2 Medium Sojamehl vorhanden, welches nach einer Optimierung auf die Hälfte der Stickstoffkonzentration reduziert wurde (HST-2S).

Eine optimierte Produktbildung konnte durch Variation der Stickstoffquelle, hauptsächlich von Sojamin zu Sojamehl (HST-1 zu HST-2), und der Reduzierung der Stickstoffkonzentration im Medium (HST-2S) erzielt werden. Da weiterhin eine auftretende Limitierung der Gelöstsauerstoffkonzentration für 30-40 Stunden detektiert wurde, wurde davon ausgegangen, dass die bisherige Medienzusammensetzung vor allem die Biomassenbildung (Primärstoffwechsel) förderte und die Zellen nur in geringen Umfang einen Sekundärstoffwechsel betrieben. Daraufhin wurde in einem weiteren Versuch die verwendete Glycerinkonzentration, die als Haupt-C-Quelle im Prozess eingesetzt wurde, auf ein Viertel der Referenzversuche reduziert. Dies resultierte in einer reprimierten Biomassenbildung. Im Vergleich zu den vorherigen Fermentationen blieb die erzielte Produktkonzentration konstant. Es konnte so eine von der Biomassenbildung unabhängige Produktbildung (Gaden Typ III) bei der Bildung der OA-Derivate nachgewiesen werden [14].

Ein weiterer Prozessparameter, der zu einer optimierten Produktbildung führte, war die Rührergeometrie (Abbildung 23).

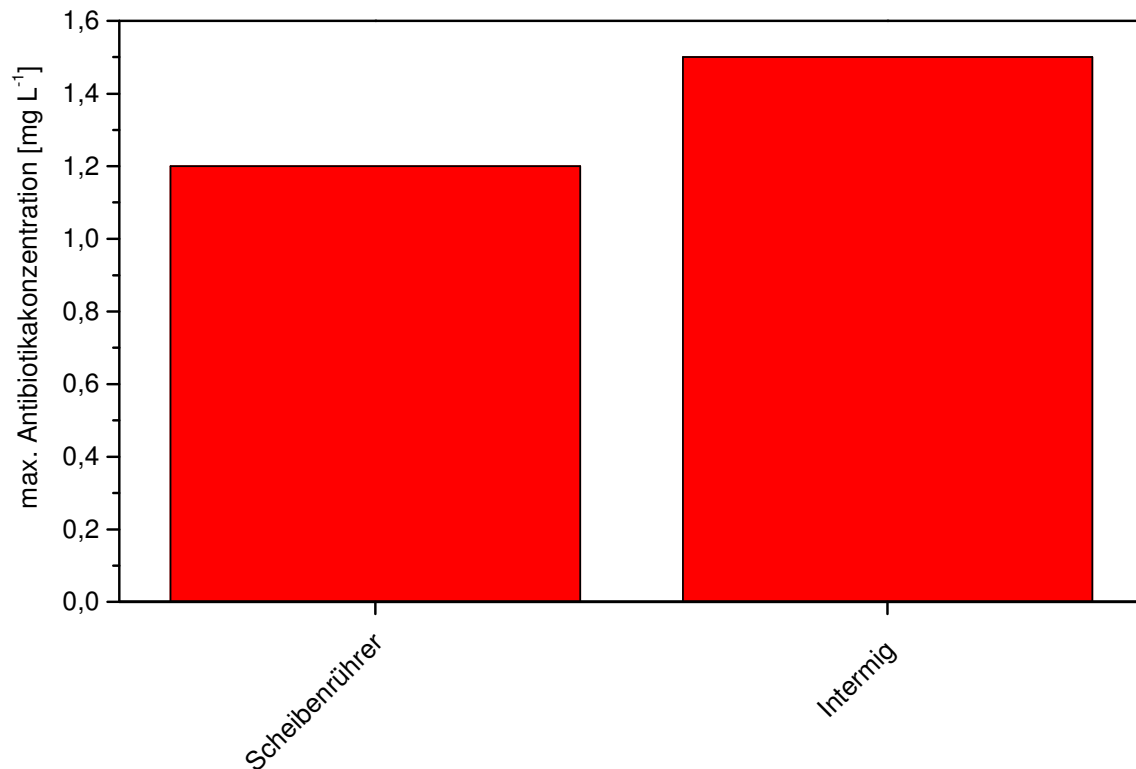


Abb. 23: Vergleich der maximal produzierten Antibiotikakonzentrationen im Zusammenhang mit den verwendeten Rührergeometrien (Scheibenrührern und Internig) bei der Kultivierung von *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 im Bioreaktor. Die Kultivierungen erfolgten bei 28 °C und variabler Rührergeschwindigkeit. Als Medium wurde das optimierte HST-2S Medium verwendet.

Wie aus der Abbildung 23 deutlich wird, konnte durch die Verwendung der für den Prozess eigens angefertigten Internig-Rührer die maximale Antibiotikakonzentration im Vergleich zu den Scheibenrührern um weitere 30 % gesteigert werden, auch wenn die Sauerstofftransportrate aufgrund der veränderten Geometrie um 35 % gesenkt wurde. Da gleichzeitig weniger Biomasse gebildet wurde, als bei dem Versuch mit Scheibenrührern, könnte die erhöhte Produktbildung auf den Scherstress zurückzuführen sein, der durch die neue Rührergeometrie reduziert wurde. Ähnliche Beobachtungen machten Shomura *et al.* bei der Überführung der *Streptomyces hastedii* SF-1993 Kultur in Schüttelkolben [57]. Hohe Scherraten im Schüttelkolben führten zur Biomassenbildung freier Hyphen und reduzierten die Bildung von Sekundärmetaboliten.

Für eine Weiterentwicklung des vorliegenden Prozesses zur Produktion der OA-6129- $\beta$ -Lactamantibiotika müssten weitere Medienzusammensetzungen untersucht werden, um die Probleme mit der hohen Biomassenbildung, der auftretenden Sauerstofflimitierung und der geringeren Produktivität zu verbessern. Vor allem induzierten die bisherigen Medienkonzentrationen die Bildung der Biomasse. Da durch die im Medium befindliche Biomasse die Gelöstsauerstoffkonzentration während des Prozessverlaufs limitierte, musste durch die höhere Rührergeschwindigkeit weiterer Sauerstoff ins Flüssigmedium eingebracht werden. Hohe

Rührgeschwindigkeiten gelten jedoch als Äquivalent zu hohem Scherstress, der die Bildung weiterer Biomasse bei *Streptomyces* sp. induziert, sofern noch Sauerstoff im Medium vorhanden war [57]. Da die Vermeidung von Scherstress und die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff bei der Bildung der Antibiotika als Voraussetzung für eine höhere Produktivität identifiziert wurden, muss demnach das Wachstum bei der Planung weiterer Prozessstrategien reduziert werden. Eine Limitierung der Stickstoff oder Phosphatquellen, wie King es 1997 berichtete, würde zu einer limitierten, reduzierten Biomassenbildung führen. Da gleichzeitig bei einer niedrigeren Biomassenkonzentration weniger Sauerstoff benötigt wird, könnte somit auch die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit und damit der Scherstress reduziert werden. Alternativ zum Einsatz der Internig-Rührer könnte auch das im Lehrstuhl befindliche CultiBag®-System der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland) verwendet werden, das vor allem für scherempfindliche Systeme entwickelt wurde.

Ein ausführlicherer Ausblick zum Thema Kultivierung von *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 zur Produktion der OA-6129 Derivate ist dazu in Kapitel 2.8 zu finden.

## 2.7 Ergebnisse zur Destabilisierung von Imipenem im wässrigen Milieu

Dieses Kapitel befasst sich mit der Hydrolyse des Imipenems als OA-6129-Analogons im wässrigen Milieu. Neben der Darstellung der Zerfallskinetiken des Imipenems in verschiedenen wässrigen Milieus und der Zerfallsprodukte des Imipenems werden auch Puffersubstanzen vorgestellt, die eine Hydrolyse reduzieren können.

### 2.7.1 Imipenem-Destabilisierung im wässrigen Milieu

Eigene Beobachtungen der Imipenem-Standards ergaben einen sehr schnellen Zerfall des Imipenems in deionisiertem Wasser und bei RT. Dies wurde durch eine intensive Gelbfärbung deutlich. Um die Stabilität des Imipenems für die HPLC-Analytik zu verbessern, wurden daher  $26 \text{ mg L}^{-1}$  Imipenem in  $0,006 \text{ M}$  3-(N-morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-Puffer gelöst (Abbildung 24) [81]. Eine Stabilisierung konnte zwar erreicht werden, dennoch war auch in einer MOPS-Lösung eine Gelbfärbung des Standards erkennbar. Um die Zusammenhänge zwischen der Imipenemkonzentration und den resultierenden Zerfallsprodukten darzustellen, wurde damit begonnen, einen zeitlichen Verlauf der Destabilisierung mittels RP-HPLC und Massenspektrometrie zu erfassen.

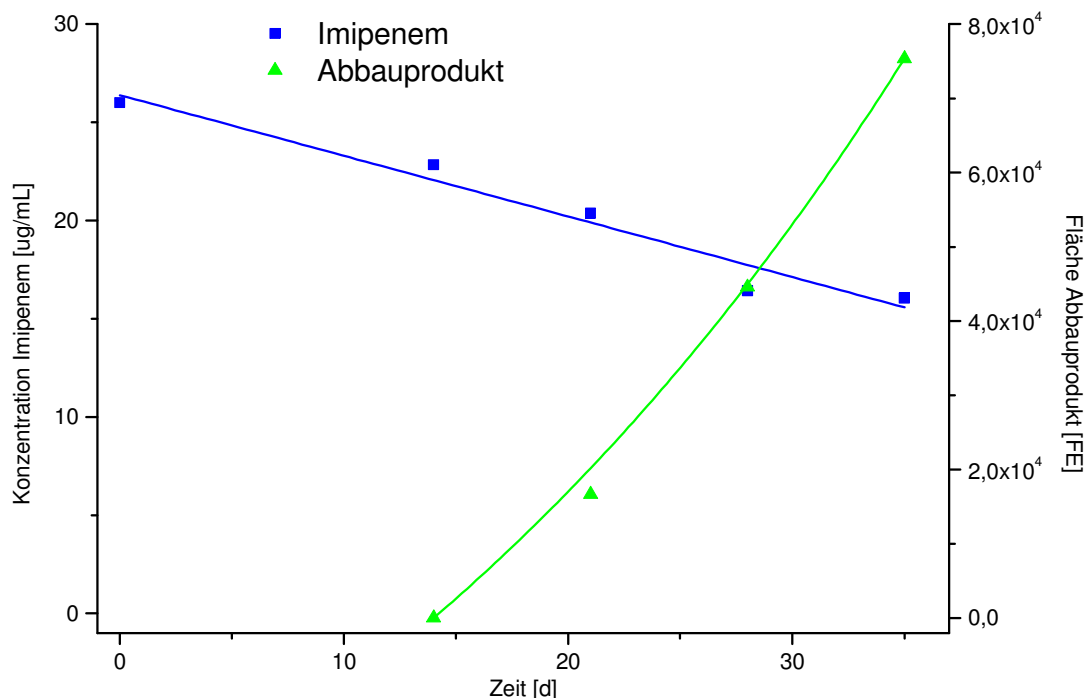


Abb. 24: Abnahme der Imipenemkonzentration ( $26 \text{ mg L}^{-1}$  in  $0,006 \text{ M}$  MOPS bei RT); Imipenem wurde mittels isokratischer RP-HPLC detektiert ( $t_R$  10,3 min);  $\lambda_{\text{max}}$  300 nm; Das entstandene Abbauprodukt ( $t_R$  5,5 min) besaß ein Absorptionsmaxima bei  $\lambda_{\text{max}}$  310 nm.

Nach 35 Tagen konnte eine Imipenemkonzentration von noch  $16 \text{ mg L}^{-1}$  detektiert werden. Wie anhand der Abbildung 24 zu erkennen ist, handelte es sich beim Zerfall einer Imipenemlösung ( $26 \text{ mg L}^{-1}$ ) um eine Reaktion Nullter Ordnung. Die ermittelte Halbwertszeit betrug 1201 Stunden bzw. 50 Tage. Nach 14 Tagen konnte ein Abbauprodukt detektiert werden, dessen Konzentration im weiteren Verlauf zunimmt. Das UV-Maximum dieser Verbindung lag bei 310 nm. Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurde ein  $m/z$  von 186 (einfache positive Ionisierung) bzw. ein Molekulargewicht von  $185 \text{ g mol}^{-1}$  ermittelt. Eine dazu passende, mögliche Struktur ist in Abbildung 25 dargestellt. Im Massenspektrogramm konnte direkt nach dem Imipenem-Peak ein zusätzlicher Peak mit  $m/z$  227, der im UV-Spektrum nicht detektierbar war, nachgewiesen werden.

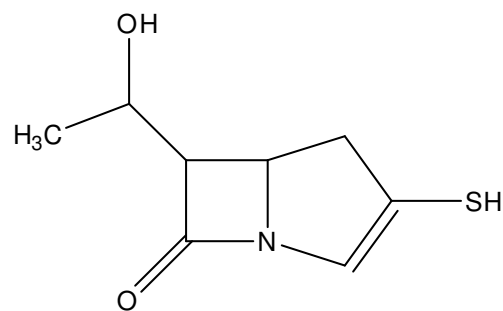


Abb. 25: Mögliche Strukturformel des Imipenem-Fragmentes mit einem Molargewicht von  $185 \text{ g mol}^{-1}$

In der Literatur wird bei dem Abbau von Imipenem in der menschlichen Niere von einem nicht UV-detektierbaren primären Abbauprodukt (als M1 bezeichnet) mit  $m/z$  318 ( $M+H^+$ ) berichtet, der bei der Öffnung des  $\beta$ -Lactamrings entsteht [82]. Dieser Metabolit wurde weiter zu einer Verbindung abgebaut, die ein UV-Maximum bei 308 nm aufzeigt. Diese Verbindung könnte die bei  $t_R$  5,5 min detektierte Substanz sein, jedoch fehlt eine Darstellung des entstandenen Zerfallsproduktes in der Literatur, um eine definitive Aussage zu treffen. Des Weiteren berichten Albers-Schönberg *et al.*, dass sich das UV-Maximum einer Thienamycinlösung bei pH 2 von 297 nm zu 309 nm verschiebt [83]. Dies lässt die Vermutung zu, dass sowohl Imipenem als auch Thienamycin zu der gleichen Verbindung (UV-Maximum von 308-310 nm) zerfielen.

Im Gegensatz zur geringkonzentrierten Imipenem-Stammlösung konnte bei der Alterung einer höherkonzentrierten Imipenem-Stammlösung von  $5,2 \text{ g L}^{-1}$  bei  $0 \text{ °C}$  ein schnellerer Zerfall mit einer Kinetik 1. Ordnung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist in der Literatur auch beim Analogon Thienamycin bekannt [29]. Im Vergleich zur  $26 \text{ mg L}^{-1}$  Imipenem-Stammlösung konnte ein breiteres Spektrum an Abbauprodukten nach 36 Tagen mittels Massenspektrometrie detektiert werden, die sehr unterschiedlichen UV-Maxima besaßen (Abbildung 26).

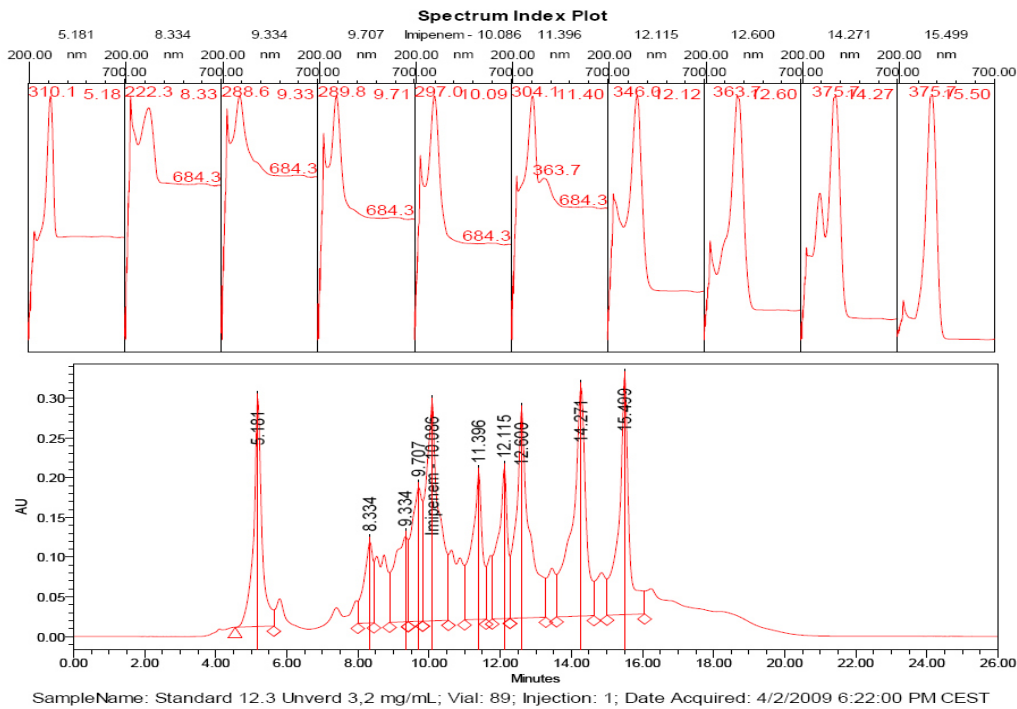


Abb. 26: Imipenem Stammlösung  $5,2 \text{ g L}^{-1}$  (in  $0,006 \text{ M MOPS}$ ); 36 Tage alt bei RT. Konzentrationsbestimmung mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe 2.4.2). Detektion bei  $200\text{-}700 \text{ nm}$ . Neben Imipenem können 9 weitere Substanzen detektiert werden, die unterschiedliche Absorptionsmaxima besitzen.

Aufgrund der hohen Anzahl der Zerfallsprodukte, die bei der Alterung nach 36 Tagen detektiert werden und wie sie aus der Abbildung 26 deutlich werden, wurde daher zur Identifizierung der neuen Zerfallsprodukte eine neun Tage alte Imipenem Stammlösung ( $5,2 \text{ g L}^{-1}$ ) chromatographisch untersucht (Abbildung 27). Neben dem Imipenem Peak (UV-Maximum:  $300 \text{ nm}$ ) wurden drei weitere Substanzen detektiert, die UV-Maxima von  $290 \text{ nm}$ ,  $376 + 291 \text{ nm}$  und  $355 \text{ nm}$  aufzeigten. Mithilfe der Massenspektrometrie wurden Molekulargewichte von  $598,4 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $898,0 \text{ g mol}^{-1}$  und  $598,4 \text{ g mol}^{-1}$  bestimmt. Smith *et al.* berichten von Dimeren (UV-Maxima von  $285 \text{ nm}$  und  $360 \text{ nm}$ ) und einem Trimer mit zwei UV-Maxima von  $360$  und  $280 \text{ nm}$ , die beim Zerfall von Imipenem bei  $\text{pH } 4$  und  $\text{pH } 9$  als Kondensationsprodukte entstehen können [84]. Die Polymere verknüpften sich zumeist durch Öffnen des  $\beta$ -Lactamring, was in einem Verlust der antibiotischen Aktivität resultierte. Diese Art der Verknüpfung ist sowohl bei Ampicillin als auch Thienamycin bekannt [85; 29]. Die aus dem Zerfall resultierenden Dimere bzw. Trimere sind mit ihrer Struktur in den folgenden Abbildungen (Abbildung 28-30) dargestellt.

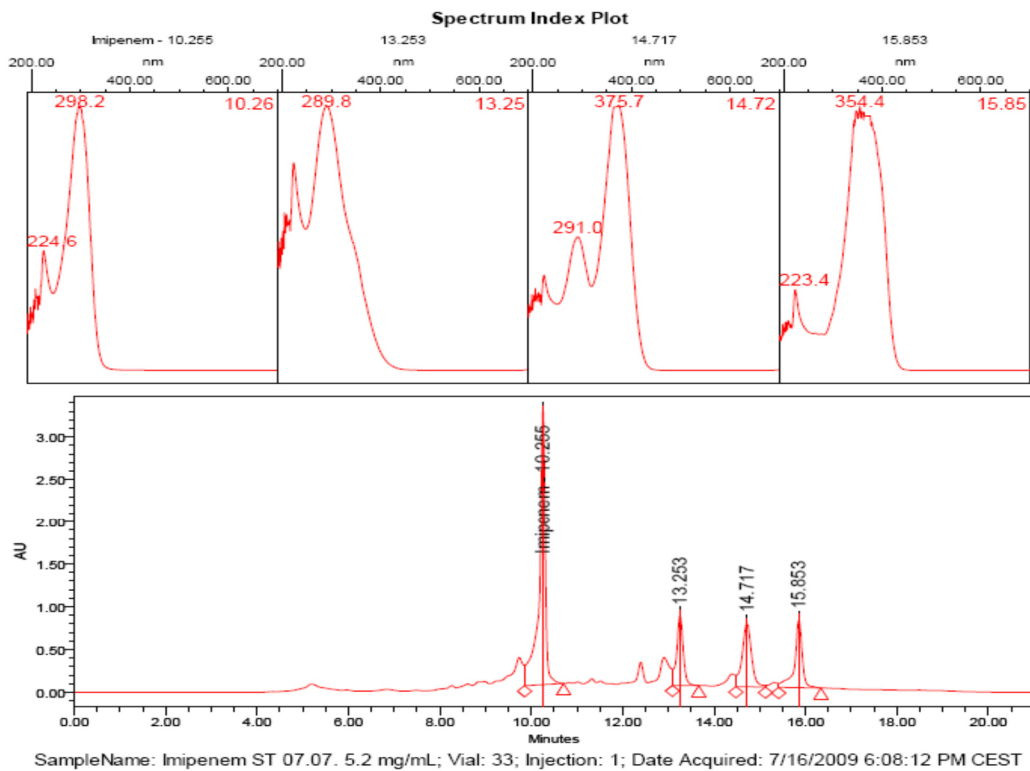


Abb. 27: Imipenem-Stammlösung  $5,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (in  $0,006 \text{ M MOPS}$ ); 9 Tage bei RT; Konzentrationsbestimmung mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe 2.4.2). Detektion bei 200-700 nm. Neben Imipenem ( $t_R$  10,3 min) können drei weitere Substanzen erfasst werden.

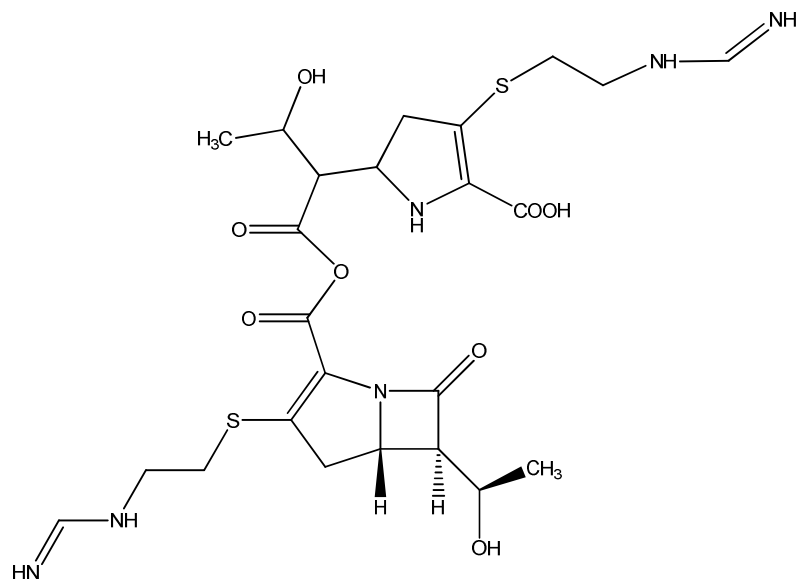


Abb. 28: Dimer (Molekulargewicht  $598,6 \text{ g mol}^{-1}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$ : 290 nm [84].



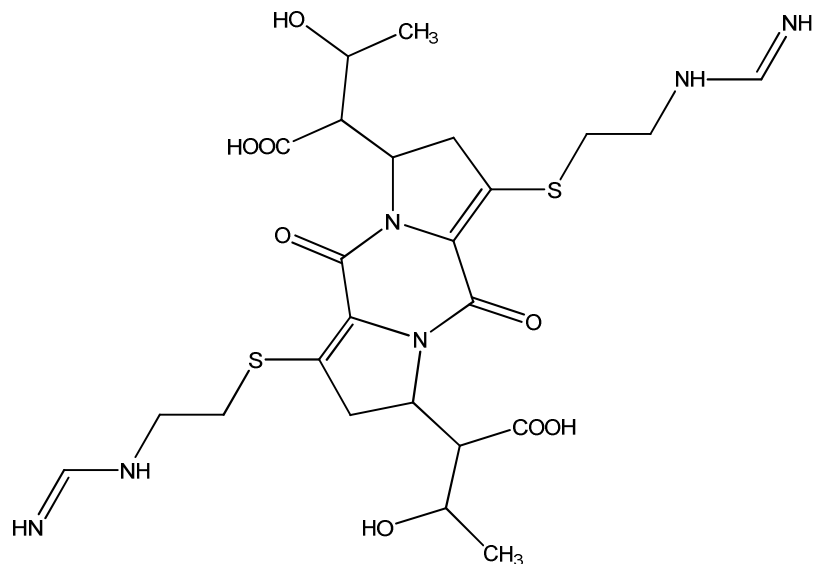


Abb. 29: Dimer (Molekulargewicht  $598,6 \text{ g mol}^{-1}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$ : 360 nm [84]

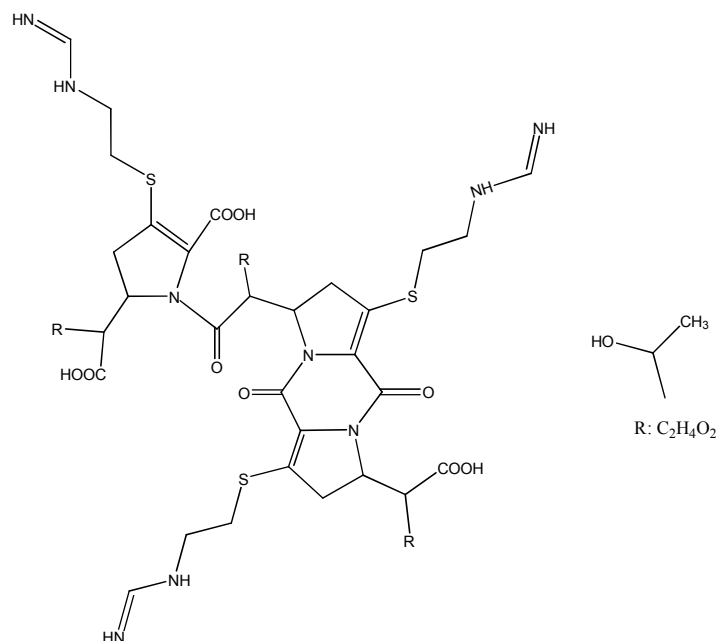


Abb. 30: Trimer (Molekulargewicht  $897 \text{ g mol}^{-1}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$ : 280 nm und 380 nm [84]

Obwohl eine Destabilisierung des Imipenems generell zu vermeiden ist, besitzt das in Abbildung 28 dargestellte Dimer als einziges Zerfallsprodukt einen intakten  $\beta$ -Lactamring und könnte damit noch eine antibiotische Aktivität besitzen. Alle anderen Strukturen (Monomere, Dimere, Trimere), die bei dem Zerfall der  $5,2 \text{ g L}^{-1}$  Imipenem Stammlösung detektiert wurden, besaßen keinen geschlossenen  $\beta$ -Lactamring und sind daher als neues antibiotisches Derivat uninteressant. Weil das vermutliche aktive Dimere nur bei einer Ausgangskonzentration von  $5,2 \text{ g L}^{-1}$  auftrat, müsste jedoch näher bestimmt werden, ob spezielle Konzentrationsgrenzen existieren, die eine Bildung des gewünschten Dimeres induzieren.

Dies betreffend hatte 1979 Kahan *et al.* beim Struktur-ähnlichem Thienamycin festgestellt, dass ein Zerfall abhängig von der verwendeten Thienamycinkonzentration, von dem pH des wässrigen Milieus und des verwendeten Puffers war [29]. Weil der pH aufgrund der Kultivierungsbedingungen vorgegeben war und eine möglichst hohe Produktkonzentration erreicht werden sollte, wäre eine Zugabe an Puffersubstanzen als Additive zum Medium eine Möglichkeit, einen Stabilisierungseffekt hervorzurufen (siehe Kapitel 2.7.8).

## 2.7.2 Fragmentierung von Imipenem durch die Elektrospray Ionisierung

Im vorherigen Kapitel wurde die HPLC-MS/MS-Analytik zur Bestimmung der Zerfallsprodukte verwendet. Jedoch wurde durch die angewandte Elektrospray Ionisierung nicht nur das Molekül ionisiert, sondern es entstanden Imipenem-spezifische Fragmente. Im Folgenden soll diese Fragmentierung des Imipenems durch die Elektrospray Ionisierung dargestellt werden (Abbildung 31).

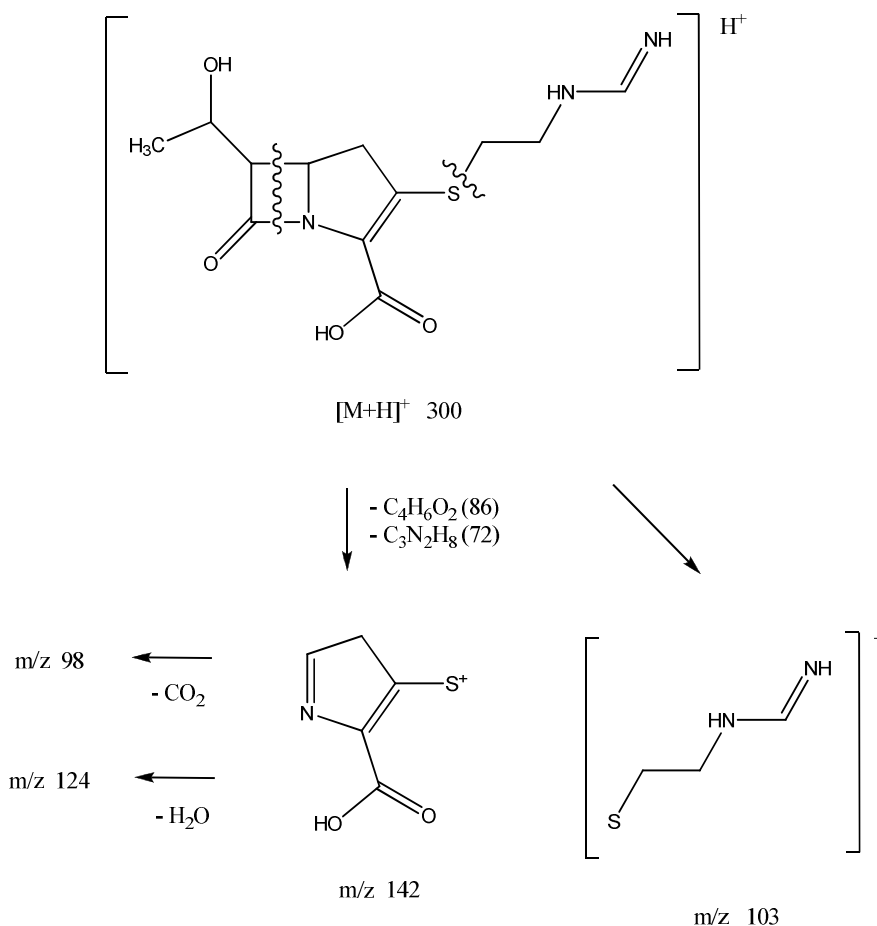


Abb. 31: Möglicher MS/MS-Fragmentierungsweg (ESIposMS/MS) von Imipenem; Imipenem ( $m/z$  300) zerfällt in zwei detektierte Fragmente ( $m/z$  103 und  $m/z$  142); Durch Decarboxylierung entsteht ein Fragment von 98  $m/z$ , durch Dehydratisierung ein Fragment von 124  $m/z$ .

In Abbildung 31 ist zu erkennen, dass die Fragmentierung mit dem Zerfall des  $\beta$ -Lactamring beginnt. Die Fragmente verlieren dadurch ihre antibiotische Wirkung und sind daher nicht mehr von pharmazeutischem Interesse. Diese Ergebnisse können jedoch für weitere Identifizierungen von Carbapenemen und ihren Fragmentierungsmustern herangezogen werden.

### 2.7.3 Zerfall von Imipenem zu Thienamycin

Der Zerfall von Imipenem zum aktiven, aber instabileren Thienamycin ist in der Literatur beschrieben [84]. Dabei reagierten zwei Imipenemmoleküle miteinander, sodass das sekundäre Amin eines Moleküls den  $\beta$ -Lactamring des zweiten Moleküls öffnete und sich dort kovalent bindete. Durch die Anwesenheit von Wasser spaltete sich das erste Molekül als Thienamycin vom zweiten Molekül ab, welches aufgrund des geöffneten  $\beta$ -Lactamrings keine antibiotische Aktivität mehr besaß (Abbildung 32).

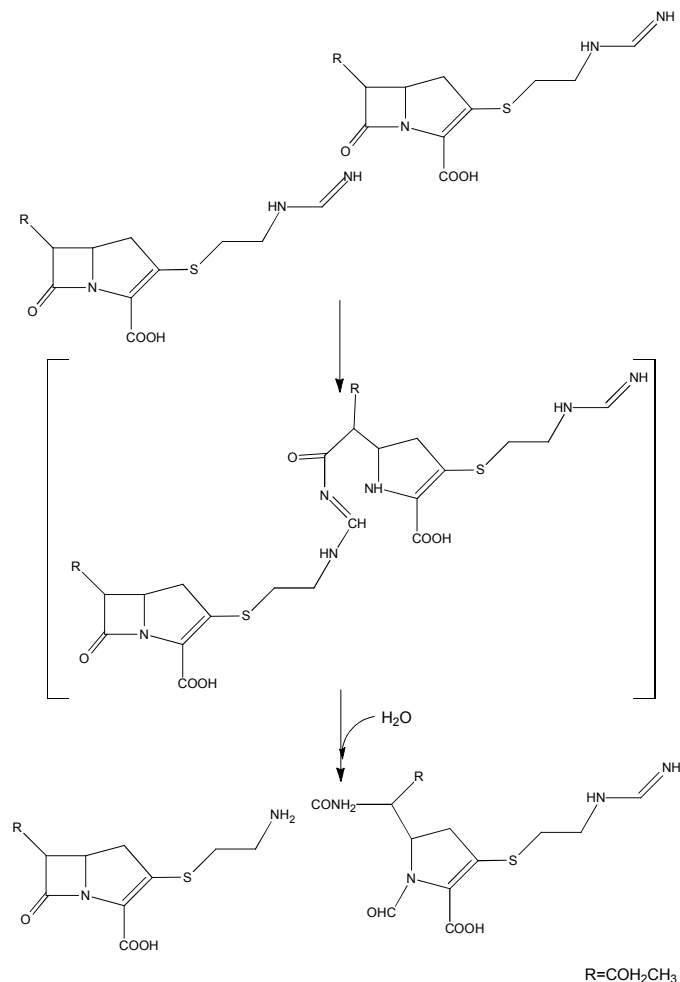


Abb. 32: Interaktion von zwei Imipenemmoleküle zur Bildung von Thienamycin nach *Smith et al.* [84].

Das vom Industriepartner übermittelte HPLC-Protokoll verwies auf einen kleinen Peak, der neben dem Imipenem detektiert werden konnte und vermutlich Thienamycin sein könnte. Das Probevolumen wurde daher auf 100  $\mu\text{L}$  erweitert, mittels der HPLC-Methode (Kapitel 2.4.3) und einer Massenspektrometer-Stufe analysiert, um den Thienamycin-Peak zu verifizieren. Als Ausgangslösung diente 1 g  $\text{L}^{-1}$  Imipenem in  $\text{H}_2\text{O}$ . Durch die RP-HPLC konnte folgendes Chromatogramm nach wenigen Minuten detektiert werden (Abbildung 33).

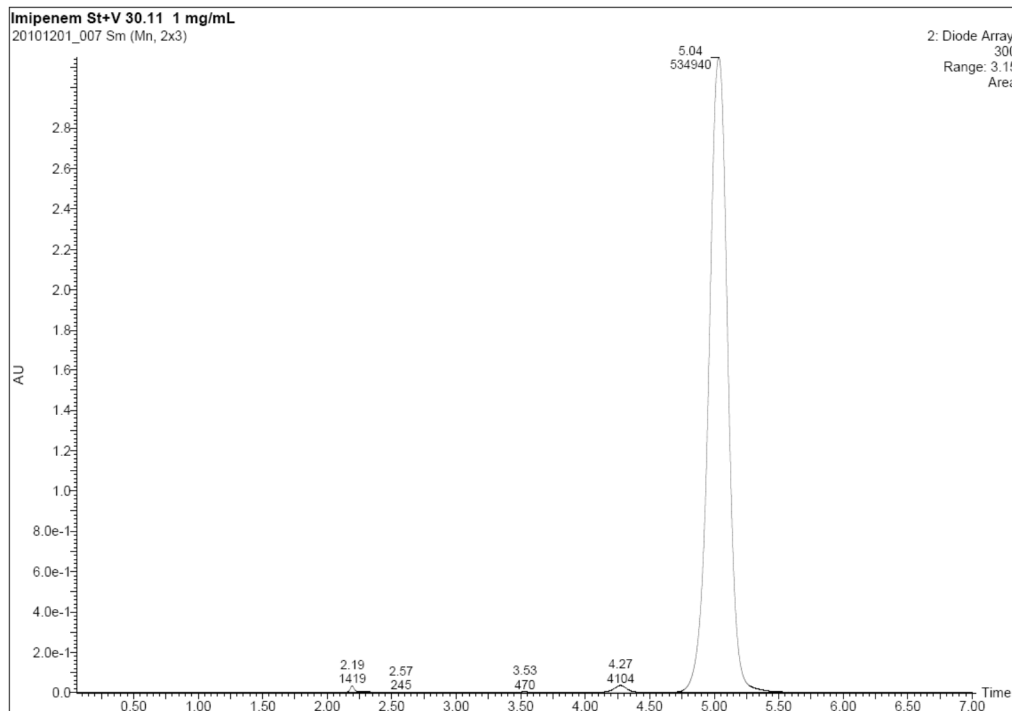


Abb. 33: HPLC-Chromatogramm von Imipenem 1 g  $\text{L}^{-1}$ . Detektion bei 300 nm mittels RP-HPLC (siehe Kapitel 2.4.3)

Wie der Abbildung 33 zu entnehmen ist, konnten bei einer Wellenlänge von 300 nm zwei Peaks ermittelt werden, die von Interesse sind. Der bei einer Retentionszeit von 5,04 min befindliche Peak ist das Ausgangsantibiotikum Imipenem. Bei einer Retentionszeit von 4,27 Minuten wurde ein unbekannter Peak erkennbar, der vermutlich Thienamycin sein könnte. Anhand der Massenspektrometrie konnte die Substanz durch folgende Diagramme beschrieben werden (Abbildung 34):

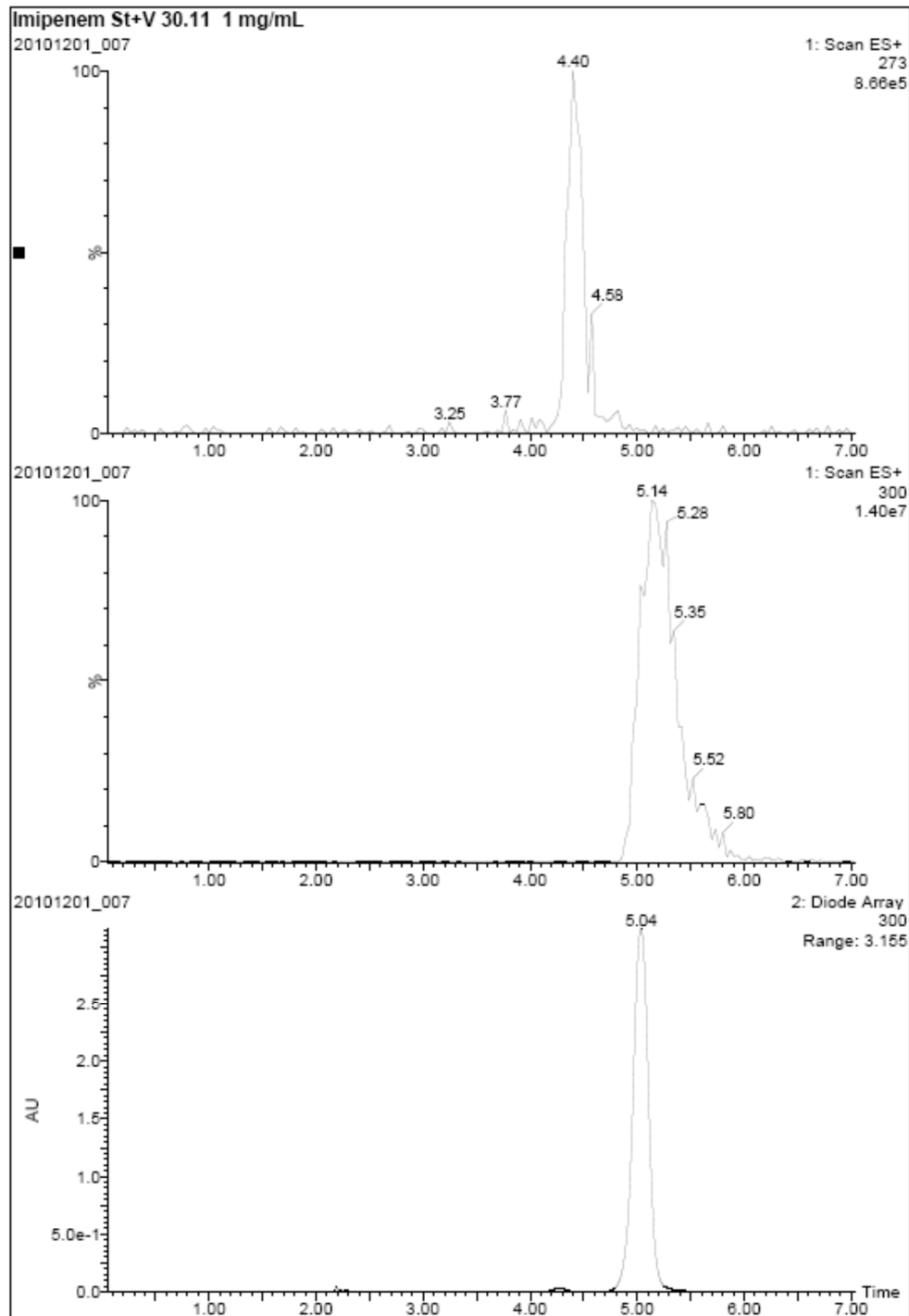


Abb. 34: Unten: Analytik der UV-Wellenlänge von  $1 \text{ g L}^{-1}$  Imipenem und Thienamycin bei 300 nm; Mitte: Massenspur bei einem m/z Verhältnis von 300 (Imipenem) und Oben: detektierte Massenspur bei einem m/z-Verhältnis von 273 (Thienamycin). Die Darstellungen erfolgen über die Retentionszeiten, die aufgrund der gekoppelten HPLC-MS sich leicht unterscheiden.

In den oberen Diagrammen der Abbildung 34 sind die Massenspuren zu sehen, wie sie vom Detektor der MS-Stufe gemessen wurden. Im unteren Diagramm ist das aus der HPLC-MS erhaltene Chromatogramm zu erkennen. Die höheren Retentionszeiten im Massenspektrometer im Vergleich zum reinen HPLC-Chromatogramm ergaben sich aus der Injektion und der Ionisierung der Analyten und sind zu vernachlässigen.

Die Software der HPLC-MS-Stufe ermöglichte eine weitere Auswertung der Peaks der Massenspuren (Abbildung 35). Dabei konnten die eingehenden Signale nach Masse/Ladungsverhältnis gefiltert werden (hier  $m/z$  273 und  $m/z$  300), so dass eine Betrachtung von  $m/z$  zur Retentionszeit möglich war.

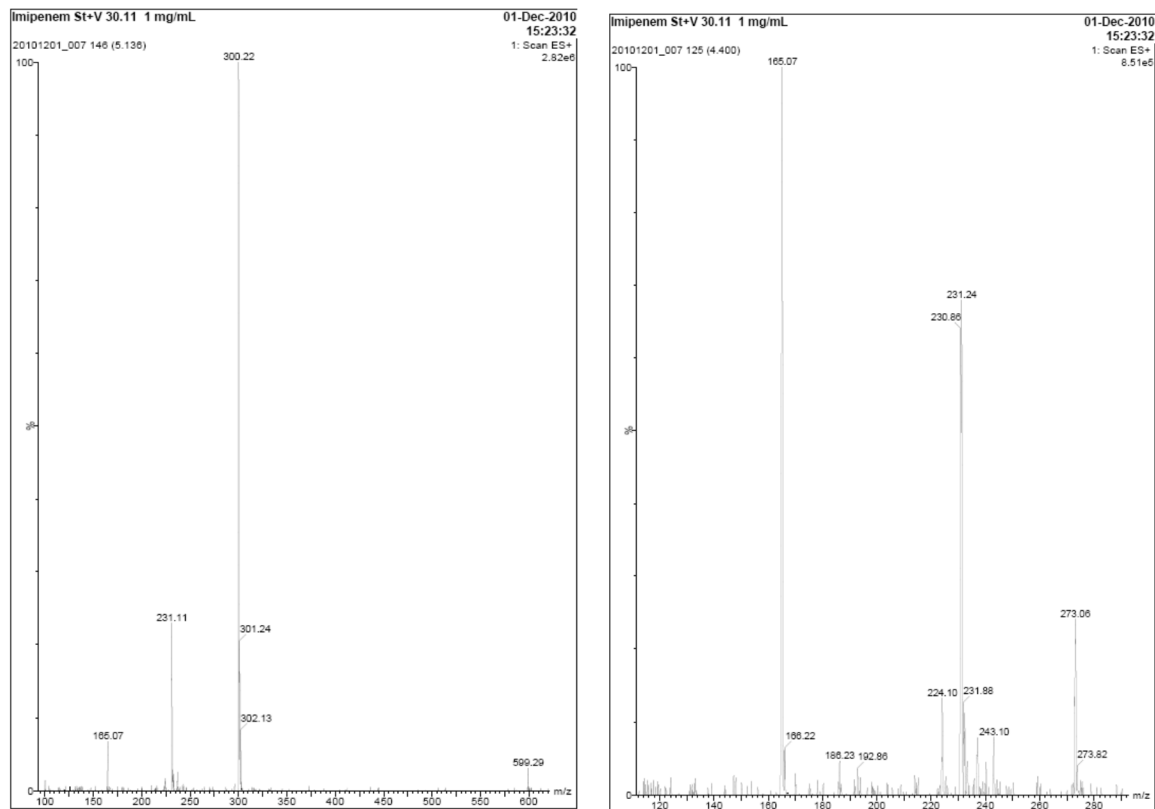


Abb. 35: Links: Massenspektrum von Imipenem (Retentionszeit von 5,14 min). Rechts: Massenspektrum bei einer Retentionszeit von 4,4 min (Thienamycin).

Im Massenspektrum von Imipenem ( $t_R$  5,14 min) (Abb. 35: Links) ist der Molekülpeak  $[M+H]^+$   $m/z$  300 am Größten. Die anderen Massen sind Adduktionen, wie sie häufig bei Elektrosprayionisation zu beobachten sind. Ein bekanntes Produkt war das Dimer, das einen Massenpeak  $m/z$  von 599 aufwies und zweifach positiv geladen war  $[2M+H]^+$ . Bei einem  $m/z$ -Verhältnis von 273 trat ein Peak auf, der eine Retentionszeit von 4,4 min besaß. Sowohl die Retentionszeit der Massenspektrometrie als der HPLC ließen darauf schließen, dass es sich hier nun mit großer Wahrscheinlichkeit um Thienamycin handelte. Im Massenspektrum von Thienamycin (Abb. 35: Rechts) war der Molekülpeak  $[M+H]^+$   $m/z$  273 nicht am Größten, welches sich durch die geringe Stabilität von Thienamycin erklären ließ. Hier führte die einfache Ionisierung dazu aus, dass sich viele unbekannte Adduktionen bildeten. Diese Ergebnisse unterstreichen die Literaturdaten, dass beim Zerfall von Imipenem Thienamycin entstand. Aufgrund des doch sehr kleinen Peaks bei 300 nm war die entstehende Thienamycinkonzentration nur sehr gering. Thienamycin besaß zudem eine geringere Stabilität als Imipenem, da die freie Aminogruppe die Stabilität reduzierte [86]. Eine wirtschaftliche Thienamycinbildung über den Zerfall von Imipenem wäre daher nicht möglich.

#### 2.7.4 Destabilisierung des Imipenems in wässrigen Lösungen bestehend aus Fermentationsmedienbestandteilen

Ziel des Experiments war es, die Hydrolyse des Imipenems in Abhängigkeit der einzelnen Medienbestandteile aufzuzeigen, die im Bioreaktor bei der Kultivierung der *Streptomyces* sp. eingesetzt wurden. Dazu wurden wässrige Lösungen angesetzt, die jeweils eine wie in der Kultivierung verwendete Konzentration eines Medienbestandteils (Tabelle 3) besaßen.

Tab. 3: Zusammensetzung und Konzentrationen des Hauptstufen-Komplexmediums (HST-1).

Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	Inhaltsstoff
80,00	Glycerin
25,80	Sojamin T 50 (7,7 % N)
7,60	Hefeextrakt (10 % N)
3,00	CaCO <sub>3</sub>
2,00	MgSO <sub>4</sub>
2,00	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Bevor das Antibiotikum der Lösung hinzugegeben wurde, wurde ein pH von 7 eingestellt, um einen pH-abhängigen Zerfall auszuschließen. Als Medienbestandteile wurden jeweils Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Glycerin, Calciumcarbonat und reines Wasser als Referenz verwendet. Die Komplexmedienbestandteile wie Hefeextrakt und Sojamehl wurden aufgrund der variierenden Zusammensetzungen ausgelassen. Die Versuche erfolgten bei 28 °C in einem Rotator in Doppelbestimmung. Die Berechnung der Geschwindigkeitskoeffizienten zur Ermittlung der verschiedenen Halbwertszeiten erfolgte mittels des Software-Tools KINETIK von der Hochschule Merseburg [54]. Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, wurden über einen Zeitraum von 60 Stunden folgende Verläufe der Imipenemkonzentrationen in reinem Wasser und wässrigen Lösungen von Glycerin und Magnesiumsulfat bestimmt.

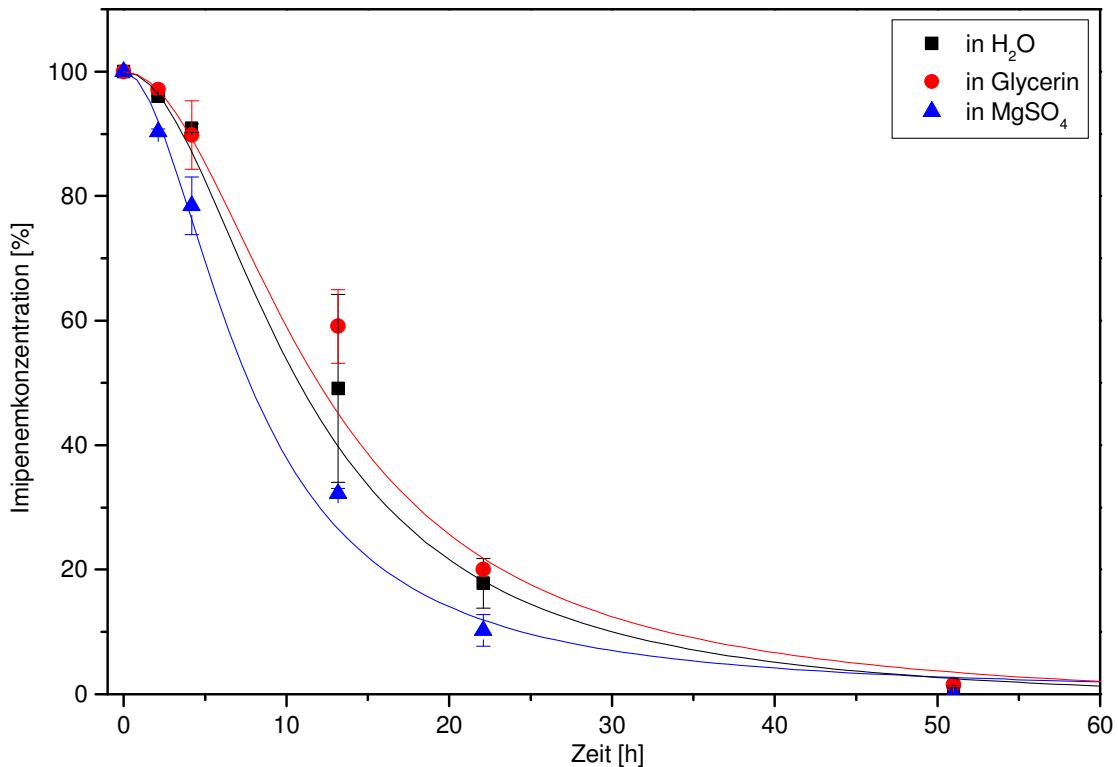


Abb. 36: Zerfall von Imipenem ( $300 \text{ mg L}^{-1}$  Initialkonzentration) in wässrigen Lösungen bestehend aus deionisiertem Wasser,  $80 \text{ g L}^{-1}$  Glycerin oder  $4,1 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ; Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7$ .

Wie aus der Abbildung 36 deutlich wird, entsprach der Zerfall des Imipenems in einer rein wässrigen Lösung, Glycerin und Magnesiumsulfat einer Reaktionskinetik 1. Ordnung: Die Abnahme der Imipenemkonzentration erfolgte in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration in der Lösung. In reinem Wasser konnte eine Halbwertszeit von 8,1 Stunden bestimmt werden. Im Gegensatz zum HPLC-Standard (Kapitel 2.7.1) schien die Zerfallsreaktion durch die höhere Konzentration als auch durch das Fehlen des MOPS-Puffers verstärkt worden zu sein. War Glycerin in Wasser gelöst, lag die Halbwertszeit von Imipenem bei 9,6 Stunden. Glycerin besaß demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Hydrolyse des Imipenems. Bei einer Magnesiumsulfat-haltigen Lösung betrug die Halbwertszeit 7,6 Stunden. Auch hier war keine signifikante Veränderung betreffend der Stabilität zu erkennen.

Betrachtet man die weiteren Zerfallskinetiken des Imipenems in Kaliumdihydrogenphosphat und Calciumcarbonat (Abbildung 37), so erkennt man eine deutliche Stabilitätssteigerung gegenüber Imipenem in reinem Wasser. In Calciumcarbonat konnte eine Halbwertszeit von 26,9 Stunden bestimmt werden, während  $300 \text{ mg L}^{-1}$  Imipenem in Kaliumdihydrogenphosphat eine Halbwertszeit von 29,5 Stunden besaß. Auch hier erfolgte eine konzentrationsabhängige Zerfallsreaktion, die jedoch langsamer verlief als in reinem Wasser.



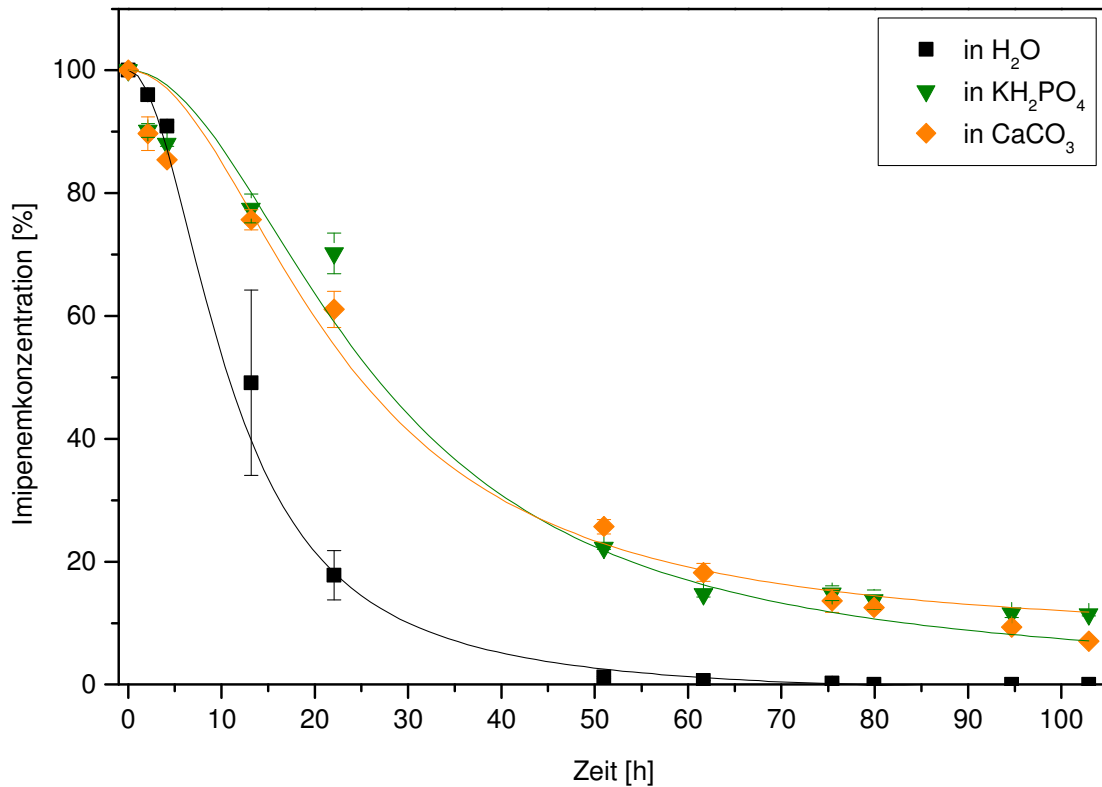


Abb. 37: Hydrolyse von Imipenem ( $300 \text{ mg L}^{-1}$  Initialkonzentration) in wässrigen Lösungen, Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 7$ ,  $2 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ,  $3 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$

Smith *et al.* beschrieben diesbezüglich, dass bei dem Zerfall von Imipenem zwei unterschiedliche Zerfallsreaktionen existieren [81]. Eine primäre, die durch die Hydrolyse eines Imipenemmoleküls beschrieben werden kann, und sekundäre Zerfallsreaktion, die zu einer Polymerisation mehrere Imipenemmoleküle führt. Diese Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit (Kapitel 2.7.1) verifiziert. Smith *et al.* nahmen auch an, dass die Polymerisation durch die Verwendung von Puffersubstanzen reduziert werden könnte, während die Hydrolyse auch bei gepufferten Lösungen nachzuweisen wäre [81]. Dabei waren vor allem die Initialkonzentrationen und das Verhältnis von Antibiotika zu Puffer für die Zerfallsgeschwindigkeit und -art entscheidend. Generell ist eine Stabilisierung auch mit diversen Puffern möglich [81; 87]. Ähnliche stabilisierende und destabilisierende Parameter wurden auch für Thienamycin beschrieben [29; 88]. Dabei führten Puffer, die primäre Amine enthalten, trotz konstantem pH-Wert zu einer Destabilisierung des Thienamycins. Eine Stabilisierung konnte daher nur durch „inaktive“ Puffer ermöglicht werden, bei denen ein nukleophiler Angriff auf den  $\beta$ -Lactamring ausgeschlossen war [29]. Eine Untersuchung von stabilisierenden Puffern wird daher durchgeführt und ist in Kapitel 2.7.8 beschrieben.

### 2.7.5 Destabilisierung des Imipenems im sterilen Medium

Nach der Ermittlung der Wechselwirkungen von Imipenem mit verschiedenen Medienbestandteilen wurde der Einfluss des sterilen Hauptstufenmediums (HST 1) unter Prozessbedingungen auf Imipenem untersucht. Dazu wurde das Hauptstufenmedium im Bioreaktor vorbereitet und autoklaviert, um Kontaminationen durch Fremdorganismen zu verhindern und das Medium durch die Hitzebehandlung den realen Bedingungen während der Kultivierung anzupassen. Die pH-Regelung erfolgte im Bioreaktor durch die Zugabe von Natronlauge und Schwefelsäure, um den pH bei 7 zu stabilisieren. In einem parallelen Ansatz wurde gleichzeitig zur Imipenemzugabe steriler MOPS-Puffer hinzu geführt, um die Stabilität des Imipenems im Fermentationsmedium zu erhöhen (Abbildung 38). Die Konzentration des MOPS-Puffers im Kulturmedium beträgt 0,1 M. Die Analytik der Imipenemkonzentration erfolgte aufgrund der hohen Ausgangskonzentration von  $300 \text{ mg L}^{-1}$  mittels HPLC.

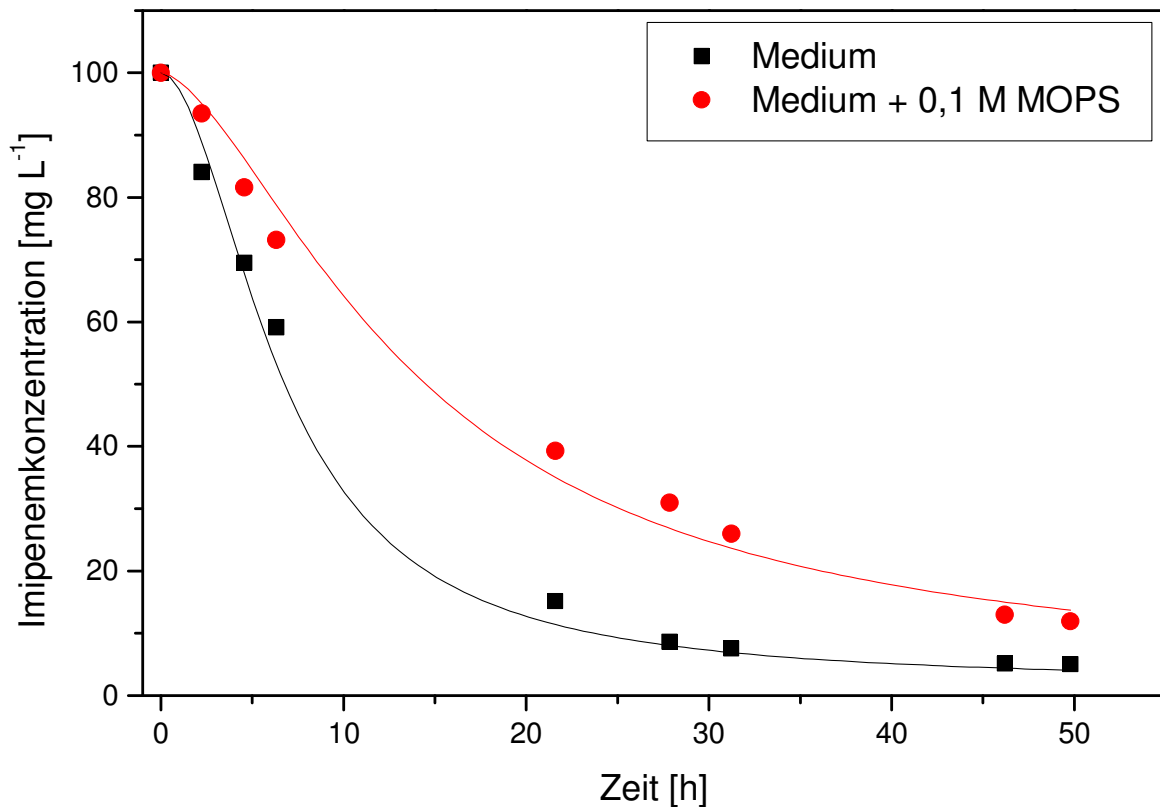


Abb. 38: Hydrolyse von Imipenem ( $300 \text{ mg L}^{-1}$  Initialkonzentration) im sterilen Hauptstufenmedium.  $T = 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 7$ , Scheibenrührer-Drehzahl 500 upm, Arbeitsvolumen 0,75 L, Begasung 1 vvm.

Im sterilen Fermentationsmedium lag die berechnete Halbwertszeit unter den vorliegenden Prozessbedingungen nur bei 9,6 Stunden. Dabei führten die Medienbestandteile zu einer signifikanten Erhöhung der Imipenem-Stabilisierung als das Imipenem in einer rein wässrigen Lösung (Kapitel 2.7.4). Wurde 0,1 M MOPS-Puffer hinzugegeben, blieb die Zerfallsreaktion konzentrationsabhängig, jedoch konnte die Zerfallsgeschwindigkeit um über 50 % auf 15,9 Stunden reduziert werden. Obwohl eine verbesserte pH-Stabilisierung durch die auto-

matische pH-Regelung des Bioreaktors und der Verwendung des stabilisierenden MOPS-Puffers erreicht wurde, entsprach der Kurvenverlauf nicht dem konzentrationsunabhängigen Kurvenverlauf der HPLC-Standards (Kapitel 2.7.1). Die Wechselwirkung des MOPS-Puffers zur vorliegenden Imipenemkonzentration schien den größten Einfluss auf die Zerfallskinetik zu besitzen. Höhere Konzentrationen an MOPS könnten zu anderen Ergebnissen führen, jedoch wäre die Verwendung von 1 M MOPS im Produktionsmaßstab mit hohen finanziellen Kosten verbunden und daher wirtschaftlich uninteressant.

### 2.7.6 Destabilisierung des Imipenems in zellfreien Überstandsprouben

Ein OA-6129-Antibiotikum unterliegt während einer Kultivierung neben den Wechselwirkungen mit Medienbestandteilen auch Wechselwirkungen mit extrazellulären oder Membran-Proteinen und den Zellen selbst. Wie bereits in Kapitel 2.6.3 angedeutet, könnten auch stammeigene  $\beta$ -Lactamasen zur Denaturierung der Antibiotika geführt haben, wie sie bei *Streptomyces* sp. CN229 bekannt sind [66]. Daher wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss extrazelluläre Proteine wie eventuell vorhandene  $\beta$ -Lactamasen auf die Stabilität von Imipenem besitzen. Eine Kultivierung wurde im Reaktor im Hauptstufenmedium unter Standardparametern gestartet, wobei Kulturproben zu bestimmten Zeitpunkten genommen wurden. Über einen Sterilfilter und einer angeschlossenen Vakuumpumpe wurden feste Medienbestandteile und Zellen vom Filtrat getrennt. Anschließend wurde das Kulturmedium in 50 mL-Reaktionsgefäße überführt, die mit Imipenem ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ) gespickt wurden. Die Stabilitätsmessung wurde bei  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  und im Rotationsschüttler fortgesetzt. Die Probenahme der Fermentation erfolgte während der Lag-Phase der Organismen, zu Beginn der  $p\text{O}_2$ -kritischen Phase und im Laufe der „Produktionsphase“ der Zellen (Abbildung 39). Die Proben wurden im Anschluss mittels HPLC analysiert.

