

# Screening und Prozessentwicklung für die fed-batch Fermentation von *Hansenula polymorpha* im 16-fach Parallel-Bioreaktor



Figure 1: Fed-batch bioreactor, detailed view

## Projektziel

Unser industrieller Projektpartner verfügte über rekombinante Klone von *H. polymorpha*, die ein therapeutisch relevantes Protein exprimierten. Die Klone waren durch Versuche im Schüttelkolbenmaßstab als gute Produzenten identifiziert worden. Die Ergebnisse sollten aber im Hochzelldichteverfahren in einem Rührreaktorsystem unter produktionsnahen Bedingungen verifiziert werden, da Screening-Versuche im Schüttelkolbenmaßstab nicht ohne weiteres auf den Rührreaktor übertragbar sind. Die Ergebnisse aus dem Parallel-Bioreaktor sollten anschließend im 5-L Bioreaktor überprüft werden.

## Fermentationsstrategie und Ergebnisse

Das Wachstum der Kulturen in den 16 Parallelansätzen wurde durch Messung der  $OD_{600}$  verfolgt. Figure 2 zeigt das Fermentationsdiagramm für einen der 16 Ansätze. Nach 43-50 h wurden die Ansätze, die zu diesem Zeitpunkt eine  $OD_{600}$  von 125 bis 150 erreicht hatten, durch Änderung der Zufütterungsstrategie individuell in die Derepressionsphase überführt, in der Glycerin mit wachstumslimitierender Rate zugeführt wird. Nach 91 h wurden die Kulturen bei einer  $OD_{600}$  zwischen 221 und 451, was einem Biomassefrischgewicht von 160 bis 298  $g \cdot l^{-1}$  entspricht, geerntet. Während der Derepressionsphase gezogene Proben wurden durch Reversed-Phase HPLC auf ihren Gehalt an rekombinantem Protein untersucht (Fig. 3). Die beiden besten Klone wurden einer Fermentation im 5-L Maßstab (Biobench 7, Applikon dependable instruments, Schiedam, Niederlande) unterworfen, wobei die im Parallelbioreaktor ermittelten Wachstums- und Produktionscharakteristika verifiziert

wurden. Die Konzentration an rekombinantem Protein zum Erntezeitpunkt lag bei bis zu  $1,2 g \cdot l^{-1}$  nach RP-HPLC.

## Fazit

In nur einer Woche wurden acht verschiedene Expressionsstämme von *Hansenula polymorpha* im Doppelansatz in einem parallelen Bioreaktorsystem unter Einsatz industriell relevanter Fermentationsstrategien verglichen. Die Wachstums- und Produktionskinetiken der beiden besten Stämme konnten im 5-L Maßstab verifiziert werden. Das Projekt zeigt somit das Potenzial des Einsatzes von Parallelreaktoren zur Verkürzung der „time-to-market“.

## Hintergrund

Die DASGIP fed-batch pro Anlage (DASGIP AG, Jülich), wurde zur 16-fach parallel-Hochzelldichtefermentation der methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* eingesetzt. Diese Hefe ist als Expressionssystem für rekombinante Proteine etabliert und wird im industriellen Maßstab, z. B. für die Produktion von rekombinantem Hirudin eingesetzt.

Die am Fraunhofer IME/RWTH Aachen installierte DASGIP fed-batch pro Anlage verfügt über 16 Kulturgefäße. Die Belüftung kann über Kopfraumbegasung oder Einblasrohre erfolgen. Magnetische Rührer, deren Geschwindigkeit für jeweils vier Reaktoren individuell geregelt werden kann, sorgen für die Durchmischung. Die Temperatur kann ebenfalls für jeweils vier Gefäße individuell geregelt werden. Drei individuell steuer- und programmierbare Dosierstrecken ermöglichen komplexe Fermentationsstrategien.

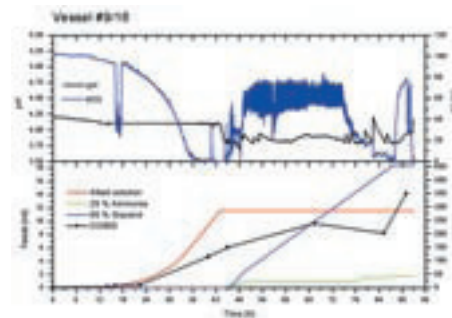


Figure 2: Fermentation history in one of 16 vessels in the DASGIP fed-batch pro device.