



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 299 380 A7

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 1/00
C 12 N 1/20
C 12 Q 3/00
C 12 R 1:19

DEUTSCHES PATENTAMT

(21)	DD C 12 N / 337 220 3	(22)	19.01.90	(45)	16.04.92
(71)	Akademie der Wissenschaften, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Deckwer, Wolf-Dieter, Prof.; Knorre, Wolfgang, Prof. Dr. sc. nat.; Korz, Dieter, Dipl.-Ing.; Pohl, Hans-Dieter, Dr.-Ing.; Riesenberg, Dieter, Dr. sc. nat.; Roß, Anton, Dr. rer. nat.; Sanders, Ernst, Dr. rer. nat.; Schulz, Volkmar, Dr. rer. nat., DE				
(73)	Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, O - 6900 Jena; Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, W - 3300 Braunschweig, DE				
(74)	Akademie der Wissenschaften, ZIMET, Beutenbergstraße 11, O - 6900 Jena, DE				
(54)	Verfahren zur Hochzelldichte-Fermentation von <i>Escherichia coli</i> in einem Rührkesselfermentor				

(55) mikrobiologisches Verfahren; *Escherichia coli*; Hochzelldichte-Fermentation; Rührkesselfermentor; Nährmedium mit organischer Kohlenstoffquelle; Glukose-Mineral Salz-Medium; abschnittsweise Fermentation; Batch-Abschnitt mit maximaler spezifischer Wachstumsrate; Fed-Batch-Abschnitt mit submaximaler spezifischer Wachstumsrate; Sauerstoffeintrag; Sauerstoffgehalt der Fermentorabluft