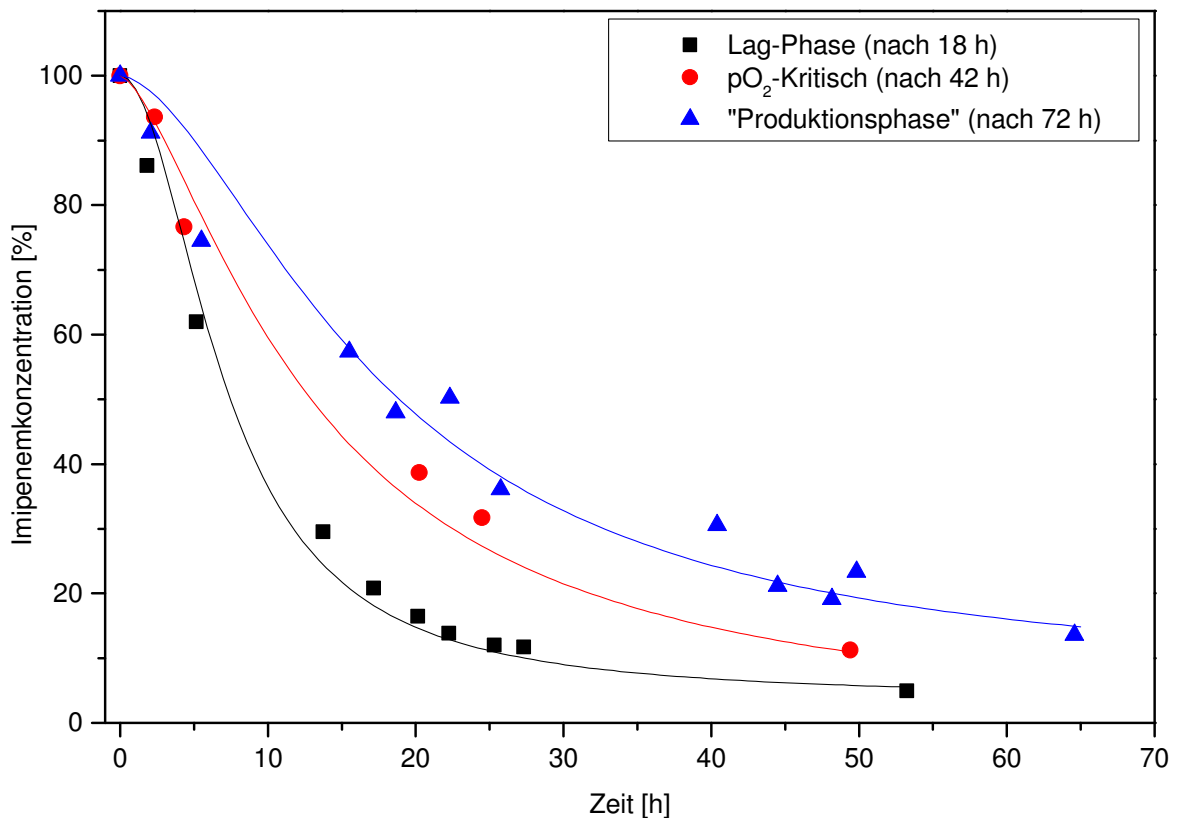


Abb. 39: Zerfall von  $300 \text{ mg L}^{-1}$  Imipenem im Hauptstufenmedium während der Lag-Phase (18. Stunde),  $p\text{O}_2$ -kritischen Phase (42. Stunde) und in der Produktionsphase des Antibiotikums (72. Stunde);  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Rotationsschüttler.

Wie der Abbildung 39 zu entnehmen ist, war die Zerfallsgeschwindigkeit von Imipenem abhängig von dem Kultivierungszeitpunkt der Probenahme. Während Imipenem einer hohen Destabilisierung in den ersten 18 Stunden der Kultivierung unterlag und zu diesem Zeitpunkt eine Halbwertszeit von nur 9,4 Stunden aufwies, wurde im Laufe des Prozesses die Destabilisierung reduziert. Daher konnte nach Anwachsen der Zellen, nach circa 42 Stunden, eine Imipenemhalbwertszeit von 15,6 Stunden nachgewiesen werden. Erreichte die Kultivierung den Zeitpunkt, in dem der Gelöstsauerstoff vollkommen aufgebraucht worden war, lag die Halbwertszeit von Imipenem in diesem Medium sogar bei 22,9 Stunden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem vorangegangenen Versuch im sterilen Medium, so führt das Medium der Lag-Phase zu einer analogen Destabilisierung des Imipenems wie das sterile Medium. Es ist anzunehmen, dass die im Medium befindlichen Feststoffe zur erhöhten Destabilisierung des Imipenems führten, solange die Bestandteile noch nicht von den Zellen zersetzt und aufgenommen wurden. Dass in der Produktionsphase eine höhere Imipenemstabilität erreicht werden konnte als im Vergleich zu reinem Wasser, lässt zwei weitere Hypothesen zu. Im Medium verblieben die Medienbestandteile, die Imipenem in wässriger Lösung stabilisieren, und/oder freigesetzte Proteine reduzieren den Imipenemzerfall. Extrazelluläre  $\beta$ -Lactamasen waren aufgrund der steigenden Halbwertszeit wahrscheinlich nicht vorhanden oder würden erst bei Kontakt mit Imipenem durch die Zellen gebildet. So wird beispielsweise bei *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas aeruginosa* durch Imipenem im Kulturmedium die

$\beta$ -Lactamasen-Bildung induziert [89]. In der vorliegenden Studie war der Überstand über die gesamte Prozesszeit zellfrei.

### 2.7.7 Destabilisierung des Imipenems im laufenden Fermentationsprozess

Antibiotika, wie die  $\beta$ -Lactame, unterliegen im gesamten Fermentationsprozess unterschiedlichen Wechselwirkungen. Neben denen aus Kapitel 2.7.5 und Kapitel 2.7.6 dargestellten Wechselwirkungen zwischen Antibiotikum und den Medienbestandteilen, könnte auch die vorliegende Zellkonzentration einen hohen Einfluss auf die Stabilität des Antibiotikums besitzen haben. Die in der Zellmembran befindlichen Transpeptidasen könnten durch das, von den Zellen produzierte, Antibiotika gehemmt worden, und somit die Zellsynthese, die  $\beta$ -Lactam-Stabilität als auch die Produktbildung reprimiert haben. Um die Wechselwirkung zwischen Imipenem als OA- $\beta$ -Lactam-Analogon am Produktionsstamm zu analysieren, wurden daher die Zerfallsraten von 300 und 30  $\text{mg L}^{-1}$  Imipenem im Kulturmedium untersucht, die zum Zeitpunkt der eigentlichen OA-Derivatbildung dem Arbeitsvolumen hinzugegeben wurden (Abbildung 40 und 41). Von Versuchen mit geringeren Imipenemkonzentrationen wurde aufgrund einer möglichen gleichzeitigen Produktbildung der OA-Derivate abgesehen.

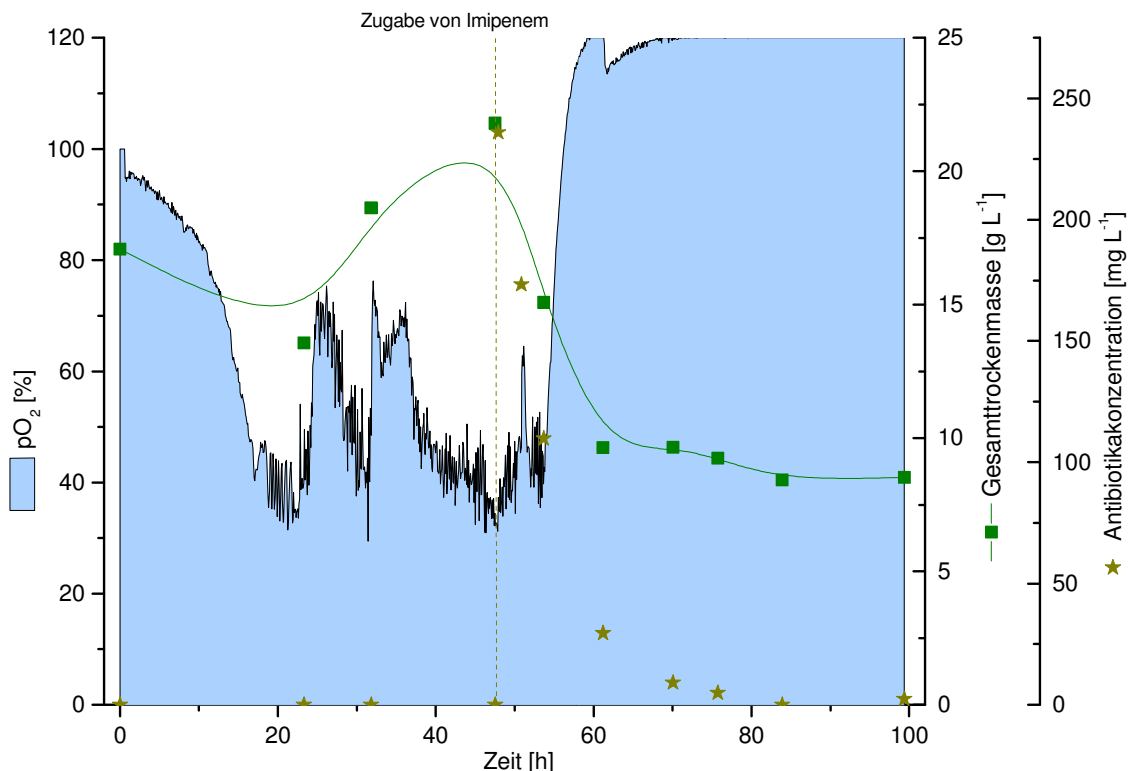


Abb. 40: Hauptstufenfermentation im HST-2S-Medium. Prozessparameter:  $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 %  $\text{pO}_2$ ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Zugabe von  $300\text{ mg L}^{-1}$  Imipenem nach einer Prozessdauer von 48 Stunden. Prozessbetrachtung anhand der Gesamt trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $\text{pO}_2$ ), und der Antibiotikakonzentration.

Die Zugabe von  $300 \text{ mg L}^{-1}$  Imipenem nach einer Kultivierungszeit von 48 Stunden führte zu einem Absterben der Zellen innerhalb der folgenden 10 Prozessstunden, wie man anhand der Gesamttrockenmasse und der Gelöstsauerstoffkonzentration in Abbildung 38 erkennen kann. Unter dem Mikroskop wurde eine Fragmentierung des Streptomyceszellnetzwerkes deutlich, was vermutlich auf der Wechselwirkung zwischen Imipenem und den Transpeptidasen der Zellen beruhte, wie sie bei *E. coli* bekannt sind [90]. Dass der  $\text{pO}_2$ -Wert final über der Ausgangsgelöstsauerstoffkonzentration lag, war auf die niedrigere Salzkonzentration im Medium sowie auf die finale Rührergeschwindigkeit zurückzuführen, die zu diesem Zeitpunkt höher waren als zu Beginn des Prozesses. Die Imipenemhalbwertszeit betrug ab dem Zeitpunkt der Zugabe 4,8 Stunden. Parallel zu diesem Prozess wurde einer weiteren Kultivierung  $30 \text{ mg L}^{-1}$  Imipenem hinzugegeben (Abbildung 41).

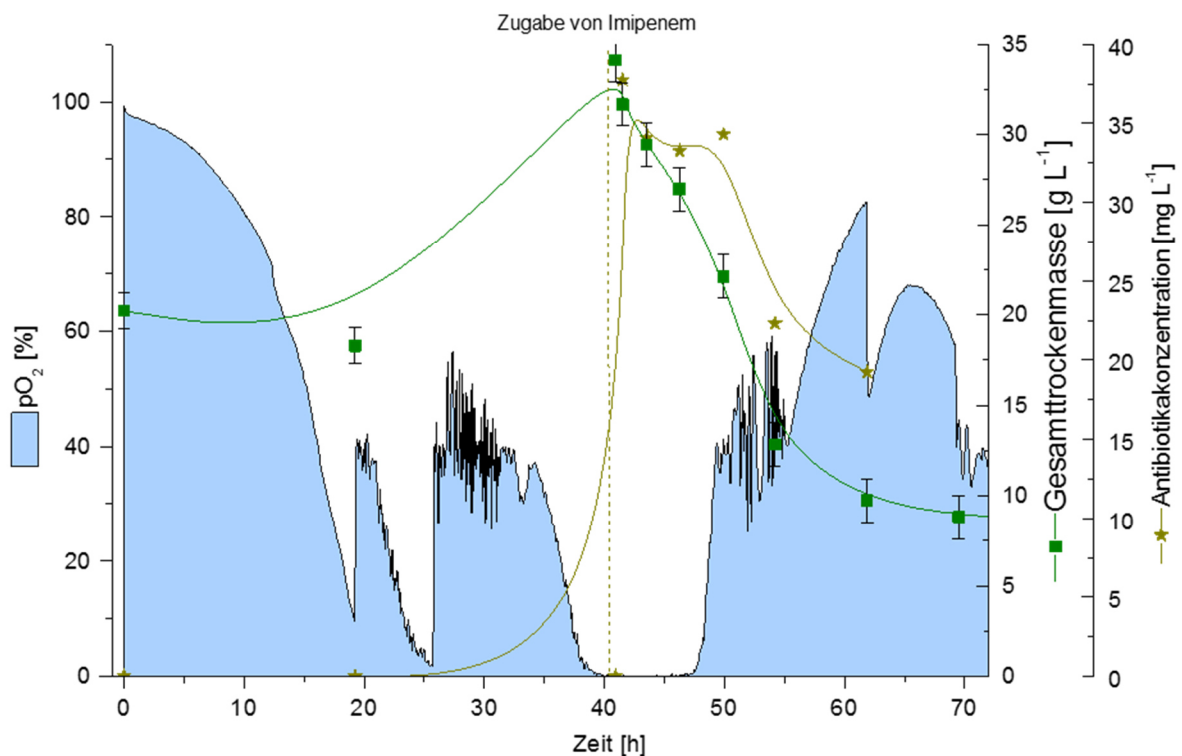


Abb. 41: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium. Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert  $40 \text{ } \%$   $\text{pO}_2$ ),  $\text{pH } 7$ , Begasung mit Luft ( $1 \text{ vvm}$ ). Zugabe von  $30 \text{ mg L}^{-1}$  Imipenem nach einer Prozessdauer von 40 Stunden. Prozessbetrachtung anhand der Trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $\text{pO}_2$ ), und der Antibiotikakonzentration.

Betrachtet man den in Abbildung 41 dargestellten Kultivierungsverlauf, so wurde auch hier ein direkter Zusammenhang zwischen Zugabe und Abnahme der Gesamttrockenmasse deutlich. Die Stabilität des Imipenems zeigte eine Halbwertszeit von  $20,2 \text{ Stunden}$  und machte den konzentrationsabhängigen Zerfall gegenüber  $300 \text{ mg}$  Imipenem deutlich. Die Gelöstsauerstoffkonzentration stieg im Vergleich zu dem vorherigen Versuch nicht auf die Aus-

gangskonzentration, sondern blieb im Bereich einer mikrobiellen Umsetzung des Gelöstsauerstoffs. Im Mikroskop wurden zu diesem Zeitpunkt viele einzelne Zellen erkennbar, jedoch konnten auch Myceliumzellen wiedergefunden werden. Diese Mycelia erschienen im Mikroskop als weniger kompakt, als vor der Zugabe des Imipenems (siehe Abbildung 42 links und rechts). Zudem war das Medium weniger intensiv von freiem Hyphen durchzogen, nachdem Imipenem zugegeben wurde. In Abbildung 42 wird dies durch den „Grauschleier“ des Mediums deutlich, der nach der Zugabe verschwand. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund ihrer komplexen Struktur das Antibiotikum weniger intensiv die Myceliumzellen schädigen konnte, als dies bei den freiliegenden Hyphen möglich war. Der Zellstoffwechsel könnte in diesem Fall erhalten geblieben worden sein und die Gelöstsauerstoffkonzentration erklären.

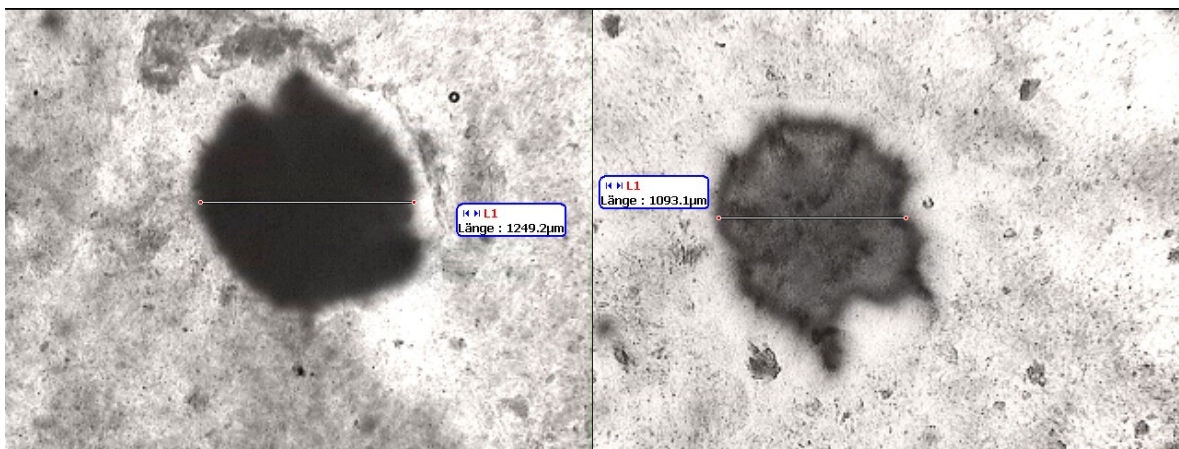


Abb. 42: Lichtmikroskopische Aufnahmen des Kulturmediums (100fache Vergrößerung) Links: Mycelium im von Hyphen durchzogenen Kulturmedium vor Zugabe von 30 mg Imipenem. Rechts: Mycelium im von Hyphen durchzogenen Kulturmedium 5 Stunden nach Zugabe von 30 mg Imipenem.

Wie aus beiden Abbildungen (40 und 41) deutlich wird, war eine hohe Konzentration an Imipenem sowohl für die Zellsynthese als auch für die Stabilität des Antibiotikums an sich problematisch. Hohe Konzentrationen führten zu einem konzentrationsabhängigen Zerfall und damit zu geringen Halbwertszeiten von Imipenem im Medium. Aufgrund des mangelnden Zugangs zu reinen Standards der OA-6129-Antibiotikas war ein direkter Vergleich von Imipenem und OA-Derivate nicht möglich, weshalb keine direkte Aussage über die Inhibition der Zellen durch die zelleigenen Produkte getroffen werden konnte. Geht man von einer gleichen Wechselwirkung zwischen den Antibiotika aus, wäre auch eine Antibiotika-instabile Zellkultur möglich. Diesbezüglich berichteten Roth *et al.*, dass während der kontinuierlichen Kultivierung von *Streptomyces hygroscopicus* zur Produktion von Turimycin undifferenzierte Zellen auftraten, die im Vergleich zu den restlichen Zellen nur sehr geringe Konzentrationen von Turimycin ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) produzieren und bereits durch geringere Turimycinkonzentrationen inhibiert werden konnten [91]. Auch betreffend des Wachstums und der Morphologie unterschied sich diese neue *Streptomyces hygroscopicus*-Kultur von den Zellen des Parentalstammes. Durch eine Analytik der Zellmembran konnte nachgewiesen werden, dass der vor

hohen Antibiotikakonzentrationen schützende Zellmechanismus, der die Permeabilität der Zellmembran reguliert, beim neuen Zelltyp inaktiv war. Roth *et al.* schlussfolgerten, dass diese Veränderungen nicht auf eine einzelne Mutation zurückzuführen seien, sondern durch einen pleiotropen Effekt hervorgerufen würden, da die Biosynthese trotz mangelnder Produktivität nachweisbar war. Da jedoch keine Erklärung gegeben wurde, wie diese Zellveränderung auftreten konnte, muss angenommen werden, dass es sich hierbei um eine Alterung des Stammes oder eine Beeinflussung der genetischen Stabilität durch den Lagerungsprozess handelte. Ob dieser pleiotrope Effekt auch bei *Streptomyces fulvoviridis* A933 17M9 1501 aufgetreten sein könnte, wäre durch eine Behandlung der Zellen mit den Produktantibiotika nachzuweisen. Dies würde dann die geringe Stabilität der Zellen als auch die geringe Produktivität klären.

### 2.7.8 Stabilisierung von Imipenem in wässriger Lösung

Nachdem die Destabilisierung von Imipenem im Medium und in wässrigen Lösungen aufgezeigt wurde, war eine Stabilisierung des Antibiotikums zielführend. Daher wurde als Referenzsystem die Hydrolyse in destilliertem Wasser bei pH 7,0 (Abbildung 43) über einen Zeitraum von 270 h bei Raumtemperatur untersucht. Beim Zerfall des Imipenems wurde eine konzentrationsabhängige Abbaukinetik (1. Ordnung) deutlich. Die ermittelte Halbwertszeit lag bei 29,9 h für eine Ausgangskonzentration von  $50 \text{ mg L}^{-1}$  an Imipenem. Sie diene als Referenzwert für die weiteren Untersuchungen zur Imipenemstabilisierung durch Additive.



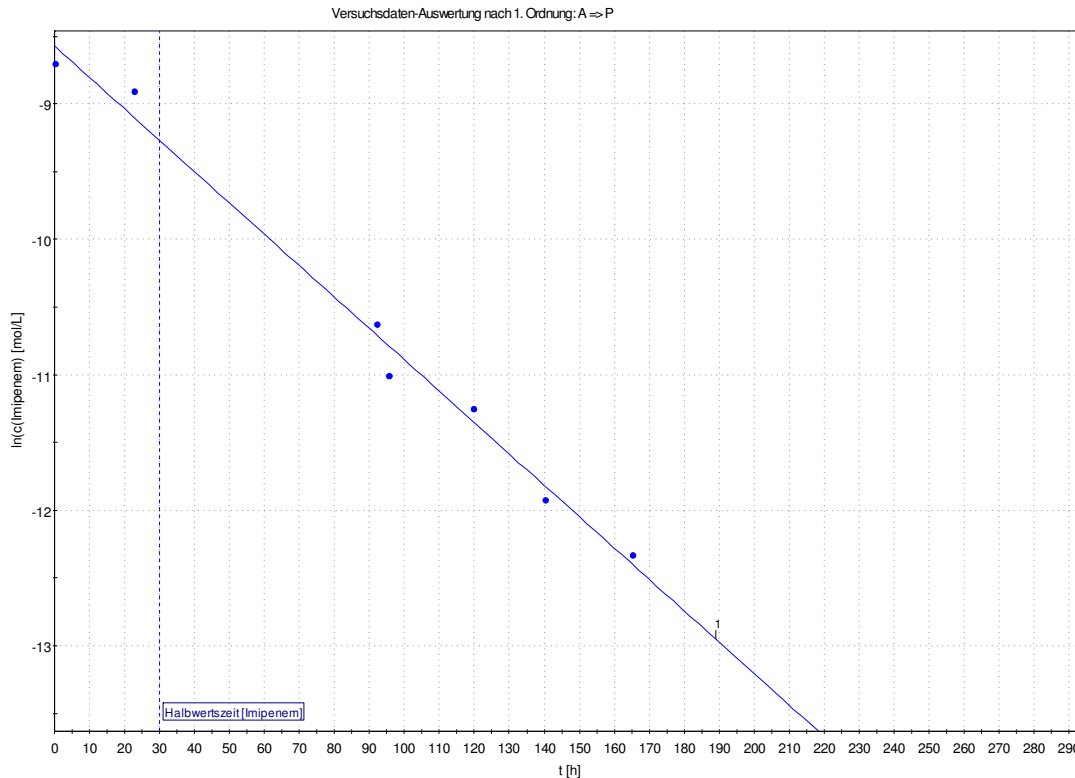


Abb. 43: Logarithmische Darstellung des Konzentrationsverlaufes von 50 mg (0,17 mM) Imipenem in Wasser bei pH 7,0 und RT. Konzentrationsbestimmung mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Die grafische Auswertung erfolgte durch die Software KINETIK, HS-Merseburg [54]. Halbwertszeit bei 29,92 h,  $R^2 = 0,99$ .

Aufgrund der hohen Zerfallsrate der verschiedenenkonzentrierten Imipenem-Stammlösungen und der Stabilisierung der HPLC-Standards durch 0,006 M MOPS-Puffer wurde näher untersucht, ob durch Puffersubstanzen ein Stabilisierungseffekt hervorgerufen werden konnte. Ähnliche Puffersubstanzen wie MOPS könnten bei der Kultivierung dem Medium hinzugegeben werden, um eine Stabilität des Imipenems bzw. des Zielantibiotikums in wässriger Lösung möglichst lange zu gewährleisten. Auch in der Literatur waren einige Puffersubstanzen beschrieben, die bei  $\beta$ -Lactame zur Erhöhung der Stabilität beitrugen: 1979 beschrieben Kahan *et al.*, dass die Halbwertszeit von dem strukturverwandten Thienamycin durch Zugabe von Morpholinoderivaten wie 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) und 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) auf 210 bzw. 144 h im Gegensatz zu einer Kaliumphosphat-Lösung (0,3 h) erhöht werden konnte [29]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Zerfall zunächst in Lösungen mit Morpholinoderivaten (MES, MOPS und 4-(N-Morpholino)butansulfonsäure (MOBS)) näher untersucht. In der folgenden Abbildung 44 wird der Zerfall von Imipenem in MES-Lösungen untersucht.

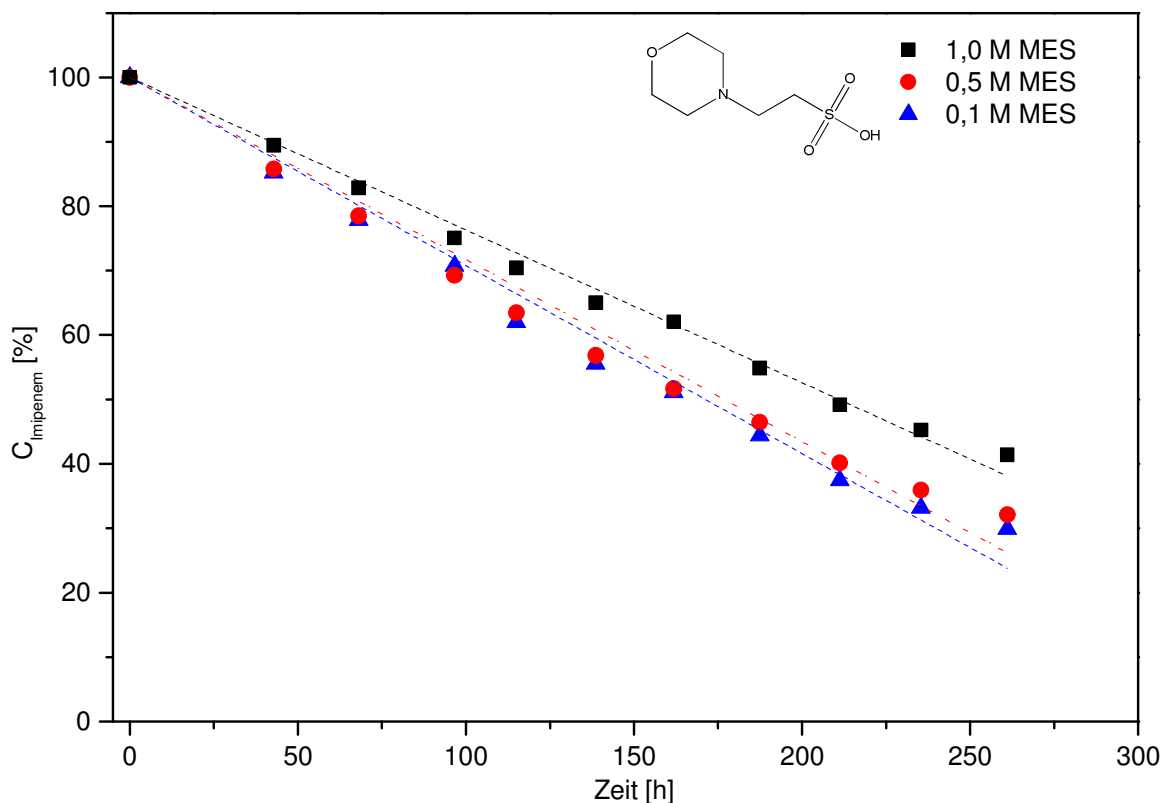


Abb. 44: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäurelösung bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Aufgrund des besseren Vergleichs wurden alle Konzentrationen normiert.

Wie aus Abbildung 44 zu entnehmen ist, nahm die Imipenemkonzentration in MES konstant jedoch konzentrationsunabhängig ab. Die Stabilität des Imipenems war demnach gleichzeitig abhängig von der MES-Konzentration im Wasser. In 1,0 M MES lag eine Halbwertszeit von Imipenem bei 205,0 h, was den Literaturwerten von Kahan entsprach, auch wenn die hier verwendete Ausgangskonzentration an 50 mg L<sup>-1</sup> Imipenem circa drei Mal höher war, als die Thienamycinkonzentration in der Literatur. Selbst die Halbwertszeiten in 0,1 M bzw. 0,5 M MES waren mit 158,6 h bzw. 166,9 h mehr als drei Mal höher als in reinem Wasser.

Durch das Verwenden des MOPS-Puffers konnte bei pH 8 folgende Zerfallsreaktionen von detektiert werden (Abbildung 45).

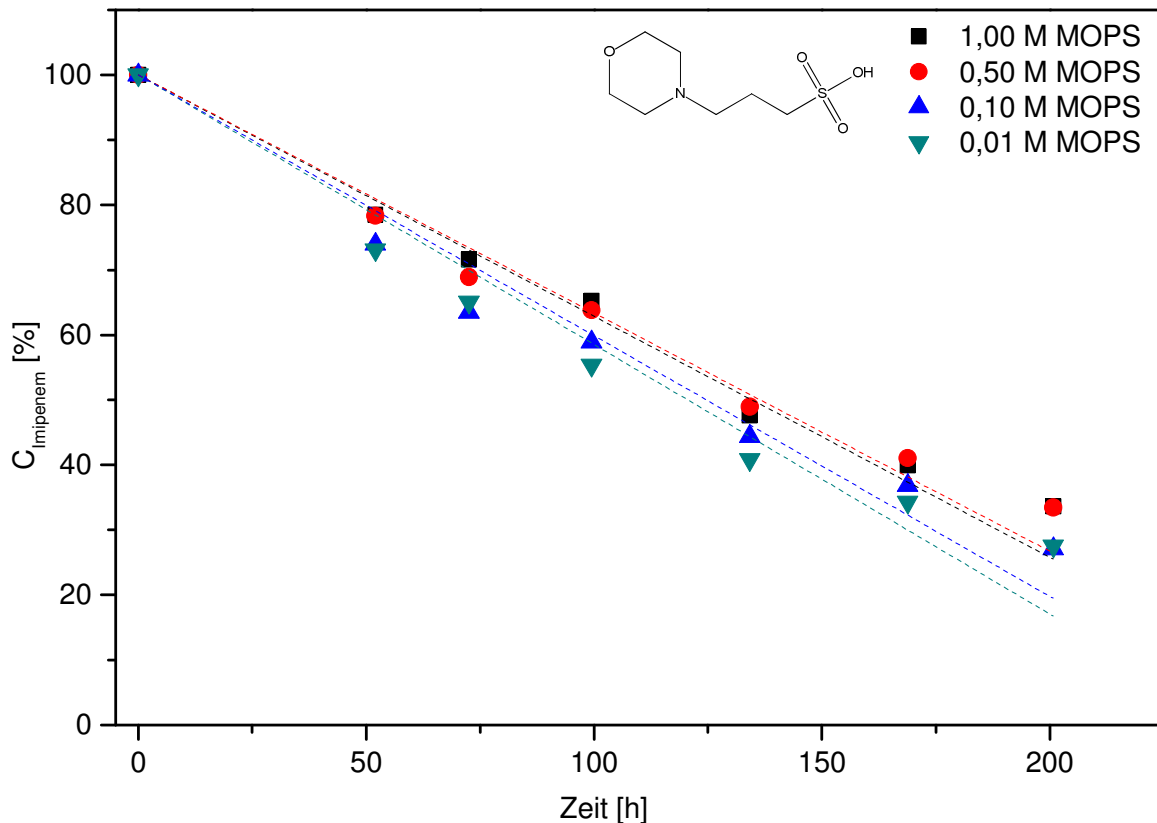


Abb. 45: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 3-(N-Morpholino)propansulfonsäurelösung bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert.

Hier konnten die Literaturwerte von Thienamycin mit einer Halbwertszeit von 144 h in 0,01 M MOPS nicht ganz erreicht werden und lagen stattdessen bei 105,5 h. In 0,1 M MOPS-Lösung betrug die Halbwertszeit 110,2 h. Eine Steigerung der Halbwertszeit konnte durch die Konzentrationserhöhung an MOPS auch in diesem Ansatz erreicht werden, wenngleich keine signifikant höhere Stabilität erzielt wurde. Bei einer 0,5 M MOPS-Lösung lag die Stabilität bei 123,1 h gegenüber der 1 M MOPS-Lösung bei 121,5 h.

Das nicht hydroxyliertes Morpholinoderivat 4-(N-Morpholino)butansulfonsäure (MOBS) wurde in Abbildung 46 verwendet. Hier lagen die Halbwertszeiten bei 355,1 h bei 1 M MOBS und 258,1 h bei 0,5 M MOBS. Der Kurvenverlauf verlief nach Nullter Ordnung. Im Gegensatz dazu war der Zerfall von Imipenem in 0,1 M MOBS-Lösung konzentrationsabhängig. Die daraus resultierende Halbwertszeit lag bei 113,03 h. Der Konzentrationseinfluss von 4-(N-Morpholino)butansulfonsäure war in dieser Studie signifikant. Höhere Konzentrationen an MOBS wären aufgrund der Löslichkeit nicht zu erreichen.

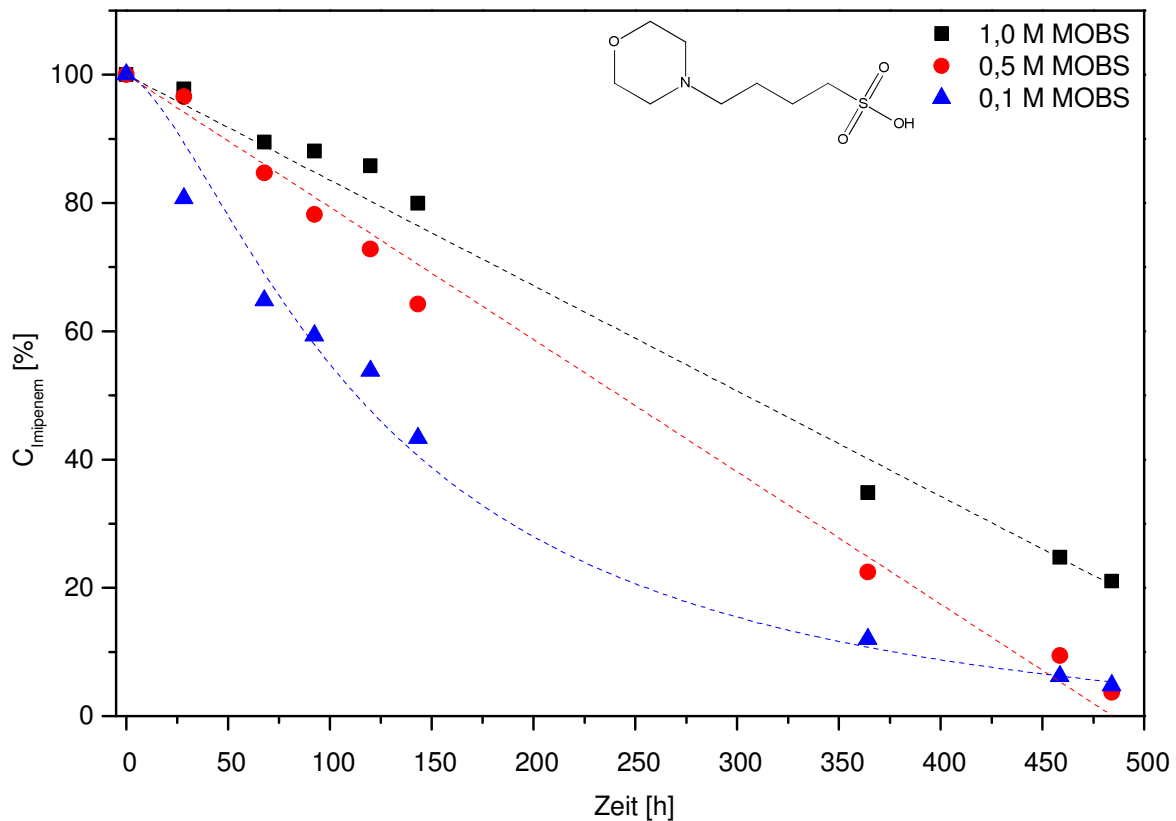


Abb. 46: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 4-(N-Morpholino) butansulfonsäurelösung bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert.

Eine Steigerung der Halbwertszeit des Imipenems konnte durch Zugabe von Morpholinosulfonsäuren im Vergleich zu einer reinen wässrigen Lösung erreicht werden. Um zu prüfen, welche Molekülstruktur nun einen stabilisierenden Einfluss auf das Antibiotikum besaß, wurden weitere strukturanaloge Derivate eingesetzt, welche die Imipenemstabilität verbessern sollten. Dabei wurde der pH-Wert für alle zu überprüfenden Substanzen bei pH 7 gehalten. Puffersubstanzen, die primäre Amine enthielten, wie Glycylglycin oder TRIS, waren bekannt dafür, den  $\beta$ -Lactamring zu destabilisieren [29]. Daher wurden Sulfonsäurederivate, wie 3-(N-Morpholino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure (MOPSO), 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) und N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES) ausgewählt, die nur sekundäre oder tertiäre Amine enthielten und Strukturähnlichkeiten zu den Morpholinoderivaten besaßen.

Im Gegensatz zu MOPS wurde bei 3-(N-Morpholino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure (MOPSO) die unpolare Kohlenstoffkette durch Integration eines Hydroxymoleküls polarisiert. Betrachtet man die dazugehörigen Zerfallsreaktionen von Imipenem Abbildung 47, so erkennt man einen konzentrationsabhängigen Zerfall. Bei hohen MOPSO-Konzentrationen nahmen die Halbwertszeiten von 17,2 Stunden (1,0 M MOPSO) bzw. 25,5 Stunden (0,5 M MOPSO)

ab, sodass diese Zerfallsreaktionen schneller verliefen, als in deionisiertem Wasser. Erst bei niedrigen Konzentrationen stieg die Halbwertszeit von Imipenem auf 68,0 Stunden an.

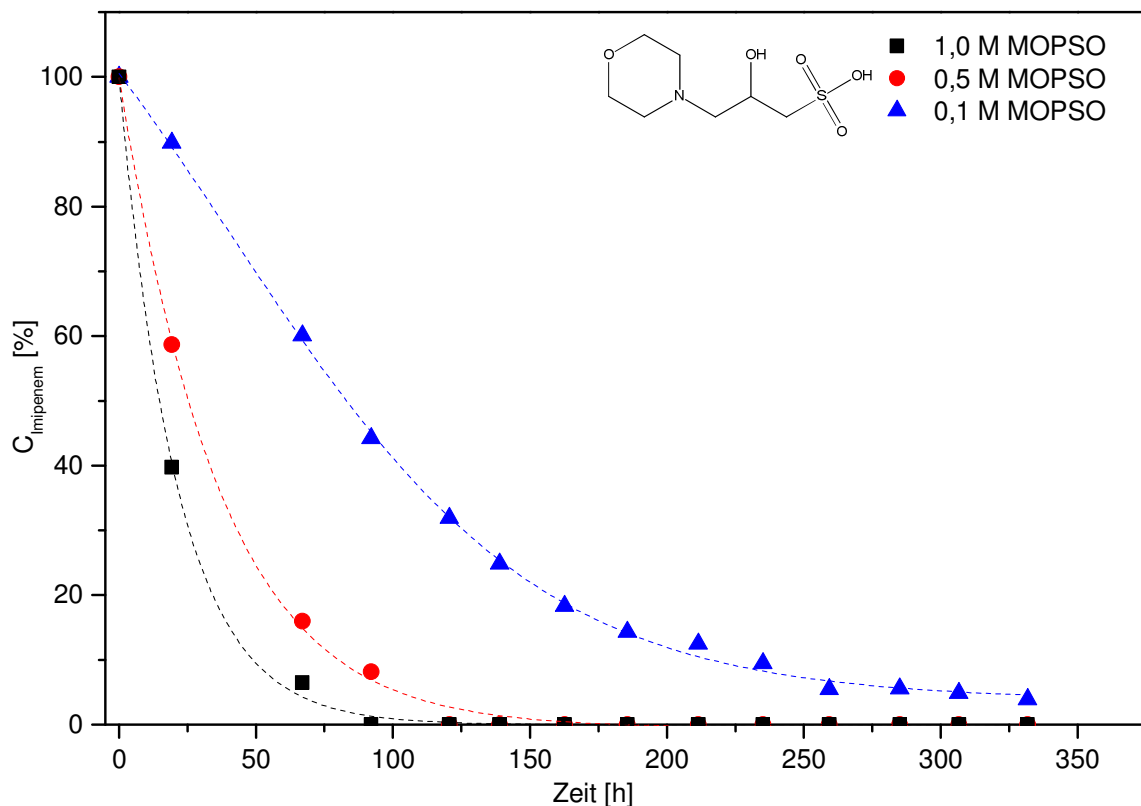


Abb. 47: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 3-(N-Morpholino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure (MOPSO) bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert.

Da mit zunehmenden Imipenemkonzentrationen die Halbwertszeit abnahm, könnte es bei höheren MOPSO-Konzentrationen zu MOPSO-MOPSO-Molekülinteraktionen gekommen sein, die eine Interaktion mit Imipenem ausschließen. Dies würde eine Aufkonzentrierung der Imipenemmoleküle im wässrigen Milieu bedeuten, was in einer schnelleren Destabilisierung resultierte. Bei geringer MOPSO-Konzentration traten vermutlich weniger MOPSO-MOPSO-Wechselwirkungen auf, sodass Imipenemmoleküle auch von MOPSO-Molekülen umgeben waren, weshalb eine rein Imipenem-abhängige Destabilisierung weniger intensiv auftrat. Jedoch war dies ohne weiterführende Untersuchungen nur eine Annahme. Entscheidend war, dass eine Polarisierung der Kohlenstoffkette des Morpholino-Derivats zu einer Reduzierung der Imipenemhalbwertszeit führte.

In einem weiteren Ansatz wurde 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) als Puffersubstanz gewählt. Hierbei war der Morpholinoring durch ein Stickstoffmolekül und eine angehängte Hydroxyethyl-Seitenkette erweitert. Der Konzentrationsverlauf ist in Abbildung 48 zu sehen.

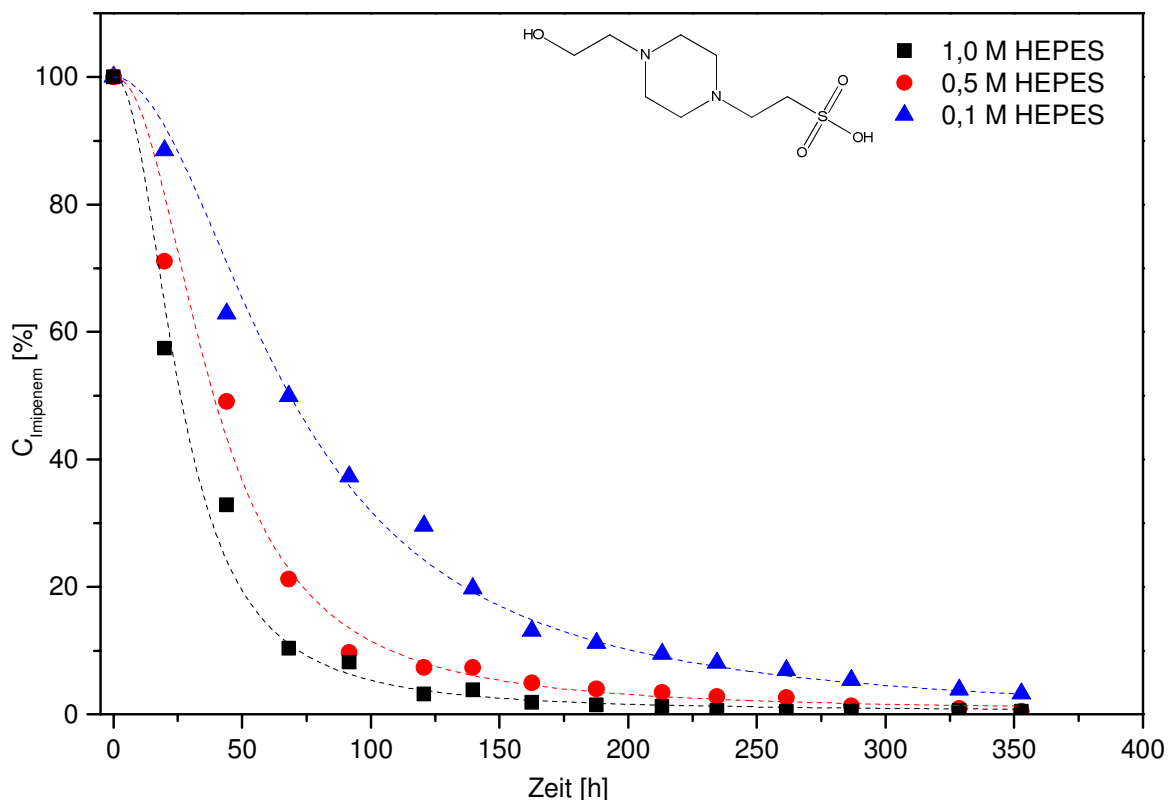


Abb. 48 Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert.

Die Auswertung des Zerfalls von Imipenem in HEPES ergab Halbwertszeiten von Imipenem von 40 bis 75 h, je höher dabei die HEPES-Konzentration war, desto schneller war die Zerfallsreaktion erster Ordnung. Eine signifikante Steigerung der Halbwertszeit gegenüber Imipenem in deionisiertem Wasser konnte mittels HEPES nicht realisiert werden. Wie bei dem Versuch mit dem MOPSO-Puffer könnten Interaktionen zwischen den Puffermolekülen die Imipenemdestabilisierung hervorgerufen haben.

Als letzte zu untersuchende Puffersubstanz wurde ein Zerfall in N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES) untersucht (Abbildung 49). Im Unterschied zu MOPS befand sich der tertiäre Stickstoff aus der Ringstruktur als sekundärer Stickstoff in der Kohlenstoffkette und der Morpholinring besaß keinen Sauerstoff. Die Löslichkeit lag bei CHES bei 20 °C bei 0,5 M, weshalb nur Untersuchungen in 0,5 bzw. 0,1 M CHES erfolgen konnten.

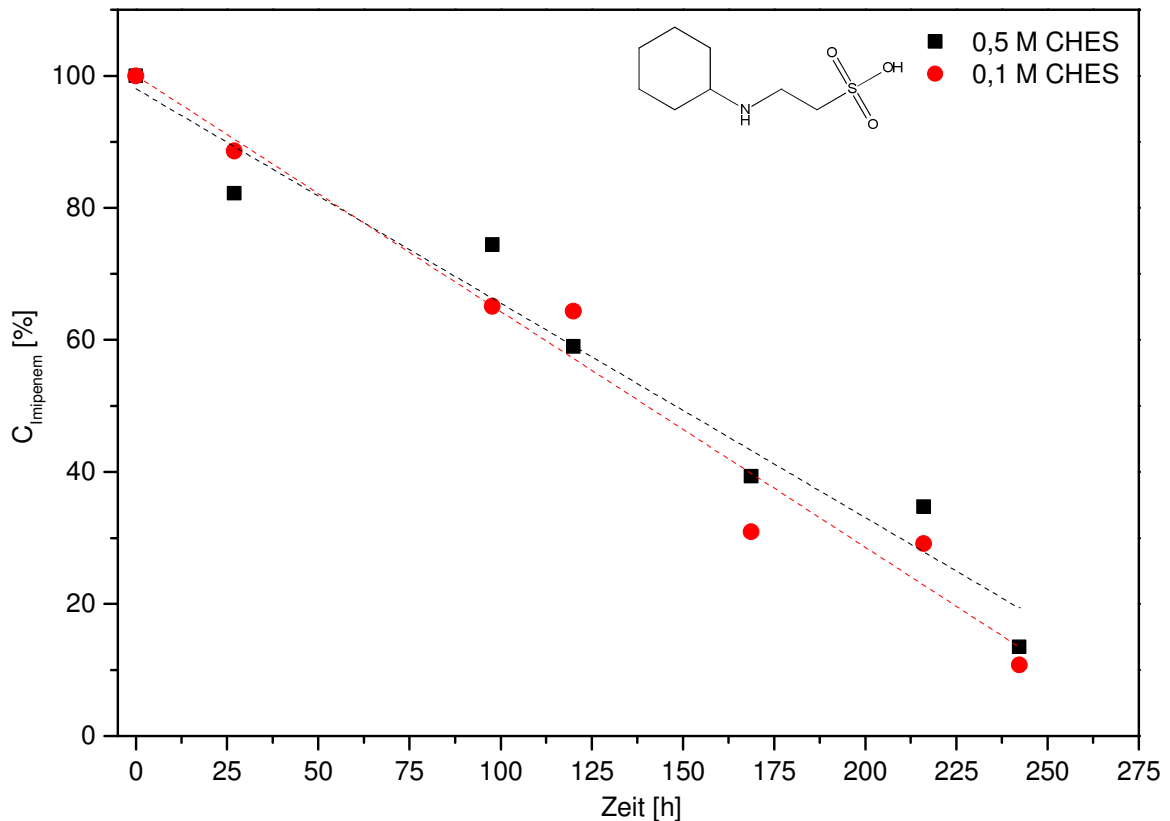


Abb. 49: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 0,5 M und 0,1 M N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES) bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert.

Wie anhand der Abbildung 49 zu erkennen ist, verhielt sich die Abbaureaktion für Imipenem in beiden CHES-Konzentrationen fast identisch. Die Halbwertszeit lag bei 131,5 h in 0,1 M CHES und bei 137,5 h in 0,5 M CHES. Die Abbaukinetik war 0. Ordnung und somit von der vorliegenden Imipenemkonzentration unabhängig.

Eine, allein auf eine pH-Wert basierende, Stabilisierung konnte durch die drei Puffer mit den höchsten Halbwertszeiten nahezu ausgeschlossen werden. Zwar wurde der pH in allen Suspensionen auf pH 7 eingestellt, die Puffersubstanzen besaßen aber unterschiedliche  $pK_S$ -Werte von 7,6 (MOBS), 6,15 (MES) und von 9,3 (CHES). Aufgrund der ähnlichen Halbwertszeiten von CHES und MOPS war anzunehmen, dass die Pufferstruktur an sich relevant bei der Imipenem-Stabilisierung war. So förderte der Abstand zwischen Ringstruktur und Sulfonsäure als auch die Ausrichtung der Sulfonsäure die Stabilität. Hingegen führten Restgruppen, wie die Hydroxylgruppen bei HEPES oder MOPSO, zu einer Destabilisierung von Imipenem.

### 2.7.9 Synopse

Neben einer möglichst hohen Antibiotika-Bildungsrate der Fermentationskultur war auch die Stabilität des Produkts im wässrigen Milieu von Interesse. Dies betreffend wurden Untersuchungen mittels des Referenzantibiotikums Imipenem durchgeführt, da die zu produzierenden OA-Derivate nicht als Reinsubstanz und in ausreichender Menge verfügbar waren. Daher wurden unterschiedliche Imipenemlösungen bei pH 7 bereitgestellt, die mittels der etablierten HPLC- und HPLC-MS-Analytik untersucht wurden. Identisch zum Thienamycin wurde auch für Imipenem ein konzentrationsabhängiger Zerfall im wässrigen Milieu beobachtet [29]. Während in niedrigkonzentrierten Imipenemlösungen und in Wasser kleine Fragmente von Imipenem nachgewiesen werden konnten, entstanden bei hochkonzentrierten Imipenemlösungen Dimere und Trimere und sich daraus ableitenden Zerfallsprodukten.

Jedoch war in diesem Kapitel von größerem Interesse, welchen Einfluss das verwendete Fermentationsmedium auf die Stabilität -gemessen an der Halbwertszeit- besaß. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Halbwertszeiten von 300 mg L<sup>-1</sup> Imipenem in wässrigen Lösungen (falls keine andere Konzentration angegeben). Die Konzentrationen der Substanzen sind im Anhang B, Kapitel B.2, Tabelle B.2.4 zu finden. Die Versuche verliefen bei pH 7 und 28 °C Raumtemperatur.

	<b>Halbwertszeiten [h]</b>
<b>Medienbestandteile</b>	
H <sub>2</sub> O	8,1
Glycerin	9,6
MgSO <sub>4</sub>	7,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29,5
CaCO <sub>3</sub>	26,9
Steriles Medium	9,6
Steriles Medium + 0,1 M MOPS	15,9
<b>zellfreie Fermentationsproben</b>	
log-Phase	9,4
pO <sub>2</sub> -kritisch	15,6
Produktionsphase	22,9
<b>laufenden Fermentation, gespikt mit</b>	
300 mg L <sup>-1</sup> Imipenem	4,8
30 mg L <sup>-1</sup> Imipenem	20,2



Wie aus der Tabelle 4 hervorgeht, wurde Imipenem anstelle der OA-Derivate als Referenzantibiotikum bei pH 7 und 28 °C verwendet. Die Bestimmung der Stabilität von 300 mg L<sup>-1</sup> Imipenem in Wasser, welches als Vergleich und zur Beurteilung der weiteren Versuche diente, ergab eine Halbwertszeit von acht Stunden. Um den Einfluss der spezifischen Medienbestandteile zu ermitteln, wurden Suspensionen erzeugt, die die gleiche Ausgangskonzentration besaßen, wie sie im Kulturmedium vorlagen. Es zeigte sich, dass die verwendeten Medienbestandteile Kaliumdihydrogenphosphat und Calciumcarbonat zu einer Stabilisierung des Antibiotikums (Halbwertszeiten von 30 bzw. 26 Stunden) führten, während Magnesiumsulfat und Glycerin keinen signifikanten Einfluss auf die Halbwertszeit besaßen. Komplexmedienbestandteile wurden aufgrund ihrer Produktvarianz nicht in die Ermittlung einbezogen. Im sterilen und vollständigen Kulturmedium wurde eine ähnliche Stabilität nachgewiesen, wie in der rein wässrigen Lösung, weshalb davon auszugehen ist, dass kein Stabilisierungseffekt durch die Komplexmedienbestandteile hervorgerufen wurde. Durch Zugabe von 0,1 M MOPS konnte diese Stabilität um über 50 % auf 16 Stunden gesteigert werden.

Um die Veränderungen des Mediums aufgrund des Zellwachstums einzubeziehen, wurden verschiedene zellfreie Proben zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten erzeugt. Die zu Prozessbeginn im Medium vorliegenden hohen Substratkonzentrationen destabilisierten das Antibiotikum aliquot zum sterilen Medium, während die destabilisierenden Eigenschaften mit der Prozesszeit abnahmen. Während der Produktbildungsphase lag eine Imipenemhalbwertszeit von fast 23 Stunden im Medium vor.

Wurde einer laufenden Kultivierung 300 mg L<sup>-1</sup> Imipenem hinzugefügt, wurden die Zellen durch die Imipenemkonzentration abgetötet. Aufgrund der sehr geringen Stabilität im Fermentationsmedium war eine Bindung von Antibiotikum und den Penicillin-bindenden-Proteinen wahrscheinlich. Die Halbwertszeit von Imipenem betrug in diesem Versuch fünf Stunden. Durch Zugabe von 30 mg L<sup>-1</sup> Imipenem in einen Fermentationsprozess nahm die Biomasse ab, jedoch konnte anhand der Gelöstsauerstoffkonzentration eine weitere Aktivität der Zellen detektiert werden. Die Halbwertszeit lag bei 20 Stunden, was sehr wahrscheinlich auf den konzentrationsabhängigen Zerfall zurückzuführen war und keine Stabilisierung vermuten lässt.

Durch die Verwendung von verschiedenen Puffersubstanzen bei pH 7 konnten in Wasser hohe Imipenem-Halbwertszeiten erzielt werden (Tabelle 5). Die daraus resultierenden Zerfallskinetiken folgten nicht mehr der ersten Ordnung, sondern waren stellenweise konzentrationsunabhängig, was in keiner veröffentlichten Studie bisweilen nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der ähnlichen Strukturen konnten zwei Halbwertszeit-fördernde und eine Halbwertszeit-reduzierende Charakteristika der Unterstrukturen bestimmt werden: Sowohl der Abstand zwischen Ringstruktur und Sulfonsäure als auch die Ausrichtung der Sulfonsäure verbessern die Stabilität. Hingegen führen Hydroxylgruppen und damit Polaritäten im Puf-

fermolekül - innerhalb der Kettenstruktur und an der Ringstruktur - zu einer Destabilisierung von Imipenem.

Tab. 5: Halbwertszeiten von 50 mg L<sup>-1</sup> Imipenem in verschiedenen wässrigen Puffersystemen bei pH 7 und RT.

Puffersystem bei pH 7	Puffersystem	Konzentration [M]	Halbwertszeit $T_{1/2}$ [h <sup>-1</sup> ]	Reaktionskinetik
H <sub>2</sub> O		-	30	1. Ordnung
MES		0,1	159	0. Ordnung
		0,5	167	0. Ordnung
		1	205	0. Ordnung
MOPS		0,01	106	0. Ordnung
		0,1	110	0. Ordnung
		0,5	123	0. Ordnung
MOBS		1	121	0. Ordnung
		0,1	113	1. Ordnung
		0,5	258	0. Ordnung
MOPSO		1	355	0. Ordnung
		0,1	68	1. Ordnung
		0,5	26	1. Ordnung
HEPES		1	17	1. Ordnung
		0,1	75	1. Ordnung
		0,5	55	1. Ordnung
CHES		1	40	1. Ordnung
		0,1	132	0. Ordnung
		0,5	137	0. Ordnung

## 2.8 Zusammenfassung und Ausblick

Das Hauptthema dieser Arbeit war es, eine wirtschaftliche Produktbildung der OA-6129-Derivate durch die Kultivierung von *Streptomyces fulvoviridis* 17M9 N1501 zu etablieren. Die dafür verwendeten Produktionsstämme wurden von Industriepartner bereitgestellt und sollten eine hohe Produktivität ermöglichen. Da zunächst keine Produktbildung im Schüttelkolben detektiert werden konnte, wurde eine Fortführung der Versuche im Bioreaktor vollzogen. Die Rührergeschwindigkeit wurde als konstanter Prozessparameter übernommen, jedoch reichte die eingebrachte Leistung nicht aus, die notwendige Sauerstoffsättigung des Mediums zu ermöglichen. Durch die Erhöhung der Sauerstoffversorgung mittels Zugabe von Wasserstoffperoxid bei gleichbleibender Rührergeschwindigkeit konnte eine antibiotische Aktivität im Medium gegenüber *Bacillus subtilis* bestimmt werden. Eine konstante Zugabe von Wasserstoffperoxid war jedoch aufgrund der langen Prozesszeit und der Volumenerhöhung wirtschaftlich unrentabel, sodass für weitere Untersuchungen eine verbesserte Sauerstoffversorgung durch eine angepasste, variable Rührerdrehzahl etabliert wurde. Dies führte gleichzeitig zu einer Erhöhung der maximalen Antibiotikakonzentration. Nach verschiedenen Optimierungen konnten drei Produktivitätsbestimmende Faktoren identifiziert werden. Diese wären die bereits beschriebene notwendige Sauerstoffversorgung der Zellen, die Medienzusammensetzung, sowie die Rührergeometrie.

Nur durch eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff konnte eine Bildung der OA-6129-Derivate erreicht werden. Eine zusätzliche Begasung mit Sauerstoff oder die Zugabe von Wasserstoffperoxid förderten das Wachstum der Zellen und die Produktbildung. Es konnte durch eine auf die Gelöstsauerstoffkonzentration angepasste variable Rührergeschwindigkeit eine Produktbildung erzielt werden, die nicht auf der Zugabe von reinem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid basiert. Dass im Produktionsmedium weiterhin die Biomassenbildung gefördert wurde, war vor allem auf den Einfluss des Mediums auf die Antibiotikabildung zurückzuführen. Aufgrund der verwendeten, hohen Konzentrationen an Medienbestandteile konnte beobachtet werden, dass zwar das Wachstum der Zellen unterstützt, aber gleichzeitig die Produktbildung reprimiert wurde. Erst durch Reduzierung der Konzentrationen der C- und N-Quelle, um ein Viertel bzw. die Hälfte des Ausgangsmediums, wurde die Antibiotikabildung verbessert. Eine weitere Optimierung der Produktbildung könnte durch eine Limitierung der Substratquellen erzielt werden [67]. Daher sollten in weiterführende Arbeiten neben einer Variation und Reduktion der C und N-Quelle die Phosphatquelle sowie die Konzentrationen an Aminosäuren mit einbezogen werden, da diese auch die Synthese der OA-Derivate beeinflussen könnten [67]. Weiterführend wäre eine Änderung der Prozessstrategie auf ein Fed-Batch-Verfahren erforderlich, um die Produktivität zu verbessern und gleichzeitig das Wachstum der Zellen zu reduzieren.

Als letzten Faktor konnte der Einfluss der Rührergeometrie nachgewiesen werden. Trotz des geringeren volumetrischen Stofftransportkoeffizienten und geringeren spezifischen Leistungseintrages bei der Verwendung der größeren Internrührer, führte diese zu einer höheren, maximalen Antibiotikakonzentration als die kleineren Scheibenrührer. Damit ist die Durchmischung des Bioreaktors ein beeinflussender Prozessfaktor als die Sauerstofftransportrate [80].

Zusammenfassend konnte eine Produktivitätssteigerung von 385 % gegenüber der ersten, erfolgreichen Kultivierungen im Bioreaktor erreicht werden. In absoluten Zahlen ausgedrückt bedeutet dies eine Erhöhung der Konzentration von  $0,39 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Damit wäre eine wirtschaftliche Produktion möglich gewesen, sofern die *Streptomyces*-Stämme eine Ausgangskonzentration von  $80 \text{ mg L}^{-1}$  gehabt hätten. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden vor 20 Jahren veröffentlicht, weshalb eine Ursachenklärung über die reprimierte Antibiotikabildung spekulativ bleibt. Davon ausgehend, dass die Medienbestandteile mit denen aus den industriellen Berichten äquivalent sind, könnte eine Zellschädigung oder Mutation der Produktionsstämme im Rahmen der Stammhaltung aufgetreten sein. Auch eine Veränderung der Kultur, die durch einen pleiotropen Effekt hervorgerufen wurde, könnte den Verlust der Produktivität erklären [91].

Um die Biosynthese der Zielantibiotika besser zu verstehen, wäre eine Bestimmung der Aktivitäten der Antibiotika-bildenden Enzyme notwendig. So ist ein Schlüsselenzym bei der Antibiotikabildung von *Streptomyces coelicolor* A3(2), welches auch die Morphologie beeinflusst, die ppGpp-Synthetase (*RelA*) [92]. Diese kann erst bei einer Stickstofflimitierung gleichzeitig mit den Antibiotika Undecylprodigiosin (Red) und Actinorhodin (Act) nachgewiesen werden. Wird die Synthese der *RelA* gestört, kann ebenfalls kein Antibiotikum nachgewiesen werden, selbst wenn eine Stickstofflimitierung vorliegt. Auch bei der Synthese von Cephamicin durch *Streptomyces clavuligerus* kann diese Wirkungsweise beobachtet werden [93]. Ob jedoch ein Analogon bei *Streptomyces fulvoviridis* vorliegt, ist bislang nicht bekannt und müsste daher untersucht werden.

Sollte ein Defekt bei der Synthese der OA-Derivate vorliegen, wäre eine genetische Modifikation der OA-Biosynthese möglich. So erzeugten Nakata *et al.* Mutanten, bei denen eine Carbapenemsynthese gestört war. Einem dieser Mutationsstämmen wurde das durch die Arbeitsgruppe erzeugte Plasmid pCPG31 hinzugefügt, welches Gene für eine Carbapenemsynthese enthält. Die maximale Produktkonzentration der reaktivierten Mutanten lag dabei über dem des Referenz- und Parentalstammes [94]. Alternativ könnten so auch Carbapenem-produzierende Nicht-*Streptomyces*en modifiziert werden, sodass eine Bildung der OA-Derivate oder ähnlicher Derivate möglich wäre.

Auf eine Erhöhung der Stabilität des Referenzantibiotikum Imipenem in wässriger Lösung lag ein weiterer Fokus in dieser Arbeit. Es konnte beobachtet werden, dass die Destabilisierung konzentrationsabhängig war, wenn Imipenem in Abwesenheit von Puffern in wässriger Lösung vorlag. Im Fermentationsmedium unterlag Imipenem aufgrund der vorhandenen Medienbestandteile und Zellen einer intensiveren Zerfallsreaktion. Durch Zugabe von Morpholino-Puffern konnte die Stabilität sowohl im Medium als auch in rein wässrigen Lösungen gesteigert werden. In der Literatur wird eine Stabilisierung von Antibiotika mit einer pH-Wert-Stabilisierung begründet [29]. Da aber sowohl destabilisierende Puffer bekannt sind, die primäre Amine enthalten, konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Stabilisierung zwar pH-Wert abhängig ist, jedoch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Puffersubstanzen und Imipenem zu einer signifikanten Erhöhung der Halbwertszeit führen. Die verwendeten Morpholino-Puffersubstanzen sind dabei biologisch inert und können somit auch in Verbindung einer klinische Verwendung genutzt werden. Auch wäre eine Übertragung der ermittelten Daten auf andere instabile Antibiotika möglich. Speziell designte Puffersubstanzen könnten in Zukunft zur Hydrolyse neigende Antibiotika vor einem Zerfall bewahren.