(57) Die Erfindung betrifft ein mikrobiologisches Verfahren zur Fermentation von *Escherichia coli*-Stämmen, darunter auch rekombinanten *E. coli*-Stämmen, zu hohen Biotrockenmassekonzentrationen. Sie verfolgt das Ziel, diese Syntheseleistungen in Rührkesselfermentoren bei möglichst effektiver Substratverwertung zu erreichen. Die dieser Zielstellung zugeordnete Aufgabe wird in der Weise gelöst, daß man die Fermentation der einbezogenen *E. coli*-Kultur unter aeroben Bedingungen in einem Medium mit einem Gehalt an Stickstoffquelle, organischer Kohlenstoffquelle und Mineralsalzen, vorzugsweise in einem Glukose-Mineral Salz-Medium wohldefinierter Zusammensetzung, abschnittsweise durchführt, wobei zuerst ein Batch-Abschnitt mit maximaler spezifischer Wachstumsrate und danach ein Fed-Batch-Abschnitt mit submaximaler spezifischer Wachstumsrate vorzusehen ist. Die jeweils gewünschte submaximale spezifische Wachstumsrate wird hierbei durch Variation des Sauerstoffeintrags eingestellt und durch Kontrolle des Sauerstoffgehalts der Fermentorabluft überwacht. Nach dem vorgeschlagenen Verfahren lassen sich *E. coli*-Kulturen mit großer Stabilität zu Biotrockenmassekonzentrationen im Hochzelldichte-Bereich fermentieren.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Hochzell-dichte-Fermentation von *Escherichia coli* in einem Rührkesselfermentor, **dadurch gekennzeichnet**, daß man in einem Medium mit einem Gehalt an Stickstoffquelle, organischer Kohlenstoffquelle sowie Mineralsalzen fermentiert und die Fermentation abschnittsweise durchführt, indem man
 - zuerst einen Batch-Abschnitt mit maximaler spezifischer Wachstumsrate sowie
 - danach einen Fed-Batch-Abschnitt mit submaximaler, über den Sauerstoffeintrag gesteuerter und/oder geregelter spezifischer Wachstumsrate vorsieht, wobei in diesem Abschnitt mit Magnesiumsulfat supplementierte Glukoselösung zugefüttert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Fed-Batch-Abschnitt ein zeitliches Profil für die submaximale spezifische Wachstumsrate vorgibt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Fed-Batch-Abschnitt als zeitliches Profil eine etwa konstante submaximale spezifische Wachstumsrate vorsieht.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den Fed-Batch-Abschnitt nach Erreichen des durch den Rührkesselfermentor vorgegebenen maximalen Sauerstoffeintrags mit einem Unterabschnitt beendet, bei dem die submaximale spezifische Wachstumsrate abfällt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man *E. coli* K12 oder einen Abkömmling davon und vorzugsweise *E. coli* TG 1 fermentiert.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man in Gegenwart von Supplinen fermentiert und Auxotrophien kompensiert.
7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man bei Thiamin-Auxotrophie des zu fermentierenden *E. coli*-K12-Stammes in Gegenwart von Thiamin fermentiert.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man *E. coli* TG 1 in Gegenwart einer Thiamin-Konzentration $\leq 4,5 \text{ mg/l}$ fermentiert.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - während der gesamten Fermentation den gasförmigen Sauerstoff nur mit Hilfe von Luft zuführt oder
 - zu Beginn der Fermentation den gasförmigen Sauerstoff mit Luft und später mit durch Sauerstoff angereicherter Luft oder reinem Sauerstoff zuführt.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als organische Kohlenstoffquelle Monosaccharide, Disaccharide und/oder Polyole verwendet.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als organische Kohlenstoffquelle Glukose, Saccharose, Lactose und/oder Glycerin verwendet.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Fed-Batch-Abschnitt zur Zufütterung eine Lösung obiger Beschaffenheit, die Glukose in einer Konzentration $\leq 700 \text{ g/l}$ sowie $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in einer Konzentration $\leq 19,2 \text{ g/l}$ enthält, sowie gegebenenfalls Antischaummittel verwendet.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man bei Verfahrensbeginn ein Nährmedium einsetzt, welches bereits alle Nährsubstrate für die Gesamtfermentation mit der Ausnahme enthält, daß zusätzlich zu der Festsetzung nach Anspruch 12 zur pH-Einstellung noch wäßrige Ammoniaklösung zugesetzt wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Nährmedium einsetzt, das qualitativ folgende Komponenten umfaßt: Glukose, Kaliumdihydrogenphosphat, Diammoniumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Eisenzitrat, Kobaltchlorid, Manganchlorid, Kupferchlorid, Borsäure, Natriummolybdat, Zinkacetat, Titriplex III und/oder Zitronensäure sowie ggf. Antischaummittel und ggf. Suppline zur Kompensation von Auxotrophien.
15. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Nährmedium verwendet, das folgende Komponenten umfaßt: Glukose ($\leq 50 \text{ g/l}$), KH_2PO_4 ($\leq 13,3 \text{ g/l}$), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\leq 4 \text{ g/l}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 1,2 \text{ g/l}$), Eisenzitrat ($\leq 60 \text{ mg/l}$), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 2,5 \text{ mg/l}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 15 \text{ mg/l}$), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 1,5 \text{ mg/l}$), H_3BO_3 ($\leq 3 \text{ mg/l}$), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 2,5 \text{ mg/l}$), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 8 \text{ mg/l}$), Titriplex III ($\leq 8,4 \text{ mg/l}$) und/oder Zitronensäure ($\leq 1,7 \text{ g/l}$) sowie ggf. Antischaummittel Ucolub N 115 ($\leq 0,1 \text{ ml/l}$).