Um eine hohe Konzentration und damit einhergehend hohe Hydrolyserate an Imipenem im Medium zu vermeiden, wurde in einem weiterführenden Projekt eine *in situ* Aufarbeitung entwickelt. Die aus dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden dazu genutzt Affinitätsadsorber zu entwickeln, die eine Denaturierung durch eine Adsorption des Antibiotikums verhindern soll. Zudem wurden diese spezifischen Adsorber an Magnetpartikel fixiert und können so durch eine Trennung mittels HGMS (*high gradient magnetic separators*) vom Medium isoliert werden. Durch das Spülen mit einem Eluenten wäre es nun möglich, das Zielantibiotikum zu entfernen und die Adsorber dem Medium wieder hinzuzufügen. Dabei reduziert eine zyklische Aufarbeitung die Zeit, in dem das Antibiotikum dem destabilisierenden wässrigen Milieu unterliegt. Dies betreffend werden weitere Untersuchungen in der Dissertation von Aline Pasteur präsentiert, die sich eingehend mit der *in-situ*-Aufarbeitung der  $\beta$ -Lactame beschäftigte [95].

### 3. Produktion und Biotransformation von Ursol- und Oleanolsäure

Dieses Dissertationskapitel befasst sich mit der Bildung und der Biotransformation der pflanzlichen Triterpene Ursol- und Oleanolsäure. Diese Triterpene können über eine Kultivierung von Salbei- und Basilikumkallus gewonnen werden und bieten hohes pharmazeutisches Potenzial. Durch eine mikrobielle Biotransformation können neue Derivate erzeugt werden, die höhere Aktivitäten aufweisen.

#### 3.1 Einleitung

Seit Tausenden von Jahren werden Pflanzen bzw. ihre Bestandteile in der Kräuterheilkunde angewendet. So basieren in der traditionellen chinesischen Medizin über 74 % aller medizinischen Anwendungen auf Pflanzenextrakten [96]. Dabei wurden sie als Salben, Tees, Umschläge oder Tinkturen verabreicht, ohne dass man ihre genauen heilwirkenden Bestandteile kannte. In den letzten 100 Jahren wurde der pharmazeutischen Industrie dieses Reservoir an bioaktiven, medizinisch-relevanten Sekundärmetaboliten bewusst, sodass an einer Isolierung und Produktion der Substanzen gezielt geforscht wurde. 2008 betrug das weltweite Handelsvolumen von Pflanzenextrakten ca. 2 Milliarden US\$ [97]. Eine spezifische Produktklasse sind die Terpene, die einen dominierenden Anteil und die höchsten jährlichen Wachstumsraten von 9 % besitzen [98]. Dabei erfolgt in Abhängigkeit von der geographischen Lage der traditionellen Kräuterkunde und den dort vorhandenen Pflanzen eine unterschiedliche Terpenforschung und -produktion. So konzentriert man sich im asiatischen Bereich auf eine Untersuchung des Ginsengs, der in der traditionellen chinesischen Medizin hauptsächlich als „Functional Food“ Verwendung findet [99]. Dabei konnten die sogenannten Ginsenoside isoliert werden, denen man anticancerogene [100], entzündungshemmende [101] Eigenschaften sowie stabilisierende Wirkungen gegen mentale Erkrankungen [102] nachweisen konnte. Durch anschließende Biotransformationen mittels *Ganoderma lucidum* oder *Bacillus* ssp. konnten die in Ginseng hochkonzentrierten, aber weniger bioaktiven Ginsenoside in höherwertige transformiert werden [103; 104].

In der europäischen Heilkunde wurde Ginseng erst im 20. Jh. eingesetzt. Stattdessen wurden in der antiken Kräuterkunde Pflanzen wie Kümmel, Fenchel, Brennnessel und Pfefferminze angewandt. Eine Pflanze, die tief in der europäischen Heilkunde verwurzelt ist, trägt seit der Römerzeit ihre Verwendung im Namen: Salbei, lateinisch von *salvare*: heilen. Wie Ginseng wird auch Salbei bei der Zubereitung von Speisen verwendet. Der Salbei enthält neben phenolischen Bestandteilen [105] bioaktive Terpene, wie Oleanol- (OS) und Ursolsäure (US), denen man viele Aktivitäten nachweisen konnte [106], die für einen Einsatz in der Medizin von Interesse sind. Ursolsäure besitzt unter anderem entzündungshemmende, anti-

oxidative [107], antitumorale [108], antibakterielle [109] und antivirale (Human Immunodeficiency Virus-1) [110] Eigenschaften. Für Oleanolsäure konnte man antibakterielle [109], antitumorale [111; 112], antivirale [113], antidiabetische [114], antioxidative [115] und Magen schonende [116] Aktivitäten nachweisen. Zudem konnten durch Biotransformationen der beiden Triterpene neue Derivate erzeugt werden, die die bioaktiven Eigenschaften verbessern [117; 118]. Die mikrobielle Umwandlung ermöglicht ein noch nicht zu erfassendes Potenzial an neuen, pharmazeutisch-interessanten Substanzen, die eine Alternative zu chemisch erzeugten Medikamenten sein können. So wird derzeit das Oleanol- und Ursolsäure-analogon Betulinsäure in klinischen Studien zur Behandlung von pigmentierten Fehlbildungen der Haut eingesetzt [119]. Der Nachteil dieser sehr potenten Triterpene liegt meist in ihrer geringen Löslichkeit in Wasser [120]. Daher wäre auch eine Verbesserung der Löslichkeit und gleichzeitig eine Steigerung oder zumindest der Erhalt der bioaktiven Eigenschaften durch eine mikrobielle Biotransformation wünschenswert.

In einer vorangegangenen Arbeit konnte eine Biotransformation von Ursolsäure durch *Nocardia iowensis* erfolgreich etabliert werden [121]. Es ergaben sich neue Biotransformationsprodukte, die für pharmazeutische Anwendungen und klinische Studien interessant sind. Jedoch wurden das eingesetzte Substrat, wie auch die in der Industrie verwendeten Triterpene, aus verschiedenen Pflanzen und Pflanzenbestandteilen, die in der Landwirtschaft produziert wurden, isoliert. Eine solche Substratversorgung unterliegt Produktionsschwankungen aufgrund von Wachstumsbedingungen (Lichtverhältnisse, Bodenbeschaffenheit, Temperaturdifferenzen) als auch von Umweltfaktoren (Schädlinge, Krankheiten, Abgase), die einen konstanten Einfluss auf die Qualität und Quantität besitzen. Hingegen würde eine chemische Synthese zu einer Vielzahl von unerwünschten Nebenprodukten führen, die eine Isolierung erschweren. Eine Alternative zu diesen beiden Herstellungsvarianten stellt die *in vitro* Kultivierung von pflanzlichen Zell- und Gewebekulturen im Bioreaktor dar, die eine ganzjährige, kontinuierliche Produktion unter optimierten Bedingungen und mit gleichbleibender Qualität und Quantität erlaubt, ohne das unerwünschte Derivate entstehen. Dabei kann zudem auf den Einsatz von Schadstoffen wie Pestizide verzichtet, sowie eine nachhaltige und ressourcenschonende Produktion ermöglicht werden. Um dies zu ermöglichen, müssen geeignete Pflanzenkulturen gefunden und diese gegebenenfalls durch genetische Modifikationen optimiert werden.

### 3.2 Zielsetzung

Das Thema des Dissertationskapitels besteht aus der Kultivierung von Pflanzenkalluskulturen und der Modifikationen der Triterpene Oleanol- und Ursolsäure über eine mikrobielle Biotransformation. Dabei werden Mikroorganismen als Ganzzellsystem verwendet. Um neue pharmazeutisch-interessante Substanzen zu detektieren, werden die entstehenden Produkte mittels RP-HPLC, HPLC-MS und HPLC-<sup>1</sup>H-NMR analysiert.

Durch *in situ*-Kultivierung von teils genetisch modifizierten *Salvia officinalis*-Kalluskulturen und einer *Ocimum basilicum*-Kalluskultur können die Zieltriterpene gebildet werden. Dabei ist zu untersuchen, welche Einflüsse die verwendeten Reaktortypen (Schüttelkolben, Rührkesselreaktor und Wavebagreaktor) auf die Produkt- und Biomassenbildung besitzen. Die dafür verwendeten Kalluszellen werden im Vorfeld als Submerskultur im Schüttelkolben sowohl im batch- als auch als repeated-batch-Verfahren kultiviert. Da daraus auch eine unterschiedliche Produktbildung resultieren könnte, werden diese beiden Verfahren im Schüttelkolben miteinander verglichen.

Betreffend der Biotransformation der Ursol- und Oleanolsäure konnte durch die Arbeiten von Leipold *et al.* und Zhang *et al.* eine Derivatisierung mittels *Nocardia iowensis* beschrieben werden [121; 122]. Dabei resultierte die Oleanolsäuretransformation in der Bildung des Oleanolsäuremethylesters. Aufgrund der Literaturdaten ist jedoch eine Bildung eines einzigen Derivates unwahrscheinlich. Eine optimierte Biotransformation sowie eine spezifische Analytik soll eine Detektion von neuen Oleanolsäure-basierende Biotransformationsprodukten ermöglichen und dabei helfen, einen neuen Biosyntheseweg der Derivatbildung aufzuzeigen.

Da bisher für jede Biotransformation der Triterpene durch *Nocardia iowensis* eine Biotransformationskultur erzeugt wurde, könnte eine Immobilisierung der Zellen eine kontinuierliche Prozessführung ermöglichen und die Wirtschaftlichkeit des Prozesses verbessern. Es werden daher geeignete Mikroorganismen über ein matrixbasierendes Immobilisierungsverfahren eingebettet und betreffend der Biotransformationseffizienz untersucht.

Final erfolgt eine Zusammenführung von *in vitro* Kultivierung von *Salvia officinalis* und anschließender Biotransformation der Triterpene durch immobilisierte *Nocardia iowensis* Zellen. Diese Untersuchung wird in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der Universität Dresden durchgeführt. Die dafür notwendige Pflanzenzellkultur wird in Dresden inkubiert, während die Immobilisierung der Biotransformationskultur in Kaiserslautern vorbereitet wird. Die anschließende Zusammenführung von Pflanzenzell-extrakt und Biotransformation erfolgt in Dresden. Um eine direkte Derivatisierung zu ermöglichen, muss eine Extraktionsmethode bestimmt werden, bei der biotransformationsstörende



Einflüsse reduziert und umfangreiche Aufarbeitungsschritte umgangen werden. Dies soll die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses verbessern.

Eine grafische Darstellung des Prozesses, welches für das Projekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft unter dem Titel „Gewinnung von pharmakologisch relevanten Triterpenen aus pflanzlichen Zellkulturen am Beispiel von Oleanol- und Ursolsäure“ gefördert wurde, ist in dem Fließbild in Abbildung 50 dargestellt:

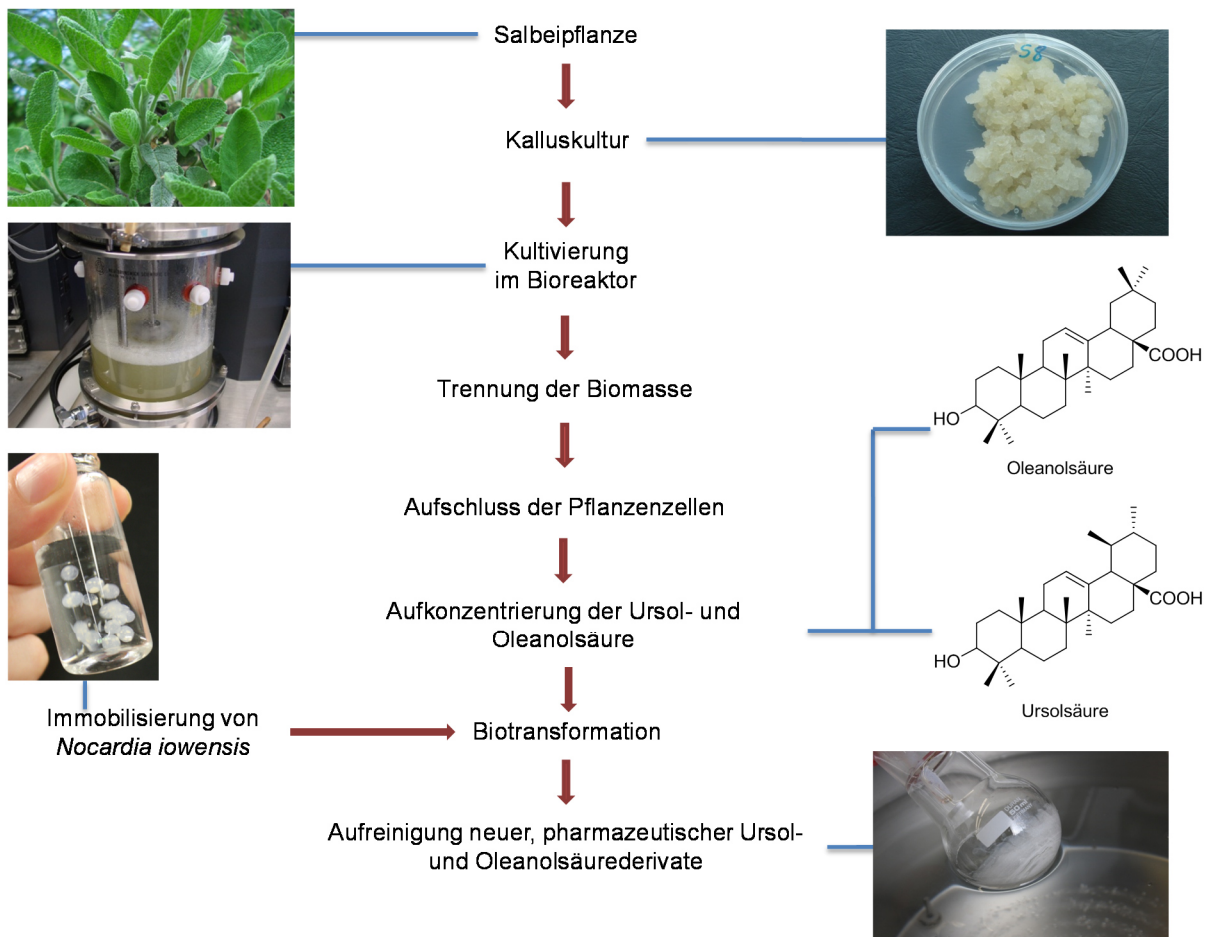


Abb. 50: Fließbild des Gesamtprojektes „Gewinnung von pharmakologisch relevanten Triterpenen aus pflanzlichen Zellkulturen am Beispiel von Oleanol- und Ursolsäure“, auf dem die hier geschilderte Zielsetzung basiert

Eine zusammenfassende Aufgabenstellung der jeweiligen Arbeitspakete ist wie folgt gegeben:

1. Kultivierung von Pflanzenkallus, betreffend der
  - Etablierung einer stabilen Stammhaltung auf Agar-Medium
  - Triterpenbildung durch die Pflanzenzelllinie *Salbei officinalis* var. *extrakta* Suc1-1
  - Triterpenbildung durch die Pflanzenzelllinie *Salbei officinalis* var. *extrakta* Suc1-4
  - Triterpenbildung durch die Pflanzenzelllinie *Ocimum basilicum*
2. Mikrobielle Biotransformation von Triterpenen
  - durch ausgewählte Mikroorganismen
  - durch *N. iowensis* und Identifizierung möglicher, neuer Derivate
  - durch immobilisierte Zellen von *Nocardia iowensis*
3. Entwicklung eines Gesamtprozesses, der die Biotransformation und die Submerskultivierung von Pflanzenzellen kombiniert

### 3.3 Theoretische Grundlagen

Im Folgenden werden theoretische Grundlagen betreffend der Biosynthese von Oleanol- und Ursolsäure, der Bedeutung von Triterpenen in Pflanzen, sowie Methoden zur *in vitro* Kultivierung von Pflanzenzellen vorgestellt. Im Anschluss folgt eine kurze Zusammenfassung zur Biotransformation von Triterpenen. Abschließend werden Methoden zur Immobilisierung von Ganzzellsystemen präsentiert.

#### 3.3.1 Biosynthese von Oleanol- und Ursolsäure

Terpene sind Sekundärmetabolite, die sowohl bei eukaryotischen als auch prokaryotischen Organismen vorkommen [123]. Bei Pflanzen zählen neben Terpene auch weitere bekannte Metabolite, wie z. B. die Alkaloide und die phenolischen Verbindungen, zu den sekundären Pflanzenstoffen. Aktuell sind 30.000 Verbindungen von Terpenen bekannt [124]. Dabei lassen sich alle Terpene biosynthetisch auf eine Isopren-Grundstruktur ( $C_5H_8$ ) zurückführen. In Abbildung 51 ist die Biosynthese von Terpenen von der Claisen-Kondensation zweier acetylierten Coenzym A-Moleküle bis zur Bildung des Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat dargestellt.

Zunächst entsteht Isopentenylpyrophosphat durch eine Trimerisierung von drei Acetyl-Coenzym A-Molekülen. Diese werden über die Claisen-Kondensation mit einer anschließenden Aldolreaktion miteinander verknüpft. Durch Abspaltung des Coenzym A und einer Reduktion der Carboxygruppe wird Mevalonsäure gebildet. Eine Phosphorylierung bei gleichzeitiger Abspaltung von Wasser und Kohlenstoffdioxid führt zur Bildung von Isopentenylpyrophosphat. Eine weitere Trimerisierung von IPP-Einheiten am Phosphatende lässt das Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat entstehen (Abbildung 51). Im weiteren Verlauf der Terpensynthese werden zwei Farnesylpyrophosphat-Moleküle über eine Schwanz/Schwanz-Bindung zu einem Triterpenem dimerisiert (Abbildung 52). Das entstandene Triterpen ist das Squalen, ein ungesättigter  $C_{30}$ -Kohlenstoff, der durch die Squalen-Monooxygenase zu 2,3-Oxidosqualen oxidiert wird. Eine nachfolgende Zyklisierung führt zur Bildung von unterschiedlichen Triterpenkonstrukten (Abbildung 52), die je nach Organismus ein Edukt für die Bildung von Steroiden, Phytohormonen und den Triterpenen wie Ursol- und Oleanolsäure sein können. Bei Pflanzen erfolgt die Zyklisierung der Triterpene durch die sogenannten Oxidosqualenzyklasten (*oxidosqualene cyclase*, OSC). Dabei besitzt jede Pflanze genetische Sequenzen für die Synthese von verschiedenen OSCs, die zur Bildung von Triterpenen mit Sessel-Wanne-Sessel- als auch zu Pflanzen-spezifischen Sessel-Sessel-Sessel-Konformationen führen (Abbildung 52). Diesbezüglich konnten allein bei *A. thaliana* 13 verschiedene Gensequenzen für Oxidosqualenzyklasten nachgewiesen werden [125].

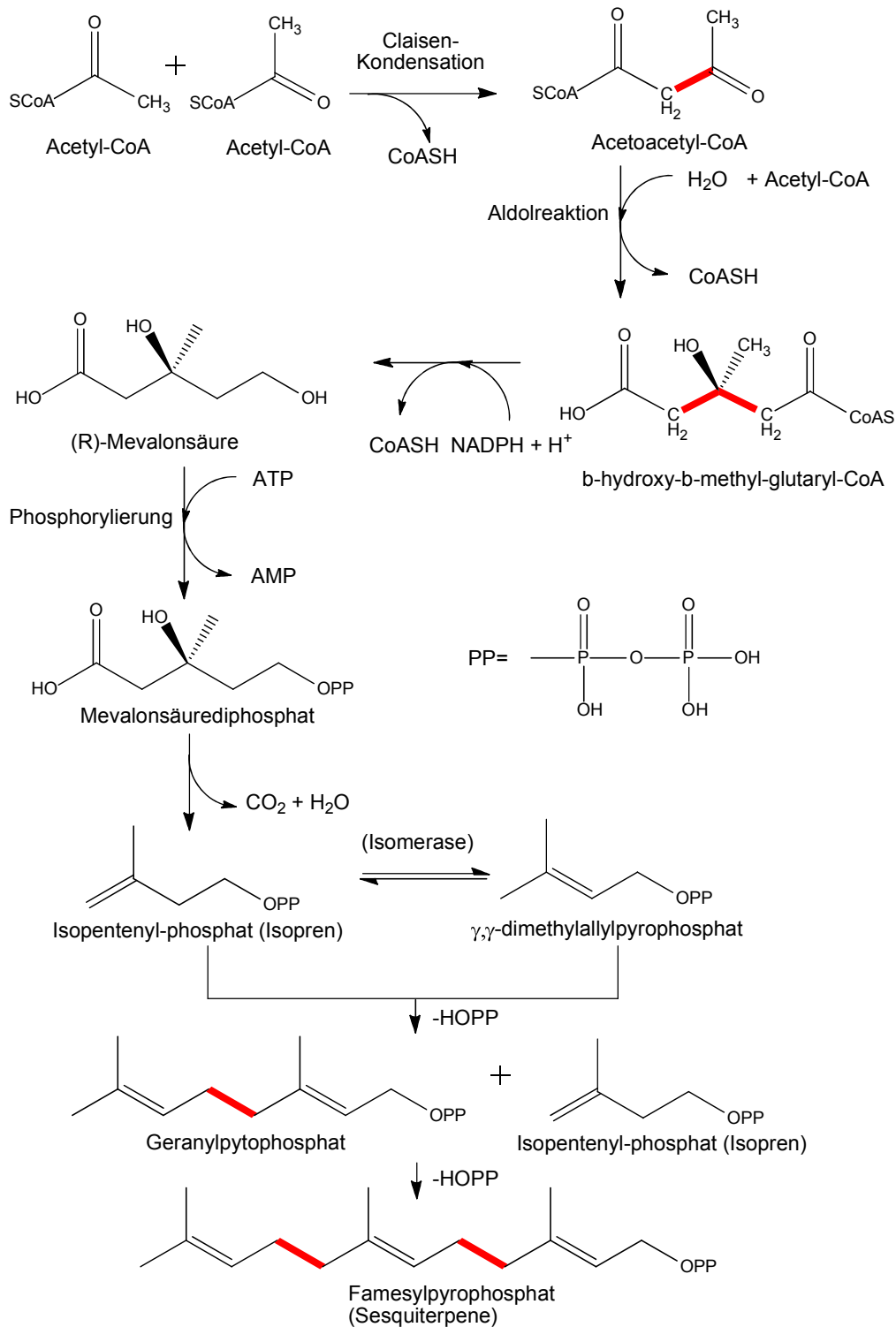


Abb. 51: Biosynthese des Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat aus acetyliertem Coenzym A nach Breitmaier et al. [124]. Die Dimerisierung erfolgt an der rot gefärbten Bindung.

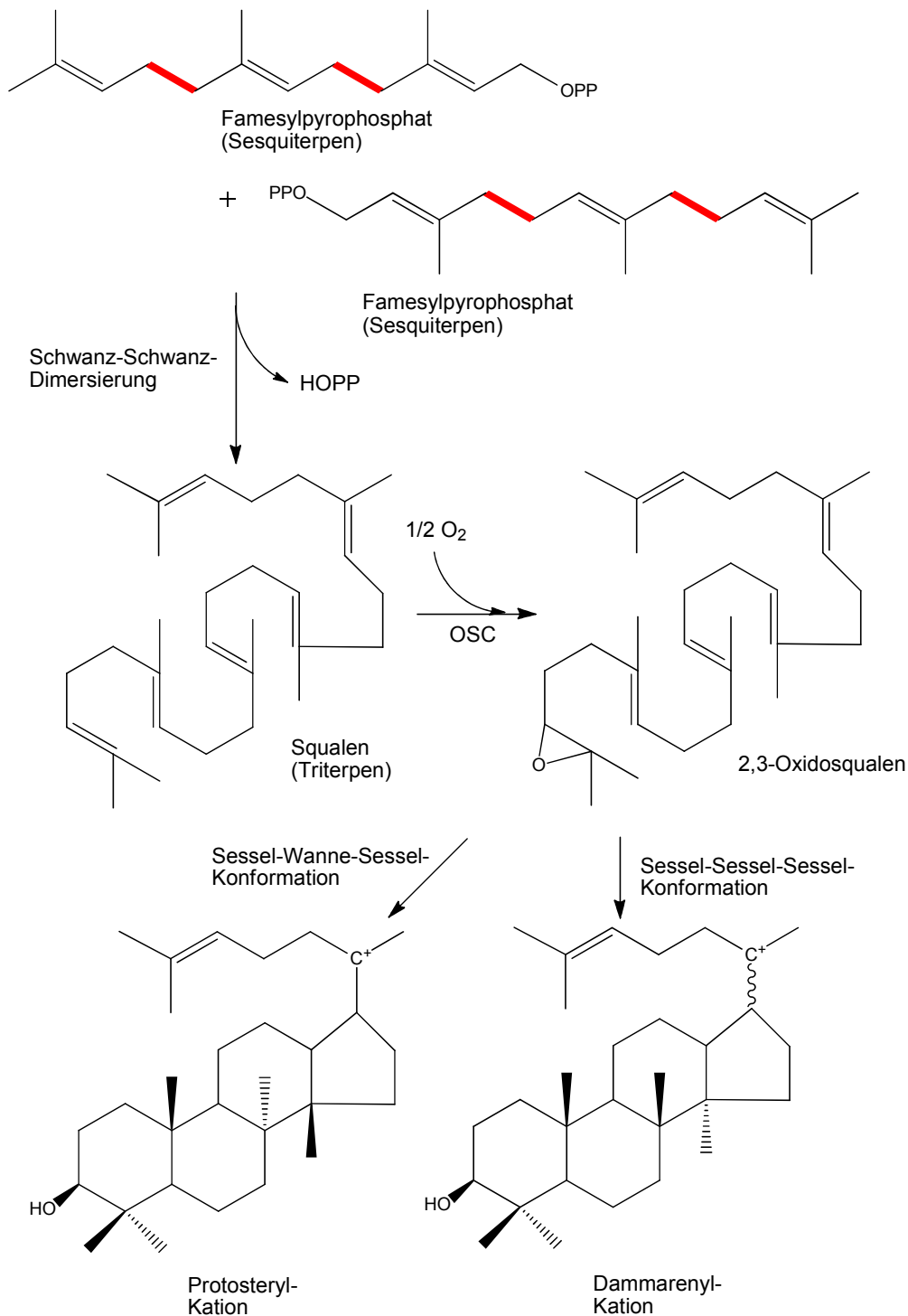


Abb. 52: Biosyntheseweg von Farnesylpyrophosphat zur Bildung von Protosteryl- und Dammarenyl-Kationen. Die Zyklisierung des Squalen erfolgt über die Bildung von 2,3-Oxisqualen mittels Oxidosqualenzyklase (OSC) nach Abe [125]. Die Dimerisierung erfolgt an der rot gefärbten Bindung.

Spezifische OSCs sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrasen, die Dammarenyl-Kationen in die namensgebenden Amyrine transformieren (Abbildung 53). Im Anschluss an die Zyklisierung können weitere Modifikationen stattfinden, die das Konstrukt um Hydroxyl-, Keto-, Carboxylgruppe oder eine Zuckerstruktur bei einer Glykolisierung erweitern [126]. Die spezifische Biosynthese der Oleanol- und Ursolsäure aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrinen erfolgt durch eine Carboxylie-

rung der Methylgruppe am Kohlenstoff 28 durch das Enzym CYP716A [127]. Weitere nachfolgende Modifikationen der beiden entstandenen Triterpene sind bei Pflanzen bekannt, und können unter anderem zur Bildung von glykolisierten Strukturen, den sogenannten Saponinen, führen [128]. Jedoch befasst sich die vorliegende Dissertation ausschließlich mit den in Pflanzen produzierten Triterpenen Oleanol- (OS) und Ursolsäure (US).

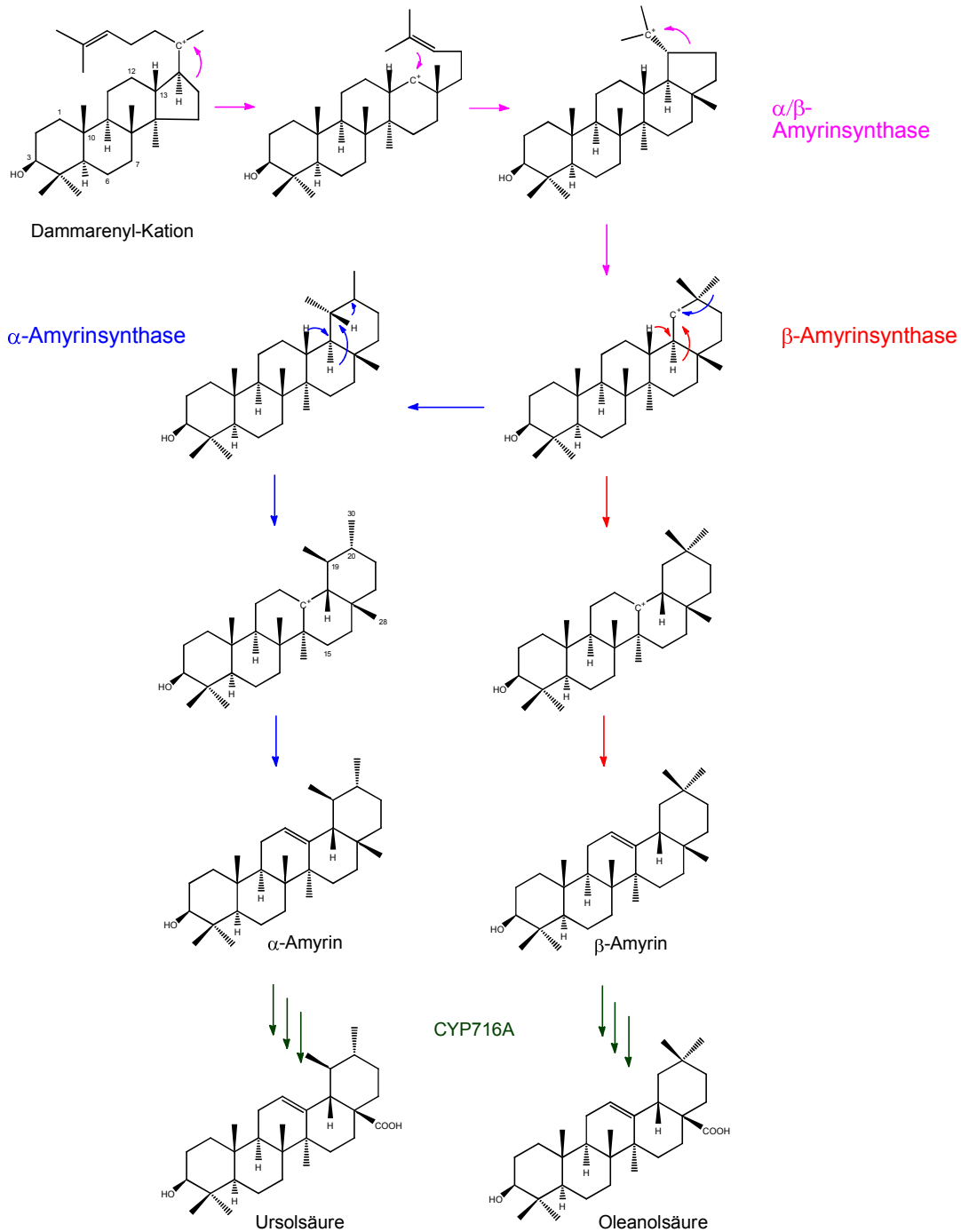


Abb. 53: Allgemeiner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrin Biosyntheseweg in Pflanzen [125] und spezifische Bildung der Ursol- und Oleanolsäure. Die Bildung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrin erfolgt durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrinsynthasen. Durch CYP716A werden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrin am C28 in ihre korrespondierenden Säuren transformiert [127].

### 3.3.2 Bedeutung von Terpenen in Pflanzen

Aufgrund der strukturellen Vielfalt ist die genaue biologische Funktion von allen Terpenen noch nicht vollständig erforscht. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass die Terpen-Biosynthese vom umgebenden Zellverband abhängig ist und jedes Terpen eine spezielle Funktionsweise übernimmt. So sind einige Terpene ätherisch (VOCs, *volatile organic compounds*) und dienen der Pflanze als Kommunikationsmittel mit der Umgebung, um beispielsweise Insekten als Beute anzulocken [129], eine Bestäubung der Pflanze zu ermöglichen oder Fraßfeinde abzuschrecken [124]. Auch können bei einem Befall der Pflanze durch herbivore Insekten karnivore Insekten durch ätherische Terpene angelockt werden, die dann die Pflanze schützen sollen [130]. Andere Terpene sind toxisch oder schmecken bitter [131]. Zudem nehmen andere Terpene die Rolle von Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren (Phytohormonen) ein [132].

Aufgrund der Vielzahl an Terpenen erfolgt eine Klassifizierung anhand der Isopreneinheiten des Terpenmoleküls. Ein Isoprenmolekül wird bei der Einteilung als halbe Einheit (griechisch *hem*) bezeichnet, sodass Terpene mit einer Isopreneinheit ( $C_5$ ) Hemiterpene genannt werden. Terpene mit zwei Isopreneinheiten ( $C_{10}$ ) werden als Monoterpene, mit drei ( $C_{15}$ ) als Sesquiterpene, mit vier ( $C_{20}$ ) als Diterpene, mit fünf ( $C_{25}$ ) als Sesterpene, mit sechs ( $C_{30}$ ) als Triterpene und mit 8 ( $C_{40}$ ) als Tetraterpene bezeichnet. Größere Terpene werden als Polyterpen zusammengefasst [124]. Eine weitere Klassifizierung erfolgt anhand der Anzahl der Ringstrukturen im Molekül. Die in dieser Arbeit beschriebenen Triterpene Oleanol- und Ursolsäure gehören aufgrund ihrer fünf Kohlenstoffringstrukturen zu den pentazyklischen Triterpenen. Wie auch viele Hemi- und Monoterpene werden sie als Abwehrmittel gegen Pathogene synthetisiert. Sie sind Bestandteile der epikutikulären Wachsschicht, welche aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften die Pflanze vor dem Bilden eines Wasserfilmes schützt (Lotus-Effekt) [133]. Gleichzeitig werden auch die Wechselwirkungen zwischen Schmutzpartikeln und Pflanzenpathogenen mit der Pflanzenoberfläche reduziert [134]. Da Mikroorganismen durch Adhäsion und chemische Signale die Wirtspflanze erkennen können und haften bleiben [135], bieten fungizide und antibakterielle Triterpene, wie Oleanol- und Ursolsäure, eine Möglichkeit, das Pathogen vor einer Infektion des Organismus abzutöten [126]. Auch eine virale Infektion kann durch die aktiven Triterpene verhindert werden. Diese umfangreichen Eigenschaften machen die Terpene als Alternative zu den herkömmlichen Antibiotika, die nur eine bakterielle Infektion bekämpfen, für eine pharmazeutische Nutzung interessant.

### 3.3.3 *In vitro*-Kultivierung von Pflanzenzellen

In dieser Dissertation wird als Ausgangsbiomasse der *in vitro*-Kultivierungen von Pflanzenzellen eine sogenannte Kalluskultur verwendet. Als Kalluszellen werden Zell- und Gewebeform bezeichnet, die aus bereits differenzierten Geweben und Organen einer Pflanze entstehen [136]. Dabei ist das Wachstum der Zellen nicht zielgerichtet, weshalb man von einem nicht differenziertem Wachstum sprechen kann. Um das Wachstum der Kalluskultur zu induzieren, wird ein desinfiziertes und angeschnittenes Blatt auf ein Medium gebracht, welches hormonartige Faktoren enthält, die eine Dedifferenzierung der Zellen und eine Induktion des Kalluswachstums am Zellrand fördern. Hierbei können genetische Veränderungen induziert werden, so dass mit der Verwendung von Phytohormonen, wie Auxinen und Cytokininen, etwaige phäno- und genotypische Veränderungen reprimiert werden müssen. Die Behandlung mit Phytohormonen ist sehr art- und gewebespezifisch, was das Anlegen einer Kalluskultur erheblich erschwert [136]. Hat sich eine Kalluskultur gebildet, muss diese auf neues Medium aufgebracht und in regelmäßigen Abständen wieder auf neue Kulturplatten überimpft werden. Dies dient der Stammhaltung der erzeugten Kalluskultur und der Revitalisierung einer gealterten Kultur. Die Aktivität der Zellen kann anhand der Färbung erkannt werden. Aktive Zellen weisen im Falle von *Salvia* sp. und *Ocimum basilicum* in völliger Dunkelheit eine weiß-leicht grünliche Zellfarbe auf (Kapitel 3.3.4 Abbildung 56). Alte, inaktive Pflanzenzellen verfärben sich mit Eintritt in die Absterbephase, der sogenannten Nekrose, braun, was auf die Oxidation von Phenolen zurückzuführen ist [136] (Abbildung 54).



Abb. 54: Gealterte *Salvia officinalis* Kultur auf Agarmedium mit braunen Pflanzenzellen. Da die Nekrose von unten nach oben erfolgt, müssen die helleren, noch aktiven Pflanzenzellen rechtzeitig auf frisches Medium überführt werden.



Die Nekrose wird dabei durch abiotische Faktoren, wie Substratlimitierung, Temperatur- und pH-Veränderungen ausgelöst [137] und kann somit auch bei Suspensionskulturen auftreten. Im Gegensatz zur klonalen Vermehrung auf Festmedien werden Suspensionskulturen von Pflanzenzellen zur Bildung von sekundären Pflanzenstoffen eingesetzt. Da jedoch für eine Inokulation des Suspensionsmediums ein Titer von mindestens 5-10 % notwendig ist, erfolgt eine Submerskultivierung im Schüttelkolben immer über eine schrittweise Erhöhung des Fermentationsvolumens, bis der erforderliche Inokulationstiter erreicht wird [136]. Im Suspensionsmedium erfolgt das Zellwachstum meist in Form von Aggregaten, die je nach Zelllinie verschiedene Größen annehmen können. Eine Aggregatbildung kann im weiteren Verlauf einer Submerskultivierung zu einer Limitierung der integrierten Pflanzenzellen führen, weshalb dies bei der Erzeugung einer stabilen Pflanzenzelllinie beachtet werden muss.

Viele weitere Prozessparameter für eine Submerskultivierung lassen sich aus der mikrobiellen Fermentation auf die Pflanzenzellkultivierung übertragen. Ähnlich wie bei der Bildung von Sekundärmetaboliten durch filamentöse Organismen ist der Scherstress der Pflanzenzellen möglichst gering zu halten. Da der Sauerstoffbedarf von Pflanzenzellkulturen im Medium bei nur  $1-3 \text{ mmol}_{\text{Sauerstoff}} \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  liegt, während Mikroorganismen  $10-100 \text{ mmol}_{\text{Sauerstoff}} \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  benötigen, sollte die Rührergeschwindigkeit möglichst zellschonend gewählt werden [138]. Größere Rührer- zu Reaktordurchmesser-Verhältnissen minimieren bei gleichem Leistungseintrag den Scherstress und sind somit vorzuziehen [76]. Der geringe Sauerstoffbedarf ermöglicht die Verwendung von Oberflächenbegasungsreaktoren, wie den Wavebag-Reaktor, und die ohne mechanische Rührung auskommenden Airlift-Bioreaktoren. Letztere besitzen den Nachteil, dass sie bei Hochzelldichte-Kultivierungen zu einer ungenügenden Durchmischung des Reaktorraumes und damit zum Zelllyse führen können [138].

Pflanzenzellen besitzen die Fähigkeit, Saccharose an und innerhalb der Zelle in Glucose und Fructose zu spalten [139]. Die aus der Spaltung resultierenden Zucker werden für weitere Zellsyntheseschritte verwendet, weshalb allein der Spaltungsort an und in der Zelle maßgebend für die weitere Biosynthese ist (Abbildung 55). Neben den nativen Stämmen von Salbei und Basilikum werden daher auch genetisch modifizierte Stämme von *Salvia officinalis* var. *extrakta* eingesetzt, die betreffend ihrer Saccharoseaufnahme optimiert wurden [140]. Die in dieser Arbeit eingesetzten, genetisch-modifizierten Salbeizellen besitzen einen optimierten Saccharosetransporter, der den Disaccharid in die Zelle transportieren, damit er dort im Cytoplasma gespalten und dem sekundären Stoffwechsel als Substrat dienen kann. Zwar ist für die weitere Verwendung im primären und sekundären Stoffwechsel auch die Spaltung von Saccharose an der Zellmembraninvertase möglich, doch müssen dann Glucose und Fructose über die jeweiligen Transporter in die Zelle gebracht werden. Ein Schema betreffend der Saccharoseaufnahme ist in der Abbildung 55 dargestellt.

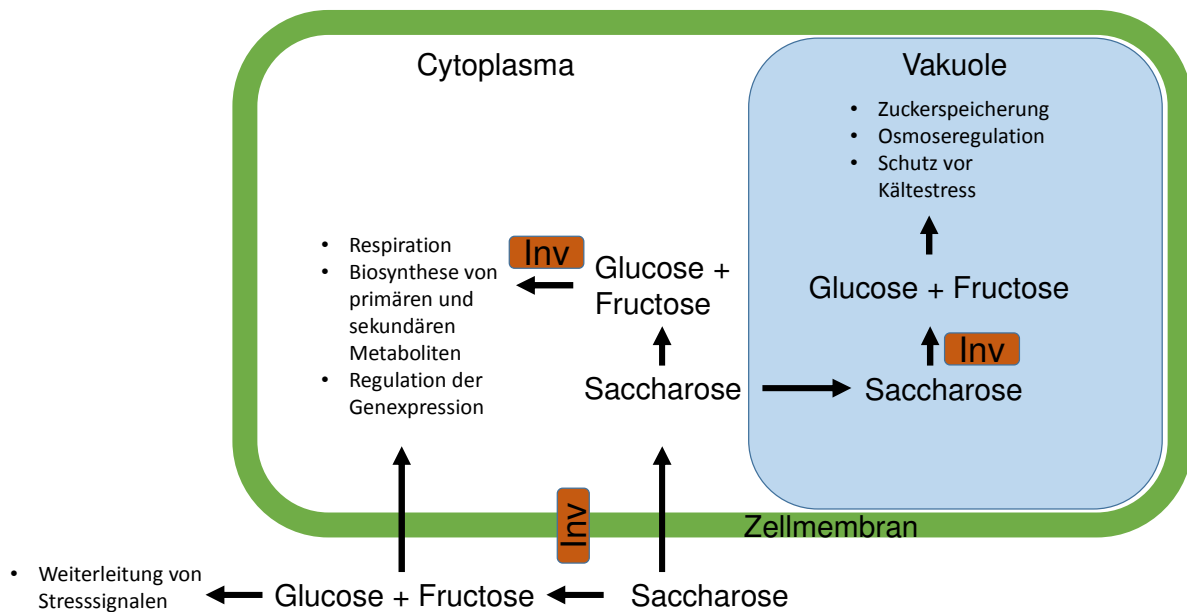


Abb. 55: Saccharoseaufnahme und -spaltung in Pflanzenzellen nach Sturm [141]. Als INV sind alle Invertasen zusammengefasst, die die Saccharose in Glucose und Fructose spalten.

### 3.3.4 Kryokonservierung von Pflanzenzellen

Eine Stammhaltung von *Salbei officinalis* erfolgt üblicherweise durch Subkultivierung im Schüttelkolben oder als Plattenkultur auf Festnährböden. Neben einer regelmäßigen Kontrolle der Kulturen und einer im Falle einer submersen Kultivierung wöchentlichen bzw. auf Festnährböden monatlichen Überführung in frisches Medium ist die Kultivierung von Pflanzenzellen aufgrund der niedrigen Wachstumsraten sehr zeitintensiv [136]. Im Laufe dieser kontinuierlichen Kultivierung zur Stammhaltung der Pflanzenzellen können Veränderungen des Expressionsmusters und des Wachstums der Pflanzenzellen anhand von Verfärbungen und Wachstumsstagnationen beobachtet werden (siehe Abbildung 56).

Bei der Kultivierung von Pflanzenzellen ist dies ein bekanntes Problem [142]. Eine Ursache könnte die Verwendung des Auxins 2,4-D(ichlorphenoxyessigsäure) sein, welches dem Medium hinzugegeben wurde, um die Embryoidbildung zu induzieren [136; 143]. Dabei könnte das Hormon zu einer somaklonalen Veränderung der Pflanzenzelle geführt haben, welche sich nur mit hohem Aufwand nachweisen ließe, da sie sowohl die DNA-Sequenz als auch deren Aktivität beeinflussen kann. Ein weiterer Faktor, der eine somaklonale Veränderung hervorrufen könnte, ist der durch die Kultivierungsform auftretende Stress [144]. Wie bei Säugetierzellen können Änderungen der Prozessparameter, wie Medienzusammensetzung und Kultivierungsform, zu Modifikationen der Zellen führen. Daher wurden in den Studien die Zellen, die eindeutig phänotypische Besonderheiten aufwiesen (Abbildung 56), aussortiert und verworfen.

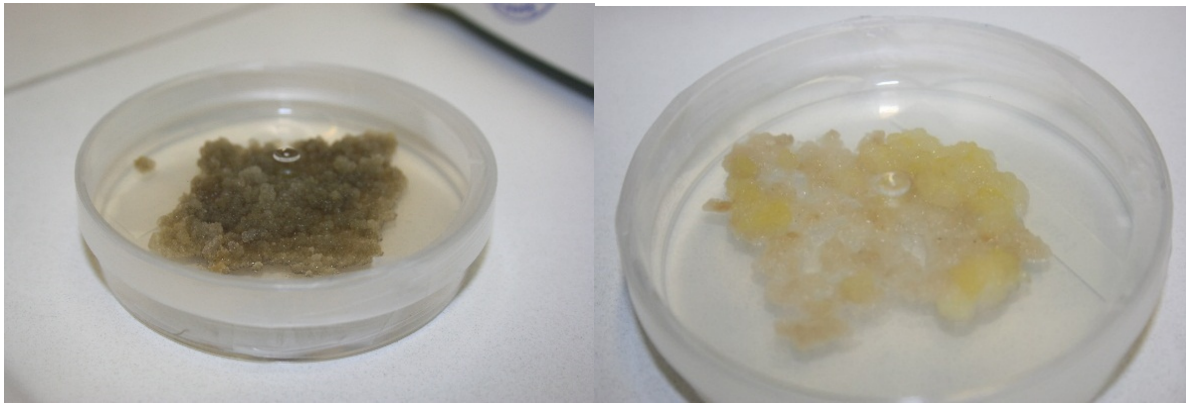


Abb. 56 Stammhaltung der Kalluskultur von *Salbei officinalis* auf LS-Medium, bei 28 °C und ohne Lichtzufuhr. Links ist eine normal weiß/grünlich gefärbte Kalluskultur zu sehen, rechts eine intensiv gelb verfärbte Kultur. Weitere Kulturen wiesen Verfärbungen im orangen oder roten Bereich auf.

Da jedoch Veränderungen des Expressionsmusters von Sekundärmetaboliten auch ohne eindeutige Verfärbungen auftreten können und reproduzierbare Produktbildungsraten aufgrund von GMP-Richtlinien bindend sind, muss eine Stammhaltung etabliert werden, die genetische Veränderungen nahezu ausschließt. Im Falle von Bakterien und Hefen erfolgt dies durch etablierte Protokolle zur Herstellung von Kryokulturen und Lagerung bei  $-80\text{ °C}$ . Bei transgenen Pflanzenzellen sind diese Protokolle oft nicht übertragbar. Erste Kryokonservierungsprotokolle wurden durch verschiedene Forschungsgruppen in den 60er und 70er Jahren erfolgreich für Wildtypkulturen entwickelt [145]. Doch aufgrund der unterschiedlichen Typen von Pflanzenzellen und den Zellmodifikationen bei genetisch-veränderten Pflanzenzellen im Besonderen sind diese Protokolle nicht direkt übertragbar [146]. Die Problematik bei der Kryokonservierung betrifft das Einfrieren, das Lagern und das Auftauen der zu konservierenden Pflanzenzellen. Bei einem zu schnellen Gefrieren besteht die Gefahr einer Perforation der Zellbestandteile, wie Zellmembran und Zellkern, durch die Ausbildung von Eiskristallen. Ist der Gefrierschritt zu langsam, friert zunächst das Medium außerhalb der Zellen, weil es weniger gelöste Substanzen enthält als die Pflanzenzelle. Durch das Wasserdampfdefizit geben die Zellen Wasser an ihre direkte Umgebung ab. Durch weitere Konzentrierung der Zellbestandteile kann diese Art von Gefriertrocknung auch zur Schädigung des Zellinnern führen [136]. Ist erst das Cytoplasma verfestigt, können selbst kleine Eiskristalle der Zelle kaum schaden. Alternativ zum Einfrieren der Zellen in wässriger Lösung können Pflanzenzellen auch in Alginat eingebettet und eingefroren werden [147]. Somit können je nach Zellart (Kalluskultur, Hairyroots) unterschiedliche Protokolle eine Kryokonservierung ermöglichen. Aufgrund der Vielzahl an Protokollen sind in der folgenden Tabelle 6 Methoden aufgelistet, die sich für das Einfrieren einer Kalluskultur anbieten:

Tab. 6: Zusammenfassung und Charakterisierung der Kryokonservierungsprotokolle aufgrund ihrer Kühlrate und Konservierungstemperatur [145; 147]

Methode	Kühlrate 1	Temperatur	Kühlrate 2	Temp. 2
	[°C min <sup>-1</sup> ]	[°C]	[°C min <sup>-1</sup> ]	[°C]
<b>Langsames Einfrieren</b>	Bis 1,0	-60 bis -196		
<b>2-Schritt-Kryokonservierung</b>	0,5 bis 2,0	-20 bis -40	<196	-196
<b>Vitrifikation (Schockfrieren)</b>	<196	-196		
<b>Einhüllen in Alginat</b>	<196	-196		

Durch eine Behandlung der einzufrierenden Zellen mit sogenannte Kryoprotektiva können die oben aufgelisteten Methoden verbessert werden. Kryoprotektiva sind chemische Substanzen, die den Gefrierpunkt von Wasser herabsetzen und damit die Zellen vor Kristallisation und den schädlichen Folgen während des Einfrierens bzw. Auftauens schützen. Dabei muss für jede Pflanzenkultur und Gewebeart die Zusammensetzung des Kryoprotektivums spezifisch bestimmt werden. Man unterteilt diese Gefrierschutzmittel in unterschiedliche Gruppen:

1. Penetrierende Kryoprotektiva (DMSO, Glycerin) [145]
2. Nicht penetrierende Kryoprotektiva (Saccharose, Glykol oder Propandiol) [148]

Erstere können eine toxische Wirkung auf die Zelle ausüben. Häufig wird auch eine Mischung beider Gruppen verwendet. Weiterhin existieren Methoden, die den intrazellulären Wassergehalt reduzieren und somit auch das Risiko der Zellschädigung minimieren [149].

Während eine stabile Lagerung der Pflanzenkulturen nur unter Verwendung einwandfreier technischer Geräte und einer regelmäßigen Revitalisierung der Kryokulturen erfolgen kann, muss auch die Wahl der Erwärmungsmethode spezifisch an die verwendete Pflanzenkultur angepasst werden. Hier werden, wie bei der Kryobehandlung, zwischen den Protokollen unterschieden, die sich durch die Geschwindigkeit der Erwärmungsraten voneinander differenzieren. Schlussendlich muss für jeden Organismus die optimale Kombination von Kryokonservierungs- und Erwärmungsprotokollen gefunden werden, damit eine stabile Zelllinie erhalten bleibt.

Auch seitens der Wachstumsphasen der Pflanzenzellen kann eine erfolgreiche Kryokonservierung gefördert bzw. erschwert werden. Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, weisen in diesem Stadium vergleichsweise kleine Vakuolen auf und sind im Vergleich zu Zellen in der stationären Phase toleranter gegenüber der Kryokonservierung

[147]. Auch wird durch das konstante Zellwachstum der intrazelluläre Wassergehalt erniedrigt, was das Risiko der Eiskristallbildung beim Einfrieren reduziert [149].

### **3.3.5 Mikrobielle Biotransformation von Triterpenen**

Eine Modifizierung von Triterpenen kann durch eine chemische Synthese erfolgen, resultiert aber häufig in unspezifischen und ungewollten Nebenprodukten, die schwer zu isolieren sind [150]. Eine sehr spezifische Modifizierung kann durch eine Biotransformation realisiert werden, die eine Derivatisierung unter milden Bedingungen (Raumtemperatur, Normaldruck) ermöglicht [151]. Die dafür notwendigen Enzyme liegen als isoliertes Präparat vor, oder können von spezifischen Mikroorganismen in der Form eines Ganzzellsystems synthetisiert werden. Da für eine Derivatisierung des Substrates über mehrere Syntheseschritte ein Enzymmix aufgrund von Herstellungskosten und der Zugabe von Stabilitäts- und Co-Faktoren einen höheren finanziellen Aufwand bedarf, ist die Verwendung eines Ganzzellsystems einer mikrobiellen Biotransformation wirtschaftlich interessanter. Konnte eine Biotransformationskapazität eines Organismus nachgewiesen werden, kann eine Isolierung der notwendigen Enzyme untersucht werden.

Eine Liste diverser Mikroorganismen, die zur Biotransformation von Oleanol- und Ursolsäure eingesetzt wurden, ist in der folgenden Tabelle 7 dargestellt. Die Auswahl erfolgte aufgrund von Literaturrecherchen.

Tab. 7: Beispiele von potenziellen Mikroorganismen, die als Ganzellsysteme zur Modifikation von Sekundärmetaboliten eingesetzt werden.

Organismus	Substrat	Referenz
<i>Aspergillus niger</i>	Methylcholot	Al-Aboudi et al.[152]
<i>Bacillus megaterium</i>	Triterpene (Betulinsäure)	Chatterjee et al.[153]
<i>Bacillus subtilis</i>	Ginsenoside (Rh1 und Re)	Li et al.[154]
<i>Bacillus thuringiensis</i> (*)	Fipronil	Mandal et al.[155]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Monoterpene, Diterpene	Rueda [156], Fraga et al. [157]
<i>Nocardia iowensis</i>	Triterpene	Zhang [122], Leipold et al. [121]
<i>Pseudomonas putida</i> R1	Isoprenoide, Monoterpene	Cantwell [158], Chatterjee et al.[159]
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Monoterpene, Diterpene	Gondal [160], Diez et al. [161]
<i>Streptomyces cattleya</i>	Triterpene (durch <i>S. griseus</i> )	Guo et al. [162]

(\*) Eine Substratlösung wurde in einem Vorprojekt durch eine heterologe Kultur kontaminiert. Die Isolierung und die Bestimmung der Kulturen erfolgte durch Dr. Susanne Müller, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ, Leipzig. Die angewandte Methode ist im Anhang, Kapitel D.3 zu finden.

### 3.3.6 Klassifizierung und Charakterisierung von *Nocardia iowensis* zur Biotransformation von Triterpenen

Die Isolierung von *Nocardia iowensis* (früher als *Nocardia* sp. NRRL 5646 bezeichnet) erfolgte durch Lederle Laboratories aus Gartenerde aus Iowa (USA) in den 1970er Jahren. Die Lederle Laboratories sind eine Abteilung der American Cyanamid Company, welche 1977 und 1978 zwei Patente zur Herstellung des antibakteriellen Wirkstoffs *trans*-BM123- $\gamma$  durch die Nocardienkulturen NRRL 5646, NRRL 8050, NRRL 11230 und deren Mutanten erwarb [163; 164]. Das Interesse an den katalytischen Eigenschaften von *Nocardia* sp. NRRL 5646 wurde Mitte der 90er Jahre wieder entdeckt, als Ibuprofen (alpha-methyl-4-(2-methylpropyl)benzen-acetylsäure) zu seinem korrespondierendem Alkohol reduziert und durch weitere Veresterungen zu Ibuprofenolacetat bzw. Ibuprofenol-O-Acetylmandelatester transformiert werden konnte [165]. Durch weitere Studien mittels *Nocardia iowensis* durch die Arbeitsgruppe von J. P. Rosazza konnte u.a. 1995 die erste Stickstoffmonooxid-Synthase in Bakterien identifiziert und 1997 die Arylaldehyd-oxidoreduktase (EC 1.2.1.30) isoliert werden. Die Reduktase transformiert Benzoesäure mithilfe der Cofaktoren ATP, Mg<sup>2+</sup> und NADPH zu Benzaldehyd. In der Studie von Li *et al.* wurde vor allem auch auf die hohe Enantioselektivität bei der Ibuprofentransformation hingewiesen, wenn *N. iowensis* als Ganzzell-Biokatalysator eingesetzt wird [166]. Eine solch hohe Selektivität und die Eigenschaft organi-

sche Verbindungen umzuwandeln, führten im Laufe der weiteren Jahre zu Studien, bei denen komplexe Substanzen transformiert wurden, wie z. B. Vanillinsäure [167], Daidzein [168], pentazyklische Triterpene (siehe Abbildung 57) [122] und das 7-Hydroxyflavone [169]. 2009 wurde durch Lamm *et al.* *Nocardia* NRRL 5646 betreffend der 16S rRNA, seinem 65-kDa Hitzeschockprotein (heat-shock protein (hsp65)) und der Preprotein Translokase (secA1) anhand der Gensequenz untersucht [170]. Dabei stellte sich heraus, dass diese Sequenzen nur zu 98,8 % mit den bekannten *Nocardia* Spezies identisch waren. Aus diesem Grunde wurde dem eigenständigen Stamm der Name *Nocardia iowensis* vergeben.

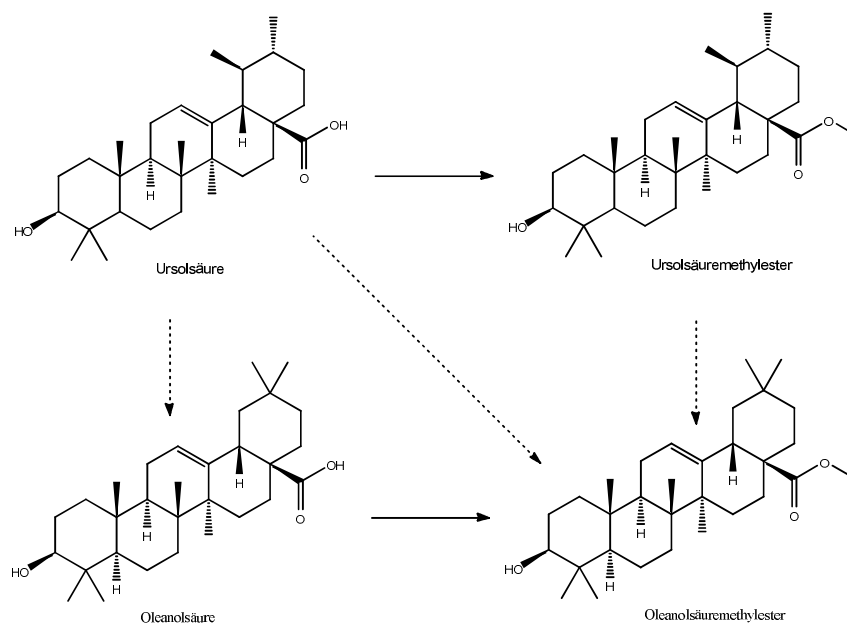


Abb. 57: Biotransformation der pentazyklischen Triterpene Oleanol- und Ursolsäure durch *Nocardia iowensis* nach Zhang *et al.* [122]. Durch Leipold *et al.* konnten die Umwandlungen der Ursolderivate zu den Oleanolderivaten nicht bestätigt werden, weshalb die Reaktionspfeile gestrichelt dargestellt sind [121].

### 3.3.7 Immobilisierung von Organismen

Wird eine industrielle Nutzung der Biotransformation von Ursolat durch *Nocardia iowensis* angestrebt, muss für jede Biotransformation eine Transformationskultur vorbereitet werden. Wirtschaftlich interessanter wäre es jedoch, wenn die biokatalytisch-aktive Kultur für mehrere Biotransformationen verwendet werden könnte. Eine Immobilisierung der Zellen ist eine einfache Methode, die Zellen für eine weitere Biotransformation zurückzuhalten. Man unterscheidet in zwei grundsätzliche Methoden einer Zellimmobilisierung: den Einschluss von Organismen durch Matrices oder porösem Polymer oder das Binden der Zellen an eine organische oder anorganische Matrix [171]. In dieser Arbeit ist die Methode der Wahl eine Immobilisierung der Biotransformationskultur in verschiedenen Matrices. Neben der Zellrückhaltung wird auch eine spätere Produkttrennung und Produktreinigung von Zellrückständen vereinfacht. Jedoch unterliegen die immobilisierten Zellen häufig einer geringeren Stabilität gegen-

über chemischen und thermischen Belastungen [172]. Ein weiterer Nachteil ist die geringere mechanische Belastbarkeit der Immobilisate in Abhängigkeit vom Reaktordesign. Im Wirbelbett- oder Rührreaktor kann es aufgrund von Drücken und mechanischen Bestandteilen wie Rührer und Stromstörer zu einer Schädigung der Gelmatrix kommen. Im Vergleich mit Suspensionszellen besteht auch die Möglichkeit, dass die immobilisierten Zellen eine geringere Aktivität besitzen, da der Stofftransport für Substrate und Produkte durch umgebende Gelmatrix deutlich erschwert ist [173; 174].

Um die Durchlässigkeit der Matrix zu untersuchen, werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Matrices miteinander verglichen, die häufig in der Industrie und in der Forschung angewandt werden. Die häufigste Methode ist eine Immobilisierung in Alginat. Sie ist ein kostengünstiges, umweltschonendes und leicht durchzuführendes Verfahren. Auch empfindliche Mikroorganismen können auf diese Weise immobilisiert werden. In der Literatur sind Berichte betreffend einer Immobilisierung in Alginat sowohl für Bakterien [175], als auch für Pilze [176], Algen [177], Pflanzenzellen [178] und tierische Zellen [179] zu finden. Meist resultierte eine Immobilisierung in einer Erhöhung der Produktkonzentration und in einer Stabilisierung der Biotransformationskapazität [136]. Jedoch kann die aus Meerespflanzen gewonnene Gelmatrix aufgrund von spezifischen biologischen Abbaureaktionen und Wechselwirkungen mit Medienbestandteilen, wie Phosphatpuffer, destabilisiert werden, sodass die Zellen aus der Immobilisatmatrix austreten können [180].

Eine Alternative zu der Alginateinbettung ist eine Immobilisierung der Zellen in synthetischen Polymeren, wie Polyvinylalkohol. Diese besitzen eine bessere mechanische Stabilität, weshalb sie in der Bioremediation [181; 182] und in der Biodegradation [183] eingesetzt werden. Auch die Bildung von Bioethanol wird mittels PVA-immobilisierten Mikroorganismen durchgeführt [184; 185]. Die Zellen unterliegen im Immobilisat eine sich vom dem umgebenden Medium Milieu, sodass eine höhere Zellstabilität gegenüber Temperatur, pH und Ethanol (EtOH) vorliegt [185]. Jedoch kann die Membran eine Diffusion von hochmolekularen Produkten stören, sodass eine gewünschte Biotransformation unterdrückt wird [186].



### **3.4 Angewandte Methoden**

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden werden in diesem Kapitel kurz zusammengefasst. Etablierte Methoden, wie die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse, Medienzusammensetzung und Charakteristika der verwendeten Bioreaktoren sind im Anhang zu finden.

#### **3.4.1 Bestimmung der Trockenbiomasse von Pflanzenzellen unter Verwendung einer Gefriertrocknungsanlage**

Kleine Volumina (bis zu 10 mL) wurden während der Kultivierung von Pflanzenzellen im Brutschrank getrocknet und gravimetrisch bestimmt (siehe Anhang, Kapitel D.1). Zudem wurde am Ende einer Suspensionskultivierung 40 mL Zellsuspension entnommen und in 50 mL-Rundkolben überführt. Der Inhalt der Kolben wurde durch ein 10-minütiges Bad im flüssigen Stickstoff verfestigt. Bei einem Druck von 0,01 mbar und in einem Zeitrahmen von 6 Tagen wurden die Zellen im Gefriertrockner (Christ LOC-1m, ALPHA 2-4) getrocknet. Die Bestimmung der erhaltenen Biotrockenmasse erfolgte durch die gravimetrische Bestimmung nach Abzug des Leergewichtes der Rundkolben.

Im Anschluss an den Trocknungsprozess wurde die getrocknete Biomasse, das sogenannte Lyophilisat, dem mechanischen Zellaufschluss überführt.

#### **3.4.2 Mechanischer Zellaufschluss von Pflanzenzellen**

Zur Bestimmung der Triterpenkonzentration in Pflanzenzellen erfolgte die Freisetzung der Triterpene über einen mechanischen Zellaufschluss. 0,1 g Lyophilisat wurden in 0,5 g Seesand und 3 mL Ethanol aufgenommen und mittels Mörsers von Hand verrieben. Nach 10 Minuten entstand daraus eine homogene Suspension, wie sie in Abbildung 58 zu sehen ist.

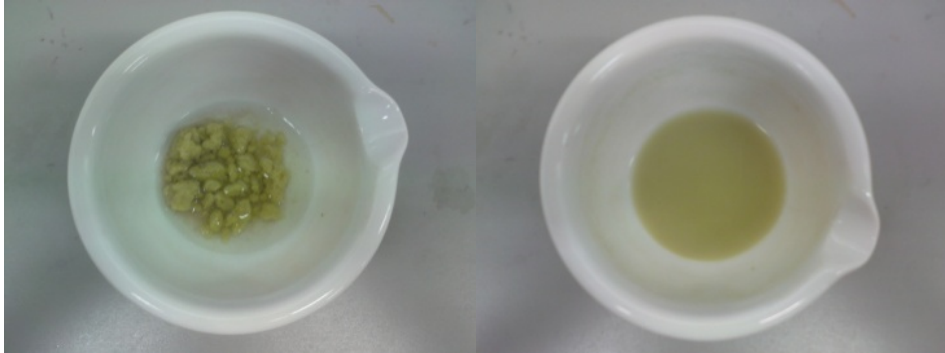


Abb. 58: Gefriergetrocknete Biomasse mit Ethanol und Seesand; links: vor dem mechanischen Zellaufschluss; rechts: nach dem mechanischen Zellaufschluss

Anschließend wurde das Gemisch in ein 15 mL-Zentrifugengefäß überführt. Bestehende Rückstände wurden in Ethanol aufgenommen und dem Zentrifugengefäß hinzugefügt. Eine Verbesserung der Triterpenausbeute wurde durch die weitere Behandlung der Probe in einem Ultraschallbad für 15 Minuten bei 50 °C und einer Intensität von 90 % erreicht. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der 15 mL-Zentrifugengefäße für 10 Minuten bei 8000g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde entnommen und in einen Rundkolben überführt. Das entstandene Pellet wurde zwei weitere Male mit 750 µL Ethanol resuspendiert und zentrifugiert. Die daraus erhaltenen Überstände wurden in einem Rundkolben gesammelt. Im Rotationsverdampfer wurde bei 50 °C und einem Vakuum von 150 mbar das Ethanol entfernt. Im Anschluss wurde die Probe mit 1,5 mL dem für die chromatographische Analytik der Triterpene verwendeten Eluent (siehe Kapitel 3.4.3) vermischt und die Rückstände durch eine Kurzbehandlung im Ultraschallbad resuspendiert. Nach einer Filtration durch einen 0,45 µm PTFE-Filter konnte die Probe für die HPLC-Analytik (siehe Kapitel 3.4.3) verwendet werden.