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Bestandteile des Nährmediums in folgender Reihenfolge in den Fermentor einbringt:
 - zuerst Kaliumhydrogenphosphat, Diammoniumhydrogenphosphat und/oder Zitronensäure;
 - danach eine ggf. aus Stammlösungen angesetzte Lösung aus Kobaltchlorid, Manganchlorid, Kupferchlorid, Borsäure, Natriummolybdat, Zinkacetat und/oder Titriplex III,
 - danach Eisenzitrat,
 - danach ggf. Antischaummittel und danach sterilisiert.
17. Verfahren nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß man für die aus Stammlösungen angesetzte Lösung zuerst Titriplex III vorlegt.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß man nach Sterilisation der im Fermentor vorgelegten Lösung eine sterilisierte Lösung von Glukose und/oder Magnesiumsulfat in den Fermentor einbringt.
19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Batch-Abschnitt bei einem $pH \leq 7,5$, insbesondere im Bereich von 6,6 bis 6,9 und vorzugsweise bei etwa 6,8, fermentiert.
20. Verfahren nach Anspruch 13 und 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zur pH-Einstellung wäßrige Ammoniaklösung einer Konzentration $\leq 25\%$ verwendet.
21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Batch-Abschnitt mit Hilfe allmählicher Erhöhung der Rührerdrehzahl einen $pO_2 \geq 1\%$, vorzugsweise im Bereich von 5 bis 20% und insbesondere etwa 10%, einstellt.
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man nach beendetem Fed-Batch-Abschnitt zur submaximalen spezifischen Wachstumsrate des Fed-Batch-Abschnittes übergeht, indem man
 - entweder während eines Zeitraumes von 5 Minuten bis 60 Minuten die Rührerdrehzahl erniedrigt
 - oder während eines Zeitraumes von 0,5 Stunden bis 10 Stunden die Rührerdrehzahl konstant hält.
23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Fed-Batch-Abschnitt mit Hilfe der Glukosedosierung einen $pO_2 \geq 1\%$, vorzugsweise im Bereich von 5 bis 20% und insbesondere von etwa 10%, einstellt.
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Fed-Batch-Abschnitt mit Hilfe erhöhten Sauerstoffeintrags die gewünschte submaximale spezifische Wachstumsrate einstellt.
25. Verfahren nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Rührerdrehzahl, die Begasungsrate, den Druck und/oder den Sauerstoffgehalt der Luft erhöht oder mit Sauerstoff begast.
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Fed-Batch-Abschnitt die submaximale spezifische Wachstumsrate überwacht und mit ihrer Hilfe einen adäquaten Sauerstoffeintrag einstellt.
27. Verfahren nach Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die submaximale spezifische Wachstumsrate mit Hilfe des Sauerstoffgehalts der Fermentorabluft überwacht.
28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man im Fed-Batch-Abschnitt, nachdem der technisch maximal zu realisierende Sauerstoffeintrag erreicht worden ist, die Kultur mit Hilfe der pO_2 -Regelung durch Glukose-Dosierung bei sinkender submaximaler spezifischer Wachstumsrate weiterfermentiert.
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Konzentration an Biotrockenmasse variiert, indem man
 - das Verhältnis der Dauer des Batch-Abschnittes zur Dauer des Fed-Batch-Abschnittes und/oder
 - im Fed-Batch-Abschnitt die Höhe der konstant zu haltenden submaximalen spezifischen Wachstumsrate variiert.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hochzelldichte-Fermentation von E. coli-Stämmen, darunter solche, die sich als Wirte für Vektoren mit rekombinanten Expressionssystemen eignen.

Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt generell in jenen Industriezweigen einer Volkswirtschaft, die einen Biotechnologie-Sektor aufweisen und in diesem E. coli-Stämme als Produzentenorganismen einsetzen.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

E. coli wird häufig als zellulärer Wirt für die Bildung rekombinanter DNA-Produkte verwendet. Neben einer hohen intrazellulären Konzentration an dem gewünschten Produkt ist die Erzielung hoher Konzentrationen an Zellen im Fermentor eine entscheidende Voraussetzung für eine hohe Gesamtausbeute.

Bei der Kultivierung zu hohen Zelldichten im üblichen Rührkesselfermentor wird man mit den Problemen der Wachstumsinhibition durch zu hohe Substratanfangskonzentrationen, dem Verbrauch essentieller Nährmedienbestandteile im Verlaufe der Kultivierung, der Bildung von inhibitorisch wirkenden Nebenprodukten des Stoffwechsels und der begrenzten Kapazität der Sauerstoffzuführung konfrontiert.

Den steigenden Bedarf an Sauerstoff einer wachsenden E. coli-Kultur kann man durch verschiedene Strategien zu decken versuchen, nämlich: Steigerung der Rührerdrehzahl und der Begasungsrate, Zuführung von sauerstoffangereicherter Luft (Jung et al. 1986; Fass et al. 1989; Krüger 1989; Eppstein et al. 1989), Begasung mit reinem Sauerstoff (Bauer und Shiloach 1974; Shiloach und Bauer 1975; Bauer und White 1976; Bauer und Ziv 1976; Mori et al. 1979; Gleiser und Bauer 1981; Mitzutani et al. 1986; Baily et al. 1987; Pan et al. 1987; Krüger 1989), Kultivierung bei niedrigen Temperaturen (Shiloach und Bauer 1975; Bauer und White 1976; Bauer und Ziv 1976) und bei erhöhtem Druck (Tsai et al. 1987).

Mit überschüssigem Sauerstoff wurde E. coli in einem Glukose-Mineralsalzmedium bis zu 16,5g Biotrockenmasse X/l fermentiert (Reiling et al. 1985). Krüger (1989) und Eppstein et al. (1989) erreichten 19g X/l. Wachstum zu höheren Zelldichten erforderte eine Fed-Batch-Technik, um einerseits Inhibition und Limitation von Substanzen auszuschalten und andererseits die Bildung von inhibitorischen Nebenprodukten des Stoffwechsels zu verhindern. In allen Fällen war es erforderlich, neben der C-Quelle und Ammoniak als N-Quelle und pH-Regulator auch andere Nährstoffe zu dosieren. Unter Verwendung eines Glukose-Mineralsalzmediums erzielten Eppstein et al. (1989) durch zusätzliches Nachfüttern von Salzen 39g X/l. Fass et al. (1989) erreichten durch Dosierung von Glukoselösung, in der sich auch Magnesiumsulfat befand, zu einem vorgelegten Glukose-Mineralsalzmedium 45g X/l. Zusätzliches Nachfüttern von Salzen führte bei Pan et al. (1987) zu 95g X/l.

Anderer Fed-Batch-Fermentationen wurden in Glukose-Mineralsalzmedien durchgeführt, die vor deren Beimpfung zusätzlich Hefeextrakt oder autolyiertes Hefepulver enthielten. Ohne zusätzliches Nachfüttern während des Zellwachstums außer Glukose und Ammoniak wurden 38g X/l erhalten (Mori et al. 1979). Zusätzliches Dosieren von Salzen ergab höhere Biomassekonzentrationen mit 47g X/l (Bauer und White 1976), 55g X/l (Shiloach und Bauer 1975) und 68g X/l (Bauer und Ziv 1976). Zusätzliches Dosieren von Salzen, Spurenelementen und Vitaminen führte zu 70g X/l (Fieschko und Ritsch 1986). Sehr hohe Zelldichten von 110g X/l (Cutayar und Poillon 1989) und 125g X/l (Mori et al. 1979) konnten durch ein komplexes Nachfüttern von Salzen, Hefeextrakt und Spurenelementen zusätzlich zur üblichen Dosierung von Glukose und Ammoniak erhalten werden. Eine weitere Supplementierung eines Glukose-Mineralsalzmediums, das vor der Beimpfung schon Hefeextrakt enthielt, mit Bactotrypton oder Pepton sowie die Zudosierung dieser komplexen Substrate während der Fermentation führte zu keiner weiteren Erhöhung der Biomassekonzentration (Bailey et al. 1987; Tsai et al. 1987). Sehr hohe Biomassenkonzentrationen von 80 bis 105g X/l (Eppstein et al. 1989) wurden durch Kombination der obenbeschriebenen Fed-Batch-Technik (Dosierung von Glukose und Salzen) durch Begasung mit sauerstoffangereicherter Luft erzielt. Krüger (1989) erzielte durch Begasung mit reinem Sauerstoff 112g X/l.