### 3.4.3 RP-HPLC-Analytik von Triterpenen

Die zu analysierenden Triterpen-Proben wurden mittels RP-HPLC analysiert. Zur Verfügung stand ein Waters Alliance 2695 System mit einem PDA (*Photo Diode Array*)-Detector 2998 (Waters, Milford Massachusetts, USA). Als stationäre Phase wurde die Säule Discovery HS C18 5 µm, 250 mm×4.6 mm bei 16 °C verwendet. Als Lauf- und Elutionsmittel diente eine Lösung aus Methanol mit 0.1 % Ameisensäure (im Verhältnis von 92:8 (v/v)). Die Flussrate betrug 1 mL min<sup>-1</sup>. Die Elution erfolgte durch die isokratische Methode. Das Proben-Injektionsvolumen betrug unter Standardbedingungen 20 µL. Die Detektion der Triterpene erfolgte im UV-Spektrum bei 205 nm.

### 3.4.4 HPLC-MS-Analytik von Triterpenen

Die Analytik des Massespektrums (MS) erfolgte in einer Tandemschaltung von RP-HPLC und einem Massenspektrometer. Zur MS-Analyse wurde ein MicromassQuattro LC Massenspektrometer (Waters, Milford Massachusetts, USA) verwendet. Um die Proben in das Massenspektrometer zu überführen, war die HPLC mit einem Splitter ausgerüstet, der nach dem Detektor in Reihe geschaltet war. So konnten Substanzen direkt nach der Detektion im UV-Spektrum bei 205 nm in das Massenspektrometer geleitet und betreffend ihres m/z-Verhältnisses untersucht werden. Die Daten wurden mittels der dazugehörigen Software (MassLynx Software V4.1 (Waters, Milford Massachusetts, USA)) ausgewertet.

Die Ionisierung mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) erfolgte durch eine Positiv-Ionisierung bei einer Kapillarspannung von 4,0 kV, einer Probentemperatur von 100 °C und einer Desolvatisierungstemperatur von 250 °C. Das Massenspektrum von 50 bis 1200 m/z konnte durch diese Methode erfasst werden.

### 3.4.5 HPLC-<sup>1</sup>H-NMR-Analytik von Triterpenen

Das <sup>1</sup>H-NMR Spektrum wurde durch eine gekoppelte HPLC-NMR ermittelt. Zur Probenvorbereitung wurden im Rotationsverdampfer LABOROTA 4003 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland) bei 150 mbar und 40 °C aufkonzentriert und in 0.3 mL CH<sub>3</sub>OH-d<sub>4</sub> re-suspendiert. Das verwendete HPLC-System bestand aus einem 1100 Series HPLC-System (Agilent Technologies, CA, USA) mit einem 600 MHz Avance Spektrometer und einem 3 mm LCSEI flow probe (Bruker BioSpin, Germany). Als HPLC-Säule wurde eine Discovery HS C18 5 µm, 250 mm×4.6 mm verwendet. Die mobile Phase bestand aus deuteriertem Acetonitril und deuteriertem Wasser, welches im Verhältnis von 92:8 (v/v) gemischt worden war. Die Elution erfolgte über eine isokratische Methode bei 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Sobald der Analyt bei 212 nm detektiert wurde, wurde dieser über die Bruker Software in den NMR-Analyser weitergeleitet.

Da durch die NMR-Analytik das Laufmittel ausgetauscht wurde, mussten die Laufeigenschaften untersucht und die Spektren mit denen der RP-HPLC-Proben aus Kapitel 3.4.3 verglichen werden. Die aus dem deuterierten Laufmittel resultierenden HPLC-Spektren waren im Vergleich zum Methanol/Ameisensäure-Laufmittel leicht verschoben. Durch das angeschlossene Massenspektrometer war eine eindeutige Identifizierung der Substanzen möglich.

### 3.4.6 Herstellung von Kryokulturen

In Kapitel 3.3.4 zur Theorie der Kryokonservierung von Pflanzenzellen wurden kurz unterschiedliche Methoden zur Herstellung von Kryokulturen dargestellt. Von Interesse waren für die durchgeführte Arbeit zwei ausgewählte Konservierungsmethoden. Zum einen das schnelle Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und zum anderen das langsame Einfrieren über einen Kühlungsgradienten. Auch eine Analyse über den Einfluss von Glycerin als Kryoprotektiva erfolgte im Laufe der Untersuchung.

Die Zellen einer 21 Tage alten Plattenkultur wurden von den Platten entnommen. Im Anschluss erfolgte eine Aufteilung der Zellen zu 0,58 g Biofeuchtmasse pro 2 mL-Zentrifugengefäß. In den Versuchsreihen über den Einfluss von Kryoprotektiva wurden den 2 mL-Zentrifugengefäßen 1 mL 80 %iges Glycerin hinzugegeben und die Lösungen mit einem Spatel vorsichtig für 2 Minuten homogenisiert.

Das schnelle Einfrieren der Zellen wurde durch ein Schockfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff realisiert. Die weiteren Proben wurden durch die Lagerung in einem Isopropanolbad bei -80 °C über Nacht vorsichtig eingefroren [148]. Diese Methode wird auch in der Literatur für empfindliche eukaryotische Zellen beschrieben. Dabei friert das umgebende Isopropanol die Zellen bei einer Kühlrate von -1 °C pro Minute langsam ein [187].

Die angelegten Kryogenkulturen wurden nach der Lagerung vor der anschließenden Kultivierung langsam aufgetaut. Das heißt, die Reaktionsgefäße wurden aus dem Gefrierschrank bei -80 °C in ein Eisbad (0 °C) überführt und bei Raumtemperatur aufgetaut. Durch die Verwendung von Eis konnten somit niedrige Auftauraten erreicht werden. Proben, die Glycerin enthielten, wurden im Anschluss bei 1000 upm für 30 Minuten vorsichtig zentrifugiert und vom Glycerin weitestgehend befreit.

Die Bestimmung der Biofeuchtmasse der Kryokulturen erfolgte durch Überführen der Proben auf Agarmedien und der gravimetrischen Bestimmung der Kulturplatten während der Kultivierung der Zellen bei 28 °C im Inkubator.

### 3.4.7 Kultivierung von *Nocardia iowensis* und anschließende Biotransformation

Die Kultivierung von *Nocardia iowensis* erfolgt im GYM-Medium (Anhang B, Kapitel B.2) im Inkubator im Erlenmeyerkolben ohne Schikane bei 28 °C und 120 upm. Die Verdopplungszeit beträgt bei diesen Prozessparametern 12,2 h. Die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit sowie der Verdopplungszeit wurde anhand Abbildung 59 ermittelt.

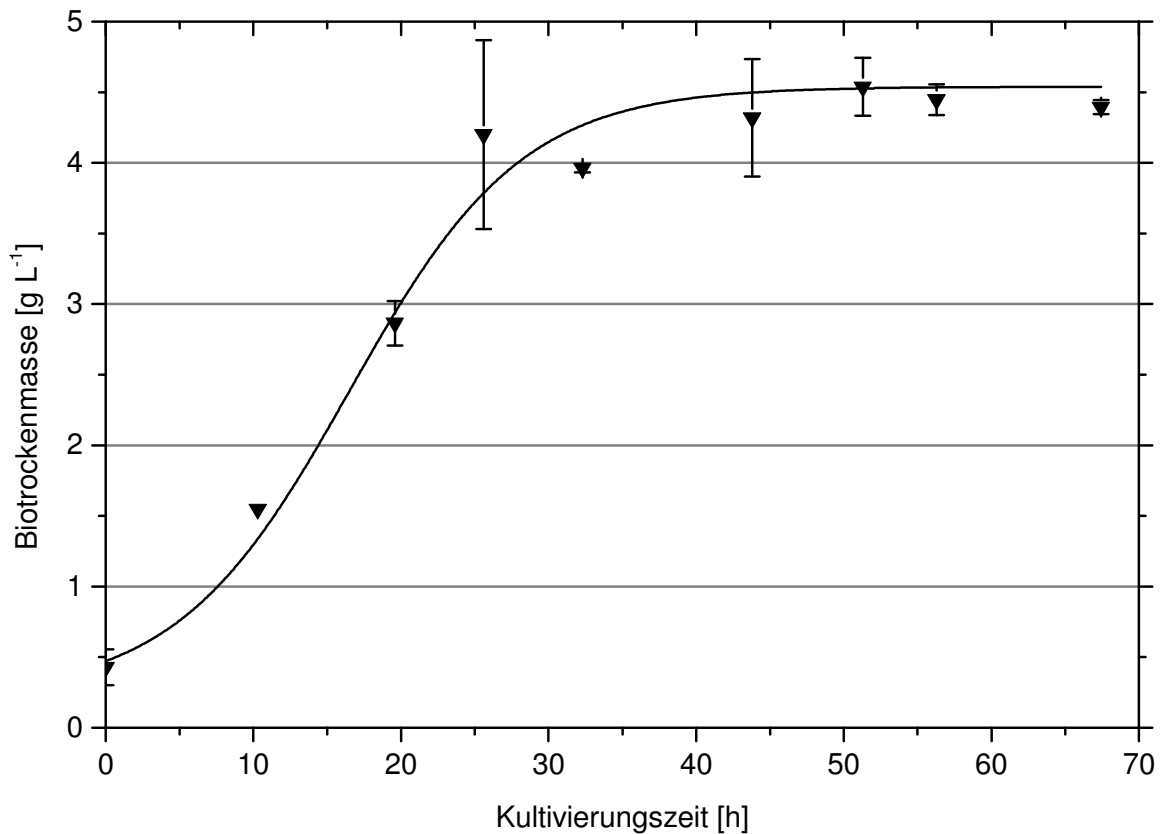


Abb. 59: Kultivierungsverlauf von *Nocardia iowensis* im Erlenmeyer-Schüttelkolben ohne Schikane und in 50 mL GYM-Medium bei 28 °C und 120 upm.

Die Wachstumsgeschwindigkeit wird maximal, wenn das Wachstum nicht durch Prozessparameter limitiert wird. Mathematisch erfasst wird diese durch die Bestimmung der Steigung der Biotrockenmasse während der exponentiellen Phase. Für die maximale Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{max}$  ergibt sich nach der Formel 25:

$$\mu X = \frac{dX}{dt} \quad (25)$$

$$\mu_{max} = \frac{\ln(4,395 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}) - \ln(0,57464 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1})}{40 \text{ h} - 4,04925 \text{ h}}$$

$$\mu_{max} = 0,057 \text{ h}^{-1}$$

Daraus folgt für die Verdopplungszeit  $t_d$  nach der Formel 26:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (26)$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{0,057 \text{ h}^{-1}} = 12,16 \text{ h}$$

Die inkubierte *Nocardia*-Kultur kann optisch durch die typische Bildung von Pellets und klarem GYM-Medium-Überstand zugeordnet werden (siehe Abbildungen 60 und 61).

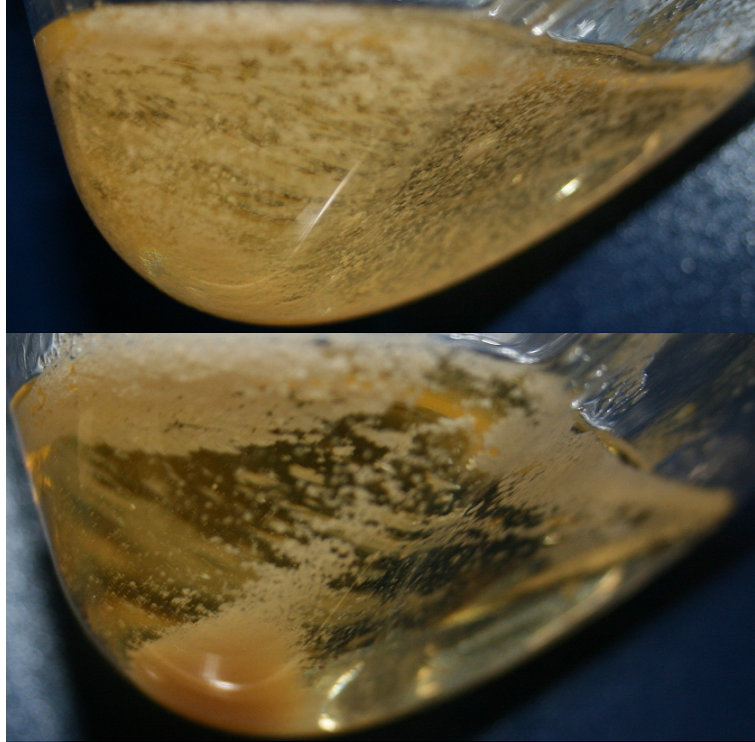


Abb. 60: Schüttelkolbenkultur von *Nocardia iowensis*. Nach 72 Stunden sind Zellpellets zu erkennen (oben), die sich innerhalb von einer Minute am Kolbenboden absetzen (unten).

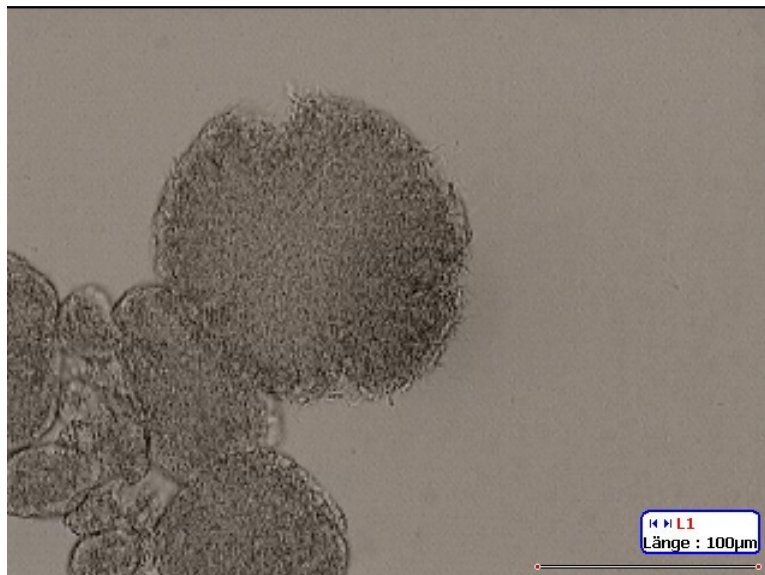


Abb. 61: Schüttelkolbenkultur von *Nocardia iowensis*. Zellpellets im Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung.

Nach 72 Stunden werden 3 % der Vorkultur zur Inokulation des Hauptmediums verwendet. Die Kultivierungstemperatur beträgt wie bei der Vorkultivierung 28° C. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium mit der zu transformierenden Substratlösung (Ursolat oder Oleanolsäure in 9 mL Ethanol) versetzt. Die Probenahme erfolgte alle zwei bis drei Tage, um signifikante Änderungen der Substrat- und Produktkonzentrationen zu erfassen. Die daraus resultierenden Proben wurden für die weitere Analytik bei –20 °C gelagert.

### 3.4.8 Immobilisierung von *Nocardia iowensis*

Um einen direkten Vergleich der Matrix-basierenden Immobilisierungsverfahren und der freien Zellen zu ermöglichen, wurden 4,5 mL einer *Nocardia iowensis* Vorkultur in 15 mL-Zentrifugenröhrchen aliquotiert und diese bei 15 min bei 4 °C und 8000g zentrifugiert. Die Medienüberstände wurden verworfen, die Kulturen 1:10 (v/v) in 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung resuspendiert und ein weiteres Mal zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die daraus resultierende Biofeuchtmasse lag bei 0,3 g ± 0,043 g pro Zentrifugengefäß. Die Biofeuchtmasse, die nicht zur Immobilisierung verwendet wurde, wurde als Referenzkultur verwendet und in einen 2 L-Erlenmeyerkolben überführt. Die Immobilisierung der restlichen Biofeuchtmasse erfolgte anhand der folgenden Protokolle.

Für eine Immobilisierung in Natriumalginat wurden die Zellen in 10 mL einer Natriumalginatlösung (1 g Natriumalginat in 35 mL Wasser) resuspendiert und mit einer 20 mL Spritze mit einer Kanüle aufgenommen. Durch langsames Drücken der Zelllösung durch die Spritze kommt es zur Tropfenbildung, deren Größe in Relation zur verwendeten Kanüle (hier 18Gx90mm) steht. Die Tropfen (<2 mm) wurden in 400 mL einer 2 %igen bzw. nach der Optimierung in 20 %igen (w/v) Calciumchloridlösung zur Bildung der Matrix aufgenommen und für 30 Minuten durchmischt. Die Immobilisate wurden vor der Verwendung im Medium filtriert und mit einer 0,9 %igen Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die Immobilisate wurden dann ohne die Natriumchloridlösung in das Hauptmedium überführt.

Zur Immobilisierung mit Polyvinylalkohol wurde LentiKat<sup>®</sup>Liquid der Firma GeniaLab als Einschlußmaterial eingesetzt. Das LentiKat<sup>®</sup>Liquid wurde in der Mikrowelle vollständig aufgeschmolzen. 3 g LentiKat<sup>®</sup>Stabilizer wurden in 200 mL destilliertem Wasser gelöst. Wie bei der Immobilisierung in Natriumalginat wurden 4,5 mL der Vorkultur in ein 50 mL Zentrifugengefäß überführt und 15 min bei 4 °C und 8000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und das erhaltene Zellpellet mit 10 mL LentiKat<sup>®</sup>Liquid vermischt. Mithilfe einer 20 mL Spritze wurde die Suspension in gleichmäßigen Tropfen in eine Petrischale gefüllt. Die Tropfen wurden bis auf eine Restfeuchtmasse von 28 % getrocknet. Für die Rückquellung und das Ablösen der Gelpartikel wurde LentiKat<sup>®</sup>Stabilizer über die LentiKat<sup>®</sup> gegossen. Die so erhaltenen linsenförmigen LentiKat<sup>®</sup>s wurden in 200 mL LentiKat<sup>®</sup>Stabilizer überführt und für weitere 30 min gerührt. Wie bei den Alginitimmobilisaten wurden die entstandenen Immobilisate ohne die Stabilisierungslösung in das Hauptmedium überführt.

### 3.4.9 Spezifikationen des eingesetzten BIOSTAT-CultiBag RM, Sartorius

Neben den in 2.4.4 vorgestellten Rührkesselbioreaktoren von Bioengineering wurde für die Kultivierung der Kalluszellen das BIOSTAT<sup>®</sup> CultiBag RM-System von Sartorius (Göttingen,

Deutschland) verwendet. Es besteht aus einer Station (Abbildung 62), in die Einweg-Kulturbeutel zur Fermentation von diversen Organismen eingesetzt werden können. In den durchgeführten Versuchen wurden 2 L-Kulturbeutel verwendet, die mit einem Liter Pflanzenkultur befüllt wurden. An den Kulturbeutel werden über Luftfilter, sowohl die Zuluft als auch die Abluft angeschlossen. Der Volumenstrom, sowie Temperatur, Durchmischung mittels Schaukelantrieb und Schaukelwinkel können über die Station geregelt werden. Spezielle Cultibags, die eine Bestimmung des pH-Werts über integrierte Einwegsonden ermöglichen, wurden im System nicht verwendet, sodass die pH-Wert-Kontrolle *offline* erfolgte. Für Kultivierung im BIOSTAT® CultiBag RM-System wurden folgende Parameter verwendet: Eine Kultivierungstemperatur von 28 °C, eine Belüftungsrate von 0,25 vvm, ein Schaukelwinkel von 7° und eine Schaukelbewegung von 30 rpm. Mittels dieser Prozessparameter wird ein spezifischer Leistungseintrag von etwa 70 W m<sup>-3</sup> in das System eingetragen (Anhang D, Kapitel D.5) [188].

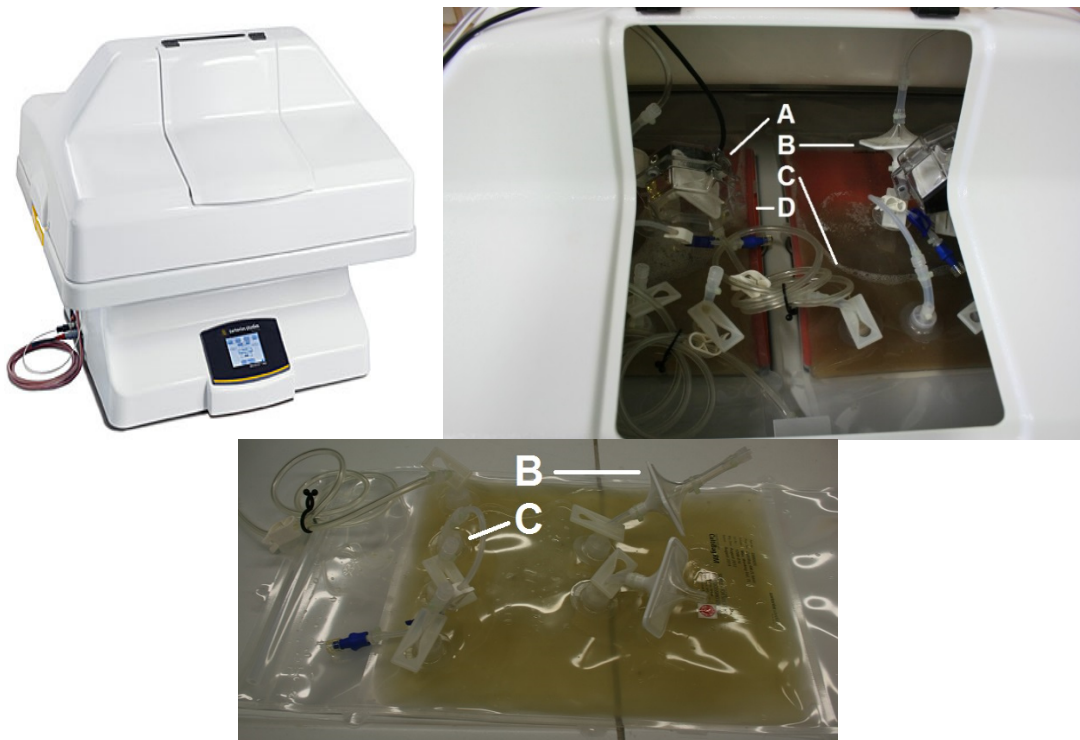


Abb. 62: Links oben: BIOSTAT® CultiBag RM von Sartorius; rechts oben: Geöffnete Station; Unten: 2 L-CultiBag RM. A) Temperierter Abluftfilter; B) Zuluftanschluss mit Filtereinheit; C) Probenahme; D) Heizplatte (rot) zur Wärmeregulierung.

### 3.4.10 Aufarbeitung der aus der Biotransformation erhaltenen Proben

Nachdem die Proben bei Zimmertemperatur aufgetaut wurden, wurden 8 mL entnommen und mit 8 mL Ethylacetat verdünnt. Durch einen Rotationsschüttler wurden die Proben für 20 Minuten bei RT durchmischt, sodass die hydrophobe Ursol- und Oleanolsäure und deren Derivate sich in der organischen, Ethylacetat-haltigen Phase lösen. Zur Beschleunigung der



anschließenden Phasentrennung wurde eine 40-minütige Zentrifugation bei 4°C und 8000g durchgeführt. Die organische, obere Phase wurde dem Reaktionsgefäß entnommen und im Rotationsverdampfer bei 150 mbar und 50 °C verdampft. Ursol- und Oleanolbestandteile bilden im Rundkolben einen weißen Niederschlag. Resuspendiert wurden die Rückstände mit jeweils 1,5 mL des HPLC-Eluenten und im Ultraschallbad bei RT. Durch das Verwenden eines 0,45 µm PTFE-Filter werden etwaige Rückstände entfernt und die Proben mit der HPLC analysiert.

### 3.4.11 Extraktion von Pflanzenzellen für eine anschließende Biotransformation

Eine Biotransformation im Pflanzenzellextrakt wäre aufgrund einer umgangenen vorherigen Aufarbeitung der Ursol- und Oleanolsäure sowohl wirtschaftlich als auch verfahrenstechnisch sehr interessant. Um dies zu realisieren und um mögliche Inhibitionen der Biotransformation zu detektieren, wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Herstellung eines Lysats angewandt.

Aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser der hydrophoben Ursol- und Oleanolsäure wurde in der ersten Methode ein konzentriertes Lysat auf Basis von Ethanol hergestellt. Dafür wurde die Pflanzenzellkultur *S. fruticosa* durch ein fünfflagiges Mull vom Medium getrennt und anschließend mit deionisiertem Wasser gewaschen. Nachdem die Zellen ein weiteres Mal gewaschen wurden, betrug die Biofeuchtmasse 460 g. Die Pflanzenzellen wurden in 1,5 L Ethanol resuspendiert, bevor sie mit einer French-Press (TS Series Cabinet, Constant Systems LTD) bei 1800 bar, 19 °C und im kontinuierlichen Prozess aufgeschlossen wurden. Um Zellrückstände aus der French-Press zu entfernen, wurde im Anschluss die Anlage mit 200 mL Ethanol gespült. Das erhaltene Extrakt wurde auf zwei 1 L Zentrifugengefäße aufgeteilt und bei 4000g für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand beider Gefäße wurde schrittweise in einen 1 L Rundkolben überführt und im Rotationsverdampfer (Rotavapor R-124, Büchi) bei 175 mbar, 60 upm und 60 °C verdampft. Final enthielt das Konzentrat noch Wasser, welches durch eine Reduzierung des Unterdruckes auf 90 mbar entfernt wurde. Mittels Ultraschall und 18 mL Ethanol konnte der Rückstand resuspendiert und für die weitere Biotransformation verwendet werden.

In der zweiten Methode wurde eine weitere *S. fruticosa* Pflanzenzellkultur aufgeschlossen. Es wurde jedoch anstelle von Ethanol Wasser als Lösungsmittel verwendet, um die hydrophilen Bestandteile aufzunehmen und hydrophobe Inhibitoren im Zellextrakt zu belassen. Durch diese Methode wurden nur geringe Konzentrationen an Ursol- und Oleanolsäure im Lysat gelöst, weshalb für die anschließende Biotransformation 50 mg Ursolat pro Versuchsansatz hinzugegeben wurde.

Nachdem die Pflanzenzellkultur gewaschen wurde, betrug die erhaltene Biofeuchtmasse 103 g. Hier erfolgte die Resuspendierung in 300 mL deionisiertem Wasser, bevor die Zellen durch die French-Press aufgeschlossen wurden. Mittels Spülen mit 100 mL deionisiertem Wasser wurden letzte Zellrückstände aus der French-Press entfernt. Durch die anschließende Zentrifugation bei 4000g für 10 Minuten konnten die Zellbestandteile abgetrennt werden. Der Überstand wurde vor der weiteren Verwendung in der Biotransformation durch eine PES-Vakuumfiltereinheit (0,2 µm) steril filtriert.

#### **3.4.12 Bestimmung der Zuckerkonzentration mittels HPLC**

Mittels einer HPLC-Anlage von Techlab (Techlab GmbH, Braunschweig, Deutschland) war eine Bestimmung der Zuckerkonzentrationen über einen RI (Redfraction Index)-Detektor möglich. Zur Probenvorbereitung wurden die Kulturproben für 15 min bei 4 °C und 8000g zentrifugiert und der Überstand über einen 0,45 µm Acryl-Sterilfilter in ein Probengefäß überführt. Der Messbereich der HPLC-Anlage lag bei dieser Methode bei 0,1 bis 2,0 g L<sup>-1</sup>, weshalb Proben gegeben falls verdünnt werden mussten. Als Eluent wurde zweifach deionisiertes Wasser mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL min<sup>-1</sup> verwendet. Eine einzelne Probe konnte so innerhalb von 25 Minuten analysiert werden. Da die Detektion des Berechnungsindex stark von der Temperatur abhängig ist, wurde die Chromatographiesäule über einen Säulenofen auf eine konstante Säulentemperatur von 80 °C beheizt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software Clarity (Techlab GmbH, Braunschweig, Deutschland).

### 3.5 Bestimmung der Erfassungs-, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der HPLC-Analytik

Wie bei der Bestimmung der Bestimmungs-, Erfassungs- und Nachweisgrenzen für die HPLC-Analytik des  $\beta$ -Lactam Antibiotikums (Kapitel 2.5), werden für die Analytik der Triterpenkonzentration die Grenzen anhand der DIN 32645 (2008 11) der in Kapitel 3.4.3 vorgestellten RP-HPLC-Analytik bestimmt. Um die Bestimmungs-, Erfassungs- und Nachweisgrenzen zu ermitteln, müssen zusätzlich statistische Kenngrößen experimentell bestimmt werden. Die Ermittlung der Grenzen erfolgte sowohl für Ursol- als auch Oleanolsäure.

Die für die Aufnahme der Kalibriergeraden verwendeten fünf Ursolsäure-Konzentrationsstufen betragen 0,025; 0,05; 0,125; 0,25 und 1,25 g L<sup>-1</sup>. Die Bestimmung der Oleanolsäureanalytik erfolgte mittels einer Verdünnung der Stammlösung von 1,21 g L<sup>-1</sup>. Daraus resultierten sechs Oleanolsäure-Konzentrationen (0,0242; 0,0485; 0,121; 0,2425; 0,485; 1,21 g L<sup>-1</sup>). Die für die Bestimmung der Grenzen notwendigen Kenngrößen sind in der folgenden Tabelle 8 aufgelistet:

Tab. 8: Kenngrößen zur Bestimmung der Erfassungs-, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen von Ursolsäure. Die mathematischen Definitionen sind in Kapitel 2.5 aufgelistet.

Bedeutung	Ergebnisse für Ursolsäure	Ergebnisse für Oleanolsäure
Arithmetisches Mittel der Gehalte aller Kalibrierproben	$\bar{x} = 0,34 \text{ mg L}^{-1}$	$\bar{x} = 0,355 \text{ mg L}^{-1}$
Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibrierung	$Q_x = 1,06575 \text{ g}^2 \text{ L}^{-2}$	$Q_x = 1,0187 \text{ mg}^2 \text{ L}^{-2}$
Geschätzter Funktionswert bei der Kalibrierung	$a = 68096$ $b = 14859885 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$	$a = 149371$ $b = 13930202 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$
Reststandardabweichung der Messwerte der Kalibrierung	$s_{y,x} = 115982,45$	$s_{y,x} = 160738$
Verfahrensstandardabweichung	$s_{x_0} = 0,0078 \text{ mg L}^{-1}$	$s_{x_0} = 0,0115 \text{ mg L}^{-1}$

Dabei ist  $i$  die Laufzahl der Kalibrierproben;  $x_i$  die Gehaltsgröße;  $y_i$  der Messwert der Kalibrierprobe;  $m$  die Anzahl der Messungen an der Analysenprobe ( $m = 1$ );  $n$  die Anzahl der Kalibrierproben ( $n = 5$ );  $f$  die Anzahl der Freiheitsgrade ( $f = n - 2 = 3$ );  $t_{f,\alpha}$  das Quantil der  $t$ -Verteilung bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 1. Art;  $t_{f,\beta}$  das Quantil der  $t$ -Verteilung

bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 2. Art;  $1/k$  die relative Ergebnisunsicherheit zur Charakterisierung der Bestimmungsgrenze ( $k=3$ ).

Daraus resultiert eine Nachweisgrenze  $x_{NG}$  für Ursolsäure wie folgt:

$$x_{NG} = s_{x_0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (27)$$

$$= 40,5 \text{ mg L}^{-1}$$

Die Erfassungsgrenze  $x_{EG}$  für Ursolsäure ist demnach:

$$x_{EG} = x_{NG} + s_{x_0} \cdot t_{f;\beta} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \quad (28)$$

$$= 81,1 \text{ mg L}^{-1}$$

Die Bestimmungsgrenze  $x_{BG}$  für Ursolsäure ergibt damit:

$$x_{BG} = k \cdot s_{x_0} \cdot t_{f;\alpha} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(k \cdot x_{NG} - \bar{x})^2}{Q_x}} \quad (29)$$

$$= 152,8 \text{ mg L}^{-1}$$

Für Oleanolsäure resultiert eine Nachweisgrenze  $x_{NG}$  von:

$$x_{NG} = 59,5 \text{ mg L}^{-1}$$

Die Erfassungsgrenze  $x_{EG}$  für Oleanolsäure ist demnach aus (3-2):

$$x_{EG} = 119,0 \text{ mg L}^{-1}$$

Die Bestimmungsgrenze  $x_{BG}$  für Oleanolsäure ergibt damit in (3-3):

$$x_{BG} = 221,3 \text{ mg L}^{-1}$$

Aus dem Vergleich der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen von Ursolsäure und Oleanolsäure wird erkennbar, dass die Grenzen von Oleanolsäure um circa 50 % höher liegen. Dies ist auf die unterschiedlichen Reststandardabweichungen der Messwerte der Kalibrierung sowie die Verfahrensstandardabweichungen der Substanzen zurückzuführen, die sich aus den spezifischen Wechselwirkungen der Analyten mit dem Adsorber und dem Eluenten ergeben. Eine Reduzierung der Abweichungen könnte erzielt werden, wenn der verwendete Eluent und die HPLC-Prozesssteuerung an den jeweiligen Analyten spezifisch angepasst wären. Eine Detektion der Substanzen durch zwei analytische Prozesse würde den zeitlichen Aufwand erhöhen. Hingegen kann eine Verbesserung der analytischen Grenzen beider Substanzen durch eine Erhöhung des Injektionsvolumens für einen gemeinsamen HPLC-Durchgang erzielt werden. Das bisher verwendete Volumen von 20  $\mu\text{L}$  kann auf 100  $\mu\text{L}$  erhöht werden und eine um den Faktor 5 genauere Detektion ermöglichen, sofern die Auflösungen der einzelnen Peaks im Chromatogramm erhalten bleiben.

## 3.6 Ergebnisse zur Produktion von Ursol- und Oleanolsäure

Im Folgenden werden die Versuchsreihen zur Kultivierung zur Produktion der Triterpene vorgestellt. Zunächst wird eine stabile Stammhaltung von *Salbei officinalis* durch Kryokonservierung präsentiert. Im Anschluss daran folgt eine Präsentation von Submerskultivierungen der Kalluskulturen, welche durch verschiedene Prozessstrategien realisiert werden.

### 3.6.1 Kryokonservierung von *Salbei officinalis*

Eine Stammhaltung von Pflanzenzellen war, wie bereits in Kapitel 3.3.4 beschrieben, sehr zeitaufwendig und konnte zu einer Stoffwechseleränderung der Zellen führen. Neben der etablierten Stammhaltung auf Agarose-Festmedien wurde daher eine Kryokonservierung des nativen *Salvia officinalis*-Kallus realisiert. Dafür wurden Salbeizellen verwendet, die einen geringen Flüssigkeitshaushalt aufwiesen, um eine Penetration der Zellmembran durch das umgebende Medium zu verhindern. Realisiert wurde dies durch das Verwenden von Salbeizellen, die sich in der exponentiellen Phase befanden und die auf Agarose-Festmedien –und damit relativ trocken- kultiviert wurden. Als Untersuchungsparameter wurde für diese Versuche die Bildung der Biofeuchtmasse gewählt, um durch möglichst viele aliquote Proben signifikante Ergebnisse zu erhalten. Die Wachstumsverläufe der Kryokulturen wurden mit denen von Kulturen, die nicht der Kryobehandlung unterlagen, verglichen. Ausgangsbiomasse waren pro Teilversuch und pro Probe 0,6 g Biofeuchtmasse. Die Kryo-1 Kulturen wurden, wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben, langsam durch ein Isopropanolbad eingefroren, während Kryo-2 Kulturen durch eine Behandlung mit Flüssigstickstoff „schockgefroren“ wurden. Proben, mit dem Attribut +Gly wurden vor dem Einfrieren mit 80 %igem Glycerin versetzt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen wieder auf Festmedien überführt und bei 28 °C kultiviert. Die daraus resultierenden Wachstumsverläufe sind in Abbildung 63 dargestellt.

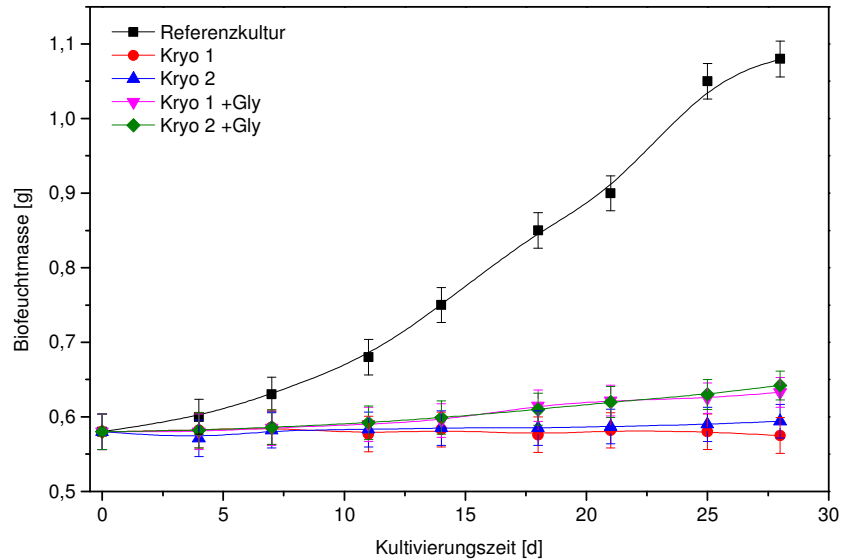


Abb. 63: Kultivierungen von *Salvia officinalis* auf Agarplatten im Anschluss an die Kryokonservierung. Als Referenz wurden Wachstumsverläufe von Salbeikulturen verwendet, die keiner Kryokonservierung unterlagen. Kryo 1-Kulturen wurden langsam, Kryo 2-Kulturen wurden mittels flüssigen Stickstoff Schock eingefroren. Kulturen mit +Gly wurden mit 80 %igem Glycerin vor der Kryobehandlung versetzt.

Wie man aus der Abbildung 63 entnehmen kann, unterschied sich das Wachstum der Salbeizellen nach einer Kryokonservierung deutlich von der Referenzkultur. Im prozentualen Vergleich zur Referenzkultur wurde eine Biofeuchtmassenbildung von 12,4 % im Versuchsansatz des schnellen Einfrierens mit flüssigem Stickstoff und der Zugabe von Glycerin als Kryoprotektiva erreicht. Die maximale spezifische Wachstumsrate betrug bei  $0,002 \text{ d}^{-1}$ . Die spezifischen maximalen Wachstumsraten lagen im Vergleich bei den Referenzkulturen bei  $0,011 \text{ d}^{-1}$ . Durch das langsame Einfrieren und der Zugabe von Glycerin konnte eine Biofeuchtmassenbildung von (10,5 % im prozentualen Vergleich mit der Referenzkultur) und ein  $\mu_{\max}$  von  $0,002 \text{ d}^{-1}$  erreicht werden. Ohne eine Glycerinzugabe als Kryoprotektiva betrug die gebildete Biofeuchtmasse nur 2,8 % mit einer maximalen spezifischen Wachstumsrate von  $0,0006 \text{ d}^{-1}$  im Versuchsansatz des schnellen Einfrierens. Die Pflanzenzellen, die langsam eingefroren wurden, zeigten keine Aktivität, die außerhalb der Messtoleranz lag, sodass weder ein Zuwachs der Biofeuchtmasse noch eine Wachstumsrate bestimmt werden konnte. Im Anschluss wurden die reaktivierten Pflanzenzellen der Versuchsreihe Kryo 2+Gly von den Platten entnommen und auf eine Kulturplatte zusammengeführt. Diese Kultur wurde für weitere 28 Tage inkubiert. Die Ausgangsbiomasse lag, aufgrund der Selektion nur möglichst aktiv-aussehende Zellen zu entnehmen, bei 0,52 g. Der daraus resultierende Wachstumsverlauf ist in Abbildung 64 im Vergleich zur Referenzkultur dargestellt. Die nach 28 Tagen ermittelte Biofeuchtmasse der reaktivierten Kultur war 0,87 g, was einem Zuwachs von 80 % im prozentualen Vergleich zur Referenzkultur entsprach. Hier wurde eine maximale spezifische Wachstumsrate von  $0,007 \text{ d}^{-1}$  bestimmt.

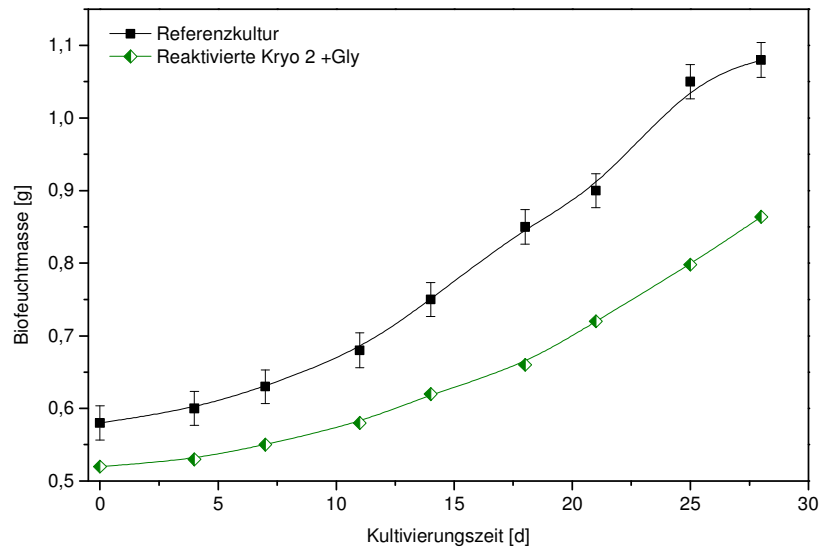


Abb. 64: Kultivierungen von *Salvei officinalis* auf Agaroseplatten im Anschluss an die Kallus-Regeneration. Als Referenz wurden Salbeikulturen verwendet, die nicht eingefroren wurden. Für die reaktivierte Kryokultur 2+Gly wurden Kalluszellen aller Platten entnommen, die mittels 80 %igem Glycerin und durch das Einfrieren mit flüssigem Stickstoff eingefroren waren.

Durch diesen Versuch konnte nachgewiesen werden, dass ein „Schockgefrieren“ der Zellen zellschonender für *Salvia officinalis* war, als ein langsames Einfrieren über ein Isopropanolbad. Die Verwendung von Kryoprotektiva zeigte den größten Einfluss bei einer Kryokonservierung von Salbei. Kultivierte man die neu gebildeten und aktiven Pflanzenzellen auf einem weiteren Festmedium, so konnte wieder eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit detektiert werden (Abbildung 64). Zwar war noch ein geringer Unterschied der Wachstumsgeschwindigkeit und der Biomassenbildung zwischen der Referenzkultur und der 2-fach kultivierten Kryokultur zu erkennen, jedoch war dies hauptsächlich auf die unterschiedliche Ausgangsbio-masse zurückzuführen. Ein Vergleich einer Referenzkultivierung mit einer geringeren Inokulationskonzentration oder eine Kryokultur mit höherer aktiver Ausgangsbio-masse hätte verdeutlicht, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Kryo- und Referenzkultur vorlag.

Ein zeitlicher Prozessverlauf betreffend der Kryokonservierung von *Salvia officinalis* ist in der abschließenden Abbildung 65 dargestellt.

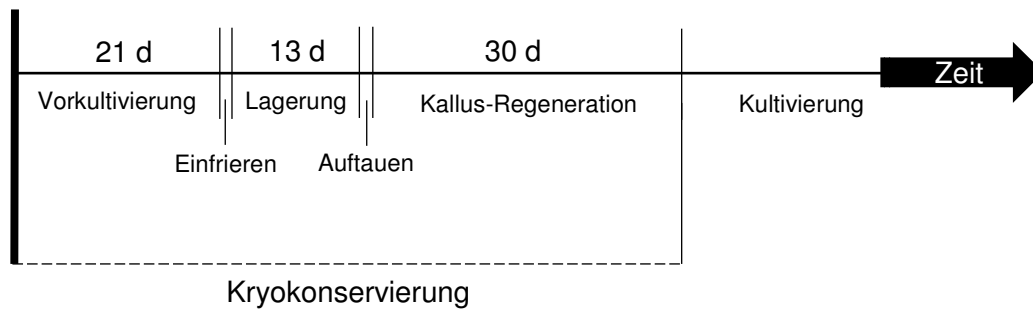


Abb. 65: Zeitlicher Verlauf der Kryokonservierung im Gesamtüberblick von *Salbei officinalis*. Das Einfrieren und Auftauen erfolgte im Laufe von 24 Stunden und war dabei abhängig vom zu lagernden Volumen.

Im Vergleich zur Literatur konnte das in Abbildung 65 vorgestellte Kryokonservierungsprotokoll von *Salbei officinalis* bestätigt werden [149; 189]. Der festgelegte Ablauf der Kryokonservierung hätte jedoch noch durch weitere Optimierungen verkürzt werden können: So hätte das Verwenden von alternativen Kulturmedien oder einer höheren Inokulationskonzentration zu einer besseren Stabilität der Pflanzenzellen oder einer kürzeren Vorkultivierung führen können, sodass weniger inaktive Zellen nach dem Auftauen und während der Regenerationsphase aufgetreten wären. Auch eine alternative Auftaumethode hätte die Revitalisierung der Zellen verbessern können. In der Dissertation von K. Schmale wurde ein schnelles Auftauen mittels Wärmebad etabliert, das schließlich zu einer Regenerationszeit von nur 20 Tagen für eine Kryokonservierung *Nicotiana tabacum* L. BY-2 führte [149]. Auch bei der Submerskultivierung der Hybrideibe *Taxus × media* Rehder wurde neben der 2-Schritt-Kryokonservierung und der Kryobehandlung mit Mannitol ein schnelles Auftauen verwendet [189]. Da jedoch nur eine sehr kurze Regenerationszeit von 3 Tagen verwendet wurde, konnte bei Mustafa *et al.* ein signifikanter Unterschied der Wachstumsverläufe zwischen der Referenzkultur und der Kryokultur noch nach 9 Wochen detektieren werden. Da eine Trennung von in- und aktiven Zellen im Flüssigmedium nicht zu realisieren ist, und inaktive Zellen auch bei einem optimierten Kryokonservierungsprotokoll auftreten, ist auch die Regenerationsphase auf Festmedien und die anschließende Trennung der Pflanzenzellen ein wichtiger Bestandteil bei der Kryokonservierung von Kalluszellen und sollte nicht übergangen werden.

### 3.6.2 Kultivierung von Pflanzenzellkulturen im batch-Verfahren

Die Kultivierung im Schüttelkolben diente im Wesentlichen der Stammhaltung und der Vorkultivierung der Suspensionszellen. Während sich noch auf Festmedien *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* und die genetisch modifizierten Zellkulturen *S. officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 und *S. officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 nur anhand der unterschiedlichen Farbgebung voneinander unterscheiden ließen, wurde bei den Suspensionskulturen eine Differenzierung durch eine unterschiedliche Aggregatbildung und Wachstumsgeschwindigkeit deutlich. Wie in der folgenden Abbildung 66 zu sehen ist, zeigten vor allem die nativen Stämme eine in-



tensivere Affinität zur Aggregatbildung als die genetisch modifizierten Zelllinien. Der aus *Ocimum basilicum* gewonnene Kallus bildete in der Suspensionskultur optisch erkennbare Aggregate aus, die eine Größe von bis zu 10 mm Durchmesser besaßen. Aggregate des nativen Stammes *Salvia officinalis* waren mit 4 mm Durchmesser vergleichsweise klein. Größtenteils bildeten die genetisch-modifizierten Zelllinien von *Salvia officinalis* var. *extrakta* sehr kleine Aggregate (<1 mm) und wenige große Zellaggregate (bis 7 mm).

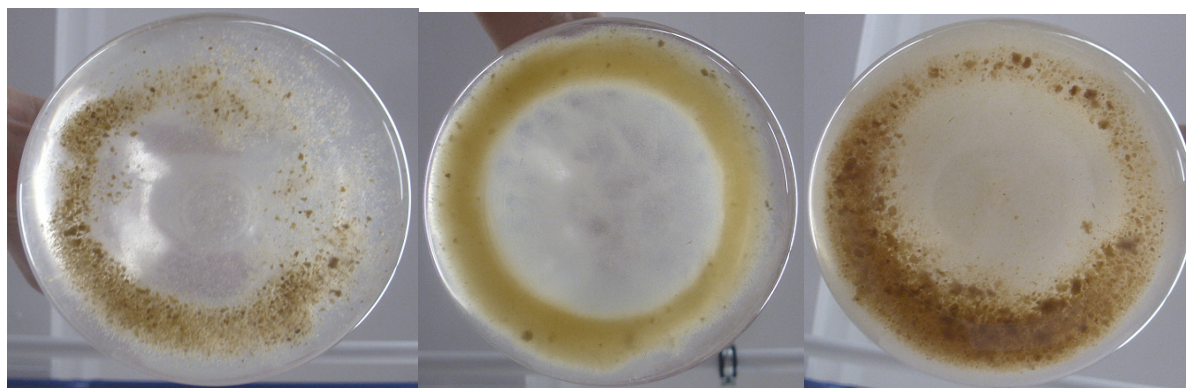


Abb. 66: Von links nach rechts: 15-Tage alte Suspensionskulturen von *Salvia officinalis*, *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 und *Ocimum basilicum* im 300 mL-Schüttelkolben bei 28 °C und 120 upm

Aufgrund der sehr geringen Wachstumsgeschwindigkeit der nativen *Salvia officinalis*-Zelllinie wurden weitere Studien nur mit den genetisch-modifizierten *S. officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 und *S. officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 sowie mit *Ocimum basilicum* durchgeführt. Um die folgenden Kultivierungen in den verschiedenen Bioreaktoren zu vergleichen, wurde zunächst eine Batchstrategie verfolgt.

### 3.6.2.1 Kultivierung des Klons *Salbei officinalis* var. *extrakta* Suc1-4

Für die Produktion der Zieltriterpene Oleanol- und Ursolsäure wurden verschiedene Prozessstrategien für eine Submerskultivierung der *Salbei officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 Pflanzenzellen vorgestellt. Bei Suspensionskulturen variierte die Proliferation durch die vorhandene Zelldichte [189]. Sie war am Größten, wenn eine hohe Zelldichte gewählt wurde [190]. Um diesen Einfluss bei der Betrachtung der verschiedenen Prozessstrategien zu reduzieren, wurde die Pflanzenzellkultivierung von *Salbei officinalis* Suc1-4 in Reaktoren gleichen Arbeitsvolumens durchgeführt und eine aliquote Inokulumkonzentration von 2 g L<sup>-1</sup> Biotrockenmasse (~38 g L<sup>-1</sup> Biofeuchtmasse) verwendet. Die Kultivierung im 2 L-Schüttelkolben, im 2 L-Bioreaktor von Bioengineering und im 2 L-Biostat<sup>®</sup> CultiBag RM Wavebag-Reaktor von Sartorius erfolgte mittels Linsmaier and Skoog (LS)-Medium (Anhang B, Tabelle B.2.9). Als C-Quelle wurde 30 g L<sup>-1</sup> Saccharose verwendet. Vor Beginn der Kultivierung wurden 5 g L<sup>-1</sup> Saccharose durch den Sterilisationsprozess in Glucose und Fructose gespalten, weshalb nur 25 g L<sup>-1</sup> Saccharose zu Beginn der Kultivierung mittels HPLC detektiert werden

konnte. Die während der Kultivierung erfasste enzymatische Spaltung von Saccharose erfolgte hauptsächlich durch die in der Zellmembran integrierten Invertasen [141], da hohe Konzentrationen an Glucose als auch an Fructose im Medium detektiert wurden. Dass zunächst Glucose von den Zellen aufgenommen worden war, kann durch die 8fache-Affinität der Hexosetransporter zu Glucose gegenüber Fructose erklärt werden [191]. Erst bei niedrigen Glucosekonzentrationen wird Fructose in die Zelle transportiert. Mit dem Beginn der Fructoselimitierung konnte eine Zellyse anhand einer reduzierten Biotrockenmasse festgestellt werden. Die maximal erreichte Biotrockenmasse lag bei der Kultivierung im Schüttelkolben bei 28 °C und 120 upm bei 12,3 g L<sup>-1</sup> (Abbildung 67).

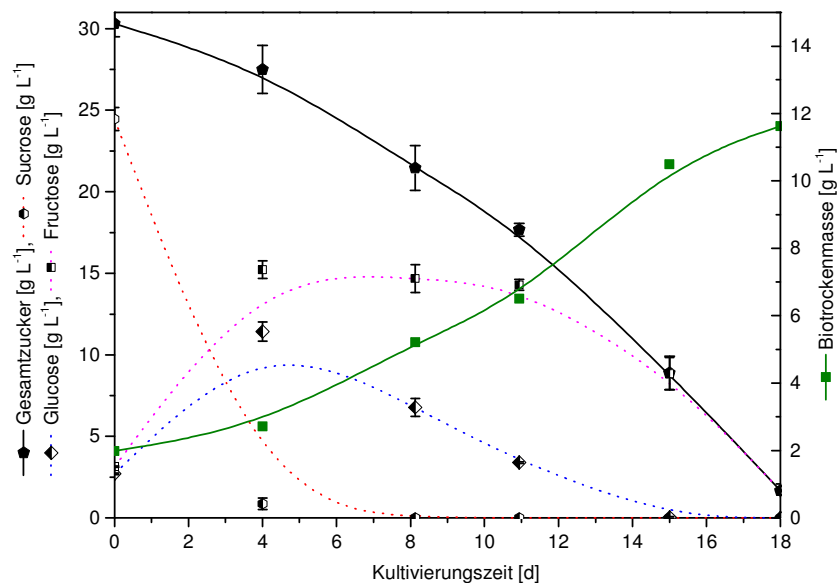


Abb. 67: Kultivierungsverlauf gemessen an der Zuckerkonzentration und an der Biotrockenmasse von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 im 2 L-Schüttelkolben ohne Schikane bei 28°C, 120 upm. Zuckermanalytik mittels HPLC und RI-Detektor.

Parallel zu der Kultivierung im Schüttelkolben wurde die Kultivierung im Rührkesselbioreaktor bei 28 °C durchgeführt. Um eine Schädigung der Pflanzenzellen durch die Rührorgane und die Luftblasen auszuschließen, wurden die Rührerdrehzahl und die Begasungsrate auf ein Minimum von 50 upm und 0,3 vvm reduziert. Zusätzlich wurden die Pflanzenzellen mikroskopisch untersucht. In Abbildung 68 wurde ein Pflanzenzellaggregat, welches nur aus vier Zellen bestand, mittels fluoreszenzaktiven Farbstoffs Calcofluor White Stain angefärbt. Dieser Farbstoff bindet sich an Membranproteine, weshalb die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop blau leuchteten. Es war deutlich zu erkennen, dass die Zellen im Bioreaktor intakt und von einer Zellwand komplett umschlossen waren.

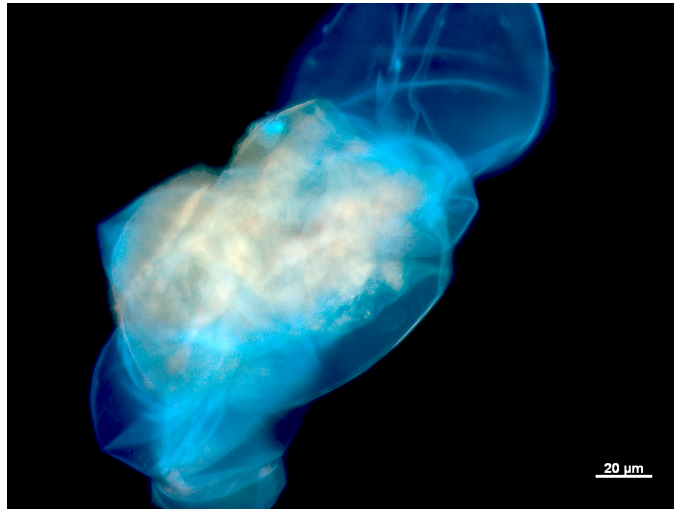


Abb. 68: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mit Calcofluor white stain angefärbten Salbeikallusaggregats (mehrere Zellen) mit dem Mikroskop Typ Axioskope und der Kamer Typ AxioCam MR 3. Die Zelle wurde aus dem Medium im Bioreaktor entnommen.

Statt einer Schädigung der Zellen durch den im Rührkessel auftretenden Scherstress konnte im Laufe der Kultivierung ein adhäsives Wachstum der Pflanzenzellen an der Glaswand und am Flüssigkeitsrand beobachtet werden. Die Biomasse wurde aus der Suspension entfernt, was das Wachstum der Zellen reduzierte (Abbildung 69). Auch eine Kultivierung in einer Blasensäule führte zum gleichen Resultat (Daten werden nicht gezeigt). Daher wurde die Kultivierung im Rührkesselreaktor nach sechs Tagen abgebrochen. Am Ende der Kultivierung wurden die Zellen aus dem Medium entnommen und der Triterpenanalytik (Kapitel 3.4.9) zugeführt.

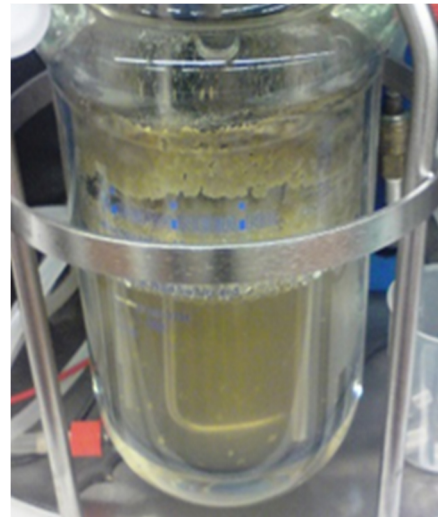
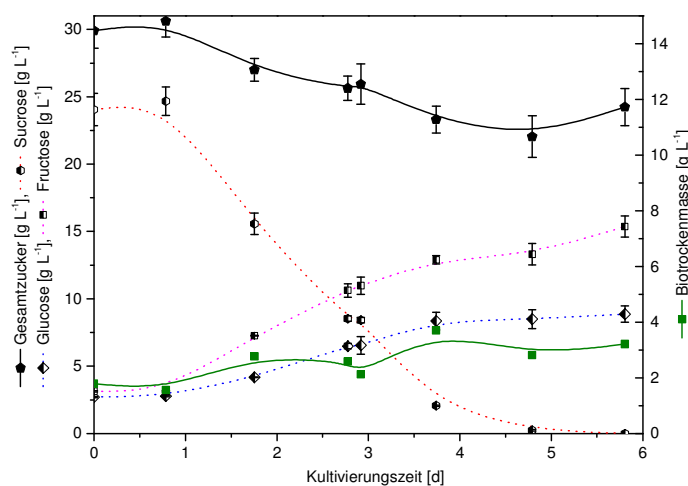


Abb. 69: Links: Kultivierungsverlauf gemessen an der Zuckerkonzentration und an der Biotrockenmasse von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 im Rührkesselreaktor, bei 28 °C, Rührerdrehzahl 50 upm, Belüftung 0,3 vvm. Schwankungen in der Biomasse und in der Substrataufnahme traten aufgrund vom adhäsiven Wachstum der Pflanzenzellen an der Reaktorwand auf. Rechts: Wachstum der Pflanzenzellen im Bioreaktor.

Eine Alternative zur Kultivierung im Rührkesselreaktor bot eine Pflanzenzellkultivierung im Wavebag-Reaktor (Das Reaktordesign ist in Kapitel 3.4.9 zu finden.). Die im Vergleich zu einem Rührkesselreaktor geringeren Scherraten und die gute Durchmischung des Mediums führten dazu, dass dieses System erfolgreich für die Generierung von pflanzlicher Biomasse und Sekundärmetaboliten in den letzten Jahren eingesetzt wurde [188]. Durch die Verwendung der Einwegbioreaktoren konnten Pflanzenzellen unter GMP-Bedingungen bis zu einem Produktionsmaßstab von 500 L kultiviert werden. Die eingesetzten Zelllinien waren neben Kalluskulturen auch die als „Hairyroots“- bekannten Wurzelzellen. Letztere wurden in Wavebag-Reaktoren für eine Produktion von Ginsenosiden eingesetzt und erreichten Bildungsraten von  $146 \text{ mg g}^{-1}$  Ginsenoside zu Biotrockenmasse.

In dem hier präsentierten Versuch erfolgte die Kultivierung im Wavebagreaktor bei  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , einer Geschwindigkeit von 30 rpm („rocks“ per Minute) und einem Neigungswinkel von  $7^\circ$  (Abbildung 70). Der für die Belüftung eingesetzte Volumenstrom betrug  $0,25 \text{ vvm}$ .

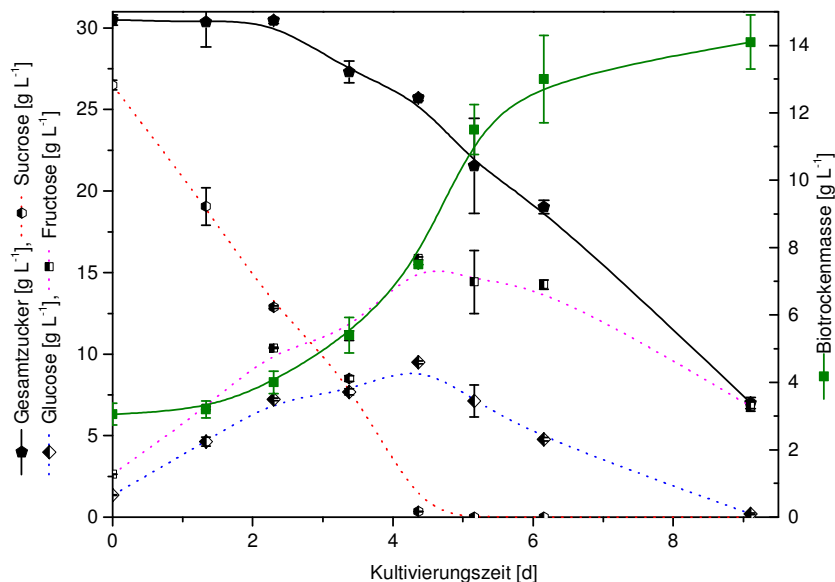


Abb. 70: Kultivierungsverlauf gemessen an der Zuckerkonzentration und an der Biotrockenmasse von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 in den 2 L-Wavebagreaktor Biostat® CultiBag RM,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Winkel  $7^\circ$ , Geschwindigkeit 30 rpm, Luftzufuhr  $0,25 \text{ vvm}$ .

Im Gegensatz zur Kultivierung im Rührkessel bzw. in der Blasensäule konnte während der Kultivierung kein adhäsives Wachstum beobachtet werden. Final wurde durch die Kultivierung im Wavebag-Reaktor eine maximale Biotrockenmasse von  $14,1 \text{ g L}^{-1}$  in einem Zeitraum von neun Kultivierungstagen erreicht. Ein Vergleich der verwendeten Systeme ist in der folgenden Tabelle 10 dargestellt:

Tab. 10: Prozessdaten zur Kultivierung von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 im Schüttelkolben (SK), Rührkesselreaktor (RK) und im Wavebag-Reaktor (WR). Die Oleanol- und Ursolkonzentration wurde mittels HPLC bestimmt und auf die aufgeschlossene Biomasse bezogen. Im Rührkessel wurde nur die im Medium enthaltene Biomasse bestimmt. Die spezifischen Leistungseinträge wurden durch die Formel 1 (Kapitel 2.4.5), Formel 35 (Anhang D.5) und mittels Eibl *et al.* bestimmt [188].

	Spezifischer Leistungseintrag P/V [W m <sup>-3</sup> ]	Max. Wachstumsrate $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	Verdopplungszeit $t_{1/2}$ [h]	Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	US-Gehalt $Y_{US/X}$ [mg g <sup>-1</sup> ]	OS-Gehalt $Y_{OS/X}$ [mg g <sup>-1</sup> ]
SK	79,1	4,3*10 <sup>-3</sup>	160	0,34	0,31	0,25
RK	0,7	1,6*10 <sup>-3</sup>	151	0,29	0,19	Enthielt keine OS
WR	70,0	13,0*10 <sup>-3</sup>	54	0,47	0,4	0,38

Wie aus Tabelle 10 deutlich wird, konnte durch die Kultivierung im Wavebagreaktor die Wachstumsrate um den Faktor 3 gegenüber der Kultivierung im Schüttelkolben und Rührkesselreaktor verbessert werden. Des Weiteren konnte eine Steigerung der Triterpenkonzentration erzielt werden, auch wenn vor allem die Bildung der Biomasse gesteigert wurde. Gleichzeitig konnte durch die Kultivierung im Wavebagreaktor die Prozesszeit reduziert werden. Da der spezifische Leistungseintrag im Vergleich zum Schüttelkolben niedriger war, bedeutet dies eine bessere Durchmischung des Mediums aufgrund des unterschiedlichen Reaktordesigns. Für weiterführende Versuche empfiehlt sich daher die Verwendung des Wavebag-Reaktors.

Ein direkter Vergleich der spezifischen Leistungseinträge mit dem Rührkesselreaktor konnte aufgrund der Vermeidung von hohem Scherstress nicht ermöglicht werden. Der niedrige Leistungseintrag des Rührkesselreaktors resultierte aus der gewählten Rührerdrehzahl von 50 upm. Äquivalent wäre der Leistungseintrag bei einer Rührerdrehzahl von 290 upm gewesen, jedoch müsste für weitere Versuche auch die Adhäsion der Pflanzenzellen an der Glaswand verhindert werden, da so kein Vergleich der Produkt- und Biomassenbildungsrate möglich wäre.

### 3.6.2.2 Kultivierung des Klons *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1

Wie bei der Kultivierung von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 erfolgte eine Kultivierung von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 im Batch-Verfahren. Aufgrund der Probleme bei den Kultivierungen im Bioreaktor und in der Blasensäule (siehe Kapitel 3.6.2.1) werden nur die Kultivierungsverläufe im Schüttelkolben und im Biostat® CultiBag RM präsentiert. Als Me-

dium wurde das Linsmaier and Skoog -Medium und Biomasse aus der gleichen Vorkultur verwendet. Die Inokulumkonzentration lag ebenfalls bei  $2 \text{ g L}^{-1}$  Biotrockenmasse ( $\sim 38 \text{ g L}^{-1}$  Biofeuchtmasse). Zunächst wurde, wie bei der Kultivierung von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4, für *Salbei officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 eine Kultivierung im Schüttelkolben aufgenommen (Abbildung 71).

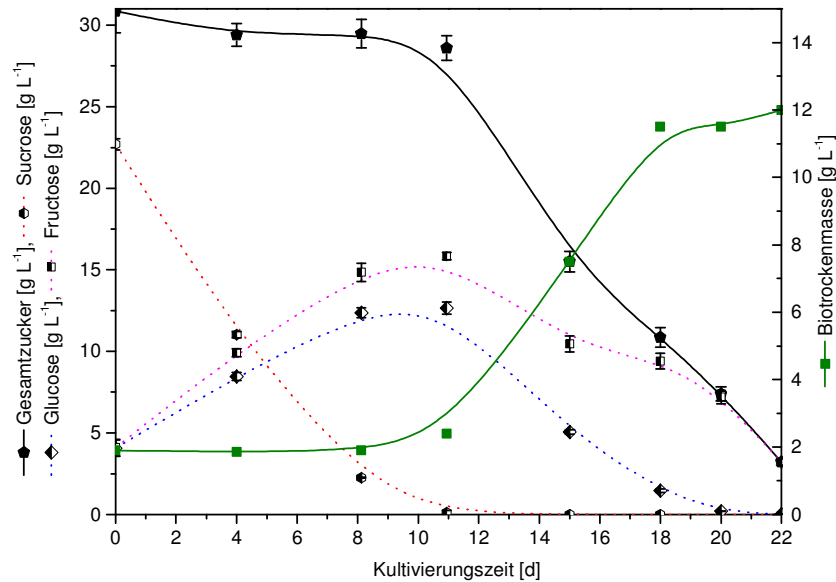


Abb. 71: Kultivierungsverlauf von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 im 2 L-Schüttelkolben ohne Schikane bei  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $120 \text{ upm}$ . Zuckermanalytik mittels HPLC und RI-Detektor.

Der Kultivierungsverlauf von *Salbei officinalis* Suc1-1 im Schüttelkolben wurde durch die 10 Tage andauernde Lag-Phase charakterisiert. In dieser Zeit unterlag Saccharose der enzymatischen Spaltung, jedoch wurde nur wenig Glucose von den Pflanzenzellen aufgenommen. Dieser Versuch wurde parallel zu den Kultivierungen von *S. officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 und *Ocimum basilicum* durchgeführt, daher kann eine Limitierung der Zellsynthese durch die Prozessparameter ausgeschlossen werden.

Die Kultivierung von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 im Wavebag-Reaktor führte zu einem signifikant anderen Wachstumsverlauf. Dieser ist der folgenden Abbildung 68 dargestellt.

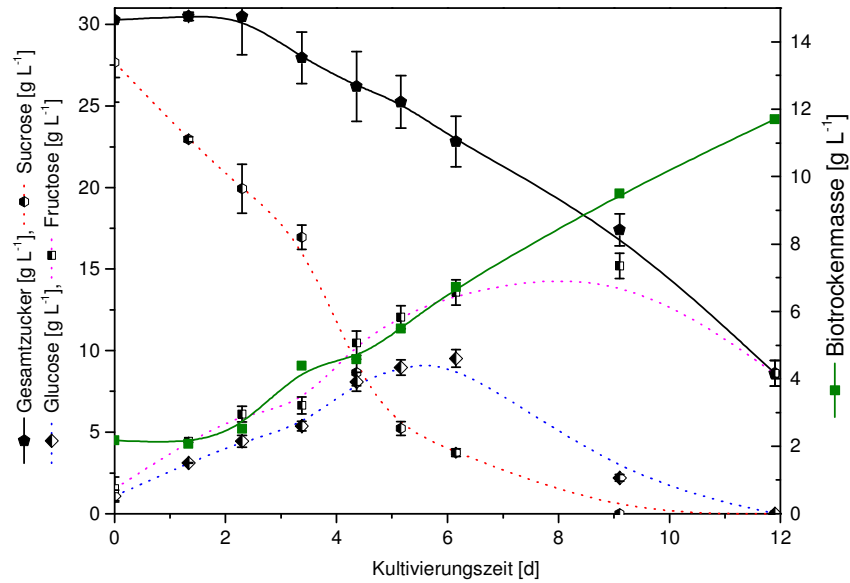


Abb. 72: Kultivierungsverlauf von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 im 2 L-Wavebagreaktor Biostat® CultiBag RM, 28 °C, Winkel 7°, Geschwindigkeit 30 rpm, Luftzufuhr 0,25 vvm.

Im Wavebag-Reaktor, welches mit einer anderen Vorkultur durchgeführt werden konnte, konnte das verlangsamte Wachstum nicht detektiert werden. Wie bei der Kultivierung von *S. officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 im Wavebag-Reaktor betrug die Lag-Phase ausschließlich 2 Tage. Im Anschluss war das Wachstum der Zellen fast linear und erreichte sein Maximum bei 11,7 g L<sup>-1</sup> am Ende der Prozesszeit. Aufgrund der niedrigen Zuckerkonzentrationen wäre es in den darauffolgenden Tagen zu einer Limitierung des Mediums und damit zur Bildung der stationären Phase gekommen.

In Tabelle 11 sind die zu den Kultivierungen von *S. officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 relevanten Prozessdaten dargestellt.

Tab. 11: Prozessdaten zur Kultivierung von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 im Schüttelkolben (SK) und im Wavebag-Reaktor (WR). Die Produktausbeuten von Oleanol- (OS) und Ursolsäure (US) sind auf die aufgeschlossene Biotrockenmasse bezogen. Die spezifischen Leistungseinträge wurden durch die Formel 35 (Anhang D.5) und mittels Eibl *et al.* bestimmt [188].

	Spezifischer Leistungseintrag P/V [W m <sup>-3</sup> ]	Max. Wachstumsrate $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	Verdopplungszeit $t_{1/2}$ [h]	Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	US-Gehalt $Y_{US/X}$ [mg g <sup>-1</sup> ]	OS-Gehalt $Y_{OS/X}$ [mg g <sup>-1</sup> ]
SK	79,1	$5,4 \cdot 10^{-3}$	127	0,37	0,17	0,2
WR	70,0	$4,7 \cdot 10^{-3}$	148	0,44	0,45	0,48

Während die maximale Wachstumsrate durch die Kultivierung im Wavebag-Reaktor im Vergleich zur Kultivierung im Schüttelkolben nur sehr gering gesteigert werden konnte, konnten

die Ausbeutekoeffizienten nahezu verdoppelt werden. Gleichzeitig wurde, wie bei der Kultivierung *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4, die Prozessdauer reduziert. Aufgrund der hohen Substratausbeutekoeffizienten führte die Aufnahme der Saccharose vor allem zur Bildung der Biomasse.

### 3.6.2.3 Kultivierung von *Ocimum basilicum*

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *Ocimum basilicum* Stammes, handelte es sich um eine handelsübliche Basilikumpflanze, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. Bley auf ein Nährmedium angeschnitten und übertragen wurde. Durch die Verwendung der Phytohormone 2,4-D und Kinetin wurde die Kallusbildung induziert und eine Stammhaltung der Zelllinie an der TU Kaiserslautern fortgesetzt. Wie bei den Kultivierungen der *Salvia officinalis* var. *extrakta* Zelllinien wurde als Suspensionsmedium das LS-Medium und die gleichen Prozessparameter verwendet. Aufgrund von Ungenauigkeiten, die aus der Aggregatbildung resultierten, wurde eine Inokulumkonzentration von  $4 \text{ g L}^{-1}$  bei der Kultivierung von *Ocimum basilicum* gewählt. Der Kultivierungsverlauf im Schüttelkolben ist in Abbildung 73 dargestellt.

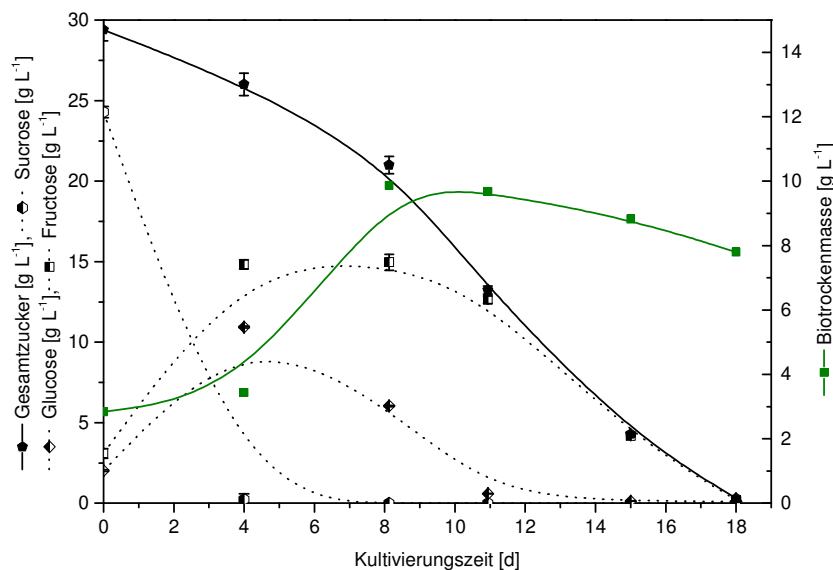


Abb. 73: Kultivierungsverlauf von *Ocimum basilicum* im 2 L-Schüttelkolben (1 L-Arbeitsvolumen) ohne Schikane bei  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , 120 upm. Zuckeranalytik mittels HPLC und RI-Detektor.

Wie dem Verlauf zu entnehmen ist, war die Bildung der Biomasse nach einer Kultivierungszeit von acht Tagen abgeschlossen, auch wenn noch  $12,5 \text{ g}$  Fructose im Medium vorhanden war. Auch wenn große Pflanzenzellaggregate ( $>10 \text{ mm}$ ) detektiert wurden, konnten während der Kultivierung keine Triterpenkonzentrationen nach Zellaufschluss detektiert werden. Erst am Ende der Kultivierungszeit konnten Produktkonzentrationen detektiert werden (Tabelle 12). Parallel zur Kultivierung im Schüttelkolben erfolgte die Kultivierung im Wavebag-Reaktor. Sie ist in der folgenden Abbildung 74 dargestellt.



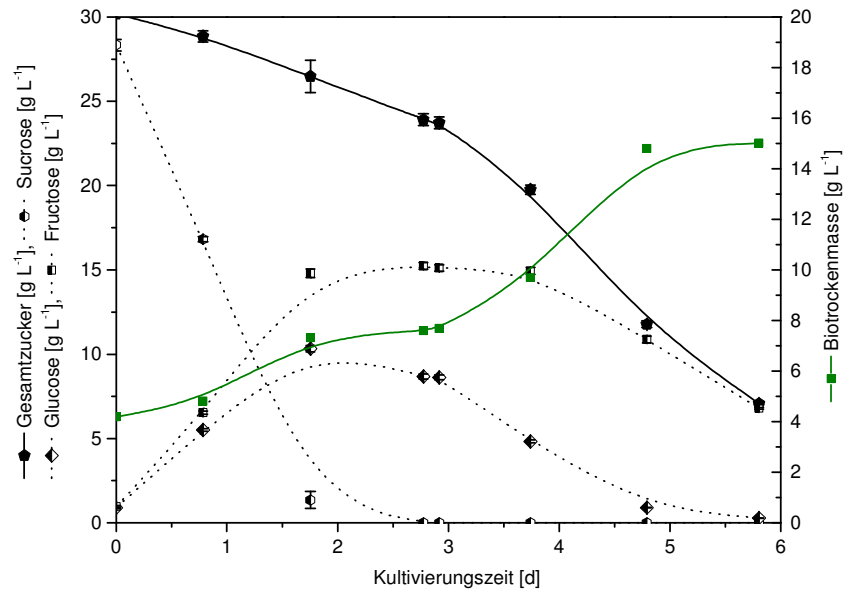


Abb. 74: Kultivierungsverlauf von *Ocimum basilicum* im 2 L-Wavebagreaktor Biostat® CultiBag RM, 28 °C, Winkel 7°, Geschwindigkeit 30 rpm, Luftzufuhr 0,25 vvm.

Zum Beginn der Kultivierung im Wavebag-Reaktor wurden große Kallusaggregate zerkleinert, da das Inokulieren der Cultibags über eine Spritze erfolgte. Wie in Abbildung 74 deutlich wird, zeigte das weitere Wachstum im Wavebag einen ähnlichen Verlauf wie im Schüttelkolben. Die bei der Kultivierung entstandenen Aggregate waren zwar kleiner (<5 mm) aber auch bei einer Restkonzentration von 10 g L<sup>-1</sup> Fructose stagnierte die Biomassenbildung. Eine Hemmung der Biomassenbildung durch Fructose konnte ausgeschlossen werden, da Fructose generell bei einer kontinuierlichen Prozessführung von Basilikum als C-Quelle eingesetzt wurde [192]. Aufgrund der gebildeten, maximalen Biomasse wäre eine Erklärung durch eine P oder N-Substratlimitierung wahrscheinlicher, die zur Limitierung des Wachstums geführt hatte. Eine spezifische Analytik müsste diese Theorie jedoch noch bestätigen. Die aus den Verläufen resultierenden Prozessdaten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 12: Prozessdaten zur Kultivierung von *Ocimum basilicum* im Schüttelkolben (SK) und im Wavebagreaktor (WR). Die Oleanol- und Ursolsäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt und auf die eingesetzte Biomasse bezogen. Die spezifischen Leistungseinträge wurden durch die Formel 35 (Anhang D.5) und mittels Eibl *et al.* bestimmt [188].

	Spezifischer Leistungseintrag P/V [W m <sup>-3</sup> ]	Max. Wachstumsrate $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	Verdopplungszeit $t_{1/2}$ [h]	Biomasseausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ [g g <sup>-1</sup> ]	US-Gehalt $Y_{US/X}$ [mg g <sup>-1</sup> ]	OS-Gehalt $Y_{OS/X}$ [mg g <sup>-1</sup> ]
SK	79,1	8,1*10 <sup>-3</sup>	85,9	0,25	0,25	0,3
WR	70,0	15,0*10 <sup>-3</sup>	47,6	0,47	0,55	0,63

Sowohl die Biomassenbildung als auch die Produktbildung konnte durch die Kultivierung im Wavebag gegenüber der Kultivierung im Schüttelkolben um den Faktor 2 gesteigert werden. Im Vergleich zu den Salbeizelllinien zeigte Basilikum eine deutlich bessere Bildung der Oleanol- und Ursolsäure. Da bislang nur eine Produktbildung von Triterpenen mittels einer hairy-root-Kultur von *Ocimum basilicum* veröffentlicht wurde [193], war dies der erste protokollierte Nachweis über eine Kultivierung von *Ocimum basilicum* Kalluskulturen zur Produktion von Ursol- und Oleanolsäure.

### 3.6.3 Kultivierung von Pflanzenkulturen im repeated-batch-Verfahren

Bei der Stammhaltung von Suspensionskulturen mussten die Kulturen alle 10-15 Tage überimpft werden, um die Aktivität der Zellen zu gewährleisten. Dabei wurde bislang nicht berücksichtigt, wie lange bzw. oft die Pflanzenkulturen in neue Schüttelkolben überimpft wurden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss eines repeated-batch-Verfahrens auf die Triterpenbildung untersucht. Dazu wurden die Zelllinien *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 und *Ocimum basilicum* im 2 L-Schüttelkolben kultiviert, nach 10-14 Tagen wurde das halbe Kulturmedium entfernt und neues Medium hinzugegeben (Abbildung 75). Das verwendete Arbeitsvolumen betrug 1 Liter.

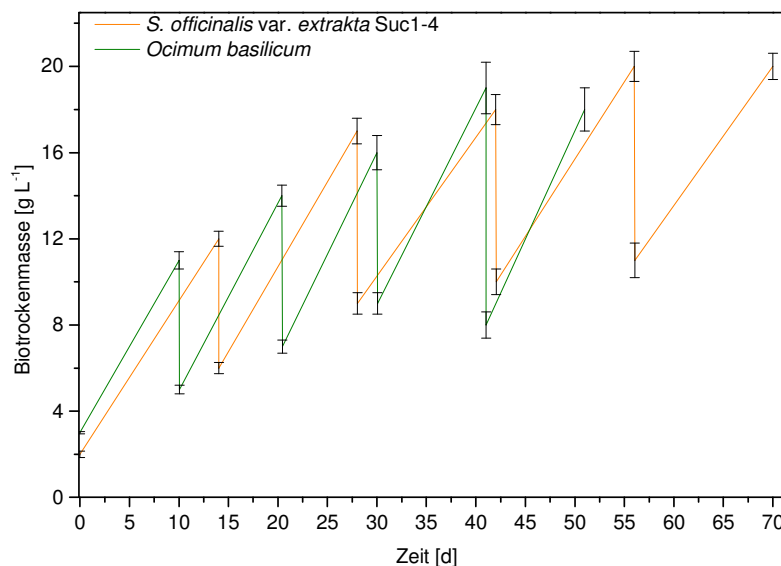


Abb. 75: Kultivierung von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc 1-4 und *Ocimum basilicum* im repeated-batch-Verfahren im Schüttelkolben und im LS-Medium bei 28 °C. Die Biotrockenmasse wurde gravimetrisch bestimmt.

Wie zu erkennen ist, wurde vor dem vierten Medienwechsel eine Biotrockenmasse von circa 20 g L<sup>-1</sup> bestimmt. Durch die anschließende Entnahme des halben Füllvolumens wurden 50 % der Zellen aus dem Medium entfernt, weshalb nach 40 Tagen die entnommene Zellkonzentration und die Biomassenbildung identisch waren. Die finale Biotrockenmasse wurde der Triterpenanalytik zugeführt. Die daraus erhaltenen Konzentrationen an Oleanol- und Ursolsäure sind in der folgenden Tabelle 13 dargestellt:

Tab. 13: Finale Triterpenkonzentrationen von *Salvia officinalis* var. *extrakta* und *Ocimum basilicum* aus dem repeated-batch-Verfahren im Schüttelkolben (SK). Aufgrund der höheren Wachstumsrate wurde Basilikum alle 10 bzw. 11 Tage, Salbei alle 14 Tage halbiert und in neues Medium überimpft.

Kultur	Reaktor	Kultivierungszeit [d]	US-Gehalt	OS-Gehalt
			$Y_{US/x}$ [mg g <sup>-1</sup> ]	$Y_{OS/x}$ [mg g <sup>-1</sup> ]
<i>Salvia officinalis</i> var. <i>extrakta</i> Suc 1-4	SK	5x 14	6,52	13,3
<i>Ocimum basilicum</i>	SK	4x 10, 1x 11	2,89	4,17

Die finalen Ausbeutekoeffizienten von Oleanol- und Ursolsäure konnten durch das repeated-batch-Verfahren im Vergleich zur batch-Kultivierung signifikant gesteigert werden. Bei der Kultivierung der Basilikum-Zelllinie wurden die Produktkonzentrationen um das 5fache (US) und das 7fache (OS) erhöht, während eine höhere Produktbildung bei *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 um das 16fache (US) und 35fache (OS) erzielt wurde. Da die Biosynthese der Triterpene unabhängig von der Bildung der Biomasse war, resultierte diese gesteigerte Produktbildung wahrscheinlich aus einer bislang unbekanntem Substratlimitierung der Salbeizellen. Ergebnisse beim Projektpartner haben diesbezüglich gezeigt, dass die Produktbildung gesteigert wurde, wenn als ein Medium mit geringerer Stickstoffkonzentration verwendet wurde [194]. Aufgrund der höheren Biomasse im repeated-batch-Verfahren könnte eine Stickstofflimitierung eingetreten sein und die Bildung von Oleanol- und Ursolsäure aus Saccharose verbessert haben. Eine generelle Aussage über eine Substratlimitierung zur Bildung von Sekundärmetaboliten lässt sich jedoch nicht treffen. Denn sowohl Zucker- und Phosphatkonzentrationen als auch das Verhältnis von Ammonium zu Nitrat beeinflussten die Bildung von diversen Pflanzensekundärmetaboliten [195]. Es müssten weitere Versuche durchgeführt werden, die den Zusammenhang zwischen Substrat und Triterpenbildung darstellen.

### 3.6.4 Synopse

In diesem Abschnitt wurden Kalluskultivierungen von den genetisch modifizierten Zelllinien *Salvia officinalis* var. *extrakta* und der nativen Pflanzenzelllinie *Ocimum basilicum* in verschiedenen Reaktortypen und mit Prozessstrategien vorgestellt. Ziel war eine Produktbildung der Triterpene Oleanol- und Ursolsäure, welche in allen Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Die Spaltung von Saccharose im Medium wurde in allen Kultivierungen durch die in der Membran lokalisierten Invertasen nachgewiesen, auch wenn die genetisch modifizierten Pflanzenzellkulturen *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 und Suc1-4 eine gesteigerte Leistung betreffend der Saccharoseaufnahme durch den Saccharosetransporter besitzen sollten. Die höchsten Produktkonzentrationen konnten durch die Verwendung des Wavebag-Reaktors und der Pflanzenkalluskultur *Ocimum basilicum* erzielt werden (Abbildung 76), auch wenn der spezifische Leistungseintrag zwischen Schüttelkolben und Wavebag-Reaktor nahezu äquivalent war. Höchstwahrscheinlich war die höhere Produkt- und Biomassenbildung auf die bessere Begasung zurückzuführen, die im Wavebag-System durch den konstanten Zuluftstrom realisiert wurde.

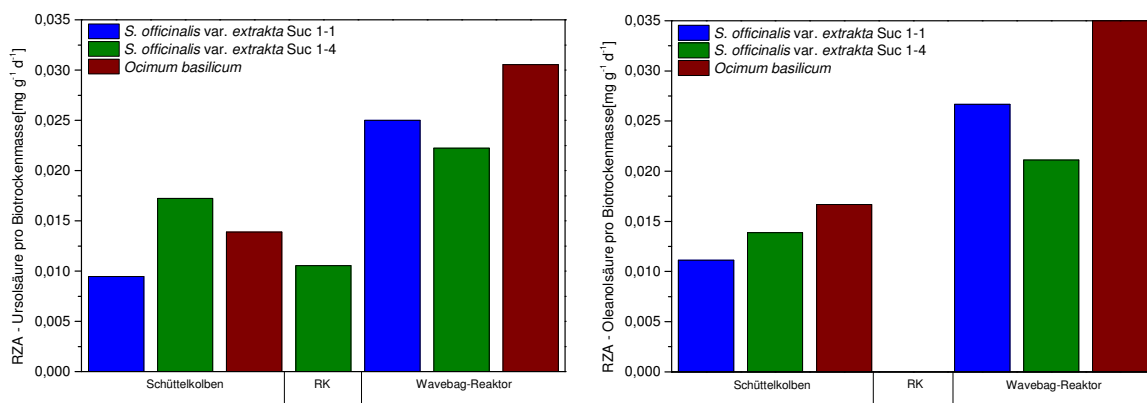


Abb. 76: Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) der Triterpenbildungsraten pro Biotrockenmasse und der verwendeten Pflanzenkalluskulturen und Bioreaktoren (2 L-Schüttelkolben, 2 L-Rührkesselreaktor (RK), 2 L-Wavebag-Reaktor). Links die RZA-Ausbeuten für Ursolsäure, rechts für Oleanolsäure.

Die Kultivierung im verwendeten LS-Medium führte primär zur Bildung der Biomasse. Höhere Produktkonzentrationen könnten durch ein optimiertes Medium erreicht werden, was jedoch nicht Gegenstand der aktuellen Arbeit war. Durch das repeated-batch-Verfahren mit der Pflanzenzelllinie *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 wurde die finale Konzentration von Ursolsäure um den Faktor 16 und die Oleanolsäurekonzentration um den Faktor 35 im Schüttelkolben gesteigert. Es ist wahrscheinlich, dass durch das hohe Inokulum an Pflanzenzellen die Medienbestandteile nach kurzer Kultivierungszeit limitierten und damit die Bildung der Biomasse reduzierten und die Bildung von Sekundärmetaboliten induzierten. Um dies zu überprüfen, müsste in weitergehenden Versuchen das Medium variiert oder die Umstellung des Prozesses in ein fed-batch- oder kontinuierliches Verfahren etabliert werden.

Des Weiteren konnte ein Kryokonservierungsprotokoll für die nativen Pflanzenzelllinien von *Salvia officinalis* etabliert werden. Durch die Kryokonservierung war es nun möglich, die Pflanzenzelllinien kostengünstig als auch mit höherer genetischer Stabilität zu lagern. Den größten Einfluss auf diese Methode besaß dabei die Verwendung von Kryoprotektiva, welche die Vitalität der Zellen verbesserte. Zwischen dem langsamen und schnellen Einfrieren konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Weitere Optimierungen in Bezug auf Medienzusammensetzung, Inokulationskonzentration und Auftaumethode könnten den zeitlichen Rahmen der Kryokonservierungsmethode um ein paar Tage verkürzen. Im Vergleich zur Literatur konnte jedoch nach einem Zeitrahmen von 52 Tagen eine vitale *Salvia officinalis*-Kultur erzeugt werden [149; 189].

### 3.7 Ergebnisse zur Biotransformation von Oleanol- und Ursolsäure

Wie in der Literatur beschrieben, können Ursol- und Oleanolsäure durch eine mikrobielle Biotransformation derivatisiert werden. In diesem Kapitel sollen weitere Untersuchungen betreffend dieser Biotransformation erfolgen. Zunächst werden ein paar ausgewählte Mikroorganismen wegen ihrer Transformationseigenschaften auf Triterpene untersucht. Ein weiteres Thema des Kapitels ist eine Immobilisierung des Bakteriums *Nocardia iowensis*, das Ursolsäure transformieren kann. Dieser Mikroorganismus soll auch genutzt werden, um unbekannte Derivate aus Oleanolsäure zu erzeugen.

#### 3.7.1 Biotransformation von Triterpenen durch Mikroorganismen

Die Biotransformation von Ursolsäure mittels *Nocardia iowensis* wurde durch die Arbeiten von *Leipold et al.* und *Zhang et al.* beschrieben. Dabei wird Ursolsäure in Ursolsäuremethylester und Ursolsäure transformiert.

Nach einer Literaturrecherche (siehe Tabelle 7, Kapitel 3.3.5) wurden einige potenzielle Mikroorganismen ausgewählt, die eine Biotransformation der Ursol- und Oleanolsäure ermöglichen könnten. Diese Mikroorganismen wurden nach erfolgreicher Vorkultivierung in spezifischen Medien dem Biotransformationsmedium überführt und mit Ursolat (72 % Ursolsäure, 28 % Oleanolsäure, gelöst in Ethanol) beimpft. Durch die Verwendung von industriell erhältlichem Ursolat war eine gleichzeitige und kostengünstige Untersuchung einer Biotransformation der beiden Zieltriterpene möglich. In der folgenden Tabelle 14 sind die in diesem Versuch untersuchten Mikroorganismen, sowie deren Ergebnisse betreffend der Biotransformation von OS und US zusammenfassend aufgelistet. *Nocardia iowensis* diente hier als Referenzkultur, bei der die Biotransformation der Triterpene bekannt war.

Tab. 14: Verwendete Mikroorganismen für eine Biotransformation von Ursol- und Oleanolsäure. Detektion der Substrate und Produkte über RP-HPLC bei 205 nm. Die weitere Analytik erfolgte mittels HPLC-MS und HPLC-NMR. Zur Vorkultivierung wurden die bei DSMZ empfohlenen, spezifischen Medien verwendet. Die Biotransformation erfolgte im GYM-Medium. Positive Nachweise mittels HPLC, HPLC-MS oder HPLC-NMR sind hervorgehoben.

	DSMZ-Nr.	Abnahme der US-/OS-Substratkonzentration (HPLC)	Nachweis von Transformationsprodukten (HPLC-MS)	Neue US/OS-Derivate (HPLC-MS / HPLC-NMR)	Vorkultivierung im ...
<b><i>Nocardia iowensis</i></b>	<b>45197</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	GYM-Medium
<b><i>Aspergillus niger</i></b>	<b>872</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ	GYM-Medium
<i>Bacillus megaterium</i>	32	negativ	negativ	negativ	GYM-Medium
<i>Bacillus subtilis</i>	618	negativ	negativ	negativ	Medium 1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	350	negativ	negativ	negativ	GYM-Medium
<b><i>Fusarium fujikuroi</i></b>	<b>893</b>	<b>positiv</b>	negativ	negativ	Kartoffelmedium
<i>Pseudomonas putida R1</i>	6125	negativ	negativ	negativ	Medium 1
<i>Rhizopus stolonifer</i>	855	negativ	negativ	negativ	Kartoffelmedium
<i>Streptomyces cattleya</i>	46488	negativ	negativ	negativ	GYM-Medium

Obwohl jeder untersuchte Mikroorganismus theoretisch eine Biotransformationspotenz betreffend Terpene aufwies, konnte eine Abnahme der Substratkonzentration nur durch die Pilze *Aspergillus niger* und *Fusarium fujikuroi* und dem Bakterium *Nocardia iowensis* nachgewiesen werden. Eine Identifizierung der Produktderivate erfolgte zunächst mittels RP-HPLC. Die identifizierten Produkte des *F. fujikuroi* konnten jedoch auch im Versuchsansatz ohne eine Substratzugabe in geringerem Maße detektiert werden, sodass allein anhand der HPLC-Analytik davon ausgegangen werden kann, dass keine neuen Derivate bei der Biotransformation entstanden, die mittels der verwendeten Analytik nachgewiesen werden konnten. Auch durch die HPLC-MS-Analytik konnten sowohl die Produkte von *A. niger* und *Fusarium fujikuroi* keinen neuen Oleanol- und Ursolderivaten zugeordnet werden. Die im HPLC-Chromatogramm erkennbaren Substanzen waren ausschließlich Stoffwechselprodukte, die aus der Denaturierung der Triterpene resultieren könnten.

### 3.7.2 Immobilisierung von *Nocardia iowensis* durch Natriumalginat und Polyvinylalkohol

Wie bereits beschrieben, konnte Ursolsäure mittels *N. iowensis* zu Ursensäure und Ursolsäuremethylester transformiert werden [121]. Durch nachfolgende Derivatisierungen ergaben sich noch weitere Produkte, welche aber in der aktuellen Arbeit nicht von Interesse waren. Zur besseren Übersicht ist die vollständige Ursolsäurebiotransformation durch *Nocardia iowensis* in der folgenden Abbildung 77 nochmals dargestellt.

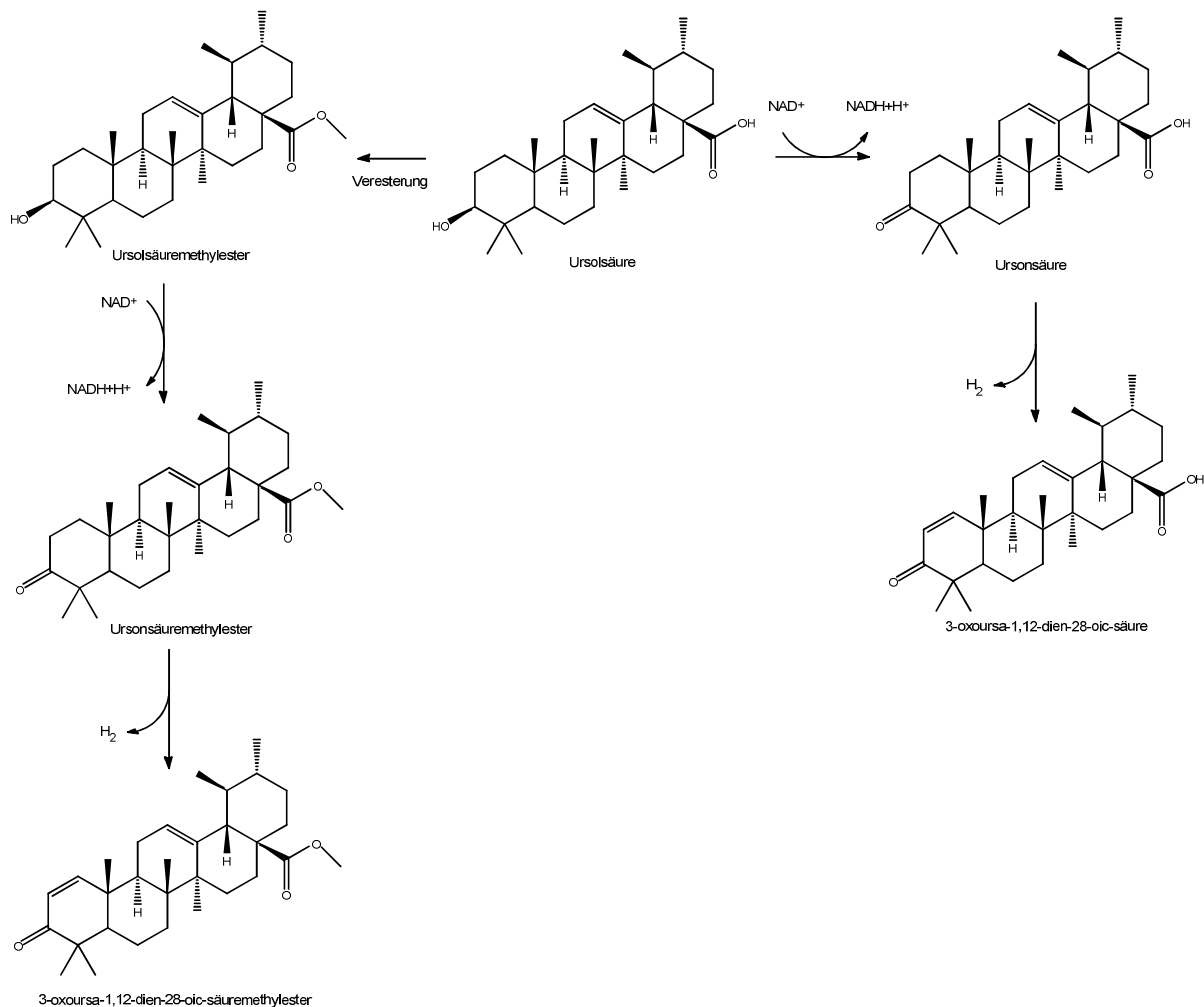


Abb. 77: Biotransformation von Ursolsäure durch *N. iowensis* nach Leipold *et al.*. Es ergeben sich zwei Derivatisierungswege: Ursolsäuremethylester wird über Ursonsäuremethylester zum 3-oxoursa-1,12-dien-28-oic-säuremethylester transformiert, während aus Ursonsäure das unmethylierte Produkt 3-oxoursa-1,12-dien-28-oic-säure resultiert [121].

Da für jede Ursolsäure-Biotransformation mittels des Bakteriums eine Kultur inkubiert werden musste, sollte durch die Immobilisierung von *Nocardia iowensis* eine wirtschaftlichere Prozessführung angestrebt werden. Die in dieser Arbeit ausgewählten Immobilisierungsverfahren von Mikroorganismen waren die Matrix-basierenden Methoden in Natriumalginat und Polyvinylalkohol. Die Herstellung der jeweiligen Immobilisate ist in Kapitel 3.4.8 präsentiert.



Um die verschiedenen Methoden miteinander vergleichen zu können, wurden parallel freie Zellen mit einer aliquoten Biomassenkonzentration zur Biotransformation verwendet. Die Biotransformation erfolgte in 1 L Schüttelkolben mit 150 mL GYM-Medium bei 28 °C. In Abbildung 78 ist der Substratverlauf bei den jeweiligen Biotransformationsversuchen dargestellt. Als Substrat wurde Ursolat verwendet, welches in dieser Versuchsreihe nach der durchgeführten Immobilisierung hinzugegeben wurde. Die unterschiedlichen Substratkonzentrationen zu Beginn der Biotransformation ließen sich auf eine schlechte Wasserlöslichkeit von Ursolsäure zurückführen, sodass angenommen werden konnte, dass zumindest mit Beginn der Biotransformation die Ursolsäurekonzentration in allen Versuchen äquivalent vorlag. Aufgrund der geringen Konzentration an Oleanolsäure erfolgte die analytische Betrachtung der Immobilisierung ausschließlich anhand der Ursolsäure und den daraus resultierenden Derivaten.

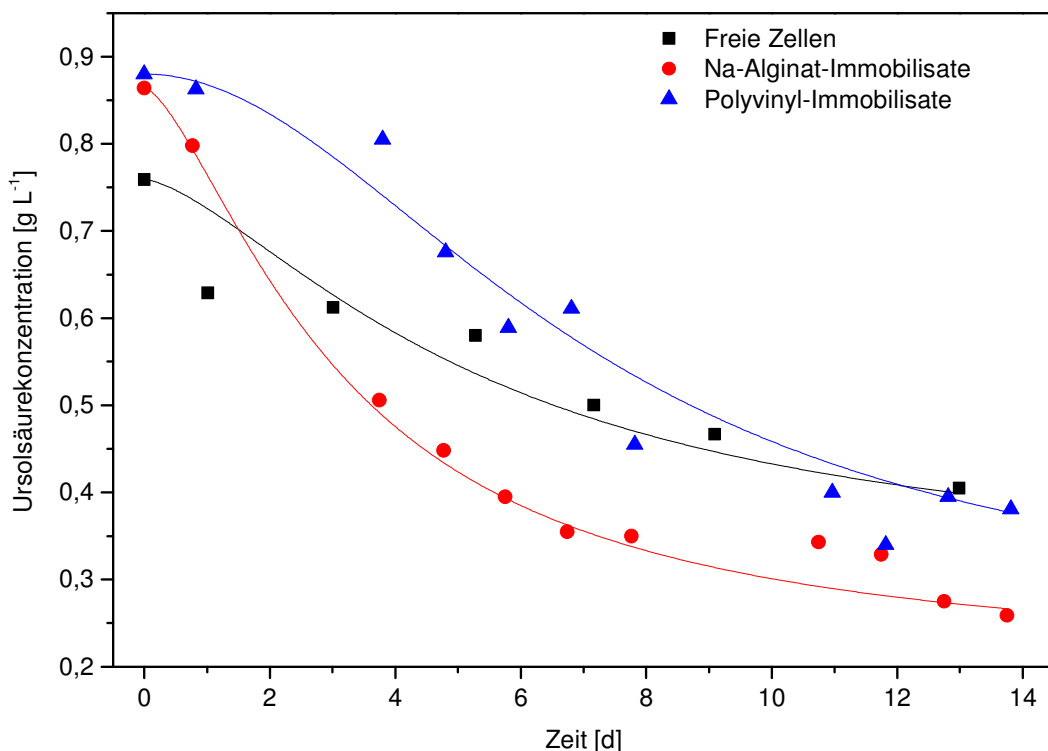


Abb. 78: Substratverlauf von Ursolsäure während der Biotransformationen mit freien und in Natriumalginat- und polyvinyl-immobilisierten *N. iowensis* Zellen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels RP-HPLC und Detektion bei 205 nm (siehe Kapitel 3.4.3).

Die Substratabnahme der einzelnen Versuche, wie sie in Abbildung 78 dargestellt ist, ließ vermuten, dass eine Immobilisierung in Natriumalginat und in Polyvinylalkohol die Biotransformation förderte. Die Bestimmung der maximalen Substrataufnahmeraten ergab für die freien Zellen  $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , für die in Natriumalginat-eingehüllten Zellen  $0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und für die in Polyvinylalkohol immobilisierten Zellen  $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Eine Immobilisierung steigerte demnach die Ursolsäureaufnahme bei *N. iowensis*. Zur Überprüfung, dass durch die Immobilisierungsmatrices die Triterpene nicht gebunden wurden, wurden Matrices verwendet, die

keine Zellen enthielten. Die Substratkonzentrationen blieben in diesen Blindversuchen konstant (Daten nicht gezeigt).

Bei der Biotransformation entstand bei freien Zellen zunächst das Derivat Ursolsäuremethylesters (USME). Der Verlauf der USME ist für die Kulturen in Abbildung 79 dargestellt.

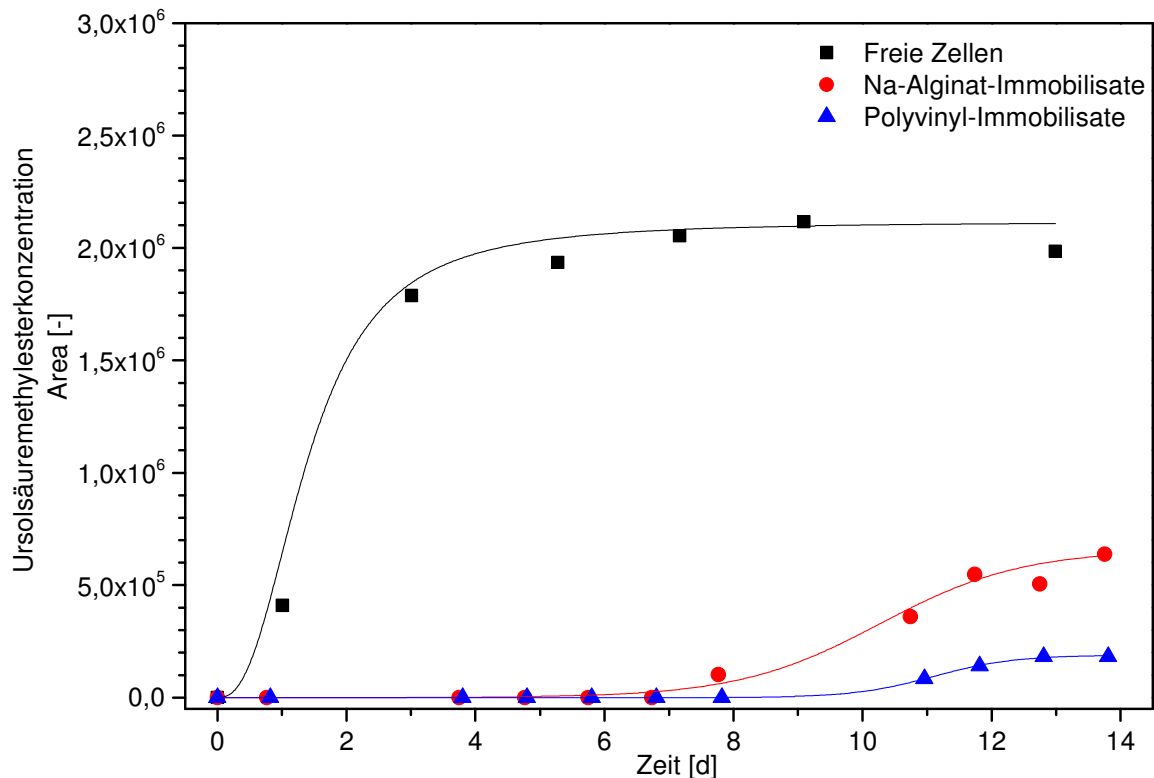


Abb. 79: Ursolsäuremethylester-Konzentrationen der verschiedenen Biotransformationsversuche mittels freien und in Natriumalginat und Polyvinyl-immobilisierten *N. iowensis* Zellen gemessen an der Fläche des Peaks, der durch die RP-HPLC-Analytik bei 205 nm ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.4.3).

Der USME-Verlauf machte deutlich, dass eine hohe Substratkonzentrationsabnahme nicht gleichbedeutend mit einer hohen Ursolsäuremethylesterbildung war. Während die freien *Nocardia iowensis* Zellen Ursolsäure zu Ursolsäuremethylester innerhalb der ersten 24 Stunden transformierten, konnte bei den Immobilisierungskulturen USME erst nach 9 Tagen detektiert werden. Final wurden durch eine Immobilisierung relative Ursolsäuremethylester-Produktausbeuten von 32,1 % (in Alginat) bzw. 9,2 % (in Polyvinylalkohol) erzielt. Im Vergleich wiesen die freien *Nocardia iowensis* Zellkulturen eine relative Produktbildung von US zu USME von 54,0 % auf.

Neben einer Biotransformation zu Ursolsäuremethylester war eine Transformation zu Ursolsäure bekannt [121]. In Versuchen mit freien Zellen konnten jedoch bislang nur geringe, relative Konzentrationen bestimmt werden, welche erst im späteren Verlauf einer Biotransformation detektiert wurden. Da man nur anhand der Retentionszeiten vermuten konnte, dass es sich um Ursolsäure handelt, wurden zur Validierung neben den Literaturdaten auch die

HPLC-MS-Spektren untersucht. Die zu identifizierende Substanz zeigte einen m/z-Peak von 456 m/z im MS-Spektrum und damit 2 m/z weniger als Ursolsäure (458). Damit war die Substanz als Ursonsäure identifiziert [121]. Der Verlauf der Ursonsäure bei den unterschiedlichen Biotransformationsversuchen ist in Abbildung 80 zu sehen.

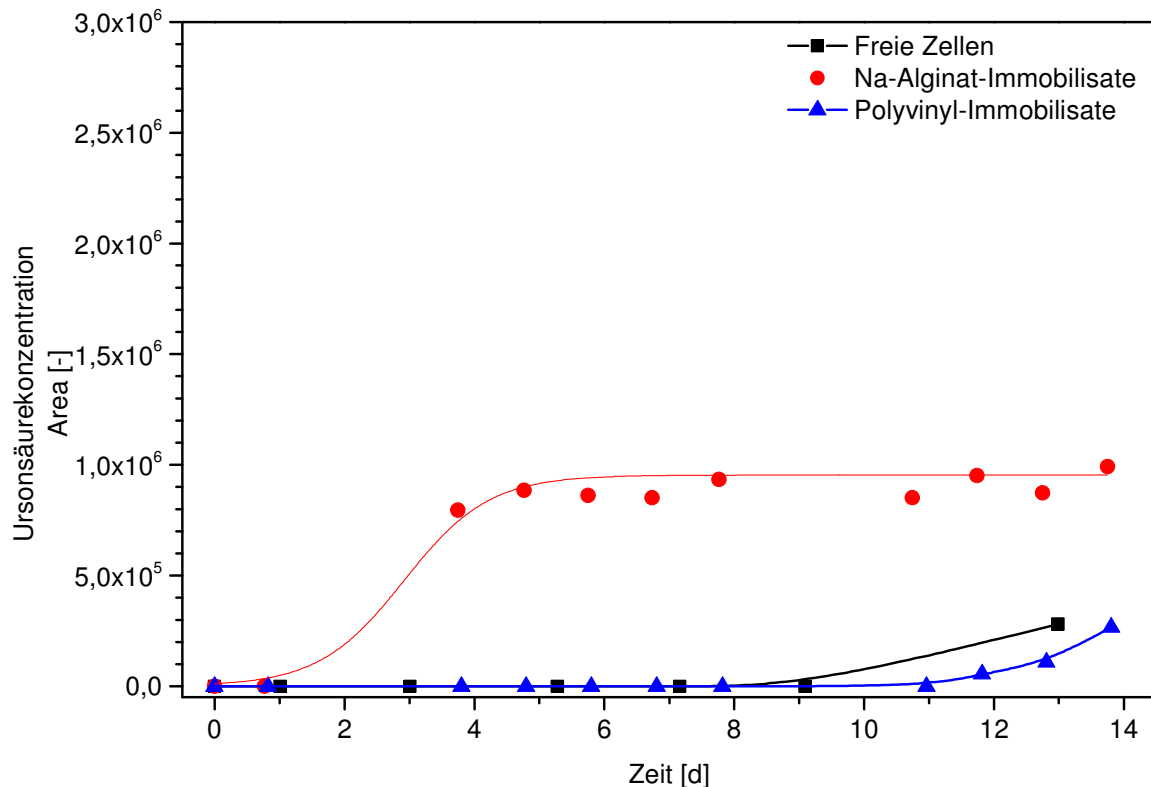


Abb. 80: Ursolsäurekonzentrationen der verschiedenen Biotransformationsversuche mittels freien und in Natriumalginat und Polyvinyl-immobilisierten *N. iowensis* Zellen gemessen an der Fläche des Peaks, der durch die RP-HPLC-Analytik bei 205 nm ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.4.3).

Wie aus Abbildung 80 hervorgeht, wurde durch eine Immobilisierung in Natriumalginat die Bildung zu Ursolsäure in den ersten 48 Stunden induziert. Die detektierte Ursolsäurekonzentration blieb bis zum Ende nahezu konstant. Auch bei einer Immobilisierung in Polyvinylalkohol konnte Ursolsäure nachgewiesen werden, jedoch entstand dies erst im späteren Biotransformationsverlauf.

Bisher wurden die ermittelten Produktkonzentrationen von Ursolsäuremethylester und Ursolsäure nur als Peakfläche angegeben. Sie waren wie US abhängig von der verwendeten HPLC-Methode. Standards zur quantitativen Bestimmung von USME und UNS waren nicht verfügbar, sodass die Flächen der Peaks sich nur anhand des Ursolsäurestandards berechnen ließen. Dies war möglich, sofern ein paar Annahmen getroffen wurden, die eine Konzentrationsbestimmung über Ursolsäure ermöglichten: Erstens, die Wechselwirkung zwischen dem Adsorber und USME/UNS entsprach der Wechselwirkung zwischen Ursolsäure und dem Adsorber. Zweitens, die Absorptionsmaxima bei 205 nm waren bei den Substanzen

gleich und drittens, es wurde für diese Substanzen die gleiche Dichte angenommen. Mit diesen Annahmen wurden die theoretischen, maximalen Ursolsäuremethylkonzentrationen bestimmt, welche zusammengefasst mit allen Ergebnissen in Tabelle 15 dargestellt sind.

Tab. 15: Ergebnisse zur Ursolsäuretransformation durch freie, in Alginat- und in polyvinylalkohol-immobilisierte Zellen. Die theoretischen USME und UNS-Konzentrationen wurden aus den Peakflächen von US bei 205 nm ermittelt.

	Substrat	Produktbildung	
	max. US-Aufnahmerate [g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	max. USME-Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	max. UNS-Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Freie Zellen	0,036	0,19	0,06
Alginat-Immobilisate	0,082	0,09	0,12
Polyvinyl-Immobilisate	0,058	0,05	0,06

Aus Tabelle 15 wird deutlich, dass Alginat-Immobilisate eine höhere Substrataufnahmerate als die freien Zellen besaßen, allerdings war die Biotransformationseffizienz, also die Bildung neuer Derivate pro aufgenommenen Substrat, nur gering. Auch eine Immobilisierung in Polyvinylalkohol führte zu einer verbesserten Substrataufnahmerate und einer geringeren Produktbildungsrate. Dabei wurde durch die Immobilisierung vor allem die Umwandlung in Ursonsäure induziert, während die Bildung von Ursolsäuremethylester reprimiert wurde.

Im Vergleich zu den Erkenntnissen von Leipold *et al.*, die bei der Biotransformation von Ursolsäure mit freien Zellen gemacht wurden, konnte anhand dieser Versuchsreihe der Verlauf der Produktbildung -USME-Bildung vor der Bildung von UNS- verifiziert werden [121]. Auch entsprach die Verteilung der gebildeten maximalen Produktmengen von Ursolsäuremethylester und Ursonsäure (3/4 zu 1/4) den Literaturdaten. Hingegen war der erste Detektionszeitpunkt von Ursonsäure um circa acht Tage verschoben. Dies könnte auf das unterschiedliche Transformationsmedium zurückzuführen sein. In der Veröffentlichung von Leipold *et al.* wurde eine Biotransformation in Phosphatpuffer präsentiert, die keine Nährstoffe für die Biotransformationskultur enthielt und damit die Zellsynthese einschränkte. Da zur Bildung der Ursonsäure das Enzym 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase vermutet wird [121] und 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase bei *Comamonas testosteroni* ausschließlich im Cytoplasma vorliegt [196], würde erst durch eine Zellyse die Dehydrogenase ins Medium transferiert, wo es die Biotransformation zu Ursonsäure ermöglichte. Demnach führte auch die Immobilisierung von *Nocardia iowensis* in Alginat trotz GYM-Medium zu einer Zellyse und damit einer Freisetzung der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase. Erst nach 10 Biotransformationstagen trat im Medium der freien Zellen vermutlich eine Limitierung oder Zellyse auf, was somit eine verzögerte Ursonsäurebildung erklären würde. Dass dennoch eine reprimierte USME-Bildung durch die in Alginat immobilisierten Zellen detektiert wurde, könnte auf den reduzier-

ten Stofftransport bzw. auf noch aktive Zellen zurückzuführen sein. Jedoch konnte nicht durch weitere Versuche bewiesen werden, wieso gleichzeitig die Ursolsäureaufnahme gesteigert wurde, wenn die Immobilisierung zu einer reprimierten Produktbildung führte. Möglich wäre eine erhöhte Degradation der Ursolsäure durch *N. iowensis*, um eine Nährstofflimitierung auszugleichen. Die in Zellen in Polyvinylalkohol immobilisierten Zellen zeigten nur eine geringe Aktivität einer USME- oder UNS-Bildung. Möglich wäre ein höherer Widerstand der Immobilisierungsmatrix, die nur gering durchlässig für Enzyme war. Eine eingehende Bestimmung der Netzwerk- bzw. Matrixdichte von Alginat und Polyvinylalkohol wurde im Anschluss der Biotransformation jedoch nicht durchgeführt.

Eine Betrachtung der Biotransformationseffizienz der Immobilisierungsverfahren kann durch die folgenden Abbildung 81 dargestellt werden.

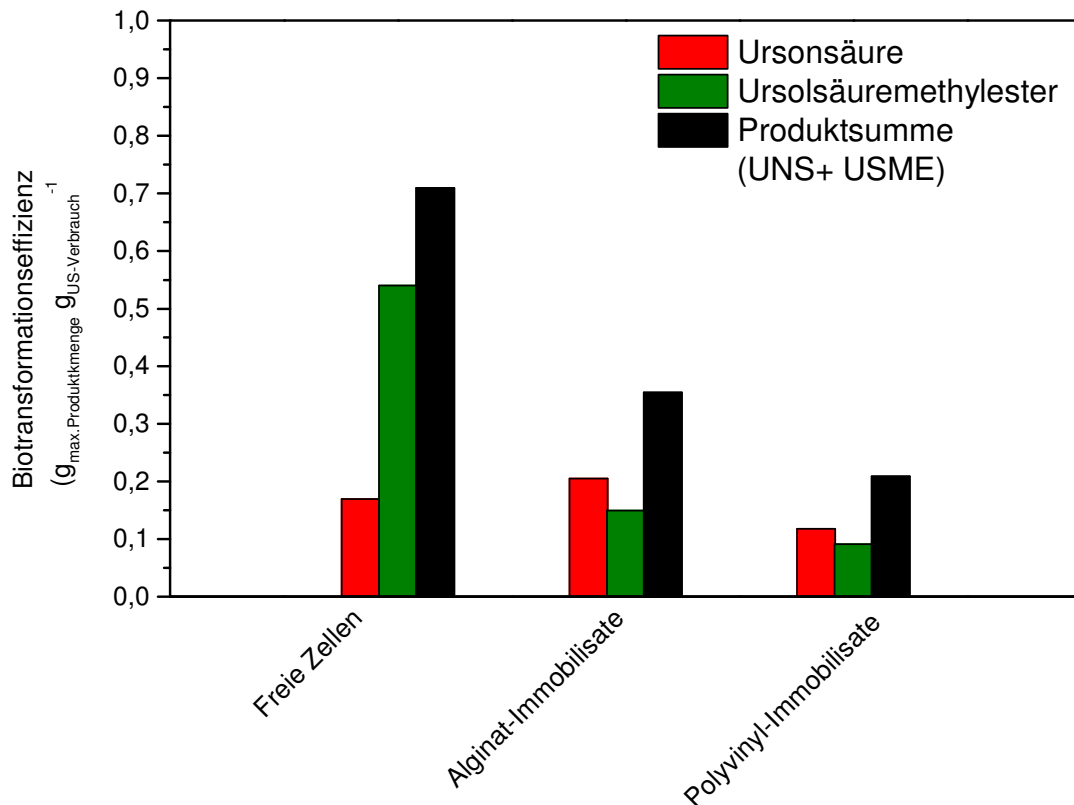


Abb. 81: Bestimmung der Biotransformationseffizienz bei der Transformation von Ursolsäure zu Ursolsäuremethylester (USME) und Ursonsäure (UNS) durch freie und immobilisierte *N. iowensis* Kulturen.

Eine weitere Erklärung für eine schlechte Biotransformationseffizienz bei der Immobilisierung in Polyvinylalkohol könnte durch das Herstellungsprotokoll erklärt werden. Diese wurde anhand des vorhandenen, vom Hersteller beschriebene LentiKat® Protokolls realisiert. Im Grunde bedeutete dies ein undefiniertes „Heißmachen“ des Liquides per Mikrowelle. Dabei sollte eine Schaumbildung durch zu hohe Temperaturen vermieden, gleichzeitig das Liquid verflüssigt werden. Nach kurzer Verwendungszeit war das Liquid verfestigt und musste er-

neut erhitzt werden. Zwar wurden unter der Cleanbench die Immobilisate erzeugt, doch bei dieser Methode blieb durch das häufige Erhitzen ein hohes Risiko einer Zellschädigung bestehen. Weil eine Beeinträchtigung der Zellen durch die warme Matrix vermutet wurde, wurden weitere Untersuchungen nur durch eine Immobilisierung in Alginat realisiert. Auch diese Immobilisierungsmethode wurde für weitere Versuche angepasst, da bei einer weiteren Verwendung der Alginatimmobilisate, eine Schädigung der Alginatmatrix durch das Wachstum der Zellen und durch den Einfluss des Mediums festgestellt wurde. Dies wurde auch in der Literatur beschrieben [180]. Eine Stabilisierung der Partikel und damit die Wiederverwendbarkeit konnte durch das Aushärten des Alginats in 20 %iger Calciumchloridlösung erreicht werden, weshalb diese Methode nun in den weiteren Versuchen verwendet wurde.

### 3.7.3 Biotransformation von Oleanolsäure durch freie und immobilisierten Zellen von *Nocardia iowensis*

In den letzten Jahren wurden viele Studien durchgeführt, um neue und bioaktivere Substanzen auf Basis der Oleanol-Struktur zu identifizieren [112]. Einige Studien erfolgten mittels Biotransformation. So beschrieben Parra *et al.* eine Biotransformation durch *Cunninghamella blakesleena*, *Penicillium chrysogenum*, *Colletotrichum phomoides* und *Aspergillus ochraceus* zu diversen Oleanolsäurederivaten [115]. In 2011 wurde eine Hydroxylierung von Oleanolsäure durch *Mucor rouxii* [197], sowie eine Glykolisierung durch *Alternaria longipes* und *Penicillium adametzi* präsentiert [198]. Die Biotransformation von Oleanolsäure zu Oleanolsäuremethylester mittels *Nocardia iowensis* wurde von Zhang *et al.* 2005 beschrieben, jedoch wurden keine weiteren Biotransformationsprodukte detektiert [122]. Bei der Validierung der Ursolsäuretransformation mittels *Nocardia iowensis* und der Verwendung von Ursolat, welches einen Anteil von Oleanolsäure besaß, konnten weitere Produkte detektiert werden. Um gleichzeitig den Einfluss einer Immobilisierung auf die Biotransformationsbildung zu untersuchen, wurden sowohl freie als auch immobilisierte Zellen in parallelen Versuchen verwendet. Die Immobilisierung in Alginat erfolgte anhand des Immobilisierungsprotokolls aus Kapitel 3.4.8. Die Vorkultivierung der *N. iowensis* Zellen wurden in einem gemeinsamen Vorkulturmilieu durchgeführt und auf 15 mL-Zentrifugengefäße aliquotiert. Der Substratverlauf dieser Biotransformation ist in Abbildung 82 dargestellt.

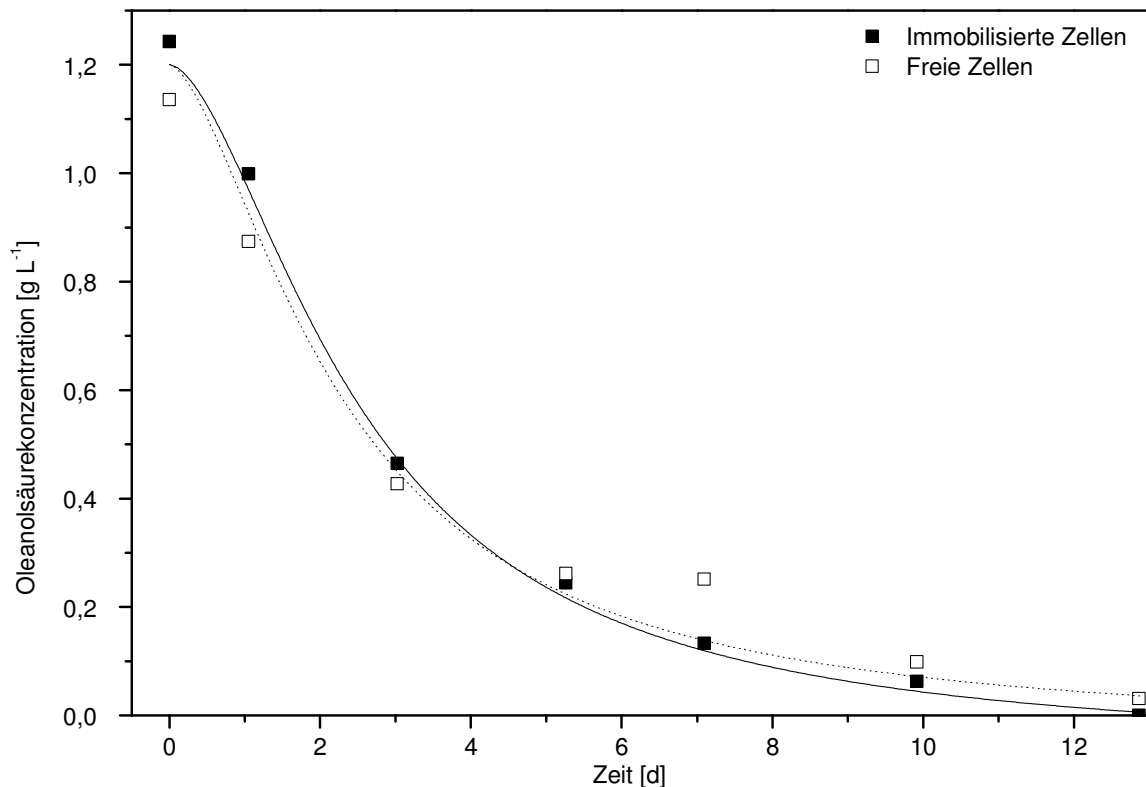


Abb. 82: Verläufe der Oleanolsäurekonzentration [g L<sup>-1</sup>] in Schüttelkolben mit freien, ungebundenen (weiß) und immobilisierten (schwarz) *Nocardia iowensis* Zellen. Die Kulturen wurden bei 28 °C und 120 upm inkubiert. Detektion erfolgte durch HPLC-RP bei 205 nm.

Trotz der Immobilisierung konnte keine signifikante Änderung des Verlaufes der Oleanolsäurekonzentration im detektiert werden (Abbildung 82). Nach 13 Tagen war in beiden Medien nur noch eine geringe Konzentration an Oleanolsäure vorhanden.

Bei der Produktanalytik konnten mittels HPLC drei Metabolite identifiziert werden, die während der Biotransformation sowohl bei der immobilisierten als auch bei der freien Zelle auftraten. Durch die Immobilisierung der Zellen konnte keine Änderung des Produktspektrums detektiert werden. Ein zeitlicher Verlauf der Produktbildung ist in den folgenden Abbildungen 83 und 84 dargestellt. Für die drei auftretenden Metaboliten wurde eine Nummerierung nach dem Zeitpunkt des Auftretens in der Biotransformation mit den nativen Zellen gewählt.

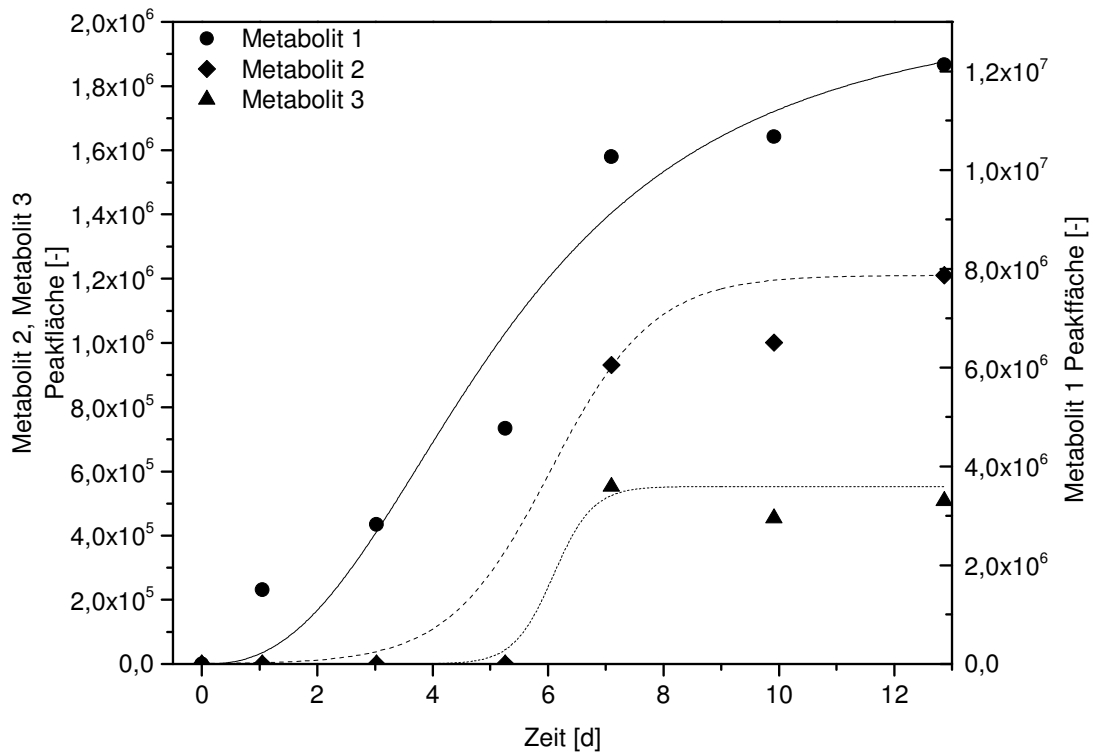


Abb. 83: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Produktbildung während der Oleanolsäuretransformation durch native *Nocardia iowensis* Zellen. Die Kultur wurde bei 28 °C und 120 upm inkubiert. Detektion erfolgte durch HPLC-RP bei 205 nm.