Die obenbeschriebenen Verfahren sind alle mit dem Nachteil behaftet, daß sie sehr komplexe Nachfütterungs-Systeme darstellen. Die Zugabe aller zusätzlichen Nährstoffe außer Glukose oder mit Magnesiumsulfat versetzter Glukose und Ammoniak bedingen spezielle Nährsubstratdosierungen, die entweder nur zeitweise Zugaben oder zeitgesteuerte Zugabephasen beinhalten. Diese betrifft auch den Einsatz des gasförmigen Substrates Sauerstoff.

Eine Abkehr von derart komplexen Nachfütterungssystemen war dann erstmals mit dem Verfahren zur E. coli-Hochzelldichte-Kultivierung von T. MATSUI et al. (Agric. Biol. Chem. 1989, 53 [8], 2115-20; Pat-JP 63.157.974) möglich, d. h., in Verbindung mit dieser Verfahrenslösung konnte erstmals ein (Ausgangs-) Nährmedium mit hinreichend kompletter Ausstattung an Mineralsalz- sowie Spurenmetall-Ionen angegeben werden, so daß nunmehr Fermentationen zu hohen Zelldichten unter alleiniger Zudosierung von Glukose und Ammoniumwasser durchführbar wurden (bis zu Biomasse-Konzentrationen von 134g X/l). Mit diesem Verfahren können jedoch noch keine längeren Fed-Batch-Fermentationsabschnitte mit konstanter spezifischer Wachstumsrate $\mu < \mu_{max}$ realisiert werden (vgl. die nachstehenden Darlegungen), die keinerlei rückgekoppelte Kontrolle dieses Zustandsparameters angestrebt wird. Für den Prozeß von MATSUI et al. ist weiterhin nachteilig, daß die Kohlenstoff-Quelle in Form von Pulver nachzufüttern ist, was den Einsatz von speziell zu fertigender Dosierungstechnik erfordert. Auch unter dem Aspekt seiner Gesamt-Effektivität läßt dieses Hochzelldichte-Verfahren noch Wünsche offen, denn die Mineralsalz- und Spurenmetall-Ionen sind in außerordentlich hohen Ausgangskonzentrationen bereitzustellen, und während der Fermentation wird der Übergang zur Begasung mit purem Sauerstoff unvermeidlich.

E. coli-Zellen, die als Wirte für Vektoren dienen und somit zur Bildung rekombinanter DNA-Produkte verwendet werden, müssen dem einzusetzenden Expressionssystem für das rekombinante Produkt adäquat fermentiert werden. Dies bedeutet, daß E. coli-Wirte mit anschaltbaren Expressionssystemen zunächst zu hohen Zelldichten fermentiert werden und dann die Anschaltung der rekombinanten DNA-Expression vorgenommen wird. Für E. coli sind auch eine Reihe homologer und heterologer Expressionssysteme, die konstitutiv sind bzw. bei denen die Expression bei niedrigeren spezifischen Wachstumsraten höher ist als bei der im jeweiligen Nährmedium maximal möglichen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} , bekannt. Die spezifische Wachstumsrate ist wie folgt definiert:

$$\mu = 1/X \cdot dX/dt.$$

Es sind einige Lösungen bekannt, mit denen ein Wachstum von *E. coli* mit $\mu < \mu_{max}$ realisiert wurde. So erreichten Zabriskie und Arcuri (1986) durch die Zufütterung der Kohlenstoffquelle zur Fermentationslösung mit einer konstanten Rate, die geringer war als diejenige, die zu μ_{max} geführt hätte, daß die Kultur mit $\mu < \mu_{max}$ wuchs. Nachteil dieser Vorgehensweise ist jedoch, daß sich μ ständig ändert. Bei Konstanthaltung der Dosierungsrate über den gesamten Fed-Batch-Prozeß würde μ ständig fallen. Allen und Luli (1985) entwickelten eine Strategie, mit der die spezifische Wachstumsrate μ mit zunehmender Zelldichte von Zeit zu Zeit durch Einstellung neuer Zufütterungsraten der Kohlenstoffquelle zeitweise neu eingestellt wurde. Diese Strategie impliziert den Nachteil, daß sich μ in einem Toleranzbereich, der von der Häufigkeit der Off-line-Messungen von Glukose und Zelldichte abhängt, ständig ändert, obwohl ein Wachstum mit $\mu < \mu_{max}$ erzwungen wird. Änderungen in der spezifischen Wachstumsrate ziehen Unstetigkeiten im Stoffwechsel nach sich und können destabilisierend wirken, insbesondere dann, wenn es zur Bildung von inhibitorisch wirkenden Nebenprodukten des Metabolismus kommt.

Um ein Wachstum mit konstantem μ zu realisieren, wurde von Lee und Mohler (1989) eine kontrollierte Wachstumsraten-Fermentation vorgestellt. Kernstück der Vorgehensweise ist die ständige Messung des von den Zellen während des Wachstums gebildeten Kohlendioxides, die hieraus per Computer berechnete jeweilige aktuelle Wachstumsrate und die sofortige Realisierung der zur Aufrechterhaltung der Soll-Wert-Wachstumsrate notwendigen Einstellung der Dosierate der Kohlenstoffquelle mit der gekoppelten Zufütterung der C-Quelle. Auf diese Weise gelang Lee und Mohler (1989) die Kultivierung von *E. coli* mit annähernd konstantem $\mu < \mu_{max}$ im Bereich der Zelldichten von 0,3 bis 80 g X/l (EP 0315944 A2). Die Strategie der Konstanthaltung von μ über die Meßgröße CO_2 beinhaltet aber prinzipiell den Nachteil, daß CO_2 nicht in allen Fällen ein wachstumskorreliertes Signal ist. Dies trifft vor allem dann zu, wenn Umstellungen im Stoffwechsel stattfinden oder anaplerotische Biosynthesewege von den Zellen genutzt werden, was besonders bei sehr hohen Zelldichten und Kohlenstoffmangel auftreten kann. Ein weiterer Nachteil der Vorgehensweise von Lee und Mohler besteht darin, daß nach Ausschöpfung aller Möglichkeiten zur Erhöhung des Sauerstoffeintrages im jeweils verwendeten Fermentorsystem das Wachstum schnell abbricht, da die Gelöstsauerstoffkonzentration sofort abfällt. Nach der Wachstumsphase mit $\mu = const < \mu_{max}$ ist somit eine spürbare Verlängerung des Wachstums zur weiteren Steigerung der Zelldichte mit $\mu < \mu_{max}$ bei ständig fallenden μ nicht möglich. Des weiteren ist die Gelöstkohlendioxidkonzentration im eingestellten pH-Bereich sehr stark vom pH-Wert abhängig; kleine pH-Änderungen wirken sich negativ auf das Meßsignal aus und können zu einer Verfälschung der μ -Berechnung führen.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, *E. coli*-Populationen in Rührkesselfermentatoren bei effektiverer Substratverwendung zu sehr hohen Zelldichten zu fermentieren.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein unaufwendig durchführbares Verfahren zu beschreiben, nach dem *E. coli*-Stämme in Rührkesselfermentoren bei effektiver Substratverwendung zu hohen Zelldichten fermentiert werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Hochzelldichte-Fermentation von *Escherichia coli* im Rührkesselfermentor gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man in einem Medium mit einem Gehalt an Stickstoffquelle, organischer Kohlenstoffquelle und Mineralsalzen fermentiert und die Fermentation abschnittsweise durchführt, indem man

- zuerst einen Batch-Abschnitt mit maximaler spezifischer Wachstumsrate und
- danach einen Fed-Batch-Abschnitt mit submaximaler, über den Sauerstoffeintrag gesteuerter und/oder geregelter spezifischer Wachstumsrate vorsieht, wobei in diesem Abschnitt mit Magnesiumsulfat supplementierte Glukoselösung zugefüttert wird.