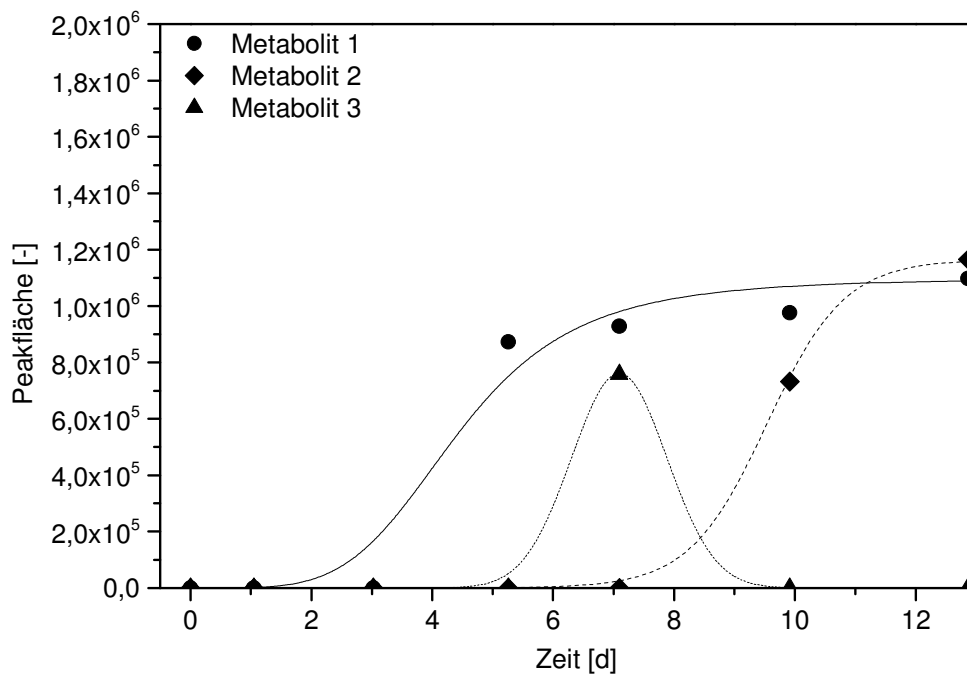


Abb. 84: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Produktbildung während der Oleanolsäuretransformation durch in Alginat immobilisierte *Nocardia iowensis* Zellen. Die Kultur wurde bei 28 °C und 120 upm inkubiert. Detektion erfolgte durch HPLC-RP bei 205 nm.



Wie man aus den Abbildungen 83 und 84 entnehmen kann, wurden die Metabolite 1 und 2 im Versuchsansatz der immobilisierten Zellen um vier Tage später detektiert als im Medium der freien Zellen. Zudem lag der Gehalt des Metaboliten 1 bei den nativen Zellen im Vergleich zu den immobilisierten Zellen um den Faktor 10 höher. Die Maxima der Metaboliten 2 waren in beiden Versuchsansätzen nicht signifikant unterschiedlich. Metabolit 3 konnte in beiden Versuchsansätzen ab Tag 7 detektiert werden, jedoch lag im weiteren Verlauf der Biotransformation Metabolit 3 im Medium der immobilisierten Zellen unterhalb der Erfassungsgrenze. In weiteren Versuchen traten Metabolit 2 und 3 nur auf, wenn auch Metabolit 1 gebildet worden war (Daten nicht gezeigt), weshalb hier eine Abhängigkeit vermutet wurde.

Um die Substanzen eindeutig zu identifizieren, folgte auf die HPC-Analytik, eine HPLC-MS und HPLC-<sup>1</sup>H NMR. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 3.4.8 zu finden. Da es für die HPLC-<sup>1</sup>H NMR notwendig war, das Laufmittel und die Lösungsmittel in deuterierter Form zu verwenden, wurden zunächst die Proben unter den veränderten Parametern in der HPLC und HPLC-MS analysiert, um Veränderungen im Chromatogramm nachzuvollziehen. Im Anschluss daran erfolgten die Magnet- und die Kernresonanzspektroskopie. Die hierüber erhaltenen Daten sind in den Tabellen (Tab 16 bis Tab. 20) aufgeführt. Die Auswertung der unbekanntenen Substanzen erfolgte zusätzlich mittels Datenbanken.

Tab. 16: HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten der Oleanolsäure

<b>Oleanolsäure (Substrat), 3<math>\beta</math>-Hydroxy-olea-12-en-28-oic-acid [199–201]</b>	
Detektion bei $\lambda_{\max}$ (MeOH)	205 nm
Molare Masse	456,7 g mol <sup>-1</sup>
Summenformel	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>
ESI-MS Daten [m/z]	458 [M+H] <sup>+</sup> , 480 [M+Na] <sup>+</sup> , 440 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> , 936 [2M+Na] <sup>+</sup> , 914 [2M+H] <sup>+</sup>
<sup>1</sup> H-NMR Daten (600 MHz) $\delta_{\text{H}}$	5.16 (1H, t, J=3.6 Hz), 2.75 (1H, dd, J=13.3/3.8 Hz), 1.08 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.87 (6H, d, J=3.1 Hz), 0.84 (3H, s), 0.72 (3H, s), 0.68 (3H, s)

Tab. 17: HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten des Oleanolsäuremethylesters (Standard)

<b>Oleanolsäuremethylester</b>	
Detektion bei $\lambda_{\max}$ (MeOH)	205 nm
Molare Masse	470,7 g mol <sup>-1</sup>
Summenformel	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>
ESI-MS Daten [m/z]	472 [M+H] <sup>+</sup> , 494 [M+Na] <sup>+</sup> , 454 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> , 964 [2M+Na] <sup>+</sup>
<sup>1</sup> H-NMR Daten (600 MHz) $\delta_{\text{H}}$	5.18 (1H, t, J = 3.6 Hz), 3.52 (OMe, s), 2.77 (1H, dd, J=14.1/4.6 Hz), 1.08 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.86 (6H, s), 0.85 (3H, s), 0.68 (3H, s), 0.66 (3H, s)

Tab. 18: HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten des Oleanolsäuremethylesters (Metabolit 1)

<b>Oleanolsäuremethylester (Metabolit 1)</b>	
Detektion bei $\lambda_{\max}$ (MeOH)	205 nm
Molare Masse	470,7 g mol <sup>-1</sup>
Summenformel	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> O <sub>3</sub>
ESI-MS Daten [m/z]	472 [M+H] <sup>+</sup> , 494 [M+Na] <sup>+</sup> , 454 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> , 964 [2M+Na] <sup>+</sup>
<sup>1</sup> H-NMR Daten (600 MHz) $\delta_{\text{H}}$	5.18 (1H, t, J = 3.4 Hz), 3.52 (OMe, s), 2.77 (1H, dd, J=14.1/4.1 Hz), 1.08 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.86 (6H, s), 0.85 (3H, s), 0.68 (3H, s), 0.66 (3H, s)

Tab. 19: HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten des Oleanonsäuremethylesters (Metabolit 2)

<b>Oleanonsäuremethylester (Metabolit 2); 3-Oxoolean-12-en-28-oic acid methyl ester [202]</b>	
Detektion bei $\lambda_{\max}$ (MeOH)	205 nm
Molare Masse	468,7 g mol <sup>-1</sup>
Summenformel	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>
ESI-MS Daten [m/z]	470 [M+H] <sup>+</sup> , 452 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> , 960 [2M+Na] <sup>+</sup> , 938 [2M+H] <sup>+</sup>
<sup>1</sup> H-NMR Daten (600 MHz) $\delta_{\text{H}}$	5.21 (1H, t, J = 3.7 Hz), 3.53 (OMe, s), 1.10 (3H, s), 0.99 (6H, s), 0.96 (3H, s), 0.86 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.72 (3H, s)

Tab. 20: HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten des Metabolits 3

<b>Unbekannter Metabolit (Metabolit 3)</b>	
Detektion bei $\lambda_{\max}$ (MeOH)	205 nm
Molare Masse	486,7 g mol <sup>-1</sup>
Summenformel	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>
ESI-MS Daten (m/z)	488 [M+H] <sup>+</sup> , 470 [M-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup> , 510 [M+Na] <sup>+</sup> , 974 [2M+H] <sup>+</sup> , 996 [2M+Na] <sup>+</sup>
<sup>1</sup> H-NMR Daten (600 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ 5.19 (1H, m), 3.52 (OMe, s), 3.22 (s), 2.81 (1H, d, J = 9.6 Hz), 1.09 (3H, s), 0.92 (6H, s), 0.86 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.71 (3H, s), 0.66 (3H, s)

Das in der Literatur beschriebene Produkt Oleanolsäuremethylester (Tabelle 17 und 18) konnte durch die Ergebnisse der HPLC-MS eindeutig identifiziert werden [121]. Auch die Massen der Metabolite 2 und 3 wurden durch Massenspektroskopie erfasst. Dabei lagen die Molekülonen [M+H]<sup>+</sup> nur als schwache Signale vor, während die Adduktionssignale, vor allem der Dupletionen [2M+Na]<sup>+</sup> stärker hervortraten. Aufgrund der Ionisierung durch die Electrospray-Ionisierung (ESI) entstanden bei dieser Analytik Adduktionen, die durch Natriumkati-

onen ionisiert wurden [203]. In Abbildung 85 ist das Massenspektrum, welches aus der ESI-Methode resultierte am Beispiel Oleanolsäuremethylester aufgeführt.

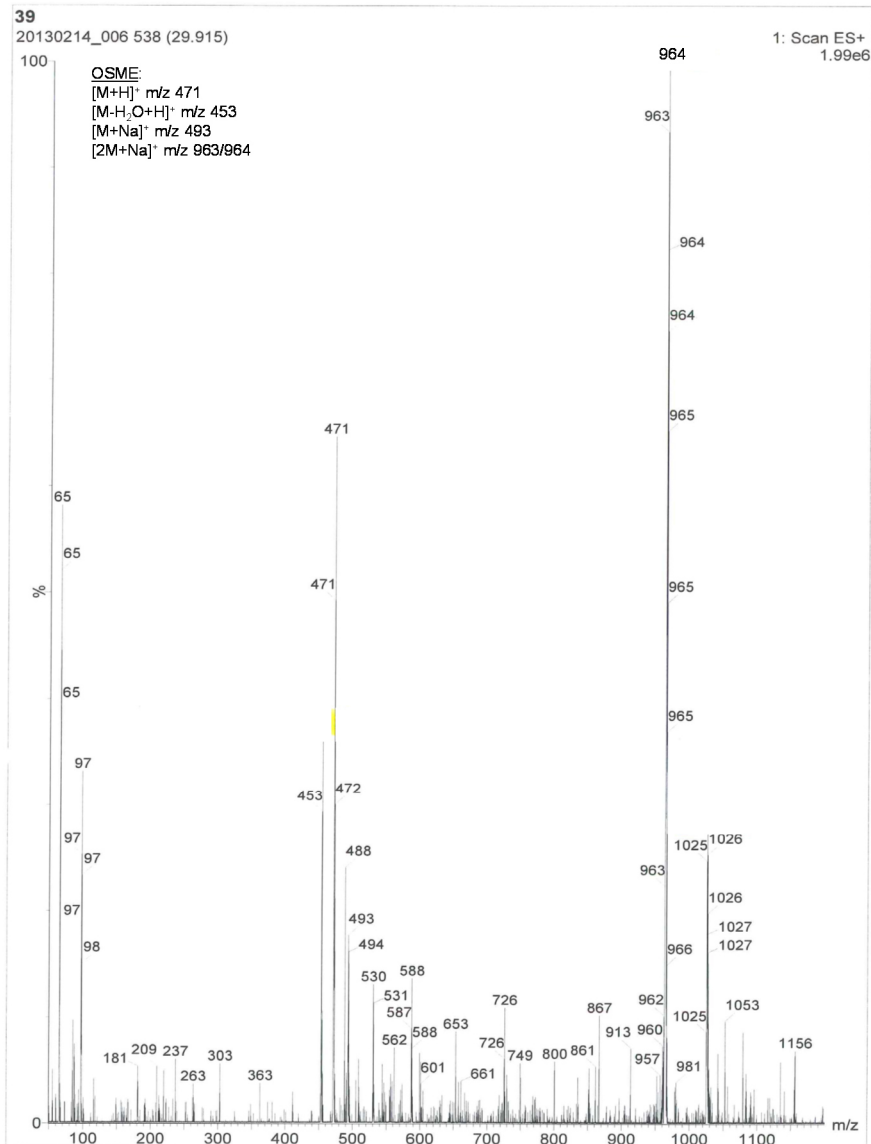


Abb. 85: Massenspektrum von Oleanolsäuremethylester und nach positiver Ionisierung durch Electro spray-Ionisierung (ESI) ( $m/z$  471) und daraus resultierenden Adduktionssignalen [OSME  $-H_2O + H^+$ ] ( $m/z$  453), [OSME  $+Na^+$ ] ( $m/z$  493) und den sehr deutlich auftretenden Duplettionen [ $2x$  OSME  $+ Na^+$ ] ( $m/z$  963/964).

Nach einer Strukturerrfassung der Metabolite durch die  $^1H$ -NMR und anhand der Literatur konnte Metabolit 2 als Oleanonsäuremethylester identifiziert werden. Wie bei der Biotransformation von Ursolsäure zu Ursonsäuren könnte die  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase die Bildung des Ketons aus Oleanolsäuremethylester katalysieren [121]. Dabei diene  $NAD^+$  als Co-Substrat und wurde zu  $NADH+H^+$  reduziert. Diesbezüglich wurde Ende 2012 in *Nocardia*

*brasiliensis* HUJEG-1 eine 3 $\alpha$ -(oder 20 $\beta$ )-Hydroxysteroid-dehydrogenase isoliert und die dazugehörige DNA sequenziert [204]. Aufgrund der 16S rRNA-Sequenzanalyse, welche zur Namensgebung von *N. iowensis* führte, konnte eine Similarität zu *N. brasiliensis* von 98,8 % nachgewiesen werden [170]. Eine Hybridisierung der DNA der beiden Stämme ergab eine Sequenzähnlichkeit von 19,9 %, weshalb die Biosynthese einer Hydroxysteroid-dehydrogenase in *N. iowensis* sehr wahrscheinlich wäre.

Mittels  $^1\text{H-NMR}$  war es nicht möglich, die Struktur des Metaboliten 3 eindeutig zu bestimmen. Die Bildung von Oleanonsäure als vermutetes Transformationsprodukt konnte anhand der Daten und der Literatur nicht validiert werden [205; 206]. Auch Maslinsäure (2 $\alpha$ -Hydroxy-oleanolsäure) [207–209] oder 15 $\alpha$ -Hydroxyl-oleanolsäure [210] konnten als Metabolit 3 ausgeschlossen werden. Aufgrund des Massenspektrums wurde eine Erhöhung der Molekülmasse um 16 m/z und damit um  $\frac{1}{2} \text{O}_2$  im Vergleich zu Oleanolsäuremethylester detektiert. Da Metabolit 3 nur dann auftrat, wenn eine entsprechende Konzentration von OSME im Medium vorhanden war, wurde davon ausgegangen, dass es sich hierbei um ein Biotransformationsprodukt von Oleanolsäuremethylester handelte. Eine weitere Analytik des Metaboliten 3 mittels  $^{13}\text{C-NMR}$  könnte die Strukturaufklärung verbessern, konnte jedoch aufgrund der geringen Produktkonzentration und des Versuchszeitrahmens nicht mehr erfolgen.

Ein möglicher Biosyntheseweg betreffend der Oleanolsäuretransformation ist in Abbildung 86 dargestellt. Die Methylierung der Oleanolsäure war in der Literatur wiederzufinden [122; 121]. Wie Zhang *et al.* berichteten, konnte auch in der vorliegenden Studie eine Transformation von Oleanolsäure zu Ursan-Derivaten ausgeschlossen werden.

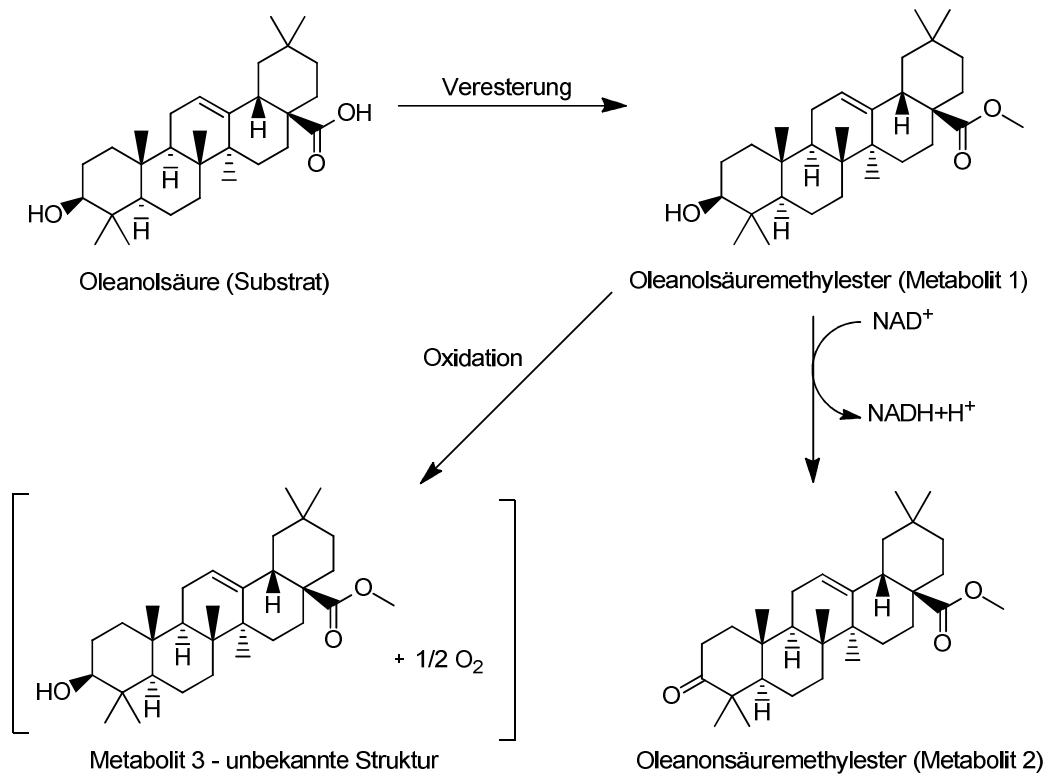


Abb. 86: Möglicher Biosyntheseweg bei der Biotransformation von Oleanolsäure durch *Nocardia iowensis*.

Eine Darstellung der wichtigsten Kenndaten zur Produktbildung und Biotransformationseffizienz ist in der folgenden Tabelle 21 dargestellt. Dabei werden die Oleanolsäureaufnahme gegenüber den maximalen Konzentrationen von Oleanolsäuremethylester, Oleanonsäuremethylester als auch des Metaboliten 3 präsentiert.

Tab. 21: Kennzahlen zum Substratverlauf und der Produktbildung bei der Biotransformation von Oleanolsäure durch freie (FZ) und immobilisierte (IZ) *Nocardia iowensis* Zellen. Die Konzentrationen von Oleanolsäuremethylester, Oleanonsäuremethylester und Metabolite 3 wurden aus der Peakfläche der Oleanolsäure bei der Adsorption bei 205 nm ermittelt.  $\Delta P$  ist die Summe aller maximalen Produktkonzentrationen, die aus dem Versuch hervorgegangen sind.

	Substrat	Produktbildung			
	OS-Aufnahmerate [g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	max. OSME-Konz. [g L <sup>-1</sup> ]	max. ONSME-Konz. [g L <sup>-1</sup> ]	max. Metabolit 3-Konz. [g L <sup>-1</sup> ]	Biotransformationseffizienz [g <sub>ΔP</sub> g <sub>OSverbrauch</sub> <sup>-1</sup> ]
FZ	0,13	0,63	0,05	0,02	0,63
IZ	0,14	0,06	0,06	0,03	0,12

Wie aus der Tabelle 21 zu entnehmen ist, lag die Biotransformationseffizienz der immobilisierten Zellen um den Faktor 5 niedriger als bei den freien Zellen. Dies war vor allem auf die reduzierte Bildung des Oleanolsäuremethylesters zurückzuführen. Wie bei der Biotransformation von Ursolat durch freie und in Alginat und Polyvinylalkohol-gebundene *N. iowensis*

Zellen reduzierte die Immobilisierung die Produktbildung. Es wird davon ausgegangen, dass die Immobilisierungsmatrix den Stofftransport reduzierte.

### 3.7.4 Synopse

Die Biotransformation der Triterpene durch ein Ganzzellsystem war Ziel des Dissertationskapitels. Dazu wurden ausgewählte Mikroorganismen verwendet, die Ursolsäure transformieren könnten. Mittels der etablierten RP-HPLC-Analytik zeigten nur die eingesetzten Pilzkulturen *Aspergillus niger* und *Fusarium fujikuroi* und das Referenzbakterium *Nocardia iowensis* eine Substrataufnahme. Eine weitere Erfassung durch eine gekoppelte HPLC-MS-Analytik resultierte in einem Nachweis, dass die entstandenen Substanzen durch die Eukaryoten abgebaut werden und damit keine neuen Derivate der Oleanol- und Ursolsäure sind.

Die Biotransformation von Ursolsäure durch native und immobilisierte *N. iowensis* Zellen führte zu der Bildung der in der Literatur beschriebenen Produkte [121]. Die Immobilisierung von *Nocardia iowensis* resultierte in einer Reduzierung der Biotransformationseffizienz (siehe Abbildung 87). Um die Wiederverwendung der Alginatepartikel zu ermöglichen, wurde die Stabilität der Alginatematrix durch das Verwenden einer 20 %igen Calciumchloridlösung verbessert. Dies führte bei der Biotransformation von Oleanolsäure zu einer geringeren Biotransformationseffizienz als zu erwarten war (ebenfalls Abbildung 87).

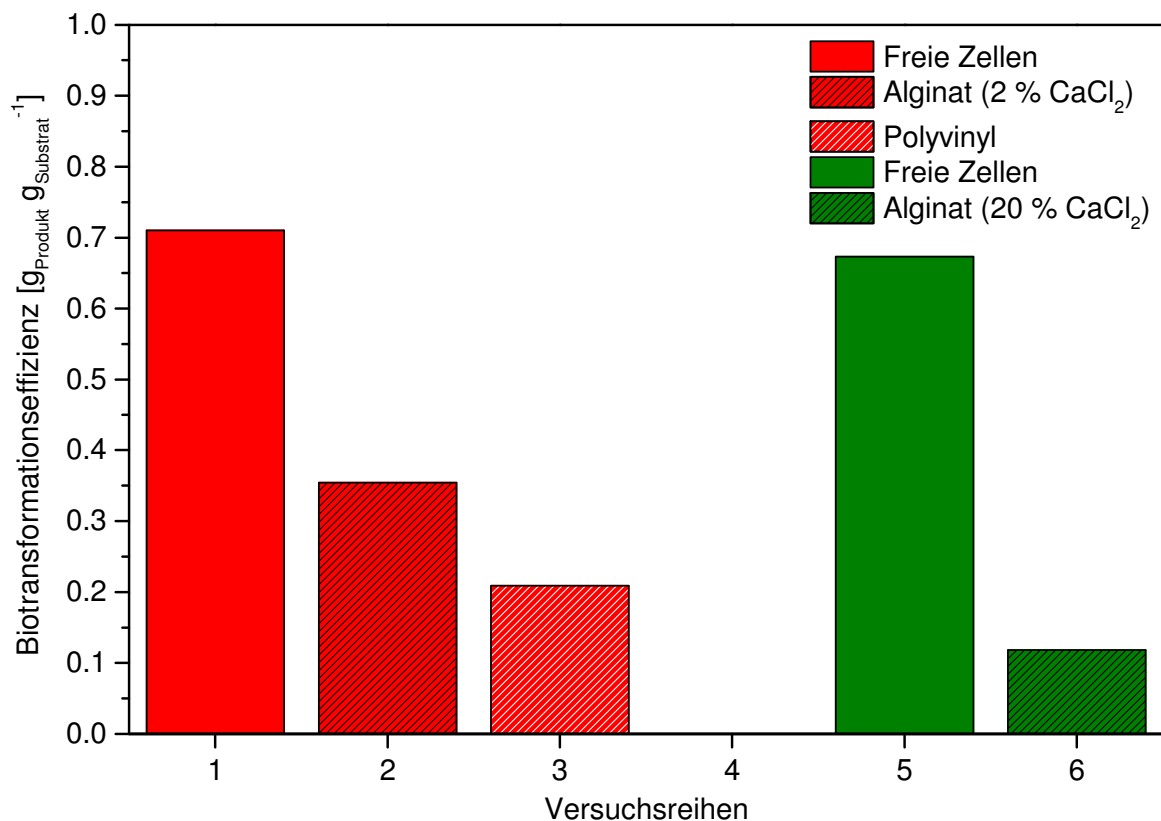


Abb. 87: Vergleich der Biotransformationseffizienzen der freien, in Alginate (2 und 20 % CaCl<sub>2</sub>)- und in polyvinyl-immobilisierten Zellen. In Rot sind die Effizienzen für die Ursolsäuretransformation und in Grün die Effizienzen für die Biotransformation von Oleanolsäure dargestellt.

Wie anhand der Abbildung 87 zu erkennen ist, konnte durch native Zellen von *N. iowensis* eine Biotransformationseffizienz von 63 % (Oleanolsäure) bis 71 % (Ursolsäure) erzielt wer-

den. Durch Einbettung der Zellen in Alginat bzw. Polyvinylalkohol wurden reduzierte Effizienzen von 35 % bzw. 20 % bezogen auf die Ursolsäuretransformation detektiert. Wurde die Alginatmatrix durch Verwendung von 20 %iger Calciumchloridlösung stabilisiert und die immobilisierte Kultur zur Biotransformation von Oleanolsäure verwendet, lag die Effizienz nur noch bei 12 %. Die Netzwerkdicke bzw. der Widerstand führten vermutlich zur Reduzierung des Stofftransports, weshalb die Matrixdicke in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden sollte. Da die Bildung von Ursolsäure über die im Cytoplasma befindliche  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase vermutet wird, müsste durch eine käuflich erwerbbar  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase die Biotransformation zu UNS verifiziert werden. Wird UNS gebildet, wäre dies ein Nachweis, dass durch Immobilisierung in Natriumalginat die Zellen lysieren und  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase freisetzen.

Bei der Biotransformation von Oleanolsäure durch sowohl freie und als auch immobilisierte Zellen von *Nocardia iowensis* konnten drei Metaboliten detektiert werden. Der in der Literatur postulierte Oleanolsäuremethylester wurde als erstes Transformationsprodukt ermittelt. Oleanonsäuremethylester konnte als ein neues Produkt bei der Biotransformation mittels HPLC-MS und HPLC-NMR-Analytik und in Korrelation zu Literaturdaten identifiziert werden. Metabolit 3 wurde während der Transformation unabhängig zu dem Oleanolsäuremethylester und dem Oleanonsäuremethylester gebildet, jedoch war die Analytik nicht aussagekräftig genug, um ihn zu identifizieren. Eine anschließende  $^{13}\text{C}$ -NMR würde eine Identifizierung ermöglichen, konnte jedoch nicht im Rahmen der Arbeit durchgeführt werden.



### **3.8 Design eines Gesamtprozesses einer Kultivierung von Salbeizellen mit anschließender Biotransformation durch immobilisierte *Nocardia iowensis* Zellen**

Üblicherweise erfolgten die Kultivierung der Pflanzenzellen und die Biotransformation der Triterpene als eigenständige Prozesse. Dabei wurden für die kommerzielle Oleanol- und Ursolsäuresubstrate verwendet, die nicht aus den eigenen Kultivierungen der Pflanzenzellen gewonnen wurden. Die erworbenen Substrate hatten einen analytischen Reinheitsgrad und wären aufgrund der hohen Kosten für eine weitere Biotransformation im industriellen Maßstab wirtschaftlich uninteressant. Ein Downstreamverfahren zur Isolierung der Oleanol- und Ursolsäuren aus einem Salbeiextrakt wäre wirtschaftlich sinnvoller, würde jedoch in weiteren Prozessstufen und zu einer Erhöhung der bisherigen Prozesskosten, der Prozesszeit sowie in einem Produktverlust an Oleanol- und Ursolsäure resultieren. Eine Prozessstrategie, die eine Kombination der beiden Verfahren ermöglichte, sodass der Einsatz der *Nocardia iowensis* Zellen im Salbeizelleextrakt etabliert werden könnte, würde diese Nachteile elegant umgehen. Jedoch könnten freigesetzte Salbeimetabolite, wie Phenole, die Biotransformation der Triterpene negativ beeinflussen. Diese könnten in einer reprimierten Zellaktivität der Biotransformationskultur als auch durch eine Inhibierung der involvierten Enzyme resultieren. Um diese störenden Einflüsse zu minimieren und eine Langzeitstabilisierung der Zellen zu ermöglichen, wurde die Transformationskultur in Alginate eingebettet.

Die Untersuchung einer direkten Biotransformation im Zellextrakt erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Dresden. Um einen schnellen Überblick zu ermöglichen, ist in der folgenden Abbildung 88 der Versuchsablauf dargestellt.

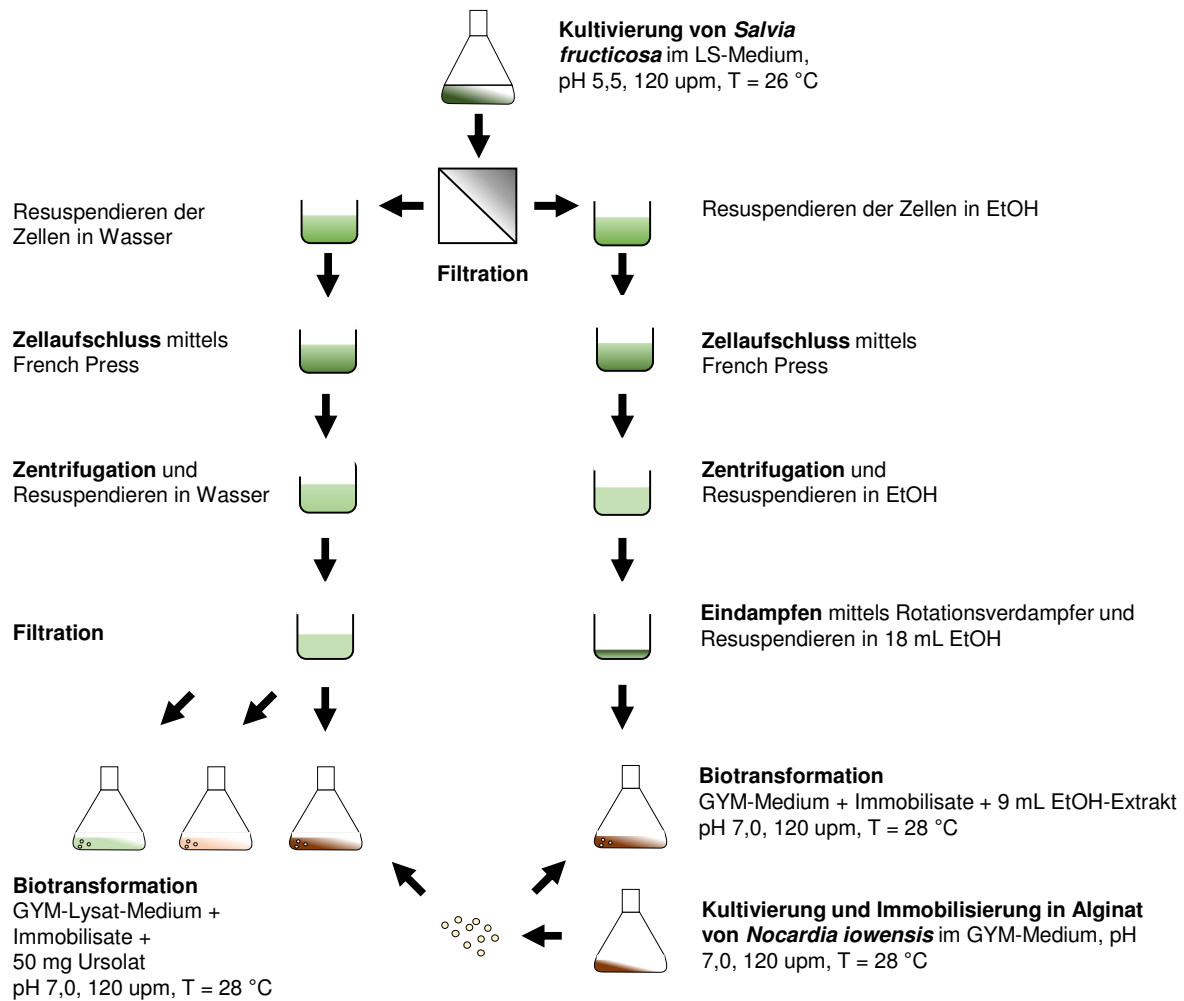


Abb. 88: Design des Gesamtprozesses: Biotransformation im nach Zellaufschluss der *Salvia fruticosa* Pflanzenkultur mittels immobilisierter *N. iowensis* Zellen. Um den Einfluss von hydrophilen und hydrophoben Pflanzenzellbestandteilen zu untersuchen, erfolgte eine unterschiedliche Extraktion.

Die *Nocardia iowensis*-Biotransformationskultur wurde in der Bioverfahrenstechnik in Kaiserslautern kultiviert, immobilisiert und für den Transport in GYM-Medium bei 4 °C gelagert (siehe Kapitel 3.4.8). Durch eine mikroskopische Kontrolle des Mediums konnte eine Kontamination vor Beginn der Zusammenführung ausgeschlossen werden. Um negative Einflüsse wie z. B. inaktive Biotransformationszellen miteinzubeziehen und die Resultate vergleichen zu können, wurden die Versuche gleichzeitig unter Standardprozessparametern, wie etabliertes Transformationsmedium und definierter pH-Wert, durchgeführt. Die Pflanzenzellkultivierung einer *Salvia fruticosa*-Kultur erfolgte am Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik in Dresden. Die Zusammenführung der Prozesse erforderte das Aufschließen der Zellen mittels French-Press. Dabei wurden die Zellen in Ethanol (EtOH) oder in Wasser aufgeschlossen, um die hydrophoben und hydrophilen Zellbestandteile zu erhalten und deren Einfluss auf die Biotransformation zu untersuchen.

Wie in Kapitel 3.4.10 beschrieben, wurden zunächst die Zellen der *Salvia fruticosa* Kultur filtriert, gewaschen und mittels French-Press in Ethanol aufgeschlossen. Durch einen Rotati-

onsverdampfer wurde das Extrakt aufkonzentriert und in Ethanol resuspendiert. Die Biotransformation erfolgte im Schüttelkolben in 150 mL GYM-Medium durch eine in Alginat immobilisierte *N. iowensis*-Kultur. Nach 24 Stunden wurden dem Medium 16 mL des ethanolhaltigen Extrakts hinzugegeben. Die Abbildung 89 zeigt einen Verlauf über 16 Tage, bei dem folgende Biotransformation von Oleanol- und Ursolsäure zu den korrespondierenden Methylestern detektiert wurde:

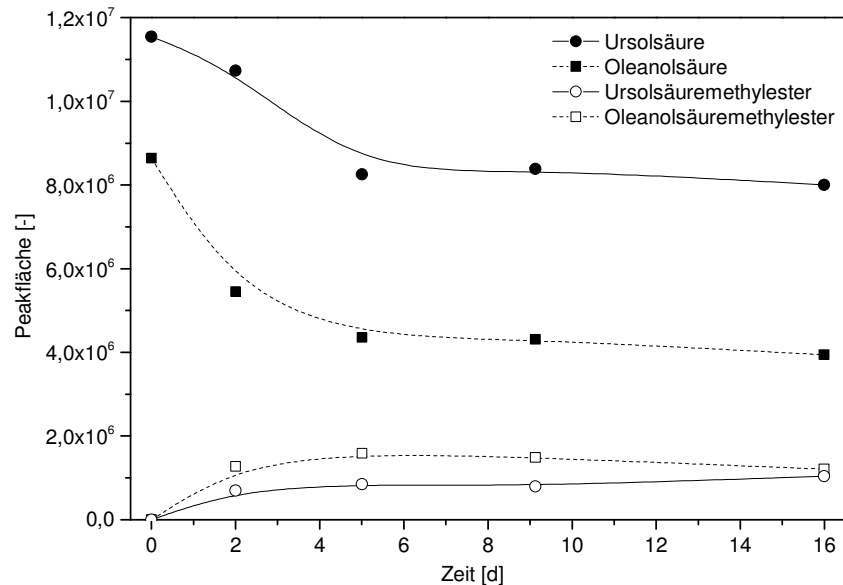


Abb. 89: Biotransformation von Oleanol- und Ursolsäure durch immobilisierte *N. iowensis* Zellen im GYM-Medium. Die Triterpene wurden aus Pflanzenzellen extrahiert und mittels Rotationsverdampfer aufkonzentriert.

Zu Beginn der Biotransformation betragen die Substratkonzentrationen 46,88 mg L<sup>-1</sup> an Oleanol- und 65,63 mg L<sup>-1</sup> an Ursolsäure. Gleichzeitig wurde durch die Zugabe des Extrakts das Medium stark getrübt (Abbildung 90).

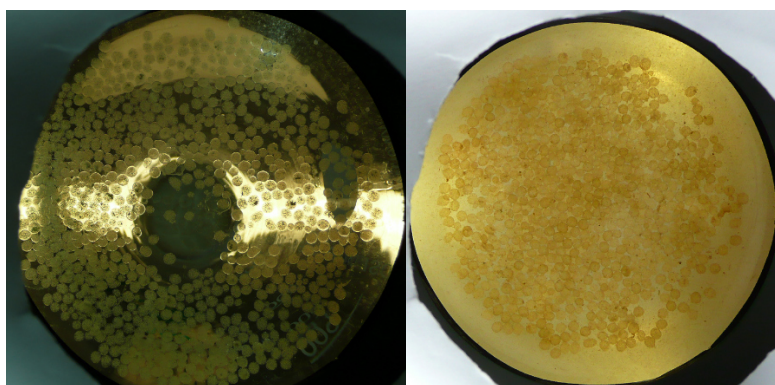


Abb. 90: Biotransformationskultur im GYM-Medium (links) und nach Zugabe des Zellextrakts und weiteren zwei Tagen im Inkubator bei 26 °C und 120 upm (rechts). Aufgrund des wässrigen Milieus ist die Trübung auf die hydrophoben Bestandteile, wie beispielsweise die Oleanol- und Ursolsäure, zurückzuführen.

In den darauffolgenden 48 Stunden konnte eine Biotransformation der beiden Triterpene zu ihren korrespondierenden Methylestern detektiert werden. Im Vergleich zu den Versuchen mit kommerziell erhältlichen Triterpenen (Kapitel 3.7.2 und 3.7.3) und aufgrund des sigmoi-

dalen Kurvenverlaufs war eine Inhibierung der Biotransformationskultur durch die im Extrakt befindlichen Pflanzenzellprodukte wahrscheinlich.

In Methanolextrakten konnten Inhaltstoffe nachgewiesen werden, die sowohl das Wachstum von Gram-positiven als auch -negativen Bakterien und Pilzen inhibieren konnten [211; 212]. Eine solche Identifikation der im Extrakt befindlichen Substanzen wäre sehr aufschlussreich, würde jedoch zu einer sehr umfangreichen Analytik führen, die in diesem Versuch nicht integriert war. Um zunächst das Problem der Inhibierung durch hydrophobe Phenole zu umgehen, wurden die Pflanzenzellen in Wasser aufgeschlossen und biotransformiert.

Die Sterilität des Mediums wurde durch das Aufnehmen des Pflanzenzellextrakts in Wasser sowie eine nachfolgende Sterilfiltration durch einen PES-Filter (0,2  $\mu\text{m}$ ) erreicht. Für die Biotransformation wurden Mischungsverhältnisse von 75 % zu 25 % und 50 % zu 50 % (GYM-Medium zu Zellysat), sowie 100 % Lysat und als Positivkontrolle 100 % GYM-Medium vorbereitet. Das Arbeitsvolumen betrug 150 mL. Veränderungen der Biotransformation, die auf einer Hemmung der Transformationskultur basierten, konnten so anhand der Medienzusammensetzung leichter identifiziert werden. Durch die Zugabe an Lysat und den darin enthaltenen oxidierten Phenolen verfärbten sich die Kolben je nach Lysatkonzentration von Gelb nach Braun (Abbildung 91). Die Braunfärbung bzw. die Oxidation der Phenole wurde in der Literatur 1997 von Takahama beschrieben [213].

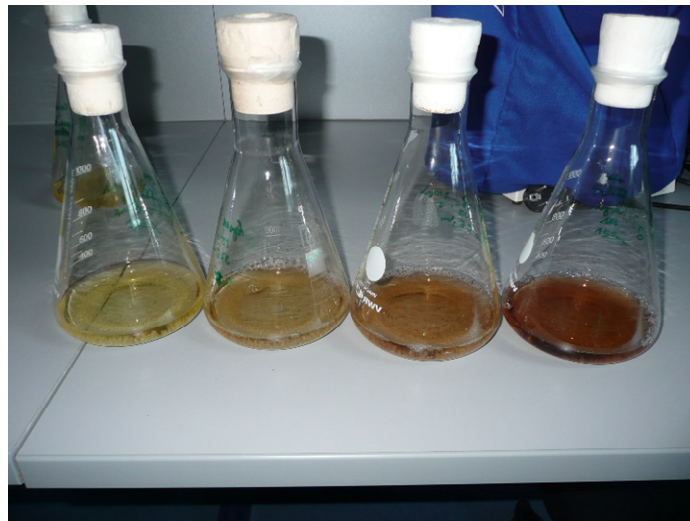


Abb. 91: Verfärbung des Biotransformationsmediums aufgrund des Verhältnisses von Zellysat zu GYM-Medium (Arbeitsvolumen von 150 mL). Kolben von links nach rechts: 100 % GYM-Medium (Positivkontrolle), 25 % Zellysat zu 75 % GYM-Medium, 50 % Zellysat zu 50 % GYM-Medium und 100 % Zellysat. Biotransformation erfolgte bei 28 °C und 120 upm.

Im Vergleich zum Aufschluss in Ethanol, wo das Zellextrakt aufkonzentriert war, besaß das reine Zellysat des wässrigen Zellaufschlusses eine Triterpenkonzentration von 3,75 mg L<sup>-1</sup>. Daher wurde allen Medien 50 mg Ursolat hinzugegeben. Gleichzeitig ermöglichte dies einen

direkten Vergleich der Resultate mit einer Biotransformation in reinem GYM-Medium. Der Verlauf der Positivkontrolle und der Biotransformation in 25 % und 50 % Lysat werden in Abbildung 92 präsentiert.

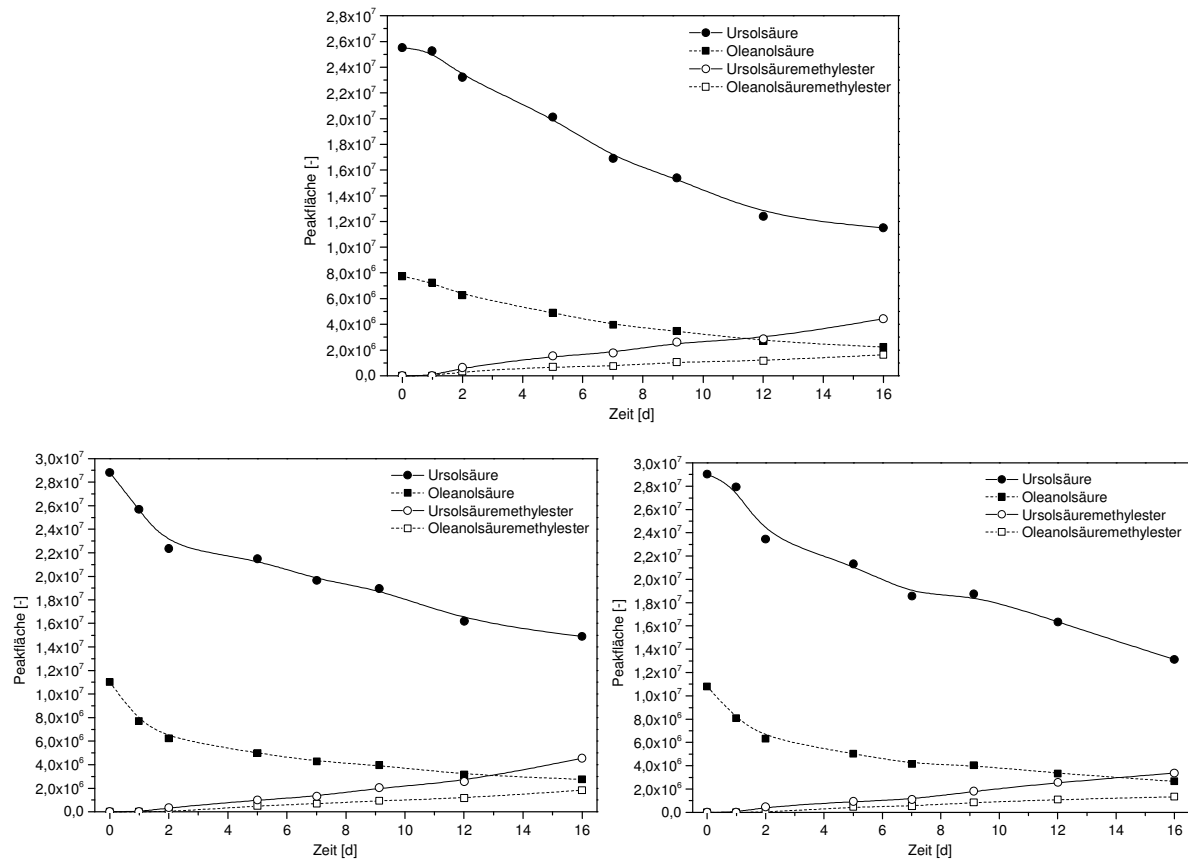


Abb. 92: Biotransformationsverläufe in reinem GYM-Medium (oben), 25 % Lysat (unten links) und 50 % Lysat (unten rechts). Die Triterpene Oleanol- und Ursolsäure wurden durch immobilisierte *N. iowensis*-Kulturen zu ihren korrespondierenden Methylestern transformiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels RP-HPLC (Kapitel 3.4.3) und die Darstellung anhand der Peakflächen bei einer Detektion bei 205 nm.

Zu Beginn der Biotransformation war die relative Konzentration an Substrat, gemessen an der Peakfläche und Detektion bei 205 nm, durch die in dem Lysat befindlichen Triterpene in den Lysat-Medien etwas größer als in der Kultur mit reinem GYM-Medium. Wie man an den Verläufen erkennen kann, wurde die Produktbildungsrate durch die Lysatzugabe nicht signifikant beeinflusst. Anders verhielt es sich bei der Biotransformation in 100 % Lysat (Abb. 93).

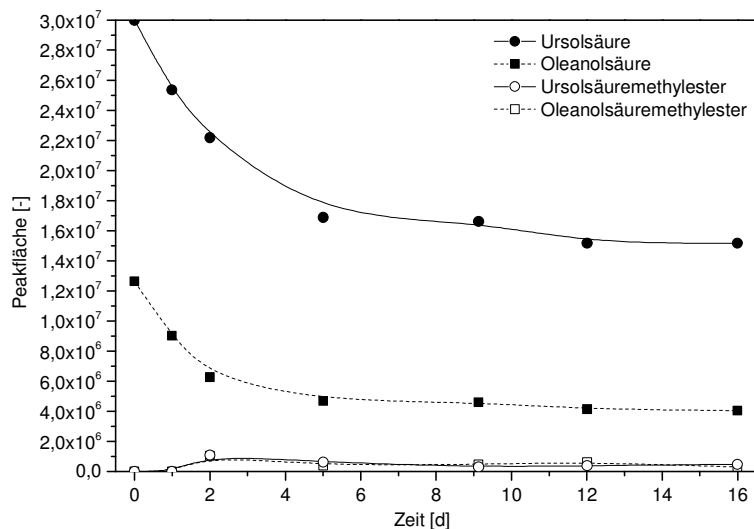


Abb. 93: Biotransformation von immobilisierten *N. iowensis* Zellen im reinen wässrigen Zellysate. Konzentrationsbestimmung mittels RP-HPLC (Kapitel 3.4.3). Detektion bei 205 nm

In den ersten 48 Stunden war eine Biotransformation im reinen Zellysate zu detektieren, die äquivalent zu der Positivkontrolle und den Biotransformationen in 25 % und 50 % Lysate war. Jedoch konnte nach 72 Stunden keine weitere Substrataufnahme und Produktbildung gemessen werden. Ob dies aus einer direkten Inhibierung der Zellen oder einer Inhibierung der involvierten Enzyme resultierte, konnte nicht bestimmt werden. Dass trotzdem in den ersten 72 Stunden eine Biotransformation detektiert werden konnte, resultierte vermutlich aus der Einbettung der Zellen und der damit verbundenen Stabilisierung der Zellen in der Alginatematrix. Bei der Denitrifikation von Schmutzwasser wurden durch Yan *et al.* höhere Toleranzen betreffend Sulfat, Chlor und Phosphorkonzentrationen im Medium beobachtet, wenn die Bakterien immobilisiert waren [214]. Auch ein Schutz vor im Medium befindliche Phenole konnte durch eine Immobilisierung in Alginate von Keweloh *et al.* beschrieben werden [215]. Eine Möglichkeit, die den Einfluss der Phenole betreffend einer eventuellen Hemmung der Zellen verdeutlichen und die Ursachenklärung unterstützen könnte, wäre ein Diffusionstest mittels des Zellextrakts. Bei *Escherichia coli* wurde die Permeabilität der Zellmembran durch Phenole erhöht [216], sobald die Bakterien einer spezifischen Phenolkonzentration ausgesetzt waren. Auch bei *N. iowensis* könnte diese Hemmung aufgetreten sein, weshalb ein Diffusionstest mit nativen *Nocardia iowensis* und *E. coli* als Positivkontrolle etabliert werden sollte. Falls daraufhin keine Hemmung aufträte, müsste eine weitere, umfangreichere Analytik etabliert werden, um die Ursache der Hemmung zu identifizieren.

Zusammenfassend konnte eine zur Biotransformation im reinen GYM-Medium äquivalente Biotransformation im 50 % Lysate-Medium erzielt werden. In reinen Extrakten führte eine unbekannte Inhibierung zu einer reduzierten Methylesterbildung. Diesbezüglich sind in der Tabelle 3.8.1 alle Kenndaten zu den Verläufen von Substrataufnahme und Produktbildung aller Versuche zusammengefasst.

Tab. 22: Darstellung der Kenndaten betreffend der Substrataufnahme und der Produktbildung von immobilisierten *N. iowensis* Zellen im Pflanzenzellextrakt. Die maximale Transformationsrate wurde in den ersten fünf Kultivierungstagen detektiert.

Versuch	Substratverlauf		Produktbildung	
	Max. OS-aufnahmerate [g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	Max. US-aufnahmerate [g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	OSME-bildungsrate [g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	USME-bildungsrate [g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]
Kontrolle	0,022	0,065	0,002	0,008
25 % Lysat	0,036	0,083	0,003	0,006
50 % Lysat	0,034	0,076	0,002	0,006
100 % Lysat	0,024	0,070	0,002	0,001
Ethanolextrakt	0,026	0,066	0,003	0,002

Die OSME- und USME-Konzentrationen wurden, wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben, aus den Konzentrationsabhängigen Peakflächen von Oleanol- und Ursolsäure ermittelt. Die maximalen Substrataufnahmeraten wurden aus den Konzentrationen in den ersten fünf Tagen bestimmt, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, kann kein signifikanter Unterschied bei den Versuchen in den reinen Medien (Positivkontrolle, 100 % Lysat und reines Ethanolextrakt) festgestellt werden. In den Mischmedien (25 % und 50 % Lysat) wurden höhere Aufnahmeraten ermittelt.

### 3.9 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel des Dissertationskapitels war die Bildung von Triterpenen durch eine *in situ* Kultivierung von Pflanzenzellen und deren Optimierung durch das Anwenden von verschiedenen Prozessstrategien und Reaktortypen. Sowohl *Salvia officinalis* sp. als auch *Ocimum basilicum* waren in der Lage, die pharmazeutisch-interessanten Triterpene Oleanol- und Ursolsäure zu bilden. Dabei wurde die höchste Biomassebildung und Produktkonzentration durch die Kultivierung der Pflanzenzellen im Wavebag-Reaktor im batch-Verfahren sowie durch die Kultivierung im Schüttelkolben als repeated-batch-Verfahrens erzielt. Bei der Kultivierung der nativen *Ocimum basilicum* Pflanzenzelllinie konnte im batch-Verfahren eine maximale Ursolsäurekonzentration von 0,55 mg pro Gramm Biomasse und eine maximale Oleanolsäurekonzentration von 0,63 mg pro Gramm Biomasse erreicht werden. Im Vergleich zur Literatur, in der bislang nur eine Triterpenbildung mittels *Ocimum basilicum* hairy-root-Kulturen dargestellt wurde [193], konnte nun der erste Nachweis über die Bildung von Oleanol- und Ursolsäure mittels Kalluskulturen dargestellt werden. Aufgrund der fehlenden Angaben in der Veröffentlichung von Marzouk war jedoch kein Vergleich betreffend der Produktbildungsrate möglich.

Durch das Verwenden des repeated-batch-Verfahrens wurden die finalen Produktkonzentrationen von *Salvia* sp. und *Ocimum basilicum* um ein Vielfaches gesteigert. So konnte eine maximale US-Konzentration von 6,52 mg pro Gramm Biomasse und eine maximale OS-Konzentration von 13,3 mg pro Gramm Biomasse bei der Kultivierung von *Salvia officinalis* var. extrakta Suc 1-4 erzielt werden. Es wurde davon ausgegangen, dass eine auftretende Substratlimitierung beim repeated-batch-Verfahren die Produktbildung verbesserte, sodass die finalen Triterpenkonzentrationen im Vergleich zum batch-Verfahren über den Faktor 16 gesteigert werden konnten. Spezifische Medienoptimierungen wurden parallel beim Projektpartner an der TU Dresden durchgeführt, die diese These unterstützten. Durch die Verwendung des Gamborg B5 (GB5)-Mediums wurde eine 7fache Erhöhung der finalen Produktkonzentrationen gegenüber der Kultivierung im Linsmaier Skoog-Medium erzielt [194]. Da das GB5-Medium im direkten Vergleich zum LS-Medium eine geringere Ammoniumkonzentration enthielt und zudem nitratfrei war, wurde die erzielte, maximale Triterpenbildung höchstwahrscheinlich im repeated-batch-Verfahren durch eine Stickstofflimitierung erreicht. Auch wenn in der Literatur bekannt war, dass spezifische Substratlimitierungen die Bildung pflanzlicher Sekundärmetabolite erhöhten [195], müsste eine spezifische Analytik am Lehrstuhl etabliert werden, um die These betreffend der Stickstofflimitierung und der Triterpenbildung zu belegen. Des Weiteren empfiehlt es sich, für eingehende Untersuchungen das repeated-batch-Verfahren, aufgrund der höheren Ausbeuten und der kürzeren Prozesszeiten, auf den Wavebag-Reaktor zu übertragen. Durch spezielle Cultibags wäre auch eine *on-line* Messung von pH und  $pO_2$  während der Kultivierung möglich. Eine weitere Variation der



Prozessstrategie bietet eine kontinuierliche Prozessführung im Wavebag-Reaktor. Zudem ermöglicht es eine angepasste Substratzugabe, um auch den Einfluss von induzierte Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphatlimitierungen auf die Produktbildung zu untersuchen.

Ein weiterer Prozessparameter, der bei der Optimierung der Sekundärmetabolitbildung von Interesse wäre, ist die Kultivierung der Pflanzenzelllinien mit Licht und Dunkelheit (Tag- und Nacht)-Zyklen. Durch die eingeleitete Photosynthese würde der Metabolismus mit Energie angeregt, welches die Bildung von Sekundärmetaboliten verbessern könnte [217]. Eine Optimierung der Zeitintervalle der Tag und Nachtzyklen sowie die Beleuchtungsstärke sind die zu untersuchenden Parameter, um eine Bildung von zellschädigenden ROS-Substanzen zu verhindern und gleichzeitig die Produktbildung zu verbessern.

Durch die Stammhaltung der aktiven Pflanzenzellkulturen auf Agarmedien konnte aufgrund der Behandlung der Zellen mit Pflanzenhormonen keine genetische Stabilität der Kulturen garantiert werden [142]. Dies führte trotz aliquoter Prozessparameter zu Varianzen bei den Produktbildungsraten [218]. Daher wurde ein Kryokonservierungsprotokoll für die native *Salvia* sp. Pflanzenzelllinie etabliert, welche die genetische Stabilität ermöglichte. Eine direkte Übertragung des Protokolls aus genetisch modifizierten *Salvia officinalis* var. *extrakta* und *Ocimum basilicum* Pflanzenzelllinien war nicht möglich, weshalb diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt werden mussten [149].

Ein weiteres Ziel des Dissertationskapitels war die Biotransformation der Triterpene in neue bioaktivere Derivate. Durch die Biotransformation mittels *N. iowensis* konnten die aus der Kultivierung der Kalluskulturen erhaltenen Triterpenen modifiziert werden. Während für Ursolsäure der Biotransformationsweg durch *Nocardia iowensis* von Leipold *et al.* bereits 2010 beschrieben wurde [121], konnte in der vorliegenden Dissertation die Biotransformation von Oleanolsäure zu neuen Substanzen beschrieben werden. Durch *N. iowensis* wurde Oleanolsäure in die Methylester Oleanolsäuremethylester und Oleanonsäuremethylester transformiert. Zudem konnte die Bildung eines weiteren, bisher unbekanntem Methylesters detektiert werden. Eine Identifikation mittels  $^1\text{H-NMR}$  und anhand Literaturdaten war nicht möglich, weshalb die Struktur des entstandenen Metabolits durch eine korrespondierende  $^{13}\text{C-NMR}$  Analytik identifiziert werden musste, was jedoch nicht im Projektzeitraum realisiert werden konnte.

Zur Bioaktivität der entstandenen Derivate war bisher nichts bekannt. Dennoch ermöglichte ein Vergleich mit der Literatur eine vielversprechende Prognose über die Wirksamkeit der Oleanolderivate. 2001 veröffentlichten Akihisa *et al.* eine Studie, bei der die Inhibierung der HIV(human immunodeficiency virus)-1 – Transkriptase mit einer geringeren Konzentration an Ursolsäuremethylester im Vergleich zu Ursolsäure erzielt wurde [117]. Oleanolsäure zeigte in dieser Studie eine noch stärkere Inhibierung als alle untersuchten Ursolderivate. Der direkte

Vergleich zwischen der Oleanolsäurederivate wurde nicht dargestellt, jedoch ist eine Aktivitätssteigerung der methylierten Oleanolsäure gegenüber der reinen Oleanolsäure höchstwahrscheinlich.

Ein weiteres Thema bei der Biotransformation von Triterpenen war die Immobilisierung der Biotransformationskultur. Durch die Einbettung von *N. iowensis* in Alginat und in Polyvinylalkohol wurde die Biotransformationskultur immobilisiert. Die in der darauffolgenden Biotransformation detektierten Substanzen entsprachen den bekannten und beschriebenen Triterpenderivaten. Jedoch wurde die Produktbildung durch das Einbetten der Zellen in Polyvinylalkohol und Alginat im Vergleich zu den freien Zellen reprimiert. Dies ist höchstwahrscheinlich auf der Nährstofflimitierung der Zellen durch den Stofftransport zurückzuführen. In der Literatur waren diesbezüglich zwei mögliche Ursachen beschrieben. In 2011 beschrieben Abdel-Naby *et al.*, dass die spezifische Enzyymbildung der extrazellulären Pullulanase nach Immobilisierung von *Bacillus licheniformis* NRC22 nur noch ein Drittel der freien Zellen entsprach, obwohl für die Studie die Matrixkonzentration und die Zelldichte für die Immobilisierung optimiert worden waren [173]. Im Falle der Immobilisierung von *Nocardia iowensis* wurden nur wenige Optimierungsschritte durchgeführt, was damit die reprimierte Produktbildung erklären könnte. Ein weiterer Aspekt, der den Stofftransport negativ beeinflussen konnte, war die Dichte der Matrix. Yen *et al.* veröffentlichten zur Produktion von Milchsäure durch eine immobilisierte *Rhizopus oryzae* Kultur, dass eine Korrelation zwischen Calciumchlorid und Dichte der Immobilisierungsmatrix bestand. Sie beobachteten, dass eine Calciumchloridkonzentration von unter 15 % beim Aushärten zu einer Matrix führte, die nur einen geringen Einfluss auf den Widerstand des Massetransfers besaß [174]. Auch bei der aktuellen Triterpenbiotransformation konnte dies beobachtet werden. Nachdem eine *N. iowensis* Kultur in Alginat und in einer 2 %igen (w/v) Calciumchloridlösung immobilisiert und anschließend in einer Biotransformation eingesetzt wurde, konnte ein Umwandlung des Substrates in die korrespondierenden Derivate von 35 % bestimmt werden. Aufgrund der mangelnden Stabilität der Immobilisate wurde die Calciumchloridkonzentration für weitere Immobilisierungen auf 20 % (w/v) erhöht, was in einer Biotransformationseffizienz von nur 12 % resultierte. Somit hatte die steigende Calciumchloridkonzentration einen zunehmenden, reprimierenden Einfluss auf die Produktbildung, obwohl auch bei einer niedrigen Calciumchloridkonzentration eine reduzierte Biotransformationseffizienz gegenüber freien Zellen festgestellt wurde. Alternative Matrices müssen daher identifiziert werden, die einerseits eine hohe Stabilität gewährleisten, und auch den Stofftransport zwischen Medium und Zellen verbessern. Mögliche komposite Immobilisierungsmatrices, die zum Beispiel aus Alginat und Polylysin bestehen, sind in der Literatur bekannt und könnten die strukturellen Schwächen und die Durchlässigkeit verbessern [219]. Alternativ zur Einbettung der Zellen in eine Matrix könnte eine Immobilisierung auch durch eine kovalente Bindung an eine Matrix erfolgen [220]. Das Problem des

Stofftransports würde damit umgangen, jedoch müsste die Stabilität der Bindung im Vorfeld überprüft werden. Nach der Identifizierung der in der Biotransformation involvierten Enzyme wäre auch eine Immobilisierung an Magnetpartikeln realisierbar, die eine einfachere und sterile Abtrennung der Enzyme vom Medium ermöglichen könnte, was hinsichtlich der Einsparung von Sterilisierungs- und Waschprozessen vorteilhaft wäre.

Die Zusammenführung der Produktion der Triterpene über eine Kultivierung der Pflanzenzellkulturen und einer anschließenden Biotransformation der Triterpene konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Das Verwenden von reinen Zellysaten reprimierte die Produktbildung. Eine Biotransformation in verdünnten Zellysat-Medien konnte bis zu einer Konzentration von 50 % Zellysat zu GYM-Medium realisiert werden, ohne dass eine signifikante Reprimierung durch Pflanzenzellbestandteile detektiert wurde. Aufgrund von umgangebenen Aufarbeitungsschritten förderte dies die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozesses. Jedoch war für eine kontinuierliche Prozessführung eine detaillierte Analytik des Pflanzenzellysats erforderlich. Weil Oleanol- und Ursolsäure schlecht wasserlöslich waren, wäre vor allem eine Optimierung des auf den Ethanolauflösung basierenden Zellextrakts notwendig. Hierfür müsste die nachgewiesene Inhibierung genauer untersucht werden. Ein Diffusionstest würde eine Aussage ermöglichen, ob die aufgeschlossenen Pflanzenzellbestandteile die Zellbiosynthese von *N. iowensis* oder nur die Biotransformation inhibieren. Des Weiteren wäre zunächst der Einsatz von freien Zellen der Biotransformationskultur zu überprüfen, um den reprimierenden Einfluss der Immobilisierungsmatrix zu umgehen.

## 4. Literaturverzeichnis

- [1] Marinelli, F. G. O., (2013), *Antimicrobials - New and Old Molecules in the Fight Against Multi-resistant Bacteria*. F. Springer Verlag.
- [2] Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, J. W., (2005), Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature reviews. Microbiology* 12 (937–947).
- [3] Freestone, P. P. E.; Sandrini, S. M.; Haigh, R. D.; Lyte, M., (2008), Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends in microbiology* 2 (55–64).
- [4] Fleming, A., (1929), On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal Of Experimental Pathology* 10 (226–236).
- [5] Thom, C., (1945), Mycology Presents Penicillin. *Mycologia* 4 (460).
- [6] Nielsen, J. H., (1997), *Physiological engineering aspects of Penicillium chrysogenum*. World Scientific, Singapore, River Edge, NJ.
- [7] Baggaley, K. H.; Brown, A. G.; Schofield, C. J., (1997), Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Natural Product Reports* 4 (309).
- [8] Reading, C.; Cole, M., (1977), Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 5 (852–857).
- [9] Demain, A. L., (1999), Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 4 (455–463).
- [10] Sachs, J., (1887), *Vorlesungen über Pflanzen-Physiologie*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- [11] Neidleman, S. L., (1989), *Advances in applied microbiology*. 34 Academic Press, San Diego.
- [12] Tatum, E. L., (1944), Biochemistry of Fungi. *Annual Review of Biochemistry* 1 (667–704).
- [13] Bu'lock, J. D., (1961), Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Advances in applied microbiology* (293–342).
- [14] Gaden, E. L., (1959), Fermentation process kinetics. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 4 (413–429).
- [15] Madigan, M. T., (2012), *Brock biology of microorganisms*. Benjamin Cummings, San Francisco.
- [16] Flärdh, K.; Buttner, M. J., (2009), *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 1 (36–49).
- [17] Chater, K. F.; Biró, S.; Lee, K. J.; Palmer, T.; Schrempf, H., (2010), The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews* 2 (171–198).

- [18] Dionigi, C. P.; Millie, D. F.; Spanier, A. M.; Johnsen, P. B., (1992), Spore and geosmin production by *Streptomyces tendae* on several media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1 (122–125).
- [19] Kubo, K.; Ishikura, T.; Fukagawa, Y., (1984), Studies on the biosynthesis of carbapenem antibiotics. II. Isolation and functions of a specific acylase involved in the depantothenylation of the OA-6129 compounds. *The Journal of antibiotics* 11 (1394–1402).
- [20] Holten, K. B.; Onusko, E. M., (2000), Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American family physician* 3 (611–620).
- [21] Dubee, V.; Triboulet, S.; Mainardi, J.-L.; Etheve-Quellejeu, M.; Gutmann, L.; Marie, A.; Dubost, L.; Hugonnet, J.-E.; Arthur, M., (2012), Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* L,D-Transpeptidase LdtMt1 by Carbapenems and Cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8 (4189–4195).
- [22] Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J. A.; Charlier, P., (2008), The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 2 (234–258).
- [23] Hawkey, P. M.; Livermore, D. M., (2012), Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ* may31 1 (e3236).
- [24] Kojima, I., (1990), Breeding of OA-6129 carbapenem-producing streptomycetes and biosynthesis of carbapenems. *Actinomycetologica* 2 (77–84).
- [25] Rodríguez, M.; Núñez, L. E.; Braña, A. F.; Méndez, C.; Salas, J. A.; Blanco, G., (2008), Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Molecular Microbiology* 3 (633–645).
- [26] Leanza, W. J.; Wildonger, K. J.; Miller, T. W.; Christensen, B. G., (1979), N-Acetimidoyl- and N-formimidoylthienamycin derivatives: antipseudomonal beta-lactam antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry* 12 (1435–1436).
- [27] Kahan, F. M.; Kropp, H.; Sundelof, J. G.; Birnbaum, J., (1983), Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy suppl D* (1–35).
- [28] Okabe, M.; Azuma, S.; Kojima, I.; Kouno, K.; Okamoto, R.; Fukagawa, Y.; Ishikura, T., (1982), Studies on the OA-6129 group of antibiotics, new carbapenem compounds. I. Taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of antibiotics* 10 (1255–1263).
- [29] Kahan, J. S.; Kahan, F. M.; Goegelman, R.; Currie, S. A.; Jackson, M.; Stapley, E. O.; Miller, T. W.; Miller, A. K.; Hendlin, D.; Mochales, S.; Hernandez, S.; Woodruff, H. B.; Birnbaum, J., (1979), Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic.

- I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of antibiotics* 1 (1–12).
- [30] Fukagawa, Y.; Okabe, M.; Azuma, S.; Kojima, I.; Ishikura, T.; Kubo, K., (1984), Studies on the biosynthesis of carbapenem antibiotics. I. Biosynthetic significance of the OA-6129 group of carbapenem compounds as the direct precursors for PS-5, epithienamycins A and C and MM 17880. *The Journal of antibiotics* 11 (1388–1393).
- [31] Núñez, L. E.; Méndez, C.; Braña, A. F.; Blanco, G.; Salas, J. A., (2003), The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chemistry & biology* 4 (301–311).
- [32] Williamson, J. M.; Inamine, E.; Wilson, K. E.; Douglas, A. W.; Liesch, J. M.; Albers-Schönberg, G., (1985), Biosynthesis of the beta-lactam antibiotic, thienamycin, by *Streptomyces cattleya*. *The Journal of biological chemistry* 8 (4637–4647).
- [33] Kubo, K.; Ishikura, T.; Fukagawa, Y., (1985), Studies on the biosynthesis of carbapenem antibiotics. IV. Beta-alanine in the C-3 pantetheinyl side chain of the OA-6129 group of carbapenems. *The Journal of antibiotics* 7 (904–911).
- [34] Kojima, I.; Fukagawa, Y.; Okabe, M.; Ishikura, T.; Shibamoto, N., (1988), Mutagenesis of OA-6129 carbapenem-producing blocked mutants and the biosynthesis of carbapenems. *The Journal of antibiotics* 7 (899–907).
- [35] Kubo, K.; Ishikura, T.; Fukagawa, Y., (1985), Studies on the biosynthesis of carbapenem antibiotics. III. Enzymological characterization of the L-amino acid acylase activity of A933 acylase. *The Journal of antibiotics* 5 (622–630).
- [36] Coulthurst, S. J.; Barnard, A. M. L.; Salmond, G. P. C., (2005), Regulation and biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 4 (295–306).
- [37] McGowan, S. J.; Sebahia, M.; Porter, L. E.; Stewart, G. S.; Williams, P.; Bycroft, B. W.; Salmond, G. P., (1996), Analysis of bacterial carbapenem antibiotic production genes reveals a novel beta-lactam biosynthesis pathway. *Molecular microbiology* 3 (415–426).
- [38] McGowan, S. J.; Holden, M. T.; Bycroft, B. W.; Salmond, G. P., (1999), Molecular genetics of carbapenem antibiotic biosynthesis. *Antonie van Leeuwenhoek* 1-2 (135–141).
- [39] Clifton, I. J.; Doan, L. X.; Sleeman, M. C.; Topf, M.; Suzuki, H.; Wilmouth, R. C.; Schofield, C. J., (2003), Crystal structure of carbapenem synthase (CarC). *The Journal of biological chemistry* 23 (20843–20850).
- [40] Sleeman, M. C.; Schofield, C. J., (2004), Carboxymethylproline synthase (CarB), an unusual carbon-carbon bond-forming enzyme of the crotonase superfamily in-

- volved in carbapenem biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 8 (6730–6736).
- [41] Sleeman, M. C.; Smith, P.; Kellam, B.; Chhabra, S. R.; Bycroft, B. W.; Schofield, C. J., (2004), Biosynthesis of carbapenem antibiotics: new carbapenam substrates for carbapenem synthase (CarC). *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 6 (879–882).
- [42] Yoshioka, T.; Kojima, I.; Isshiki, K.; Watanabe, A.; Shimauchi, Y.; Okabe, M.; Fukagawa, Y.; Ishikura, T., (1982), Structures of OA-6129A, B1, B2 and C, new carbapenem antibiotics. *Tetrahedron Letters* 49 (5177–5180).
- [43] Yoshioka, T.; Kojima, I.; Isshiki, K.; Watanabe, A.; Shimauchi, Y.; Okabe, M.; Fukagawa, Y.; Ishikura, T., (1983), Structures of OA-6129A, B1, B2 and C, new carbapenem antibiotics produced by *Streptomyces* sp. OA-6129. *The Journal of antibiotics* 11 (1473–1482).
- [44] Yoshioka, T.; Kojima, I.; Okabe, M.; Shimauchi, Y.; Fukagawa, Y.; Ishikura, T.; Watanabe, A., (1983), Derivatives of antibiotics OA-6129A, OA-6129B1 and OA-6129B2 and their preparation method. EP 0 085 407.
- [45] Okabe, M.; Yoshioka, T.; Fukagawa, Y.; Okamoto, R.; Kouno, K.; Ishikura, T., (1981), Novel beta-lactam compounds, process for production thereof, and use thereof as medicines. EP 0 048 999 A1.
- [46] Okabe, M.; Yoshioka, T.; Fukagawa, Y.; Okamoto, R.; Kouno, K.; Ishikura, T., (1982), Novel antibiotics and process for production thereof. EP 0 068 485 A2.
- [47] Yoshioka, T.; Watanabe, A.; Kojima, I.; Shimauchi, Y.; Okabe, M.; Fukagawa, Y.; Ishikura, T., (1984), Structures of OA-6129D and E, new carbapenam antibiotics. *The Journal of antibiotics* 3 (211–217).
- [48] Kubo, K.; Yoshioka, T.; Okabe, M.; Fukagawa, Y.; Ishikura, T., (1982), Novel phosphoric ester of antibiotic OA-6129 and its preparation method. EP 0 076 466 A2.
- [49] Sakamoto, M.; Kojima, I.; Okabe, M.; Fukagawa, Y.; Ishikura, T., (1982), Studies on the OA-6129 group of antibiotics, new carbapenem compounds. II. In vitro evaluation. *The Journal of antibiotics* 10 (1264–1270).
- [50] Kubo, K.; Ishikura, T.; Fukagawa, Y., (1985), Microbial phosphorylation of the OA-6129 group of carbapenem compounds. *The Journal of antibiotics* 3 (333–339).
- [51] Decristoforo, G., (1984), High-performance liquid chromatography of carbapenem antibiotics in complex biological samples with column switching and simultaneous multichannel ultraviolet monitoring. *Analytica Chimica Acta* (25–33).

- [52] Aubin, J.; Xuereb, C., (2006), Design of multiple impeller stirred tanks for the mixing of highly viscous fluids using CFD. *Chemical Engineering Science* 9 (2913–2920).
- [53] Emig, G.; Klemm, E., (2005), *Technische Chemie*. Springer, Berlin [u.a.].
- [54] Gerd Hradetzky, (), *Kinetik*. Hochschule Merseburg,
- [55] Deutsches Institut für Normung e.V., (11.2008), DIN 32645 (38).
- [56] Aus der Forschung und Entwicklung der Biochemie Gesellschaft m. b. H., (03/84), Carbapenem OA-6129 - Versuche zur fermentativen Gewinnung im Schüttelkolben (1–13).
- [57] Shomura, T.; Yoshida, J.; Amano, S.; Kojima, M.; Inouye, S.; Niida, T., (1979), Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *The Journal of antibiotics* 5 (427–435).
- [58] Henriksen, C. M.; Nielsen. J.; Villadsen. J., (1997), Influence of the Dissolved Oxygen Concentration on the Penicillin Biosynthetic Pathway in Steady-State Cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Progress* 13 (776–782).
- [59] Schlegel, H. G., (1977), Aeration without air: oxygen supply by hydrogen peroxide. *Biotechnology and Bioengineering* 3 (413–424).
- [60] Wang, H.; Chen, S.; Zhang, J.; Rothenbacher, F. P.; Jiang, T.; Kan, B.; Zhong, Z.; Zhu, J.; van Schaik, W., (2012), Catalases Promote Resistance of Oxidative Stress in *Vibrio cholerae*. *PLoS ONE* 12 (e53383).
- [61] Howell, M. L.; Alsabbagh, E.; Ma, J.-F.; Ochsner, U. A.; Klotz, M. G.; Beveridge, T. J.; Blumenthal, K. M.; Niederhoffer, E. C.; Morris, R. E.; Needham, D.; Dean, G. E.; Wani, M. A.; Hassett, D. J., (2000), AnkB, a Periplasmic Ankyrin-Like Protein in %W, Is Required for Optimal Catalase B (KatB) Activity and Resistance to Hydrogen Peroxide. *Journal of Bacteriology* 16 (4545–4556).
- [62] Kim, J.-h.; Shim, M.-s.; Son, S.-y., (1999), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance is linked to the degree of fatty acid unsaturation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biotechnology Letters* 9 (759–762).
- [63] Fukutsu, N.; Kawasaki, T.; Saito, K.; Nakazawa, H., (2006), An approach for decontamination of beta-lactam antibiotic residues or contaminants in the pharmaceutical manufacturing environment. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 9 (1340–1343).
- [64] Chmiel, H., (2011), *Bioprozesstechnik*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [65] Storhas, W.; Behrendt, U.; Rubbeling, H.; Wiedemann, P., (2013), *Bioverfahrensentwicklung*. 2. Auflage, Wiley-VCH.



- [66] Lazim, H.; Salah, A. M.; Slama, N.; Barkallah, I.; Hassen, A. B.; Limam, F., (2007), Biochemical detection of a metallo- $\beta$ -lactamase in carbapenem resistant strain of *Streptomyces* sp. CN229 isolated from soil. *Annals of Microbiology* 4 (515–519).
- [67] Shapiro, S., (1989), Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- [68] Yin, P.; Wang, Y.-H.; Zhang, S.-L.; Chu, J.; Zhuang, Y.-P.; Chen, N.; Li, X.-F.; Wu, Y.-B., (2008), Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 6 (609–615).
- [69] Choi, D.; Park, E.; Okabe, M., (2000), Dependence of Apparent Viscosity on Mycelial Morphology of *Streptomyces fradiae* Culture in Various Nitrogen Sources. *Biotechnology Progress* 4 (525–532).
- [70] O'Cleirigh, C.; Walsh, P. K.; O'Shea, D. G., (2003), Morphological quantification of pellets in *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* fermentation broths using a flatbed scanner. *Biotechnology letters* 19 (1677–1683).
- [71] Kelly, S.; Grimm, L.; Bendig, C.; Hempel, D.; Krull, R., (2006), Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology. *Process Biochemistry* 10 (2113–2117).
- [72] Johansen, C.; Coolen, L.; Hunik, J., (1998), Influence of Morphology on Product Formation in *Aspergillus awamori* during Submerged Fermentations. *Biotechnology Progress* 2 (233–240).
- [73] King, R., (1997), A structured mathematical model for a class of organisms: I. Development of a model for *Streptomyces tendae* and application of model-based control. *Journal of Biotechnology* 3 (219–234).
- [74] Treskatis, S. K.; Orgeldinger, V.; Wolf, H.; Gilles, E. D., (1997), Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnology and Bioengineering* 2 (191–201).
- [75] Xia, X.; Lin, S.; Xia, X.-X.; Cong, F.-S.; Zhong, J.-J., (2014), Significance of agitation-induced shear stress on mycelium morphology and lavendamycin production by engineered *Streptomyces flocculus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 10 (4399–4407).
- [76] Jüsten, P.; Paul, G. C.; Nienow, A. W.; Thomas, C. R., (1996), Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering* 6 (672–684).

- [77] Nielsen, J.; Johansen, C. L.; Jacobsen, M.; Krabben, P.; Villadsen, J., (1995), Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnology Progress* 1 (93–98).
- [78] O'Cleirigh, C.; Walsh, P. K.; O'Shea, D. G., (2003), Morphological quantification of pellets in *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* fermentation broths using a flatbed scanner. *Biotechnology letters* 19 (1677–1683).
- [79] Kwade, A.; Núñez-Ramírez, D. M.; Valencia-López, J. J.; Calderas, F.; Solís-Soto, A.; López-Miranda, J.; Medrano-Roldán, H.; Medina-Torres, L., (2012), Mixing Analysis for a Fermentation Broth of the Fungus *Beauveria bassiana* under Different Hydrodynamic Conditions in a Bioreactor. *Chemical Engineering & Technology* 11 (1954–1961).
- [80] Rau, U.; Gura, E.; Olszewski, E.; Wagner, F., (1992), Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *Journal of Industrial Microbiology* 1 (19–25).
- [81] Smith, G. B.; Schoenewaldt, E. F., (1981), Stability of N-formimidoylthienamycin in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 3 (272–276).
- [82] Musson, D. G.; Hajdu, R.; Bayne, W. F.; Rogers, J. D., (1991), Quantification of Imipenem's primary metabolite in plasma by postcolumn chemical rearrangement and UV detection. *Pharmaceutical research* 1 (33–39).
- [83] Albers-Schoenberg, G.; Arison, B. H.; Hensens, O. D.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Kaczka, E. A.; Rhodes, R. E.; Kahan, J. S.; Kahan, F. M., (1978), Structure and absolute configuration of thienamycin. *Journal of the American Chemical Society* 100 // 20 (6491–6499).
- [84] Smith, G. B.; Dezeny, G. C.; Douglas, A. W., (1990), Stability and kinetics of degradation of Imipenem in aqueous solution. *Journal of pharmaceutical sciences* 8 (732–740).
- [85] Bundgaard, H.; Larsen, C., (1977), Polymerization of penicillins. *Journal of Chromatography A* 1 (51–59).
- [86] Deshpande, A. D.; Baheti, K. G.; Chatterjee N. R., (2004), Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Current science* 12 (1684–1685).
- [87] Méndez, R.; Alemany, T.; Martín-Villacorta, J., (1992), Catalysis of hydrolysis and aminolysis of non-classical beta-lactam antibiotics by metal ions and metal chelates. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 12 (3228–3233).
- [88] Finholt, P.; Jürgensen, G.; Kristiansen, H., (1965), Catalytic effect of buffers on degradation of penicillin G in aqueous solution. *Journal of pharmaceutical sciences* (387–393).

- [89] Aronoff, S. C.; Shlaes, D. M., (1987), Factors that Influence the Evolution of  $\beta$ -Lactam Resistance in  $\beta$ -Lactamase-Inducible Strains of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infectious Diseases* 5 (936–941).
- [90] Hashizume, T.; Ishino, F.; Nakagawa, J.; Tamaki, S.; Matsushashi, M., (1984), Studies on the mechanism of action of Imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *The Journal of antibiotics* 4 (394–400).
- [91] Roth, M.; Noack, D.; Reinhardt, G., (1982), Properties of Non-differentiating Derivatives of *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiology* 11 (2687–2691).
- [92] Chakraburty, R.; Bibb, M., (1997), The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *Journal of bacteriology* 18 (5854–5861).
- [93] Bibb, M. J., (2005), Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Current opinion in microbiology* 2 (208–215).
- [94] Nakata, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T., (1989), Cloning and characterization of the carbapenem biosynthetic genes from *Streptomyces fulvoviridis*. *FEMS microbiology letters* 1 (51–55).
- [95] Pasteur, A., (2014), Einsatz magnetisierbarer Partikelsysteme in der Bioverfahrenstechnik. Technische Universität Kaiserslautern; Dissertation.
- [96] Collins, R. A., (2011), A ten-year audit of traditional Chinese medicine and other natural product research published in the Chinese Medical Journal (2000-2009). *Chinese medical journal* 9 (1401–1408).
- [97] Bart, H.-J.; Hagels, H. J.; Kassing, M.; Jenelten, U.; Johannisbauer, W.; Jordan, V.; Pfeiffer, D.; Pfennig, A.; Tegtmeier, M.; Schäffler, M.; Strube, J., (2012), Phytoextrakte - Produkte und Prozesse. Frankfurt am Main.
- [98] Bart, H.-J.; Pilz, S., (2011), Industrial scale natural products extraction. Wiley-VCH, Weinheim.
- [99] Park, H.; Park, A. K., (2008), Discussions on various theories relevant to ginseng food. Leuven.
- [100] Xu, T.-m.; Xin, Y.; Cui, M.-h.; Jiang, X.; Gu, L.-P., (2007), Inhibitory effect of ginsenoside Rg3 combined with cyclophosphamide on growth and angiogenesis of ovarian cancer. *Chinese medical journal* 7 (584–588).
- [101] Lee, D. C. W.; Yang, C. L. H.; Chik, S. C. C.; Li, J. C. B.; Rong, J.-H.; Chan, G. C. F.; Lau, A. S. Y., (2009), Bioactivity-guided identification and cell signaling technology to delineate the immunomodulatory effects of *Panax ginseng* on human promonocytic U937 cells. *Journal of translational medicine* (34).

- [102] Chen, Y.-H.; Wang, D.-X.; Liu, P.; Wang, J.-I.; Dai, C.; Cheng, G.-F., (2005), Anti-depression effect of Kai Xin San and research of its compatibility. *Chinese medical journal* 14 (1214–1216).
- [103] Hsu, B. Y.; Lu, T. J.; Chen, C. H.; Wang, S. J.; Hwang, L. S., (2013), Biotransformation of ginsenoside Rd in the ginseng extraction residue by fermentation with lingzhi (*Ganoderma lucidum*). *Food chemistry* 4 (4186–4193).
- [104] Lim, S.-I.; Cho, C.-W.; Choi, U.-K.; Kim, Y.-C., (2010), Antioxidant Activity and Ginsenoside Pattern of Fermented White Ginseng. *Journal of Ginseng Research* 3 (168–174).
- [105] Ryan, E.; Aherne, S. A.; O'Grady, M. N.; McGovern, L.; Kerry, J. P.; O'Brien, N. M., (2009), Bioactivity of Herb-Enriched Beef Patties. *Journal of Medicinal Food* 4 (893–901).
- [106] Topçu, G., (2006), Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *Journal of Natural Products* 3 (482–487).
- [107] Ramachandran, S.; Prasad, N. R., (2008), Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. *Chemico-biological interactions* 2-3 (99–107).
- [108] Hsu, Y.-L.; Kuo, P.-L.; Lin, C.-C., (2004), Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Life sciences* 19 (2303–2316).
- [109] Fontanay, S.; Grare, M.; Mayer, J.; Finance, C.; Duval, R. E., (2008), Ursolic, oleanolic and betulonic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *Journal of Ethnopharmacology* 2 (272–276).
- [110] Lee, J. S.; Miyashiro, H.; Nakamura, N.; Hattori, M., (2008), Two new triterpenes from the Rhizome of *Dryopteris crassirhizoma*, and inhibitory activities of its constituents on human immunodeficiency virus-1 protease. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 5 (711–714).
- [111] Cipak, L.; Grausova, L.; Miadokova, E.; Novotny, L.; Rauko, P., (2006), Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects. *Archives of Toxicology* 7 (429–435).
- [112] Liang, C.; Ding, Y.; Nguyen, H. T.; Kim, J.-A.; Boo, H.-J.; Kang, H.-K.; Nguyen, M. C.; Kim, Y. H., (2010), Oleanane-type triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their anticancer activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23 (7110–7115).
- [113] Bag, P.; Chattopadhyay, D.; Mukherjee, H.; Ojha, D.; Mandal, N.; Sarkar, M.; Chatterjee, T.; Das, G.; Chakraborti, S., (2012), Anti-herpes virus activities of bi-

- oactive fraction and isolated pure constituent of *Mallotus peltatus*: an ethnomedicine from Andaman Islands. *Virology Journal* 1 (98).
- [114] Chen, J.; Liu, J.; Zhang, L.; Wu, G.; Hua, W.; Wu, X.; Sun, H., (2006), Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11 (2915–2919).
- [115] Parra, A.; Rivas, F.; Garcia-Granados, A.; Martinez, A., (2009), Microbial transformation of triterpenoids. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 4 (307–320).
- [116] Sánchez, M.; Theoduloz, C.; Schmeda-Hirschmann, G.; Razmilic, I.; Yáñez, T.; Rodríguez, J. A., (2006), Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: In vitro–in vivo relationships. *Life Sciences* 14 (1349–1356).
- [117] Akihisa, T.; Ogiwara, J.; Kato, J.; Yasukawa, K.; Ukiya, M.; Yamanouchi, S.; Oishi, K., (2001), Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *Lipids* 5 (507–512).
- [118] Poehland, B. L.; Carté, B. K.; Francis, T. A.; Hyland, L. J.; Allaudeen, H. S.; Troupe, N., (1987), *In vitro* antiviral activity of dammar resin triterpenoids. *Journal of Natural Products* 4 (706–713).
- [119] Ramawat, K. G.; Merillon, J. M., (2008), *Bioactive molecules and medicinal plants*. Springer, Berlin.
- [120] Jäger, S.; Winkler, K.; Pfüller, U.; Scheffler, A., (2007), Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. *Planta medica* 2 (157–162).
- [121] Leipold, D.; Wünsch, G.; Schmidt, M.; Bart, H.-J.; Bley, T.; Neuhaus, E.; Bergmann, H.; Richling, E.; Muffler, K.; Ulber, R., (2010), Biosynthesis of ursolic acid derivatives by microbial metabolism of ursolic acid with *Nocardia* sp. strains—Proposal of new biosynthetic pathways. *Process Biochemistry* 7 (1043–1051).
- [122] Zhang, J.; Cheng, Z.-H.; Yu, B.-Y.; Cordell, G. A.; Qiu, S. X., (2005), Novel biotransformation of pentacyclic triterpenoid acids by *Nocardia* sp. NRRL 5646. *Tetrahedron Letters* 13 (2337–2340).
- [123] Ortwin Guhling, (2006), *Biosynthese kutikulärer Triterpenoide: Klonierung und Charakterisierung von Epoxysqualenzyklasen aus Ricinus communis und Lycopersicon esculentum*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Dissertation.
- [124] Breitmaier, E., (2006), *Terpenes*. Wiley-VCH, Weinheim.
- [125] Abe, I., (2007), Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Natural product reports* 6 (1311–1331).
- [126] Augustin, J. M.; Kuzina, V.; Andersen, S. B.; Bak, S., (2011), Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 6 (435–457).

- [127] Fukushima, E. O.; Seki, H.; Ohyama, K.; Ono, E.; Umemoto, N.; Mizutani, M.; Saito, K.; Muranaka, T., (2011), CYP716A Subfamily Members are Multifunctional Oxidases in Triterpenoid Biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* 12 (2050–2061).
- [128] Carelli, M.; Biazzi, E.; Panara, F.; Tava, A.; Scaramelli, L.; Porceddu, A.; Graham, N.; Odoardi, M.; Piano, E.; Arcioni, S.; May, S.; Scotti, C.; Calderini, O., (2011), *Medicago truncatula* CYP716A12 is a multifunctional oxidase involved in the biosynthesis of hemolytic saponins. *The Plant cell* 8 (3070–3081).
- [129] Kreuzwieser, J.; Scheerer, U.; Kruse, J.; Burzlaff, T.; Honsel, A.; Alfarraj, S.; Georgiev, P.; Schnitzler, J.-P.; Ghirardo, A.; Kreuzer, I.; Hedrich, R.; Rennenberg, H., (2014), The Venus flytrap attracts insects by the release of volatile organic compounds. *Journal of experimental botany*.
- [130] Degenhardt, J.; Gershenzon, J.; Baldwin, I. T.; Kessler, A., (2003), Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Current Opinion in Biotechnology* 2 (169–176).
- [131] Bedoya-Pérez, M. A.; Isler, I.; Banks, P. B.; McArthur, C., (2013), Roles of the volatile terpene, 1,8-cineole, in plant-herbivore interactions: a foraging odor cue as well as a toxin? *Oecologia*.
- [132] Liu, X.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Feng, Z.; Li, Q.; Yang, H.-Q.; Luan, S.; Li, J.; He, Z.-H., (2013), Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 38 (15485–15490).
- [133] Hankin, L.; Kolattukudy, P. E., (1969), Degradation of Ursolic Acid, a Major Component of Apple Wax, by a Pseudomonad Isolated from Soil. *Journal of General Microbiology* 2 (151–156).
- [134] Barthlott, W.; Neinhuis, C., (1997), Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 1 (1–8).
- [135] Carver, T. L.; Gurr, S. J., (2007), *Filamentous Fungi on Plant Surfaces* (368–397).
- [136] Heß, D., (1992), *Biotechnologie der Pflanzen*. Ulmer, Stuttgart.
- [137] van Doorn, W. G.; Beers, E. P.; Dangel, J. L.; Franklin-Tong, V. E.; Gallois, P.; Hara-Nishimura, I.; Jones, A. M.; Kawai-Yamada, M.; Lam, E.; Mundy, J.; Mur, L. A. J.; Petersen, M.; Smertenko, A.; Taliansky, M.; van Breusegem, F.; Wolpert, T.; Woltering, E.; Zhivotovsky, B.; Bozhkov, P. V., (2011), Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* 8 (1241–1246).

- [138] Bhojwani, S. S.; Razdan, M. K., (1996), Plant tissue culture. Elsevier, Amsterdam, New York.
- [139] Tiessen, A.; Padilla-Chacon, D., (2013), Subcellular compartmentation of sugar signaling: links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning. *Frontiers in Plant Science*.
- [140] Haas, C.; Hengelhaupt, K.-C.; Kümritz, S.; Ludwig, B.; Muffler, K.; Ulber, R.; Möhlmann, T.; Neuhaus, E.; Bley, T.; Pavlov, A.; Steingroewer, J., (), *Salvia* suspension cultures as production system for oleanolic and ursolic acid. *Biochemistry process*.
- [141] Sturm, A., (1999), Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant physiology* 1 (1–8).
- [142] Chattopadhyay, S.; Srivastav, A. K.; Bisaria, V. S., (2002), Optimization of Culture Parameters for Production of Podophyllotoxin in Suspension Culture of *Podophyllum hexandrum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1-6 (381–394).
- [143] Tawfik, A. A.; Mohamed, M. F., (2007), Regeneration of *salvia* (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 1 (21–27).
- [144] Hammerschlag, F. A.; Saxena, P., (2003), Biotechnology in horticultural crop improvement: achievements, opportunities and limitations. *A proceedings of the XXVI International Horticultural Congress, Toronto, Canada, 11 - 17 August, 2002 ; Symposium on 'Biotechnology of Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitations'*. Leuven.
- [145] Quatrano, R. S., (1968), Freeze-Preservation of Cultured Flax Cells Utilizing Dimethyl Sulfoxide. *Plant physiology* 12 (2057–2061).
- [146] Day, J. G.; Stacey, G., (2006), Cryopreservation and freeze-drying protocols. 368 2, Arkholme Humana; Quantum, distributor, Totowa, N.J.
- [147] Engelmann, F.; Takagi, H., (2000), Cryopreservation of tropical plant germplasm. 8 Japan International Research Center for Agricultural Sciences; International Plant Genetic Resources Institute, Tsukuba, Japan, Rome.
- [148] Reed, B., (2008), Plant cryopreservation. Springer, New York.
- [149] Schmale, K., (2007), Einsatz von Pflanzenzellkulturen als industriell nutzbare Expressionssysteme für therapeutische Proteine. Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen. Dissertation.
- [150] Gzella, A.; Linkowska, E.; Zaprutko, L.; Wrzeciono, U., (1999), Triterpenoide. XIV. [2,3- d ] Isoxazoltriterpenderivate. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications* 6 (1031–1034).

- [151] Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M.-C.; Haas, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H. E.; Mirata, M. A.; Schrader, J.; Ulber, R., (2011), Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* 1 (1–15).
- [152] Al-Aboudi, A.; Mohammad, M. Y.; Haddad, S.; Al-Far, R.; Choudhary, M. I.; Attar-Rahman, (2009), Biotransformation of methyl cholate by *Aspergillus niger*. *Steroids* 4-5 (483–486).
- [153] Chatterjee, P.; Kouzi, S. A.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T., (2000), Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Applied and environmental microbiology* 9 (3850–3855).
- [154] Li, G. H.; Shen, Y. M.; Liu, Y.; Zhang, K. Q., (2006), Production of saponin in fermentation process of Sanchi (*Panax notoginseng*) and biotransformation of saponin by *Bacillus subtilis*. *Annals of Microbiology* 2 (151–153).
- [155] Mandal, K.; Singh, B.; Jariyal, M.; Gupta, V., (2013), Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (87–92).
- [156] Moreno Rueda, M. G.; Guerrini, A.; Giovannini, P. P.; Medici, A.; Grandini, A.; Sacchetti, G.; Pedrini, P., (2013), Biotransformations of Terpenes by Fungi from Amazonian Citrus Plants. *Chemistry & Biodiversity* 10 (1909–1919).
- [157] Fraga, B. M.; Bressa, C.; González-Vallejo, V.; González, P.; Guillermo, R., (2012), Biotransformation of ent-kaur-16-ene and ent-trachylobane 7 $\beta$ -acetoxo derivatives by the fungus *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium fujikuroi*). *Phytochemistry* (60–70).
- [158] Cantwell, S. G.; Lau, E. P.; Watt, D. S.; Fall, R. R., (1978), Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *Journal of bacteriology* 2 (324–333).
- [159] Chatterjee, T.; Bhattacharyya, D. K., (2001), Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Applied microbiology and biotechnology* 5 (541–546).
- [160] Gondal, H. Y.; Choudhary, M. I.; Khan, A. A., (2011), Microbial Transformations of (+)-Isomenthol by *Fusarium lini* and *Rhizopus stolonifer*. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 7 (874–875).
- [161] Díez, D.; Sanchez, J. M.; Rodilla, J. M.; Rocha, P. M.; Mendes, R. S.; Paulino, C.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Urones, J. G., (2005), Microbial hydroxylation of sclareol by *Rhizopus stolonifer*. *Molecules* (Basel, Switzerland) 8 (1005–1009).
- [162] Guo, F.-F.; Feng, X.; Chu, Z.-Y.; Li, D.-P.; Zhang, L.; Zhang, Z.-S., (2013), Microbial transformation of asiatic acid. *Journal of Asian Natural Products Research* 1 (15–21).



- [163] Martin, J. H. E. J.; Tresner, H. D.; Porter, J. N., (1975), Antibiotic BM123 and production thereof. 4007167.
- [164] Ingle, D. L., (1978), Antibacterial agent BM123-gamma, pharmaceutically acceptable salts, complexes and alkylated derivatives as animal food additives. US4237120 A.
- [165] Chen, Y.; Rosazza, J. P., (1994), Microbial transformation of Ibuprofen by a *Nocardia* species. Applied and environmental microbiology 4 (1292–1296).
- [166] Li, T.; Rosazza, J. P., (1997), Purification, characterization, and properties of an aryl aldehyde oxidoreductase from *Nocardia* sp. strain NRRL 5646. Journal of bacteriology 11 (3482–3487).
- [167] Li, T.; Rosazza, J. P., (2000), Biocatalytic synthesis of vanillin. Applied and environmental microbiology 2 (684–687).
- [168] Maatooq, G. T.; Rosazza, J. P. N., (2005), Metabolism of daidzein by *Nocardia* species NRRL 5646 and *Mortierella isabellina* ATCC 38063. Phytochemistry 9 (1007–1011).
- [169] Herath, W.; Mikell, J. R.; Hale, A. L.; Ferreira, D.; Khan, I. A., (2006), Microbial metabolism. Part 6. Metabolites of 3- and 7-hydroxyflavones. Chemical & pharmaceutical bulletin 3 (320–324).
- [170] Lamm, A. S.; Khare, A.; Conville, P.; Lau, P. C. K.; Bergeron, H.; Rosazza, J. P. N., (2009), *Nocardia iowensis* sp. nov., an organism rich in biocatalytically important enzymes and nitric oxide synthase. International journal of systemaiv and evolutionary microbiology 10 (2408–2414).
- [171] Klein, J.; Ziehr, H., (1990), Immobilization of microbial cells by adsorption. Journal of biotechnology 1-2 (1–15).
- [172] Buchholz, K.; Kasche, V., (1997), Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. VCH, Weinheim, New York.
- [173] Abdel-Naby, M. A.; Osman, M. Y.; Abdel-Fattah, A. F., (2011), Production of pululanase by free and immobilized cells of *Bacillus licheniformis* NRC22 in batch and continuous cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology 12 (2903–2911).
- [174] Yen, H.-W.; Lee, Y.-C., (2010), Production of lactic acid from raw sweet potato powders by *Rhizopus oryzae* immobilized in sodium alginate capsules. Applied Biochemistry and Biotechnology 2 (607–615).
- [175] Dobreva, E.; Ivanova, V.; Tonkova, A.; Radulova, E., (1996), Influence of the immobilization conditions on the efficiency of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis*. Process Biochemistry 3 (229–234).

- [176] Singh, O. V., (2008), Modulated gluconic acid production from immobilized cells of *Aspergillus niger* ORS-4.410 utilizing grape must. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 6 (780–787).
- [177] Moreno-Garrido, I.; Campana, O.; Lubián, L. M.; Blasco, J., (2005), Calcium alginate immobilized marine microalgae: experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Marine pollution bulletin* 8-12 (823–829).
- [178] Iizuka, Y.; Kato, R.; Shibasaki-Kitakawa, N.; Yonemoto, T., (2005), Combination of extractive solvent addition and immobilization culture for continuous production of scopoletin by *tobacco* cells. *Biotechnology Progress* 2 (603–607).
- [179] Park, S. Y.; Lee, G. M., (1995), Enhancement of monoclonal antibody production by immobilized hybridoma cell culture with hyperosmolar medium. *Biotechnology and Bioengineering* 6 (699–705).
- [180] Salter, G. J.; Kell, D. B., (1991), New materials and technology for cell immobilization. *Current opinion in biotechnology* 3 (385–389).
- [181] Jianlong, W.; Wenhua, H.; Yi, Q., (1995), Immobilization of microbial cells using polyvinyl alcohol (PVA) - polyacrylamide gels. *Biotechnology Techniques* 3 (203–208).
- [182] Lv, X.; Jiang, G.; Xue, X.; Wu, D.; Sheng, T.; Sun, C.; Xu, X., (2013), Fe<sub>0</sub>-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites embedded polyvinyl alcohol/sodium alginate beads for chromium (VI) removal. *Journal of Hazardous Materials* (748–758).
- [183] Zhang, L.-s.; Wu, W.-z.; Wang, J.-l., (2007), Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of environmental sciences (China)* 11 (1293–1297).
- [184] Idris, A.; Zain, N. A. M.; Suhaimi, M. S., (2008), Immobilization of Baker's yeast invertase in PVA–alginate matrix using innovative immobilization technique. *Process Biochemistry* 4 (331–338).
- [185] Rodríguez-Nogales, J. M.; Vila-Crespo, J.; Fernández-Fernández, E., (2013), Immobilization of *Oenococcus oeni* in lentikats® to develop malolactic fermentation in wines. *Biotechnology Progress* 1 (60–65).
- [186] Nagadomi, H.; Hiromitsu, T.; Takeno, K.; Watanabe, M.; Sasaki, K., (1999), Treatment of aquarium water by denitrifying photosynthetic bacteria using immobilized polyvinyl alcohol beads. *Journal of bioscience and bioengineering* 2 (189–193).
- [187] Schrödel, A., (2009), Kryokonservierung von eukaryotischen Zellkulturzellen. *Biologie in unserer Zeit* 5 (308).

- [188] Eibl, R.; Werner, S.; Eibl, D., (2010), Bag bioreactor based on wave-induced motion: characteristics and applications. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (55–87).
- [189] Mustafa, N. R.; Winter, W. de; van Iren, F.; Verpoorte, R., (2011), Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols* 6 (715–742).
- [190] Brittain-Loucas, H.; Bowley, S. R.; McKersie, B. D., (1998), Callus concentration regulates somatic embryo production in orchardgrass suspension cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 4 (281–284).
- [191] Krook, J.; Vreugdenhil, D.; van der Plas, L. H., (2000), Uptake and phosphorylation of glucose and fructose in *Daucus carota* cell suspensions are differently regulated. *Plant Physiology and Biochemistry* 7-8 (603–612).
- [192] Dalton, C. C., (1984), The Effect of Sugar Supply Rate on Photosynthetic Development of *Ocimum basilicum* (Sweet Basil) Cells in Continuous Culture. *Journal of Experimental Botany* 4 (505–516).
- [193] Marzouk, A. M., (2009), Hepatoprotective triterpenes from hairy root cultures of *Ocimum basilicum* L. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* 3-4 (201–209).
- [194] Haas, C., (2014), Produktion von Oleanol- und Ursolsäure mit Salbeizellkulturen und durchflusszytometrische Untersuchungen. Technische Universität Dresden, Dresden. Dissertation.
- [195] Rao, S. R.; Ravishankar, G. A., (2002), Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances* 2 (101–153).
- [196] Oppermann, U. C. T.; Maser, E., (1996), Characterization of a 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Carbonyl Reductase from the Gram-Negative Bacterium *Comamonas testosteroni*. *European Journal of Biochemistry* 3 (744–749).
- [197] Capel, C. S.; Souza, A. C. D.; Carvalho, T. C.; Sousa, J. P. B.; Ambrósio, S. R.; Martins, C. H. G.; Cunha, W. R.; Galán, R. H.; Furtado, N. A. J. C., (2011), Bio-transformation using *Mucor rouxii* for the production of oleanolic acid derivatives and their antimicrobial activity against oral pathogens. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 9 (1493–1498).
- [198] Liu, D.-L.; Liu, Y.; Qiu, F.; Gao, Y.; Zhang, J.-Z., (2011), Biotransformation of oleanolic acid by *Alternaria longipes* and *Penicillium adametzi*. *Journal of Asian Natural Products Research* 2 (160–167).

- [199] Gohari, A. R.; Saeidnia, S.; Hadjiakhoondi, A.; Abdoullai, M.; Nezafati, M., (2009), Isolation and quantitative analysis of oleanolic acid from *Satureja mutica* Fisch. & C. A. Mey. *Journal of Medicinal Plants* 5 (65–69).
- [200] Güvenalp, Z.; Özbek, H.; Kuruüzüm-Uz, A.; Kazaz, C.; Demirezer, Ö., (2009), Secondary metabolites from *Nepeta heliotropifolia*. *Turkish Journal of Chemistry* 5 (667–675).
- [201] Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O., (2003), Complete assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR resonances of oleanolic acid, 18-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry* 8 (636–638).
- [202] Choi, J. S.; Woo, W. S., (1984), Coumarins and triterpenoid glycosides from the roots of *Patrinia scabiosaefolia*. *Archives of Pharmacal Research* 2 (121–126).
- [203] Krueve, A.; Kaupmees, K.; Liigand, J.; Oss, M.; Leito, I., (2013), Sodium adduct formation efficiency in ESI source. *Journal of Mass Spectrometry* 6 (695–702).
- [204] Vera-Cabrera, L.; Ortiz-Lopez, R.; Elizondo-Gonzalez, R.; Perez-Maya, A. A.; Ocampo-Candiani, J., (2012), Complete genome sequence of *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1. *Journal of bacteriology* 10 (2761–2762).
- [205] Shirane, N.; Hashimoto, Y.; Ueda, K.; Takenaka, H.; Kato, K., (1996), Ring-A cleavage of 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid by the fungus *Chaetomium longirostre*. *Phytochemistry* 1 (99–104).
- [206] Abbas, F. A.; Al-Massarany, S. M.; Khan, S.; Al-Howiriny, T. A.; Mossa, J. S.; Abourashed, E. A., (2007), Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L. *Natural product research* 5 (383–391).
- [207] Bilia, A. R.; Mendez, J.; Morelli, I., (1996), Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 3 (191–197).
- [208] Tanaka, J. C. A.; Vidotti, G. J.; Silva, C. C. d., (2003), A new tormentic acid derivative from *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 3 (475–478).
- [209] Murakami, C.; Myoga, K.; Kasai, R.; Ohtani, K.; Kurokawa, T.; Ishibashi, S.; Dayrit, F.; Padolina, W. G.; Yamasaki, K., (1993), Screening of plant constituents for effect on glucose transport activity in Ehrlich ascites tumor cells. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 12 (2129–2131).
- [210] Sun Hua; Liu Ting; Shen Yan-Jun; Zhang Li-Ming; Wang Min, (2010), Preparation and Crystal Structure of 15 alpha-Hydroxyl-oleanolic Acid. *Chinese journal of structural chemistry* 12 (1798–1801).

- [211] Sousa, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Calhella, R.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Seabra, R.; Estevinho, L.; Bento, A.; Pereira, J. A., (2006), Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives 'alcaparra'. *Bioorganic & medicinal chemistry* 24 (8533–8538).
- [212] Pereira, J. A.; Oliveira, I.; Sousa, A.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Ferreira, I. C.; Ferreres, F.; Bento, A.; Seabra, R.; Estevinho, L., (2007), Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology* 11 (2287–2295).
- [213] Takahama, U.; Oniki, T., (1997), A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* 4 (845–852).
- [214] Yan, J.; Jetten, M.; Rang, J.; Hu, Y., (2010), Comparison of the effects of different salts on aerobic ammonia oxidizers for treating ammonium-rich organic wastewater by free and sodium alginate immobilized biomass system. *Chemosphere* 5 (669–673).
- [215] Keweloh, H.; Heipieper, H.-J.; Rehm, H.-J., (1989), Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 4.
- [216] Heipieper, H.-J.; Heweloh, H.; Rehm, H.-J., (1991), Influence of Phenols on Growth and Membrane Permeability of Free and Immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 4 (1213–1217).
- [217] Sforza, E.; Simionato, D.; Giacometti, G. M.; Bertucco, A.; Morosinotto, T.; Weber, A., (2012), Adjusted Light and Dark Cycles Can Optimize Photosynthetic Efficiency in Algae Growing in Photobioreactors. *PLoS ONE* 6 (e38975).
- [218] Neuhaus, E., (08.11.2012), Varianzen in den Produktausbeuten von *S. officinalis* var. *extrakta* SUC.
- [219] Zhang, J.-F.; Liu, Z.-Q.; Zhang, X.-H.; Zheng, Y.-G., (2014), Biotransformation of iminodiacetonitrile to iminodiacetic acid by *Alcaligenes faecalis* cells immobilized in ACA-membrane liquid-core capsules. *Chemical Papers* 1 (53–64).
- [220] Knierim, C. P., (2013), Immobilisierung von Bakterien in Hydrogelen und chemische Weiterverarbeitung zu wasserstabilen lebenden Biohybridsystemen. Philipps-Universität Marburg, Marburg. Dissertation.
- [221] Lisica, S., (unpublished), Energieeintrag in Wave-Bioreaktoren. Modelling Approaches. Zurich University of Applied Sciences Wädenswil, Schweiz.

## Anhang

### Anhang A Verwendete Chemikalien und Stammhaltung

#### Anhang A.1 Chemikalienliste

<b>Chemikalienbezeichnung, Reinheit Bezogen bei, Artikel-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy) Artikel-Nr. D0911.0100	Duchefa Biochemie
Acetonitril D3, 99.80% D für die NMR Artikel-Nr. 151807-50G	Sigma-Aldrich Co. LLC
Agar für die Bakteriologie VWR, Artikel-Nr. APPCA0949.1000	AppliChem GmbH
Ameisensäure, Reinheit 98 – 100 %, p.a. VWR, Artikel-Nr. 1.00264.2510	Merck KGaA
Ammoniaklösung 25% EMSURE® zur Analysis VWR, Artikel-Nr. 1.05432.1000	Merck KGaA
Calciumcarbonat, GPR RECTAPUR® gefällt VWR, Artikel-Nr. 22296.294	VWR International
CHES, 2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure VWR, Artikel-Nr. 0392-100G	VWR International
Cobalt(II)chlorid Hexahydrat, technical VWR, Artikel-Nr. 22892.261	VWR International
L-Cystein VWR, Artikel-Nr. 1.02838.0100	Merck KGaA
Deuteriumoxid 99,9 % D für die NMR VWR, Artikel-Nr. 1.13366.0025	Merck KGaA
Di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei Artikel-Nr. 17835-250G	Sigma-Aldrich Co. LLC
Eisen(III)chlorid Hexahydrat Reag.Ph.Eur. VWR, Artikel-Nr. 24208.237	VWR International
Ethanol, $\geq$ 99,8 %, p.a. Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern	Carl Roth GmbH & Co. KG

Ethylacetat > 99,5 % Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern	Mallinckrodt Baker B.V
Fleischextrakt VWR, Artikel-Nr. 84688.0500	VWR International
Glucose, wasserfrei Artikel-Nr. G0350500-1EA	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Glycerin, reinst. Wasserfrei Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern	Bernd Kraft GmbH
Hefeextrakt VWR, Artikel-Nr. A3732.0500	AppliChem GmbH
HEPES, für die Biochemie (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethansulfonsäure) VWR, Artikel-Nr. 441485H	VWR International
Imipenem Sandoz	Sandoz
Isopropanol, technisch, Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern	AppliChem GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat, EMSURE® ISO zur Analyse VWR Artikel-Nr. 1.04873.1000	Merck KGaA
Kinetin Artikel-Nr. K0905.0005	Duchefa Biochemie
Lentikat® Liquid, 200 mL Artikel-Nr. 50.10.0250.01001	<a href="http://www.genialab.com">www.genialab.com</a>
Lentikat® Stabilizer, 50 mL Artikel-Nr. 50.10.0250.01001	<a href="http://www.genialab.com">www.genialab.com</a>
Linsmaier & Skoog Medium incl. Vitamine Artikel-Nr. L0230.0050	Duchefa Biochemie
Magnesiumchlorid Hexahydrat GPR RECTAPUR® VWR Artikel-Nr. 25107.292	VWR International
Magnesiumsulfat Heptahydrat Ph.Eur VWR Artikel-Nr. 25167.298	VWR International
Malzextrakt, für die Mikrobiologie VWR Artikel-Nr. 84618.0500	VWR International
Methanol, HPLC Gradient Grade Chemikalienausgabe TU Kaiserslautern	Mallinckrodt Baker B.V.,

Methanol D4, 99.8 % D für die NMR VWR Artikel-Nr. 1.06028.0025	Merck KGaA
MES-Puffer (2-Morpholino)ethansulfonsäure Monohydrat VWR Artikel-Nr. 1.06126.0250	Applichem BioChemica
MOBS, > 99,9 % 4-(N-Morpholino)butansulfonsäure VWR Artikel-Nr. SAFSM3295-25G	Sigma-Aldrich Co. LLC.
MOPS 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure VWR Artikel-Nr. 0670-100G	VWR International
MOPSO 3-(4-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure VWR Artikel-Nr. A1078.0100	Applichem BioChemica
Natriumsulfat, technical VWR, Artikel-Nr. 28104.292	VWR International
Natriumchlorid, Ph.Eur. VWR, Artikel-Nr. 27808.297	VWR International
Natriumhydroxid p.a. VWR Artikel-Nr. 1.06498.1000	Merck KGaA
Oleanolsäure, ≥97% Artikel-Nr. O5504-500MG	Sigma-Aldrich
Oleanolsäuremethylester Artikel-Nr. CDX-00015300-010	LGC-Standards
Pepton (aus Soja) VWR Artikel-Nr. 1.07212.0500	Merck KGaA
Plant agar Artikel-Nr. P1001.5000	Duchefa Biochemie
Pharmamedia, Baumwollsaatmehl Sandoz	Merck KGaA
Sojamin T50 Sandoz	<i>Degussa/Evonik</i>
<i>Sojamin T50</i> Sandoz	<i>Cargill</i>
Sucrose, >99,7 % Artikel-Nr. S0809.5000	Duchefa Biochemie



Trypton (Pepton aus Casein) VWR Artikel-Nr. 84610.0500	Merck KGaA
Ursolat, ~80 % Ursolsäure, 20 % Oleanolsäure Boehringer Ingelheim Pharma GmbH	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH
Ursolsäure, $\geq$ 98.5% Artikel-Nr. 89797-25MG-F	Sigma-Aldrich Co. LLC
Ursolsäuremethylester, Artikel-Nr. CDX-00021650-025	LGC-Standards
Vitamin B12 VWR Artikel-Nr. A2090.0001	Applichem BioChemica
Zinkchlorid, technical VWR Artikel-Nr. 29126.294	VWR International

## Anhang A.2 Eingesetzte Mikroorganismen und Pflanzenzelllinien

Tab. A.2.1: Zur Herstellung des Carbapenems OA-6129 verwendete *S. fulvoviridis*-Mutanten

Parentalstammbezeichnung	Mutante
<i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501	3N 783
<i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501	3N 503
<i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501	4N 1181
<i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501	4N 1222
<i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501	4N 1263
<i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501	4N 3607

Tab. A.2.2: Verwendete Pflanzenzelllinien

Zelllinien	Eingesetzt zur	Erhalt der Zelllinien von
<i>Salvia officinalis</i>	Herstellung von Kryogenkulturen, Stammhaltung	AG Bley, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, TU Dresden
<i>Salvia officinalis</i> var. <i>extrakta</i> Suc1-1 und Suc1-4*	Stammhaltung, Kultivierung im Schüttelkoben, Rührkessel- und Wavebag-Reaktor	AG Neuhaus, Pflanzenphysiologie, TU Kaiserslautern
<i>Ocimum basilicum</i>	Stammhaltung, Kultivierung im Schüttelkoben, Rührkessel- und Wavebag-Reaktor	AG Bley, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, TU Dresden
<i>Salvia fruticosa</i>	Design eines Gesamtprozess	AG Bley, Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, TU Dresden

\*Die genetische Modifizierung der *S. officinalis* -Zelllinien ist in der Veröffentlichung von Christiane Haas dargestellt (siehe Kapitel G.2). Zusammenfassend wurde die Stoffwechselaktivität durch eine Überexpression eines Saccharosetransporters aus *Arabidopsis thaliana* in *Salvia officinalis* var. *extrakta* optimiert.

Tab. A.2.3: Mikroorganismen, die bei der Biotransformation von Ursol- und Oleanolsäure eingesetzt wurden.

Organismus	DSMZ-Nr.	Vorkultivierung im ...
<b><i>Nocardia iowensis</i></b>	<b>45197</b>	<b>GYM-Medium</b>
<i>Aspergillus niger</i>	872	GYM-Medium
<i>Bacillus megaterium</i>	32	GYM-Medium
<i>Bacillus subtilis</i>	618	Medium 1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	350	GYM-Medium
<i>Fusarium fujikuroi</i>	893	Kartoffelmedium
<i>Pseudomonas putida</i> R1	6125	Medium 1
<i>Rhizopus stolonifer</i>	855	Kartoffelmedium
<i>Streptomyces cattleya</i>	46488	GYM-Medium

## Anhang B Verwendete Lösungen und Medien

### Anhang B.1 Verwendete Lösungen

Beschreibung	Zusammensetzung
0,1 % Ameisensäure	Verdünnung von Ameisensäure, Reinheit 98 – 100 %, p.a., 1:1000 mit zweifach deionisiertem H <sub>2</sub> O
CHES, 0,10 M, pH 7,0	1,036 g CHES in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
CHES, 0,50 M, pH 7,0	5,182 g CHES in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
HEPES, 0,10 M, pH 7,0	1,191 g HEPES in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
HEPES, 0,50 M, pH 7,0	5,958 g HEPES in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
HEPES, 1,00 M, pH 7,0	11,910 g HEPES in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MES, 0,10 M, pH 7,0	1,066 g MES-Monohydrat in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MES, 0,50 M, pH 7,0	5,331 g MES-Monohydrat in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MES, 1,00 M, pH 7,0	10,662 g MES-Monohydrat in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOBS, 0,10 M, pH 7,0	1,117 g MOBS in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOBS, 0,50 M, pH 7,0	5,583 g MOBS in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOBS, 1,00 M, pH 7,0	11,165 g MOBS in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOPS, 0,01 M, pH 7,0	0,105 g MOPS in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOPS, 0,10 M, pH 7,0	1,046 g MOPS in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOPS, 0,50 M, pH 7,0	5,627 g MOPS in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOPS, 1,00 M, pH 7,0	10,463 g MOPS in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOPSO, 0,10 M, pH 7,0	1,125 g MOPSO in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOPSO, 0,50 M, pH 7,0	5,627 g MOPSO in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)
MOPSO, 1,00 M, pH 7,0	11,254 g MOPSO in deionisiertem Wasser (50 mL) pH-Einstellung mittels 1M NaOH (1 M)

Formiatpuffer 9,43 mL Ameisensäure (0,25 M) mit Wasser auf 1 L aufgefüllt und mit 27 mL Ammoniaklösung (25%) auf pH 8,5 eingestellt.

Für die Analytik der  $\beta$ -Lactame und den Triterpenen wurden folgende Eluenten verwendet:

Eluent, $\beta$ -Lactame	800 mL Formiatpuffer 200 mL Methanol
Eluent, Triterpene	920 mL Methanol 80 mL 0,1 % Ameisensäure
Eluent, Triterpene zur $^1\text{H-NMR}$ -Analytik	920 mL deuteriertem Acetonitril 80 mL Deuteriumoxid

## Anhang B.2 Zusammensetzung der Kultivierungsmedien

Eine Auflistung der Medienbestandteile und ihrer Quellen ist in Anhang A zu finden.

### Medium zur Produktion der OA-6129-Derivate

Die hier gelisteten Medien sind aus industriellen Vorberichten entnommen bzw. wurden im Laufe der Studie variiert. Die Kultivierungen erfolgten bei 28 °C und pH 7.

Tab. B.2.1: Zusammensetzung und Konzentrationen des Vorstufen-Komplexmediums 1 (VST-1). Zur Vermeidung der Maillard-Reaktion wird die Glucose getrennt von dem restlichen Medium autoklaviert.

Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	Inhaltsstoff
1,00	Glucose
24,00	Kartoffelstärke
3,00	Fleischextrakt
5,90	Sojamine T 50
5,00	Bacto Tryptone
2,00	CaCO <sub>3</sub> gef.

Tab. B.2.2: Zusammensetzung und Konzentration des variierten Vorstufen-Komplexmediums (VST-2). Zur Vermeidung der Maillard-Reaktion wird die Glucose getrennt von dem restlichen Medium autoklaviert.

Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	Inhaltsstoff
24,00	Glucose
0,20	L-Cystein
2,00	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
5,00	Hefeextrakt
10,00	Bacto-Tryptone
2,20	Pharmamedia
2,00	CaCO <sub>3</sub>
0,002	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O

Tab. B.2.3: Zusammensetzung und Konzentrationen des Hauptstufen-Komplexmediums (HST-1).

Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	Inhaltsstoff
80,00	Glycerin
25,80	Sojamine T 50 (7,7 % N)
7,60	Hefeextrakt (10 % N)
3,00	CaCO <sub>3</sub>
2,00	MgSO <sub>4</sub>
2,00	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Tab. B.2.4: Zusammensetzung und Konzentrationen des variierten Hauptstufen-Komplexmediums (HST-2).

Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	Inhaltsstoff
80,00	Glycerin
44,12	Sojamehl (7,7 % N)
12,00	Hefeextrakt (10 % N)
3,00	CaCO <sub>3</sub>
2,00	MgSO <sub>4</sub>
2,00	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Tab. B.2.5: Zusammensetzung und Konzentrationen der Spurenlösung und Vitamin B<sub>12</sub>, die in den Hauptstufenfermentationen verwendet wurden.

Konzentration [mg L <sup>-1</sup> ]	Inhaltsstoff
80,0	MgCl <sub>2</sub> *6*H <sub>2</sub> O
15,0	ZnCl <sub>2</sub>
7,0	FeCl <sub>3</sub> *6*H <sub>2</sub> O
2,0	CoCl <sub>2</sub> *6*H <sub>2</sub> O
5,0	Vitamin B <sub>12</sub>

Medium-1

Zur Kultivierung von *Bacillus subtilis* wurde das von der DSMZ empfohlene Medium 1 verwendet. Nachdem Pepton und Fleischextrakt im Medium gelöst war, wurde der pH 7,0 mittels 1 M Natronlauge eingestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C.

Tab. B.2.6: Zusammensetzung des Medium-1

Pepton	5	g L <sup>-1</sup>
Fleischextrakt	3	g L <sup>-1</sup>

GYM-Medium

Hefeextrakt und Malzextrakt wurden zur Herstellung des Medium in Wasser gelöst und mit 1 M Natronlauge auf pH 7,2 gebracht. Zur Vermeidung der Maillard-Reaktion wurde die Glucose als Stammlösung von 100 g L<sup>-1</sup> angesetzt und getrennt von dem restlichen Medium autoklaviert. Vor Kultivierungsbeginn wurden beide Lösungen vereint.

Tab. B.2.7: Zusammensetzung des GYM-Mediums

Glucose	4	g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	4	g L <sup>-1</sup>
Malzextrakt	10	g L <sup>-1</sup>

Kartoffel-Medium

Als Kartoffel-Medium wurde das von der DSMZ zur Kultivierung von Pilzen empfohlene Medium. Zur Herstellung des Kartoffelmediums wurden 200 g –möglichst alte- Kartoffeln gesäubert und geschnitten. In 1 L Wasser wurden diese für 1 Stunde gekocht und im direkten Anschluss durch ein feines Sieb gepresst. Das Permeat wurde aufgefangen und vor der weiteren Verwendung sterilisiert. Vor der Inokulation wurde dem Medium Glucose hinzugegeben.

Tab. B.2.8: Zusammensetzung und Konzentrationen des Kartoffel-Mediums

Kartoffel-lösung	1000	mL
Glucose	20	g L <sup>-1</sup>

LB-(engl. Lysogeny broth)Medium

Alle Medienbestandteile wurden gewogen und in Wasser gelöst (siehe Tabelle B.1.9). Vor dem Autoklavieren wurde der pH mittels 1 M Natronlauge auf den Wert von pH 7,0 gebracht. Nach dem Sterilisationsprozess wurde das Medium noch heiß in die Platten gegossen, um ein vorzeitiges Aushärten zu vermeiden.

Tab. B.2.9: Zusammensetzung und Konzentrationen des LB-Mediums der Kulturplatten

Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	Inhaltsstoff
10	Trypton
5	Hefeextrakt
5	Natriumchlorid
15	Agar

### Linsmaier & Skoog-Medium

Vor Beginn wurden die Gefäße, die zum Herstellen des Mediums verwendet wurden, mit Wasser gefüllt und bei 120 °C für 20 Minuten autoklaviert. Dies sollte einer ungewollten Maillard-Reaktion vorbeugen. Das Wasser wurde im Anschluss verworfen und die Gefäße für die Herstellung des Mediums verwendet. Dazu wurden Saccharose, LS-Komplexmedium, MES und Agarose gewogen und in dest. Wasser gelöst (siehe Tabelle B.1.10). Der pH wurde mittels 1 M Natronlauge auf den Wert von pH 5,7 gebracht, bevor von jeweils einer 1 g L<sup>-1</sup> Stammlösung der Pflanzenhormone (2,4-D und Kinetin) 500 µL L<sup>-1</sup> hinzu pipettiert wurden. Die Sterilisation erfolgte im Autoklav bei 120 °C für 20 Minuten. Erscheint das Medium gelbstichig, kam es zu einer Maillard-Reaktion des Komplexmediums und der Sucrose. Da das Wachstum der Zellen durch die Produkte der Maillard-Reaktion reprimiert wurde, musste das Medium in diesem Fall verworfen werden.

Zur Herstellung der Agarose-Kulturplatten wurde das Medium nach dem Sterilisationsprozess noch heiß in die Petrischalen gegossen, um ein vorzeitiges Aushärten zu vermeiden. Hier war zu beachten, dass die Pflanzenzellen ein Höhenwachstum besitzen, weshalb Petrischalen mit einer Höhe von 20,6 mm notwendig waren. Nach dem Aushärten wurde als Sterilnachweis eine Kulturplatte für 48 h und 28 °C in den Inkubator gelegt.

Tab. B.2.10: Zusammensetzung und Konzentration des LS-Mediums für das Flüssig- als auch das Feststoffmedium

Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	Inhaltsstoff
30	Saccharose (Sucrose)
4,4	Linsmaier & Skoog Medium (LS)
1	MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)
5* 10 <sup>-4</sup>	2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure)
5* 10 <sup>-4</sup>	Kinetin (6-(Furfuryl-amino)purine)
5,5	Agarose (nur bei Herstellung von Kulturplatten)

## Anhang C Eingesetzte Geräte

Abgasanalytik, BCpreFerm + Software FermVis	BlueSens gas sensor GmbH, Deutschland
Autoklav, Systec V150	Systec GmbH, Deutschland
Bioreaktoren	
R-ALF-Kaskade	Bioengineering, Schweiz
Biostat CultiBAG-RM	Sartorius, Deutschland
Digitalkamera, EOS 400D	Canon, Japan
FrenchPress TS Series Cabinet	Constant Systems LTD, Großbritannien
Gefriertrocknungsanlage	
Christ LOC-1m, ALPHA 2-4	Martin Christ GmbH, Deutschland
Drehschieber-Vakuumpumpe	Vakuumband GmbH + Co, Deutschland
HPLC-Analytik	
<u>1100 Series</u> HPLC-System (NMR)	Agilent Technologies, USA
<u>Waters</u> Alliance 2695	Waters GmbH, Deutschland
Waters PDA Detektor 2998	Waters GmbH, Deutschland
HPLC-Säule, Discovery <sup>®</sup> HS C18, 250 * 4,6 mm	Supelco <sup>™</sup> Analytical, Sigma Aldrich, Deutschland
ReproSil 100 Å, C18, 125 * 4,6 mm	Dr. Maisch GmbH
<u>Techlab</u>	Techlab GmbH, Deutschland
HPLC RI-Detektor RID-6A	Shimadzu, Japan
Reprogel-Ca <sup>2+</sup> , 300 * 8 mm	Dr. Maisch GmbH
Inkubatoren	
Ecotron	Infors-HT, Schweiz
Certomat BS-T	Sartorius, Deutschland
Binder BF 53	Binder, Deutschland
Stammhaltungskühlschrank Modell AV039P	Labotec GmbH, Deutschland
Magnetrührer, MR Hei-Mix L	Heidolph-Instruments, Deutschland



## Massenspektrometer

<u>API 2000 MS/MS</u> Tandem Mass Spectrometer	Applied Biosystems Sciex, Deutschland
<u>MicromassQuattro LC</u>	Waters, USA
MassLynx Software V4.1	Waters, USA

## Mikroskop

Motic B1 Series	System Microsokopes, Deutschland
Mikroskop Typ Axioskope	Fa. Carl Zeiss, Deutschland
Kamer Typ AxioCam MR 3	Fa. Carl Zeiss, Deutschland

## NMR-Spektrometer

600 MHz Avance	Bruker, Österreich
pH-Einstabmesskette, pH 211 Microprocessor	Hanna Instruments, Deutschland
Reinstwasseranlage Millipore	Merck Millipore, USA

## Rotationsverdampfer

LABOROTA 4003	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Rotavapor R-124	Büchi GmbH, Deutschland

## Simulation

Material Studios	Accelrys
Kinetik_LD	Prof. Hradetzky, HS Merseburg.
Sterilbank, HERAsafe® KS 12	Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Überkopfschüttler Intelli-Mixer	NeoLab, Deutschland

## Ultraschallbad, Bandelin Sonorex

Bandelin electronic GmbH & Co. KG,  
Deutschland

## Waage

Analysewaage ABS	Kern, Deutschland
Waage Scout™-Pro	Ohaus, Schweiz

## Zentrifugen

Z 383 K	Hermle Labortechnik, Deutschland
---------	----------------------------------

16DH

VWR Galaxy, Deutschland

## Anhang D Versuchsprotokolle, Berechnungen und Assays

In diesem Kapitel werden alle Versuchsprotokolle aufgelistet, die keine Weiterentwicklung des Lehrstuhls waren und als gängig angesehen werden können.

### Anhang D.1 Gravimetrische Bestimmung der Trockenmasse bzw. des Sedimentvolumens

Die Bestimmung der Biomassenbildung erfolgte durch gravimetrische Messung der Biotrockenmasse und durch Sedimentbestimmung. Dies war notwendig, da aufgrund des Komplexmediums keine optische Dichte bestimmt werden konnte.

Für die Bestimmung wurden in den Schüttelkolbenversuchsreihen jeweils zwei komplette Hauptstufenschüttelkolben der Analyse unterzogen, während aus dem Bioreaktor ein einzelnes, bestimmtes Probenvolumen entnommen wurde. Diese Proben wurden in einem vorher ausgewogenen Zentrifugenröhrchen bei 4.500 upm für 15 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, konnte das Sedimentvolumen bestimmt werden. Anschließend wurde die Biofeuchtmasse gravimetrisch erfasst und das Probenröhrchen im Brutschrank bei 50 °C für fünf Tage getrocknet. Anschließend erfolgte die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde für weitere Analytik bei -20 °C tiefgefroren.

### Anhang D.2 Glycerin-Assay

Der Glycerinnachweis erfolgte indirekt mittels UV-Detektion. Hierfür wurde der Enzymassay 10 148 270 035 der Firma R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland) verwendet. In einer dreistufigen Reaktion wird  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert, welches über ein Photometer bei 340 nm bestimmt werden kann. Aufgrund des stöchiometrischen Zusammenhangs zwischen den einzelnen Reaktionsschritten kann die Absorption zur Bestimmung der Glycerinkonzentration herangezogen werden.

$$\Delta E = (E_1 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_1 - E_2)_{\text{Leerwert}} \quad (30)$$

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \quad [\text{g L}^{-1}] \quad (31)$$

Mit  $V$  dem Testvolumen [mL];  $v$  dem Probenvolumen [mL];  $MG$  dem Molekulargewicht (92,1 g mol<sup>-1</sup>);  $d$  der Küvettenschichtdicke [cm];  $\varepsilon$  dem Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm (6,2 L mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) und  $E_x$  des Absorptionswertes bei 340 nm vor und nach Beginn der Reaktionen.