Gemäß einer speziellen Ausführungsform kann man im Fed-Batch-Abschnitt eine etwa konstante submaximale spezifische Wachstumsrate vorsehen. Ferner kann der Fed-Batch-Abschnitt nach Erreichen des durch den Rührkesselfermentor vorgegebenen maximalen Sauerstoffeintrags mit einem Unterabschnitt beendet werden, bei dem die spezifische Wachstumsrate abfällt.

Seit dem 26.11.1973 liegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen eine Hinterlegung vor für den Stamm *E. coli* K 12 (Reg.-Nr. DSM 498); der Stamm *E. coli* TG 1 hingegen ist vorveröffentlicht bei Carter et al. (1985), *Nucleic Acids Res.* 13: 4431-4443.

Man kann die Fermentierung in Gegenwart von Supplinen vornehmen und dadurch Auxotrophien kompensieren. Liegt eine Thiamin-Auxotrophie vor, so kann man den *E. coli*-Stamm in Gegenwart von Thiamin fermentieren. Beispielsweise kann man *E. coli* TG 1 in Gegenwart einer Thiamin-Konzentration $\leq 4,5$ mg/l fermentieren.

Es ist möglich, während der gesamten Fermentation den gasförmigen Sauerstoff nur mit Hilfe von Luft zuzuführen. Man kann jedoch den gasförmigen Sauerstoff auch zuerst mit Hilfe von Luft zuführen und danach mit Sauerstoff angereicherte Luft oder Sauerstoff verwenden.

Als organische Kohlenstoffquelle kann man vorzugsweise Monosaccharide, Disaccharide und/oder Polyole, Glucose, Saccharose, Lactose und/oder Glycerin verwenden. Gemäß einer speziellen Ausführungsform des vorgeschlagenen Verfahrens kann man im Fed-Batch-Abschnitt mit Magnesiumsulfat (beispielsweise einer Konzentration $\leq 19,2$ g $MgSO_4 \cdot 7H_2O/l$) supplementierte Glukoselösung (beispielsweise einer Konzentration ≤ 700 g/l) und ggf. Antischaummittel verwenden.

Gemäß einer weiteren speziellen Ausführungsform kann das in das vorgeschlagene Verfahren eingesetzte Nährmedium bereits alle Nährsubstrate für die gesamte Fermentation mit den Ausnahmen enthalten, daß

- wässrige Ammoniaklösung (beispielsweise einer Konzentration $\leq 25\%$) zur pH-Einstellung zudosiert wird,
- im Fed-Batch-Abschnitt mit Magnesiumsulfat (beispielsweise einer Konzentration $\leq 19,2$ g $MgSO_4 \cdot 7H_2O/l$) supplementierte Glukoselösung (beispielsweise einer Konzentration ≤ 700 g/l) zudosiert wird und
- ggf. Antischaummittel, beispielsweise Ucolub N 115 (Brenntag Mineraloel GmbH, BRD), zudosiert wird.

Das in das vorgeschlagene Verfahren eingesetzte Nährmedium kann qualitativ beispielsweise folgende Komponenten umfassen:

Glukose, Kaliumdihydrogenphosphat, Diammoniumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Eisenzitat, Kobaltchlorid, Manganchlorid, Kupferchlorid, Borsäure, Natriummolybdat, Zinkacetat, Titriplex III (Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz; Fa. Merck, BRD) und/oder Zitronensäure sowie ggf. Antischaummittel und ggf. Suppline zur Kompensation von Auxotrophien.