### Anhang D.3 Bestimmung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten ( $k_L a$ )

Die Bestimmung des volumetrischen Sauerstoffkoeffizienten erfolgte mittels der Ausgasmethode. Dazu wurde deionisiertes Wasser bei einer eingestellten Rührerdrehzahl, vorgegebener Temperatur und Begasungsrate mit Sauerstoff gesättigt. Nachdem die Gelöstsauerstoffkonzentration konstant bei 100 % gehalten wurde, wurde das Begasungsgas von Luft auf Stickstoff gewechselt. Durch die Begasung mit Stickstoff wurde Sauerstoff aus dem Wasser verdrängt, weshalb die Gelöstsauerstoffkonzentration auf einen relativen Wert von 0 % fiel. Wurde nun wieder Luft oder ein Sauerstoffgemisch angeschlossen, verdrängte Sauerstoff den Stickstoff – die Gelöstsauerstoffkonzentration stieg an.

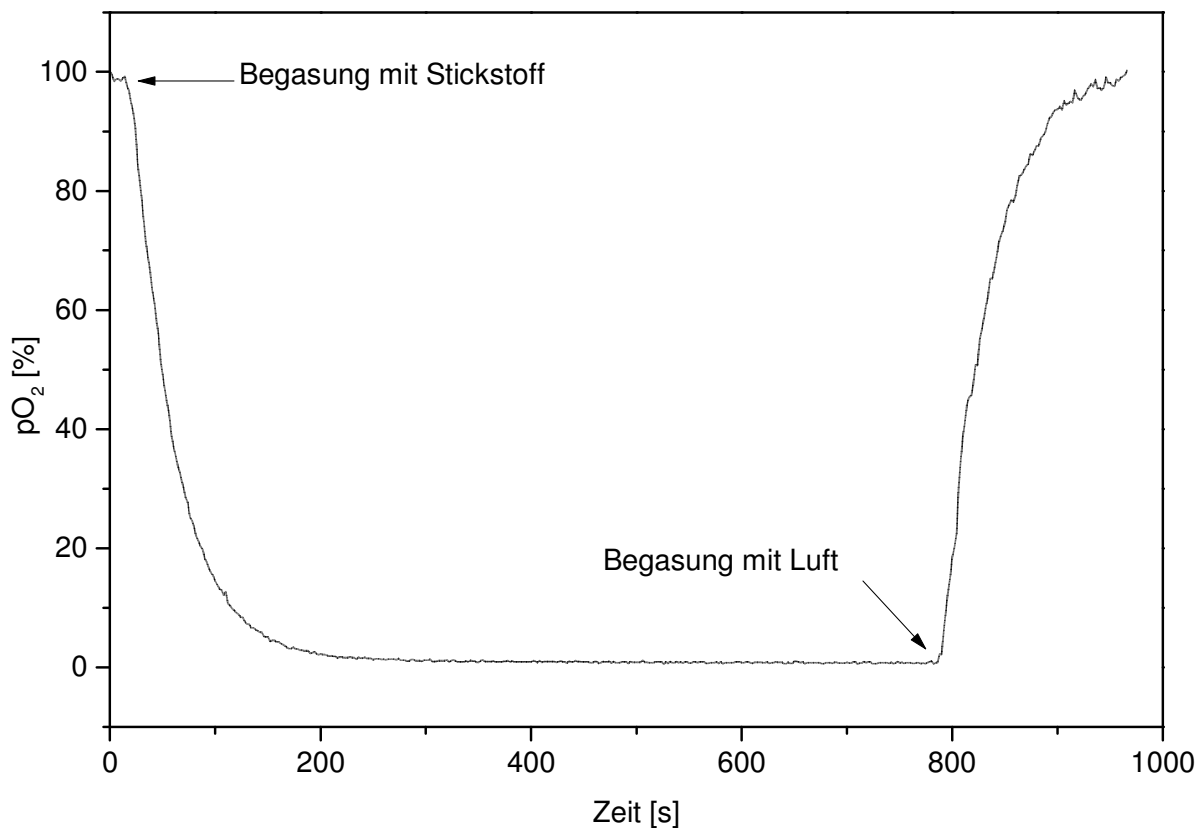


Abb. D.1: Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration beim Wechsel der Begasung mit Stickstoff und Sauerstoff in Wasser bei 28 °C und der Verwendung von Internig-Rührern (200 upm).

Aus dieser Steigung, wie sie in Abbildung D.1 zu sehen ist, ließ sich der volumetrische Stoffübergangskoeffizient berechnen, der abhängig von verschiedenen Prozessparametern wie Grenzfläche der Gasblasen, Größe der Gasblasen etc. war. Basierend auf der Zweifilmtheorie wurde als Ausgangsformel der Berechnung der Sauerstofftransportrate (OTR, *oxygen transfer rate*) verwendet [64], die ausgedrückt wird mit

$$OTR = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) = \frac{dc_{O_2}}{dt} \quad (32)$$

Mit  $c_{O_2}^*$  = Sättigungssauerstoffkonzentration,

$c_{O_2}$  = IST-Sauerstoffkonzentration im Medium und

$\frac{dc_{O_2}}{dt}$  = Veränderung der Gelöstsauerstoffkonzentration

Durch Umformen und Integration von  $k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) = \frac{dc_{O_2}}{dt}$  erhielt man dann

$$k_L a \cdot t = \ln \frac{c_{O_2}^*}{(c_{O_2}^* - c_{O_2})} \quad (33)$$

Durch das Auftragen der Zeit  $t$  [s] gegen  $\ln \frac{c_{O_2}^*}{(c_{O_2}^* - c_{O_2})}$  wird durch die Steigung der volumetrischen Stoffübergangskoeffizient dargestellt (Abbildung D.2). Für unterschiedliche Rührergeschwindigkeiten und –geometrien können somit charakteristische Stoffübergangskoeffizienten ermittelt werden.

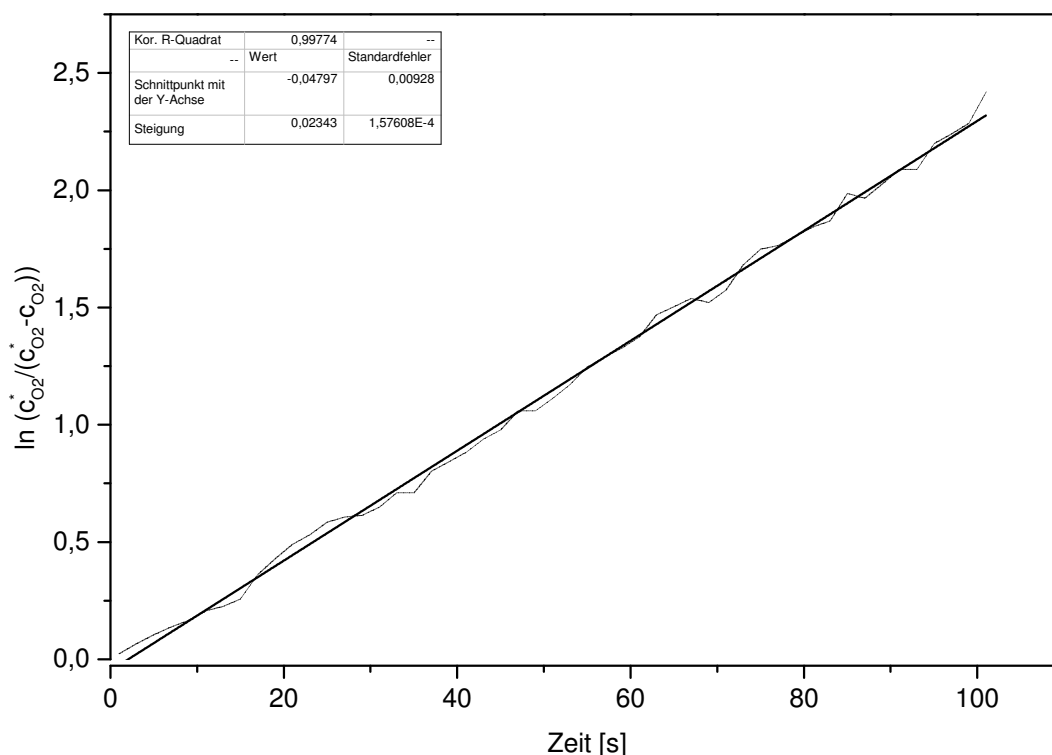


Abb. D.2: Bestimmung des volumetrischen Stofftransportkoeffizienten für den Intermig-Rührer bei 200 upm und bei 28 °C.

#### Anhang D.4 Isolierung und Identifizierung der Kontaminanten bei der mikrobiellen Biotransformation von Triterpenen

Die Kulturen, die in kontaminierten Medien auftraten und bei denen man trotzdem eine Biotransformation zu den bekannten Derivaten nachweisen konnte, wurden auf Agaroseplatten isoliert und kultiviert. Im Anschluss wurde die DNA der einzelnen Stämme extrahiert und eine PCR für eine anschließende T-RFLP durchgeführt. Dabei wurde das universelle Bakterienprimerpaar 27FAM (fluoreszenzmarkiert, für T-RFLP nötig) und 1492r verwendet. Für die T-RFLP-Analyse wurden die Restriktionsenzyme RsaI, BstUI und HaeIII eingesetzt. Die Analyse erfolgte vollautomatisch im ABI PRISM-TM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Die resultierenden Elektropherogramme zeigten jeweils ein für Reinkulturen charakteristisches Muster, welche mit Datenbanken verglichen werden konnte. Die Identifikation ergab eine Kontamination durch *Bacillus thuringiensis* und *Stenotrophomonas* sp.. Da eine Bio-transformation von Oleanol- und Ursolsäure im kontaminierten Versuch nachgewiesen werden konnte, wurde *B. thuringiensis* als Reinkultur eingesetzt, obwohl eine Derivatisierung von Terpenen in der Literatur nicht bekannt ist. Eine Zuordnung des Stammes *Stenotrophomonas* sp. IC4094 mit Kulturdatenbanken war zum Zeitpunkt der Versuche nicht möglich. Da es sich hierbei um eine Kultur der Risikostufe 2 handeln könnte, wurde von weiteren Versuchen abgesehen.

#### Anhang D.5 Bestimmung der Leistungseinträge der verwendeten Rührerkesselreaktoren, des Culti-Bag®-Systems und der 2 L-Erlenmeyer-Schüttelkolben ohne Schikane

Bei Reaktorsystemen ist eine wichtige Prozesskennzahl der Leistungseintrag. Er wird durch die Turbulenz der Strömung und damit die Dispersion des eingetragenen Gases, die Art der Durchmischung sowie deren Geschwindigkeit und der Art des Mediums charakterisiert.

Um den spezifischen, volumetrischen Leistungseintrag ( $P/V$ ) eines unbegasteten Systems im **Rührkesselreaktor** näherungsweise zu bestimmen, kann die folgende Formel herangezogen werden, die in Storhas *et al.* beschrieben wird, mit [65]:

$$\frac{P}{V} = \frac{Ne \cdot \rho \cdot n_R^3 \cdot D_R^5}{V} \quad (34)$$

Ne ist dabei die Newtonzahl (Leistungskennzahl) [-],

$\rho$  die Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ],

$n_R$  die Rührerdrehzahl [ $\text{s}^{-1}$ ],

$D_R$  der Rührerdurchmesser [m] und

V das Arbeitsvolumen [L].

Dabei ist die Newtonzahl neben der Rührer- und der Bioreaktorgeometrie auch abhängig von dem Strömungsverhalten des Mediums (beides wird ausgedrückt durch die Reynoldszahl  $Re$ ), der Froudezahl, sowie der Begasungsrate  $q$  [65]. Im unbegasteten System hängt Ne ausschließlich von der Reynoldszahl ab, die definiert wird, als

$$Re = \frac{n_R \cdot D_R^2 \cdot \rho}{\eta} \quad (35)$$

Mit  $\rho$  die Dichte [ $\text{kg m}^{-3}$ ],

$n_R$  die Rührerdrehzahl [ $\text{s}^{-1}$ ],

$D_R$  der Rührerdurchmesser [m] und

$\eta$  der dynamischen Viskosität [ $\text{Pa s}$ ].

Zur Vereinfachung bei der Bestimmung der Reynoldszahl in den verwendeten Systemen wird die dynamische Viskosität ( $10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und die Dichte von Wasser ( $1000 \text{ kg m}^3$ ) als Fermentationsmedium im Bioreaktor mit 40 mm Scheibenrührern und einer Rührergeschwindigkeit von 50 upm ( $0,833 \text{ s}^{-1}$ ) angenommen, welches in einer Reynoldszahl von  $1,3 \cdot 10^3$  resultiert. Bei höheren Rührerdrehzahlen oder Rührerdurchmesser liegen Reynoldszahlen von  $>10^4$  vor, sodass im Allgemeinen von einer turbulenten Durchmischung und einer konstanten Newtonzahl ausgegangen werden kann (siehe Abbildung D.3).

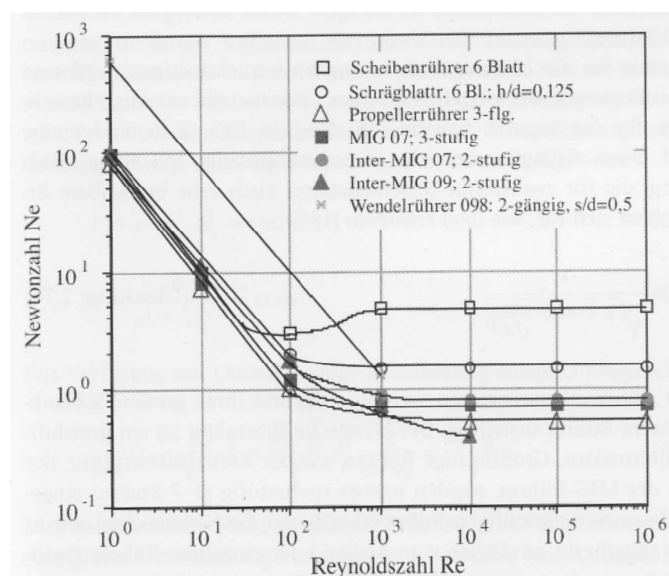


Abb. D.3: Zusammenhang zwischen Reynoldszahl und Newtonzahl für gängige Rührsysteme [65]. (Die Darstellung wurde der Literaturstelle Storhas *et al.* zu Anschauungszwecken entnommen.) Ab einer Reynoldszahl von  $>10^4$  kann im Allgemeinen von einer turbulenten Durchmischung ausgegangen werden. Für die verwendeten Rührersysteme, Scheibenrührer und Intermig, wird ein Ne von 6 bzw. 0,9 angenommen.

Mit denen aus der Abbildung D.3 grafisch-ermittelten Newtonzahlen und der Formel (34) lassen sich die Leistungseinträge für die verwendeten, unbegasteten Rührkesselreaktoren (2 L und 6,7 L Bioengineering-Kaskade) und für die verwendeten Rührergeometrien bestimmen. Zusammenfassend sind diese in Tabelle D.5.1 dargestellt.

Tab. D.5.1: Ermittelte Leistungseinträge P und spezifische, volumetrische Leistungseinträge P/V für die verwendeten Rührkesselreaktoren (Arbeitsvolumen (AV) der 2 L und 6,7 L Bioengineering-Kaskade), für die installierten Rührergeometrien (Scheibenrührer und Intermig) bezogen auf die unterschiedlichen Rührerdrehzahlen.

Rührerdrehzahl	Scheibenrührer [40 mm]		Scheibenrührer [60 mm]		Intermig [80 mm]	
	Leistungseintrag P	spezifischer Leistungseintrag P/V	Leistungseintrag P	spezifischer Leistungseintrag P/V	Leistungseintrag P	spezifischer Leistungseintrag P/V
[ $\text{min}^{-1}$ ]	für einen Rührer	(2 Rührer / 1 LAV)	für einen Rührer	(2 Rührer / 4 LAV)	für einen Rührer	(2 Rührer / 4 LAV)
50	0,0004	0,0007				
200	0,0228	0,0455	0,17	0,09	0,11	0,05
300	0,0768	0,1536	0,58	0,29	0,37	0,18
400	0,1820	0,3641	1,38	0,69	0,87	0,44
500	0,3556	0,7111	2,70	1,35	1,71	0,85
600	0,6144	1,2288	4,67	2,33	2,95	1,47
700	0,9756	1,9513	7,41	3,70	4,68	2,34
800	1,4564	2,9127	11,06	5,53	6,99	3,50
900	2,0736	4,1472	15,75	7,87	9,95	4,98

Die Bestimmung des Leistungseintrages für den **Wavebag-Reaktor** erfolgt über eine näherungsweise Darstellung von Eibl *et al.*, die die Arbeit ( $W$ ) über das Integral des Momentums ( $M$ ) zwischen den Bewegungswinkel  $+\varphi$  und  $-\varphi$  definiert:

$$W = \int_{-\varphi_{max}}^{+\varphi_{max}} M \cdot d\varphi \quad (36)$$

Die Arbeit und die „rocking“-Geschwindigkeit  $k_r$  [ $\frac{\text{min}^{-1}}{60} = \text{sec}^{-1}$ ] ergeben die auf das Arbeitsvolumen bezogen spezifische Leistungsdichte  $\frac{P}{V}$ , mit

$$\frac{P}{V} = \frac{W \cdot k_r}{V \cdot 60} \quad (37)$$

Da die von Eibl *et al.* präsentierte Bestimmung des Momentums nur durch eine nicht öffentlich zugängliche Hochschulschrift erfolgte [221], und so keine eigene Ermittlung möglich war, erfolgte die Bestimmung der spezifischen Leistungsdichte bei einem Winkel von  $7^\circ$  und einer Geschwindigkeit von 30 rpm grafisch durch die folgende Abbildung D.4.

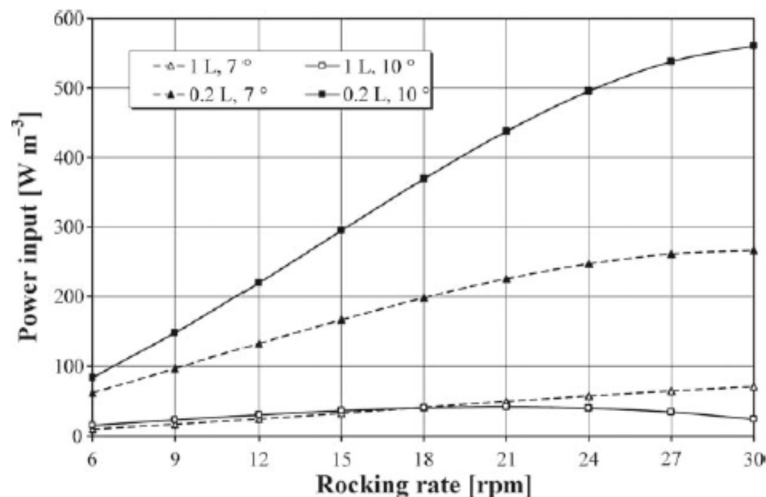


Abb. D.4: Zusammenhang zwischen spezifischer Leistungsdichte und Winkel und Geschwindigkeit in Wavebag-Reaktoren [188]. Die Darstellung wurde der Literaturstelle Eibl *et al.* entnommen und wurde nicht durch die vorliegende Arbeit generiert. Die verwendeten Prozessparameter waren 1 L Arbeitsvolumen, ein Kippwinkel von  $7^\circ$  und eine „Rock“geschwindigkeit  $k_r$  von 30 rpm.

Der aus den verwendeten Prozessparameter resultierender spezifischer Leistungseintrag wurde auf  $70 \text{ W m}^{-3}$  festgelegt.

Des Weiteren wurde für die Bestimmung des spezifischen Leistungseintrages für Schüttelkolben die Korrelationsgleichung für **Schüttelkolben** ohne Schikane verwendet [65].

$$\frac{P}{V} = 3,11 \times 10^{-9} \frac{n_s^{3,1} \times r^{3,12}}{V^{0,62} \times e^{0,12}} \quad (38)$$

Mit  $r$  = Kolbenradius [cm] (8,3 cm),  
 $e$  = Exzentrizität [cm] (2,5 cm),  
 $n$  = Schüttelfrequenz [ $\text{min}^{-1}$ ] (120 upm),



$V$  = Füllvolumen [mL] (1000 mL).

Bei Schüttelkolben mit eingestellter Schüttelfrequenz und Exzentrizität sinkt die spezifische Leistungsdichte mit zunehmendem Füllvolumen. Die Darstellung des spezifischen Leistungseintrags kann daher nur näherungsweise durch eine Formel dargestellt werden. Viele Prozessparameter, wie Schikanen im Schüttelkolben, hohes Volumina, geringere Exzentrizität oder unterschiedliche Schüttelfrequenzen führen zu einer hohen Varianz an möglichen Leistungseinträgen, die eine praktische Bestimmung des Leistungseintrages notwendig machen.

## Anhang E Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Darstellung des verwendeten <i>Streptomyces</i> -Stammbaums nach Kubo <i>et al.</i> . Durch Zugabe von <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (NTG) und Natriumselenat (rot) wurden neue Stämme aus dem Parentalstamm erzeugt, die ein geringeres Produktspektrum der OA-Derivate besaßen. Die in der Arbeit verwendeten Stämme sind N3-783, 4N 1181 und 4N 3607 [19]. ..... 8	8
Abb. 2:	Strukturdiversität der $\beta$ -Lactame am Beispiel der monozyklische $\beta$ -Lactamen, der bekannten Penicilline (hier Penicillin G), der Cephalosporine (hier das Cephalosporin C) und der Carbapeneme (hier PS-5) ..... 9	9
Abb. 3:	Thienamycinsynthese nach Núñez und Williamson bis zur Anbindung Pantetheins: Fusionierung des Co-Enzyms A und des $\gamma$ -Glutamylphosphat zur Pyrolidinringbildung durch ThnE, Methylierung des C6 durch die Enzyme ThnK, ThnL und ThnP, Bildung des $\beta$ -Lactamrings mittel ThnM, Oxidation am C2-C3 durch ThnD und ThnO und Pantetheinanbindung am C3 durch die Enzyme ThnT und ThnV [31; 32]. Verwendete Co-Substrate sind Coenzym A (CoAS) und S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), das zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAHC) reduziert wird..... 11	11
Abb. 4:	Thienamycinsynthese der OA-Derivate (A, B1, B2, C) im Anschluss an die Anbindung des Pantetheins [30]. Die Abspaltung des Panthoteins durch die Acylase A933 erfolgt am rot markierten Kohlenstoff..... 13	13
Abb. 5:	Hemmhof-Kalibriergerade von Imipenem gegen <i>Bacillus subtilis</i> nach einer Kultivierung von 24 h bei 37 °C ( $R^2 = 0,99$ ). ..... 16	16
Abb. 7:	Rührer, die in den 6,7 L-Bioreaktoren der Firma Bioengineering (Wald, Schweiz) eingesetzt wurden. Links: 6-Blatt-Scheibenrührer ( $D_R = 60$ mm); Rechts: Intermigrührer ( $D_R = 80$ mm). Pro Reaktor wurden jeweils zwei Rührer verwendet..... 19	19
Abb. 8:	Bestimmung der $k_{La}$ -Werte zu den Umdrehungsgeschwindigkeiten der Rührergeometrien: Scheibenrührer ( $D_R = 60$ mm) und Intermig-Rührer ( $D_R = 80$ mm) mittels Ausgasen des Wassers mit Stickstoff bei 28 °C und anschließender Belüftung mit Raumluft..... 19	19
Abb. 9:	Grafische Darstellung des Leistungseintrages der verwendeten Rührergeometrien: Scheibenrührer ( $D_R = 60$ mm) und Intermig-Rührer ( $D_R = 80$ mm). ..... 21	21
Abb. 10:	Das aus der verwendeten Kartoffelstärke gelantierte Vorstufenmedium. .... 22	22
Abb. 11:	Hauptstufen-Fermentation des Stammes 4N 3607 im 500 mL-Schüttelkolben (ohne Schikane) mit 20 mL Arbeitsvolumen bei 28 °C und 240 upm. Die Prozessbetrachtung erfolgt anhand Biofeuchtmasse / Sedimentvolumen, Glycerinkonzentration und pH-Verlauf..... 30	30
Abb. 12:	Fermentation im 6 L-Bioreaktor (Bioengineering, Schweiz) des Stammes 4N 1181 bei 28 °C, 250 upm und 3 L Arbeitsvolumen. Zwischen der 38. und 76. h	

- wurden  $20 \text{ mM L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  Wasserstoffperoxid dem Medium zugegeben. Prozessbetrachtung erfolgt anhand Sedimentvolumen, Glycerinkonzentration, Sauerstoffpartialdruck im Medium und Antibiotikakonzentration. .... 33
- Abb. 13: Fermentation des Stammes 4N 1181 bei  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $1 \text{ L}$  Arbeitsvolumen. Variable Rührerdrehzahl, die durch die aktuelle Gelöstsauerstoffkonzentration reguliert wird. Die Prozessbetrachtung erfolgt anhand Sedimentvolumen, Glycerinkonzentration, Sauerstoffpartialdruck im Medium, Rührergeschwindigkeit und Antibiotikakonzentration. .... 34
- Abb. 14: Mikroskopischer Nachweis über die Assimilation der Medienbestandteile (schwarze, runde Strukturen) innerhalb des wachsenden *Streptomyces* Mycelium nach einer Kultivierungszeit von 48 Stunden (Lichtmikroskop bei  $400\times$  Vergrößerung) im Vorstufenmedium..... 37
- Abb. 15: Hauptstufenfermentation mit dem HST-1-Medium. Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert  $40 \text{ } \%$   $p\text{O}_2$ ),  $\text{pH } 7$ , Begasung mit Luft ( $1 \text{ vvm}$ ). Prozessbetrachtung anhand der absoluten Trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $p\text{O}_2$ ), der Antibiotikakonzentration und der aufgenommenen Sauerstoffmenge ( $q\text{O}_2$ ) über der Zeit. .... 38
- Abb. 16: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2-Medium. Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert  $40 \text{ } \%$   $p\text{O}_2$ ),  $\text{pH } 7$ , Begasung mit Luft ( $1 \text{ vvm}$ ). Prozessbetrachtung anhand der absoluten Trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $p\text{O}_2$ ), der Antibiotikakonzentration und der aufgenommenen Sauerstoffmenge ( $q\text{O}_2$ ) über der Zeit. .... 39
- Abb. 17: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium und halber Stickstoffkonzentration. Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert  $40 \text{ } \%$   $p\text{O}_2$ ),  $\text{pH } 7$ , Begasung mit Luft ( $1 \text{ vvm}$ ). Prozessbetrachtung anhand der Biotrockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $p\text{O}_2$ ), der Antibiotikakonzentration in Abhängigkeit von der Zeit. .... 42
- Abb. 18: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium. Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert  $40 \text{ } \%$   $p\text{O}_2$ ),  $\text{pH } 7$ , Begasung mit Luft ( $1 \text{ vvm}$ ) bis zum Erreichen der  $40 \text{ } \%$ , anschließend Fermentation mit reinem Sauerstoff ( $99,5 \text{ } \%$ ). Nach Entleerung der Gasflasche wird wieder mit Luft begast. Prozessbetrachtung anhand der Trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $p\text{O}_2$ ) und der Antibiotikakonzentration. .... 44
- Abb. 19: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium. Prozessparameter:  $T = 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , Intermig mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert  $40 \text{ } \%$   $p\text{O}_2$ ),  $\text{pH } 7$ , Begasung mit Luft ( $1 \text{ vvm}$ ). Prozessbetrachtung anhand der

	Biotrockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ) und der Antibiotikakonzentration.....	47
Abb. 20:	Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium. Prozessparameter: $T = 28\text{ °C}$ , Intermig-Rührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 % $pO_2$ ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Prozessbetrachtung anhand der Biotrockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ), Glycerinkonzentration und der Antibiotikakonzentration.....	49
Abb. 21:	Vergleich der maximal produzierten Antibiotikakonzentrationen im Fokus auf die Sauerstoffsättigung des Mediums bei der Kultivierung von <i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501 im Bioreaktor. Die Kultivierungen erfolgten bei $28\text{ °C}$ und 240 upm, sofern die Rührergeschwindigkeit ( $n_R$ ) mit den Scheibenrührern konstant blieb. Als Medium wurde das Hauptstufenmedium 1 verwendet.....	51
Abb. 22:	Vergleich der maximal produzierten Antibiotikakonzentrationen im Zusammenhang mit den variierten Medien bei der Kultivierung von <i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501 im Bioreaktor. Die Kultivierungen erfolgten bei $28\text{ °C}$ und variabler Rührergeschwindigkeit mit den Scheibenrührern. Während das HST-1 Medium Sojamin als Stickstoffquelle enthält, ist im HST-2 Medium Sojamehl vorhanden, welches nach einer Optimierung auf die Hälfte der Stickstoffkonzentration reduziert wurde (HST-2S).....	52
Abb. 23:	Vergleich der maximal produzierten Antibiotikakonzentrationen im Zusammenhang mit den verwendeten Rührergeometrien (Scheibenrührern und Intermig) bei der Kultivierung von <i>Streptomyces fulvoviridis</i> A933 17M9 1501 im Bioreaktor. Die Kultivierungen erfolgten bei $28\text{ °C}$ und variabler Rührergeschwindigkeit. Als Medium wurde das optimierte HST-2S Medium verwendet.....	53
Abb. 24:	Abnahme der Imipenemkonzentration ( $26\text{ mg L}^{-1}$ in $0,006\text{ M MOPS}$ bei RT); Imipenem wurde mittels isokratischer RP-HPLC detektiert ( $t_R$ 10,3 min): $\lambda_{max}$ 300 nm; Das entstandene Abbauprodukt ( $t_R$ 5,5 min) besaß ein Absorptionsmaxima bei $\lambda_{max}$ 310 nm. ....	55
Abb. 25:	Mögliche Strukturformel des Imipenem-Fragmentes mit einem Molargewicht von $185\text{ g mol}^{-1}$ .....	56
Abb. 26:	Imipenem Stammlösung $5,2\text{ g L}^{-1}$ (in $0,006\text{ M MOPS}$ ); 36 Tage alt bei RT. Konzentrationsbestimmung mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe 2.4.2). Detektion bei 200-700 nm. Neben Imipenem können 9 weitere Substanzen detektiert werden, die unterschiedliche Absorptionsmaxima besitzen.....	57
Abb. 27:	Imipenem-Stammlösung $5,2\text{ mg mL}^{-1}$ (in $0,006\text{ M MOPS}$ ); 9 Tage bei RT; Konzentrationsbestimmung mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe	

2.4.2). Detektion bei 200-700 nm. Neben Imipenem ( $t_R$ 10,3 min) können drei weitere Substanzen erfasst werden.....	58
Abb. 28: Dimer (Molekulargewicht 598,6 g mol <sup>-1</sup> ): $\lambda_{max}$ : 290 nm [84].....	58
Abb. 29: Dimer (Molekulargewicht 598,6 g mol <sup>-1</sup> ): $\lambda_{max}$ : 360 nm [84].....	59
Abb. 30: Trimer (Molekulargewicht 897 g mol <sup>-1</sup> ): $\lambda_{max}$ : 280 nm und 380 nm [84].....	59
Abb. 31: Möglicher MS/MS-Fragmentierungsweg (ESIposMS/MS) von Imipenem; Imipenem (m/z 300) zerfällt in zwei detektierte Fragmente (m/z 103 und m/z 142); Durch Decarboxylierung entsteht ein Fragment von 98 m/z, durch Dehydratisierung ein Fragment von 124 m/z.....	60
Abb. 32: Interaktion von zwei Imipenemmoleküle zur Bildung von Thienamycin nach <i>Smith et al.</i> [84]. .....	61
Abb. 33: HPLC-Chromatogramm von Imipenem 1 g L <sup>-1</sup> . Detektion bei 300 nm mittels RP-HPLC (siehe Kapitel 2.4.3) .....	62
Abb. 34: Unten: Analytik der UV-Wellenlänge von 1 g L <sup>-1</sup> Imipenem und Thienamycin bei 300 nm; Mitte: Massenspur bei einem m/z Verhältnis von 300 (Imipenem) und Oben: detektierte Massenspur bei einem m/z-Verhältnis von 273 (Thienamycin). Die Darstellungen erfolgen über die Retentionszeiten, die aufgrund der gekoppelten HPLC-MS sich leicht unterscheiden.....	63
Abb. 35: Links: Massenspektrum von Imipenem (Retentionszeit von 5,14 min). Rechts: Massenspektrum bei einer Retentionszeit von 4,4 min (Thienamycin). .....	64
Abb. 36: Zerfall von Imipenem (300 mg L <sup>-1</sup> Initialkonzentration) in wässrigen Lösungen bestehend aus deionisiertem Wasser, 80 g L <sup>-1</sup> Glycerin oder 4,1 g L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O; Prozessparameter: T = 28 °C, pH 7.....	66
Abb. 37: Hydrolyse von Imipenem (300 mg L <sup>-1</sup> Initialkonzentration) in wässrigen Lösungen, Prozessparameter: T = 28 °C, pH 7, 2 g L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> , 3 g L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	67
Abb. 38: Hydrolyse von Imipenem (300 mg L <sup>-1</sup> Initialkonzentration) im sterilen Hauptstufenmedium. T = 28 °C, pH 7, Scheibenrührer-Drehzahl 500 upm, Arbeitsvolumen 0,75 L, Begasung 1 vvm. ....	68
Abb. 39: Zerfall von 300 mg L <sup>-1</sup> Imipenem im Hauptstufenmedium während der Lag-Phase (18. Stunde), pO <sub>2</sub> -kritischen Phase (42. Stunde) und in der Produktionsphase des Antibiotikums (72. Stunde); T = 28 °C, Rotationschüttler. ....	70
Abb. 40: Hauptstufenfermentation im HST-2S-Medium. Prozessparameter: T = 28 °C, Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 % pO <sub>2</sub> ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Zugabe von 300 mg L <sup>-1</sup> Imipenem nach einer Prozessdauer von 48 Stunden. Prozessbetrachtung anhand der Gesamttrockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration (pO <sub>2</sub> ), und der Antibiotikakonzentration.....	71
Abb. 41: Hauptstufenfermentation mit dem HST-2S-Medium. Prozessparameter: T = 28 °C, Scheibenrührer mit angepasster Rührergeschwindigkeit (Sollwert 40 % pO <sub>2</sub> ), pH 7, Begasung mit Luft (1 vvm). Zugabe von 30 mg L <sup>-1</sup> Imipenem nach	

- einer Prozessdauer von 40 Stunden. Prozessbetrachtung anhand der Trockenmasse, der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ), und der Antibiotikakonzentration..... 72
- Abb. 42: Lichtmikroskopische Aufnahmen des Kulturmediums (100fache Vergrößerung) Links: Mycelium im von Hyphen durchzogenen Kulturmedium vor Zugabe von 30 mg Imipenem. Rechts: Mycelium im von Hyphen durchzogenen Kulturmedium 5 Stunden nach Zugabe von 30 mg Imipenem..... 73
- Abb. 43: Logarithmische Darstellung des Konzentrationsverlaufes von 50 mg (0,17 mM) Imipenem in Wasser bei pH 7,0 und RT. Konzentrationsbestimmung mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Die grafische Auswertung erfolgte durch die Software KINETIK, HS-Merseburg [54]. Halbwertszeit bei 29,92 h,  $R^2 = 0,99$ ..... 75
- Abb. 44: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäurelösung bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Aufgrund des besseren Vergleichs wurden alle Konzentrationen normiert. .... 76
- Abb. 45: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 3-(N-Morpholino)propansulfonsäurelösung bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert..... 77
- Abb. 46: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 4-(N-Morpholino)butansulfonsäurelösung bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert..... 78
- Abb. 47: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 3-(N-Morpholino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure (MOPSO) bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert..... 79
- Abb. 48: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 1,0 M, 0,5 M und 0,1 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert..... 80
- Abb. 49: Zerfall von (0,17 mM) Imipenem in 0,5 M und 0,1 M N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES) bei RT und pH 7,0. Konzentrationsbestimmung mittels isokratischer RP-HPLC-Methode (siehe Kapitel 2.4.2). Detektion bei 300 nm. Zum besseren Vergleich wurden die Konzentrationen normiert..... 81

Abb. 50:	Fließbild des Gesamtprojektes „Gewinnung von pharmakologisch relevanten Triterpenen aus pflanzlichen Zellkulturen am Beispiel von Oleanol- und Ursolsäure“, auf dem die hier geschilderte Zielsetzung basiert.....	91
Abb. 51:	Biosynthese des Sesquiterpen Farnesylpyrophosphat aus acetyliertem Coenzym A nach Breitmaier et al. [124]. Die Dimerisierung erfolgt an der rot gefärbten Bindung.....	94
Abb. 52:	Biosyntheseweg von Farnesylpyrophosphat zur Bildung von Protosteryl- und Dammarenyl-Kationen. Die Zyklisierung des Squalen erfolgt über die Bildung von 2,3-Oxisqualen mittels Oxidosqualenzyklase (OSC) nach Abe [125]. Die Dimerisierung erfolgt an der rot gefärbten Bindung.....	95
Abb. 53:	Allgemeiner $\alpha$ - und $\beta$ -Amyrin Biosyntheseweg in Pflanzen [125] und spezifische Bildung der Ursol- und Oleanolsäure. Die Bildung der $\alpha$ - und $\beta$ -Amyrin erfolgt durch $\alpha$ - und $\beta$ -Amyrinsynthasen. Durch CYP716A werden $\alpha$ - und $\beta$ -Amyrin am C28 in ihre korrespondierenden Säuren transformiert [127].....	96
Abb. 54:	Gealterte <i>Salvia officinalis</i> Kultur auf Agarmedium mit braunen Pflanzenzellen. Da die Nekrose von unten nach oben erfolgt, müssen die helleren, noch aktiven Pflanzenzellen rechtzeitig auf frisches Medium überführt werden. ....	98
Abb. 55:	Saccharoseaufnahme und –spaltung in Pflanzenzellen nach Sturm [141]. Als INV sind alle Invertasen zusammengefasst, die die Saccharose in Glucose und Fructose spalten.....	100
Abb. 56	Stammhaltung der Kalluskultur von <i>Salbei officinalis</i> auf LS-Medium, bei 28 °C und ohne Lichtzufuhr. Links ist eine normal weiß/grünlich gefärbte Kalluskultur zu sehen, rechts eine intensiv gelb verfärbte Kultur. Weitere Kulturen wiesen Verfärbungen im orangen oder roten Bereich auf. ....	101
Abb. 57:	Biotransformation der pentazyklischen Triterpene Oleanol- und Ursolsäure durch <i>Nocardia iowensis</i> nach Zhang et al. [122]. Durch Leipold et al. konnten die Umwandlungen der Ursolderivate zu den Oleanolderivaten nicht bestätigt werden, weshalb die Reaktionspfeile gestrichelt dargestellt sind [121].....	105
Abb. 58:	Gefriergetrocknete Biomasse mit Ethanol und Seesand; links: vor dem mechanischen Zellaufschluss; rechts: nach dem mechanischen Zellaufschluss.....	108
Abb. 59:	Kultivierungsverlauf von <i>Nocardia iowensis</i> im Erlenmeyer-Schüttelkolben ohne Schikane und in 50 mL GYM-Medium bei 28 °C und 120 upm.....	111
Abb. 60:	Schüttelkolbenkultur von <i>Nocardia iowensis</i> . Nach 72 Stunden sind Zellpellets zu erkennen (oben), die sich innerhalb von einer Minute am Kolbenboden absetzen (unten). ....	112
Abb. 61:	Schüttelkolbenkultur von <i>Nocardia iowensis</i> . Zellpellets im Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung.....	112
Abb. 62:	Links oben: BIOSTAT® CultiBag RM von Sartorius; rechts oben: Geöffnete Station; Unten: 2 L-CultiBag RM. A) Temperierter Abluftfilter; B) Zuluftanschluss mit Filtereinheit; C) Probenahme; D) Heizplatte (rot) zur Wärmeregulierung.....	114

- Abb. 63: Kultivierungen von *Salvia officinalis* auf Agarplatten im Anschluss an die Kryokonservierung. Als Referenz wurden Wachstumsverläufe von Salbeikulturen verwendet, die keiner Kryokonservierung unterlagen. Kryo 1-Kulturen wurden langsam, Kryo 2-Kulturen wurden mittels flüssigen Stickstoff Schock eingefroren. Kulturen mit +Gly wurden mit 80 %igem Glycerin vor der Kryobehandlung versetzt. .... 120
- Abb. 64: Kultivierungen von *Salbei officinalis* auf Agaroseplatten im Anschluss an die Kallus-Regeneration. Als Referenz wurden Salbeikulturen verwendet, die nicht eingefroren wurden. Für die reaktivierte Kryokultur 2+Gly wurden Kalluszellen aller Platten entnommen, die mittels 80 %igem Glycerin und durch das Einfrieren mit flüssigem Stickstoff eingefroren waren. .... 121
- Abb. 65: Zeitlicher Verlauf der Kryokonservierung im Gesamtüberblick von *Salbei officinalis*. Das Einfrieren und Auftauen erfolgte im Laufe von 24 Stunden und war dabei abhängig vom zu lagernden Volumen. .... 122
- Abb. 66: Von links nach rechts: 15-Tage alte Suspensionskulturen von *Salvia officinalis*, *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 und *Ocimum basilicum* im 300 mL-Schüttelkolben bei 28 °C und 120 upm ..... 123
- Abb. 67: Kultivierungsverlauf gemessen an der Zuckerkonzentration und an der Biotrockenmasse von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 im 2 L-Schüttelkolben ohne Schikane bei 28°C, 120 upm. Zuckernalytik mittels HPLC und RI-Detektor. .... 124
- Abb. 68: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mit Calcofluor white stain angefärbten Salbeikallusaggregats (mehrere Zellen) mit dem Mikroskop Typ Axioskope und der Kamer Typ AxioCam MR 3. Die Zelle wurde aus dem Medium im Bioreaktor entnommen. .... 125
- Abb. 69: Links: Kultivierungsverlauf gemessen an der Zuckerkonzentration und an der Biotrockenmasse von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 im Rührkesselreaktor, bei 28 °C, Rührerdrehzahl 50 upm, Belüftung 0,3 vvm. Schwankungen in der Biomasse und in der Substrataufnahme traten aufgrund vom adhäsiven Wachstum der Pflanzenzellen an der Reaktorwand auf. Rechts: Wachstum der Pflanzenzellen im Bioreaktor. .... 125
- Abb. 70: Kultivierungsverlauf gemessen an der Zuckerkonzentration und an der Biotrockenmasse von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-4 in den 2 L-Wavebagreaktor Biostat® CultiBag RM, 28 °C, Winkel 7°, Geschwindigkeit 30 rpm, Luftzufuhr 0,25 vvm. .... 126
- Abb. 71: Kultivierungsverlauf von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 im 2 L-Schüttelkolben ohne Schikane bei 28 °C, 120 upm. Zuckernalytik mittels HPLC und RI-Detektor. .... 128
- Abb. 72: Kultivierungsverlauf von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc1-1 im 2 L-Wavebagreaktor Biostat® CultiBag RM, 28 °C, Winkel 7°, Geschwindigkeit 30 rpm, Luftzufuhr 0,25 vvm. .... 129



- Abb. 73: Kultivierungsverlauf von *Ocimum basilicum* im 2 L-Schüttelkolben (1 L-Arbeitsvolumen) ohne Schikane bei 28 °C, 120 upm. Zuckeranalytik mittels HPLC und RI-Detektor. .... 130
- Abb. 74: Kultivierungsverlauf von *Ocimum basilicum* im 2 L-Wavebagreaktor Biostat® CultiBag RM, 28 °C, Winkel 7°, Geschwindigkeit 30 rpm, Luftzufuhr 0,25 vvm. .... 131
- Abb. 75: Kultivierung von *Salvia officinalis* var. *extrakta* Suc 1-4 und *Ocimum basilicum* im repeated-batch-Verfahren im Schüttelkolben und im LS-Medium bei 28 °C. Die Biotrockenmasse wurde gravimetrisch bestimmt. .... 132
- Abb. 76: Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) der Triterpenbildungsraten pro Biotrockenmasse und der verwendeten Pflanzenkalluskulturen und Bioreaktoren (2 L-Schüttelkolben, 2 L-Rührkesselreaktor (RK), 2 L-Wavebag-Reaktor). Links die RZA-Ausbeuten für Ursolsäure, rechts für Oleanolsäure. .... 134
- Abb. 77: Biotransformation von Ursolsäure durch *N. iowensis* nach Leipold *et al.*. Es ergeben sich zwei Derivatisierungswege: Ursolsäuremethylester wird über Ursonsäuremethylester zum 3-oxoursa-1,12-dien-28-oic-säuremethylester transformiert, während aus Ursonsäure das unmethylierte Produkt 3-oxoursa-1,12-dien-28-oic-säure resultiert [121]. .... 138
- Abb. 78: Substratverlauf von Ursolsäure während der Biotransformationen mit freien und in Natriumalginat- und polyvinyl-immobilisierten *N. iowensis* Zellen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels RP-HPLC und Detektion bei 205 nm (siehe Kapitel 3.4.3). .... 139
- Abb. 79: Ursolsäuremethylester-Konzentrationen der verschiedenen Biotransformationsversuche mittels freien und in Natriumalginat und Polyvinyl-immobilisierten *N. iowensis* Zellen gemessen an der Fläche des Peaks, der durch die RP-HPLC-Analytik bei 205 nm ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.4.3). .... 140
- Abb. 80: Ursonsäurekonzentrationen der verschiedenen Biotransformationsversuche mittels freien und in Natriumalginat und Polyvinyl-immobilisierten *N. iowensis* Zellen gemessen an der Fläche des Peaks, der durch die RP-HPLC-Analytik bei 205 nm ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.4.3). .... 141
- Abb. 81: Bestimmung der Biotransformationseffizienz bei der Transformation von Ursolsäure zu Ursolsäuremethylester (USME) und Ursonsäure (UNS) durch freie und immobilisierte *N. iowensis* Kulturen. .... 143
- Abb. 82: Verläufe der Oleanolsäurekonzentration [g L<sup>-1</sup>] in Schüttelkolben mit freien, ungebundenen (weiß) und immobilisierten (schwarz) *Nocardia iowensis* Zellen. Die Kulturen wurden bei 28 °C und 120 upm inkubiert. Detektion erfolgte durch HPLC-RP bei 205 nm. .... 145
- Abb. 83: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Produktbildung während der Oleanolsäuretransformation durch native *Nocardia iowensis* Zellen. Die Kultur wurde bei 28 °C und 120 upm inkubiert. Detektion erfolgte durch HPLC-RP bei 205 nm. .... 146

Abb. 84:	Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Produktbildung während der Oleanolsäuretransformation durch in Alginate immobilisierte <i>Nocardia iowensis</i> Zellen. Die Kultur wurde bei 28 °C und 120 upm inkubiert. Detektion erfolgte durch HPLC-RP bei 205 nm. ....	146
Abb. 85:	Massespektrum von Oleanolsäuremethylester und nach positiver Ionisierung durch Electrospray-Ionisierung (ESI) (m/z 471) und daraus resultierenden Adduktionssignalen [OSME -H <sub>2</sub> O +H <sup>+</sup> ] (m/z 453), [OSME +Na <sup>+</sup> ] (m/z 493) und den sehr deutlich auftretenden Dupletionen [2x OSME + Na <sup>+</sup> ] (m/z 963/964). ....	149
Abb. 86:	Möglicher Biosyntheseweg bei der Biotransformation von Oleanolsäure durch <i>Nocardia iowensis</i> . ....	151
Abb. 87:	Vergleich der Biotransformationseffizienzen der freien, in Alginate (2 und 20 % CaCl <sub>2</sub> )- und in polyvinyl-immobilisierten Zellen. In Rot sind die Effizienzen für die Ursolsäuretransformation und in Grün die Effizienzen für die Biotransformation von Oleanolsäure dargestellt. ....	153
Abb. 88:	Design des Gesamtprozesses: Biotransformation im nach Zellaufschluss der <i>Salvia fructicosa</i> Pflanzenkultur mittels immobilisierter <i>N. iowensis</i> Zellen. Um den Einfluss von hydrophilen und hydrophoben Pflanzenzellbestandteilen zu untersuchen, erfolgte eine unterschiedliche Extraktion. ....	156
Abb. 89:	Biotransformation von Oleanol- und Ursolsäure durch immobilisierte <i>N. iowensis</i> Zellen im GYM-Medium. Die Triterpene wurden aus Pflanzenzellen extrahiert und mittels Rotationsverdampfer aufkonzentriert. ....	157
Abb. 90:	Biotransformationskultur im GYM-Medium (links) und nach Zugabe des Zellextrakts und weiteren zwei Tagen im Inkubator bei 26 °C und 120 upm (rechts). Aufgrund des wässrigen Milieus ist die Trübung auf die hydrophoben Bestandteile, wie beispielsweise die Oleanol- und Ursolsäure, zurückzuführen. ....	157
Abb. 91:	Verfärbung des Biotransformationsmediums aufgrund des Verhältnisses von Zellysat zu GYM-Medium (Arbeitsvolumen von 150 mL). Kolben von links nach rechts: 100 % GYM-Medium (Positivkontrolle), 25 % Zellysat zu 75 % GYM-Medium, 50 % Zellysat zu 50 % GYM-Medium und 100 % Zellysat. Biotransformation erfolgte bei 28 °C und 120 upm. ....	158
Abb. 92:	Biotransformationsverläufe in reinem GYM-Medium (oben), 25 % Lysat (unten links) und 50 % Lysat (unten rechts). Die Triterpene Oleanol- und Ursolsäure wurden durch immobilisierte <i>N. iowensis</i> -Kulturen zu ihren korrespondierenden Methylestern transformiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels RP-HPLC (Kapitel 3.4.3) und die Darstellung anhand der Peakflächen bei einer Detektion bei 205 nm. ....	159
Abb. 93:	Biotransformation von immobilisierten <i>N. iowensis</i> Zellen im reinen wässrigen Zellysat. Konzentrationsbestimmung mittels RP-HPLC (Kapitel 3.4.3). Detektion bei 205 nm. ....	160

Abb. D.1:	Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration beim Wechsel der Begasung mit Stickstoff und Sauerstoff in Wasser bei 28 °C und der Verwendung von Intermig-Rührern (200 upm). .....	198
Abb. D.2:	Bestimmung des volumetrischen Stofftransportkoeffizienten für den Intermig-Rührer bei 200 upm und bei 28 °C. ....	199
Abb. D.3:	Zusammenhang zwischen Reynoldszahl und Newtonzahl für gängige Rührsysteme [65]. Ab einer Reynoldszahl von $>10^4$ kann im Allgemeinen von einer turbulenten Durchmischung ausgegangen werden. Für die verwendeten Rührersysteme, Scheibenrührer und Intermig wird ein Ne von 6 bzw. 0,9 angenommen. ....	201
Abb. D.4:	Zusammenhang zwischen spezifischer Leistungsdichte und Winkel und Geschwindigkeit in Wavebag-Reaktoren [188]. Die verwendeten Prozessparameter waren 1 L Arbeitsvolumen, ein Kippwinkel von 7° und eine Rockinggeschwindigkeit $k_r$ von 30 rpm. ....	202

## Anhang F Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Reaktormaße des RALF-Plus Systems .....	18
Tab. 2:	Statistische Kenngrößen zur Bestimmung der Erfassungs-, Bestimmungs- und Nachweisgrenze.....	28
Tab. 3:	Zusammensetzung und Konzentrationen des Hauptstufen-Komplexmediums (HST-1). .....	65
Tab. 4:	Halbwertszeiten von 300 mg L <sup>-1</sup> Imipenem in wässrigen Lösungen (falls keine andere Konzentration angegeben). Die Konzentrationen der Substanzen sind im Anhang B', Kapitel B.2, Tabelle B.2.4 zu finden. Die Versuche verliefen bei pH 7 und 28 °C Raumtemperatur. ....	82
Tab. 5:	Halbwertszeiten von 50 mg L <sup>-1</sup> Imipenem in verschiedenen wässrigen Puffersystemen bei pH 7 und RT.....	84
Tab. 6:	Zusammenfassung und Charakterisierung der Kryokonservierungsprotokolle aufgrund ihrer Kühlrate und Konservierungstemperatur [145; 147] .....	102
Tab. 7:	Beispiele von potenziellen Mikroorganismen, die als Ganzzellsysteme zur Modifikation von Sekundärmetaboliten eingesetzt werden.....	104
Tab. 8:	Kenngrößen zur Bestimmung der Erfassungs-, Bestimmungs- und Nachweisgrenzen von Ursolsäure. Die mathematischen Definitionen sind in Kapitel 2.5 aufgelistet.....	117
Tab. 10:	Prozessdaten zur Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> var. <i>extrakta</i> Suc1-4 im Schüttelkolben (SK), Rührkesselreaktor (RK) und im Wavebag-Reaktor (WR). Die Oleanol- und Ursolkonzentration wurde mittels HPLC bestimmt und auf die aufgeschlossene Biomasse bezogen. Im Rührkessel wurde nur die im Medium enthaltene Biomasse bestimmt. Die spezifischen Leistungseinträge wurden durch die Formel 1 (Kapitel 2.4.5), Formel 35 (Anhang D.5) und mittels Eibl <i>et al.</i> bestimmt [188].....	127
Tab. 11:	Prozessdaten zur Kultivierung von <i>Salvia officinalis</i> var. <i>extrakta</i> Suc1-1 im Schüttelkolben (SK) und im Wavebag-Reaktor (WR). Die Produktausbeuten von Oleanol- (OS) und Ursolsäure (US) sind auf die aufgeschlossene Biotrockenmasse bezogen. Die spezifischen Leistungseinträge wurden durch die Formel 35 (Anhang D.5) und mittels Eibl <i>et al.</i> bestimmt [188]. ....	129
Tab. 12:	Prozessdaten zur Kultivierung von <i>Ocimum basilicum</i> im Schüttelkolben (SK) und im Wavebagreaktor (WR). Die Oleanol- und Ursolsäurekonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt und auf die eingesetzte Biomasse bezogen. Die spezifischen Leistungseinträge wurden durch die Formel 35 (Anhang D.5) und mittels Eibl <i>et al.</i> bestimmt [188]. ....	131
Tab. 13:	Finale Triterpenkonzentrationen von <i>Salvia officinalis</i> var. <i>extrakta</i> und <i>Ocimum basilicum</i> aus dem repeated-batch-Verfahren im Schüttelkolben (SK). Aufgrund der höheren Wachstumsrate wurde Basilikum alle 10 bzw. 11 Tage, Salbei alle 14 Tage halbiert und in neues Medium überimpft. ....	133

Tab. 14:	Verwendete Mikroorganismen für eine Biotransformation von Ursol- und Oleanolsäure. Detektion der Substrate und Produkte über RP-HPLC bei 205 nm. Die weitere Analytik erfolgte mittels HPLC-MS und HPLC-NMR. Zur Vorkultivierung wurden die bei DSMZ empfohlenen, spezifischen Medien verwendet. Die Biotransformation erfolgte im GYM-Medium. Positive Nachweise mittels HPLC, HPLC-MS oder HPLC-NMR sind hervorgehoben. ....	137
Tab. 15:	Ergebnisse zur Ursolsäuretransformation durch freie, in Alginat- und in polyvinylalkohol-immobilisierte Zellen. Die theoretischen USME und UNS-Konzentrationen wurden aus den Peakflächen von US bei 205 nm ermittelt.....	142
Tab. 16:	HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten der Oleanolsäure.....	147
Tab. 17:	HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten des Oleanolsäuremethylesters (Standard) .....	147
Tab. 18:	HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten des Oleanolsäuremethylesters (Metabolit 1) .....	148
Tab. 19:	HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten des Oleanonsäuremethylesters (Metabolit 2) .....	148
Tab. 20:	HPLC, HPLC-MS und HPLC-NMR Daten des Metabolits 3 .....	148
Tab. 21:	Kennzahlen zum Substratverlauf und der Produktbildung bei der Biotransformation von Oleanolsäure durch freie (FZ) und immobilisierte (IZ) <i>Nocardia iowensis</i> Zellen. Die Konzentrationen von Oleanolsäuremethylester, Oleanonsäuremethylester und Metabolite 3 wurden aus der Peakfläche der Oleanolsäure bei der Adsorption bei 205 nm ermittelt. $\Delta P$ ist die Summe aller maximalen Produktkonzentrationen, die aus dem Versuch hervorgegangen sind.....	151
Tab. 22:	Darstellung der Kenndaten betreffend der Substrataufnahme und der Produktbildung von immobilisierten <i>N. iowensis</i> Zellen im Pflanzenzellextrakt. Die maximale Transformationsrate wurde in den ersten fünf Kultivierungstagen detektiert. ....	161
Tab. A.2.1:	Zur Herstellung des Carbapenems OA-6129 verwendete <i>S. fulvoviridis</i> -Mutanten .....	188
Tab. A.2.2:	Verwendete Pflanzenzelllinien .....	188
Tab. A.2.3:	Mikroorganismen, die bei der Biotransformation von Ursol- und Oleanolsäure eingesetzt wurden. ....	188
Tab. B.2.1:	Zusammensetzung und Konzentrationen des Vorstufen-Komplexmediums 1 (VST-1). Zur Vermeidung der Maillard-Reaktion wird die Glucose getrennt von dem restlichen Medium autoklaviert. ....	190
Tab. B.2.2:	Zusammensetzung und Konzentration des variierten Vorstufen-Komplexmediums (VST-2). Zur Vermeidung der Maillard-Reaktion wird die Glucose getrennt von dem restlichen Medium autoklaviert.....	191
Tab. B.2.3:	Zusammensetzung und Konzentrationen des Hauptstufen-Komplexmediums (HST-1). ....	191

Tab. B.2.4: Zusammensetzung und Konzentrationen des variierten Hauptstufen-Komplexmediums (HST-2).....	191
Tab. B.2.5: Zusammensetzung und Konzentrationen der Spurenlösung und Vitamin B <sub>12</sub> , die in den Hauptstufenfermentationen verwendet wurden. ....	191
Tab. B.2.6: Zusammensetzung des Medium-1.....	192
Tab. B.2.7: Zusammensetzung des GYM-Mediums.....	192
Tab. B.2.8: Zusammensetzung und Konzentrationen des Kartoffel-Mediums.....	192
Tab. B.2.9: Zusammensetzung und Konzentrationen des LB-Mediums der Kulturplatten .....	193
Tab. B.2.10: Zusammensetzung und Konzentration des LS-Mediums für das Flüssig- als auch das Feststoffmedium .....	193
Tab. D.5.1: Ermittelte Leistungseinträge P und spezifische, volumetrische Leistungseinträge P/V für die verwendeten Rührkesselreaktoren (Arbeitsvolumen (AV) der 2 L und 6,7 L Bioengineering-Kaskade), für die installierten Rührergeometrien (Scheibenrührer und Intermig) bezogen auf die unterschiedlichen Rührerdrehzahlen. ....	201

## Anhang G Angaben zur Person

### Anhang G.1 Betreute Forschungs- und Studienarbeiten

- C. Seebach Vergleich verschiedener Carbapenem-produzierender Stämme im Labormaßstab, *keine Abgabe*
- P. Jung Nachweis und Analytik eines Carbapenems mittels dem Penicillin-bindenden Protein 2b, Kaiserslautern 2009
- T. Bonk Chromatographische Bestimmung von  $\beta$ -Lactamen nach DIN 32645 und ihre Anwendung zur Untersuchung von stofflichen Wechselwirkungen, Kaiserslautern 2010
- F. Duarte DAAD-Austauschprogramm, Untersuchungen zu Morphologieeinflüssen durch Magnetpartikel, Kaiserslautern 2010
- H. Fan Erhöhung der Stabilität von Imipenem in wässriger Lösung, Kaiserslautern 2010
- T. Ladner Fermentation von *Salvia officinalis* als Platten- und Suspensionskultur, Kaiserslautern 2012
- N. Wesuls Biotransformation von Triterpenen durch Einsatz verschiedener Transformationsstämme, Kaiserslautern 2012
- M. Thoma Kultivierungen von *Salvia officinalis* und Biotransformation von Triterpenen, *keine Abgabe*
- R. Shi Biotransformation von Triterpenen durch immobilisierte *Nocardia iowensis* Zellen, Kaiserslautern 2012
- J.-Y. Chung Biotransformation von Triterpenen mit immobilisierte Zellen von *Nocardia iowensis*, Kaiserslautern 2012
- K. Hirsch Aufarbeitung von Oleanolsäure und Ursolsäure, Kaiserslautern 2012
- K. Scheffler Trennung und Herstellung von Triterpenen, Kaiserslautern 2013

### Anhang G.2 Veröffentlichungen

1. B. Ludwig, D. Geib, C. Haas, T. Möhlmann, E. Neuhaus, J. Steingroewer, T. Bley, K. Muffler, R. Ulber (2014); Characterization of new metabolites from whole-cell biotransformation of oleanolic acid by free and immobilized cells of *Nocardia iowensis*; *Engineering in Life Science*; 15, 1; 108-115.
2. C. Haas, K.-C. Hengelhaupt, S. Kümritz, B. Ludwig, K. Muffler, R. Ulber, T. Möhlmann, E. Neuhaus, T. Bley, A. Pavlov, J. Steingroewer (2014); *Salvia* suspension cultures as production system for oleanolic and ursolic acid; *eingereicht*.

**Anhang G.3 Tagungsbeiträge**

1. A. Pasteur, B. Ludwig, S. Maurer, N. Tippkötter, P. Singer, Ch. Meyer, K. Gottschall, P. Kampeis, R. Diller, B. König, R. Ulber; (2010) Entwicklung selektiver Adsorbermaterialien zur Aufarbeitung von Lactamantibiotika; GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Bioprozessorientiertes Anlagendesign, Nürnberg \*Posterpreis\*
2. A. Pasteur, B. Ludwig, P. Singer, N. Tippkötter, C. Meyer, P. Kampeis, R. Diller, R. Ulber; (2011) Synthese magnetisierbarer Nanopartikel-Silicabeads zur Abtrennung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika aus Fermentationsmedien. NanoKat Frühjahrstagung, Kaiserslautern, Deutschland
3. A. Pasteur, B. Ludwig, S. Maurer, N. Tippkötter, P. Singer, Ch. Meyer, K. Gottschall, P. Kampeis, R. Diller, B. König, R. Ulber; (2010) Aufarbeitung von Lactamantibiotika mittels selektiver, magnetischer Adsorbermaterialien; DECHEMA-Jahrestagung, Aachen, Deutschland
4. A. Pasteur, B. Ludwig, M. Zhang, N. Tippkötter, J. Ernst, P. Singer, R. Diller, P. Kampeis, B. König, C. Meyer, R. Ulber; (2011) Purification of  $\beta$ -lactam antibiotics with magnetisable particle systems; European Congress of Chemical Engineering and Applied Biotechnology, Berlin, Deutschland
5. B. Ludwig, K. Muffler, D. Leipold, T. Möhlmann, E. Neuhaus, J. Steingroewer, C. Haas, T. Bley, R. Ulber; (2011) Production of biologically active triterpenes by biotransformation; European Congress of Chemical Engineering and Applied Biotechnology, Berlin, Deutschland
6. B. Ludwig, T. Hahn, K. Muffler, R. Ulber; (2011) Nachwachsende Rohstoffe als Quelle antiviraler Pharmawirkstoffe, Technologietag, Mainz, Deutschland
7. B. Ludwig, K. Muffler, D. Leipold, T. Möhlmann, E. Neuhaus, J. Steingroewer, C. Haas, T. Bley, R. Ulber; (2012) Biotransformation von bioaktiven Triterpenen; GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Biopharmazeutische Produktion, Freiburg, Deutschland



8. C. Haas, S. Schulz, K.-C. Hengelhaupt, T. Möhlmann, B. Ludwig, K. Muffler, E. Neuhaus, R. Ulber, T. Bley, J. Steingroewer; (2012) Oleanolic acid and ursolic acid production by *in vitro* cultures of *Salvia* species; GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Biopharmazeutische Produktion, Freiburg, Deutschland
9. B. Ludwig, K. Muffler, D. Leipold, T. Möhlmann, E. Neuhaus, J. Steingroewer, C. Haas, T. Bley, R. Ulber; (2012) Immobilisierung von *Nocardia iowensis* zur Biotransformation von bioaktiven Triterpenen; 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung, Karlsruhe, Deutschland
10. B. Ludwig, K. Muffler, D. Geib, T. Möhlmann, E. Neuhaus, J. Steingroewer, C. Haas, T. Bley, R. Ulber; (2013) Vergleich verschiedener Bioreaktorsysteme zur Kultivierung von Salbeizellkulturen; GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Frühjahrstagung der Biotechnologen 2013, Frankfurt, Deutschland
11. B. Ludwig, K. Muffler, D. Geib, T. Möhlmann, E. Neuhaus, J. Steingroewer, C. Haas, T. Bley, R. Ulber; (2013) Biotransformation von Triterpenen mittels *Nocardia iowensis*; GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie, Bad Wildungen, Deutschland
12. C. Haas, S. Schulz, B. Ludwig, K. Muffler, R. Ulber, T. Bley, J. Steingroewer; (2013) *Salvia* sp. *in vitro* cultures as source of oleanolic and ursolic acid; PSE Young Scientist Meeting "Trends in natural products research", Obergurgl, Österreich
13. C. Haas, S. Schulz, B. Ludwig, K. Muffler, R. Ulber, T. Bley, J. Steingroewer; (2013) Production of oleanolic and ursolic acid with a *Salvia fruticosa* suspension culture and their following biotransformation; International Conference on Natural Products Utilization, Bansko, Bulgarien

**Anhang G.4 Lebenslauf**Christoph Benjamin Ludwig**Hochschul- und Schulausbildung**

08/2009 bis 02/2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern  Dissertationstitel „Produktion von pharmakologischen Sekundärmetaboliten“
08/2008 bis 07/2009	Stipendium des Fachbereichs Maschinenbau und Verfahrenstechnik der Technischen Universität Kaiserslautern
08/2003 bis 04/2008	Studium der molekularen Biotechnologie, Universität Bielefeld, Abschluss Diplom (sehr gut)  Praktische Durchführung der Arbeit im Unternehmen Chr.Hansen, Prozessentwicklung, Nienburg  Arbeitstitel: „Untersuchung der Auswirkungen des Leistungseintrages auf die Chymosinbildung bei <i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> und Maßstabmodellierung eines 19 L-Fermenters“
04/2001 bis 08/2003	Studium der naturwissenschaftlichen Informatik, Universität Bielefeld, Abschluss Vordiplom
07/1999	Abitur

**Weitere Tätigkeiten**

01/2007 bis 03/2007	<b>Hilfswissenschaftler</b> , Universität Bielefeld
10/2005 bis 03/2006	<b>Hilfswissenschaftler</b> , Universität Bielefeld