Insbesondere kann das eingesetzte Nährmedium beispielsweise folgende Komponenten umfassen: Glukose (≤ 50 g/l), KH_2PO_4 ($\leq 13,3$ g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (≤ 4 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 1,2$ g/l), Eisenzitat (≤ 60 mg/l), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 2,5$ mg/l), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (≤ 15 mg/l), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 1,5$ mg/l), H_3BO_3 (≤ 3 mg/l), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\leq 2,5$ mg/l), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (≤ 8 mg/l), Titriplex III ($\leq 8,4$ mg/l) und/oder Zitronensäure ($\leq 1,7$ g/l) sowie ggf. Antischaummittel Ucolub N 115 ($\leq 0,1$ ml/l).

Zur Durchführung des vorgeschlagenen Verfahrens kann man die Bestandteile des Nährmediums in folgender Reihenfolge in den Fermentor einbringen:

- zuerst Kaliumdihydrogenphosphat, Diammoniumhydrogenphosphat und/oder Zitronensäure;
- danach eine ggf. aus Stammlösung angesetzte Lösung von Kobaltchlorid, Manganchlorid, Kupferchlorid, Borsäure, Natriummolybdat, Zinkacetat und/oder Titriplex III,
- danach Eisenzitat,
- danach ggf. ein Antischaummittel,

wonach man sterilisiert.

Für die aus Stammlösungen angesetzte Lösung kann man zuerst Titriplex III vorlegen.

Nach Sterilisation der im Fermentor vorgelegten Lösung kann man eine sterilisierte Lösung von Glukose und/oder Magnesiumsulfat in den Fermentor einbringen.

Nach der Beimpfung des Nährmediums kann vor dem Batch-Abschnitt eine lag-Phase auftreten.

Im Batch-Abschnitt kann man beispielsweise bei einem $\text{pH} \leq 7,5$, insbesondere im Bereich von 6,6 bis 6,9 und vorzugsweise bei etwa 6,8, fermentieren. Die Einstellung des pH -Wertes kann mit wässriger Ammoniaklösung (einer Konzentration von beispielsweise $\leq 25\%$) erfolgen.

Gemäß einer speziellen Ausführungsform des vorgeschlagenen Verfahrens kann man im Batch-Abschnitt durch allmähliche Erhöhung der Rührerdrehzahl einen $\text{pO}_2 \geq 1\%$, vorzugsweise im Bereich von 5 bis 20% und insbesondere etwa 10%, einstellen.

Nach beendetem Batch-Abschnitt kann man zur submaximalen spezifischen Wachstumsrate des Fed-Batch-Abschnitts dadurch übergehen, daß man

- entweder die Rührerdrehzahl erniedrigt, beispielsweise im Bereich von 5 bis 60 min,
- oder die Rührerdrehzahl konstant hält, beispielsweise im Bereich von 0,5 bis 10 h.

Im Fed-Batch-Abschnitt kann man mit Hilfe der Glukosedosierung einen $\text{pO}_2 \geq 1\%$, vorzugsweise im Bereich von 5 bis 20% und insbesondere von etwa 10%, einstellen.

Auch kann man im Fed-Batch-Abschnitt die gewünschte submaximale spezifische Wachstumsrate mit Hilfe erhöhten Sauerstoffeintrags einstellen. Dazu kann man die Rührerdrehzahl, die Begasungsrate, den Druck und/oder den Sauerstoffgehalt der Luft erhöhen oder mit Sauerstoff begasen.

Wenn man beim Fed-Batch-Abschnitt die submaximale spezifische Wachstumsrate überwacht, kann man mit ihrer Hilfe einen adäquaten Sauerstoffeintrag einstellen. Die submaximale spezifische Wachstumsrate läßt sich vorzugsweise mit Hilfe des Sauerstoffgehalts der Fermentorabluft überwachen.

Gemäß einer speziellen Ausführungsform des vorgeschlagenen Verfahrens kann man die Kultur im Fed-Batch-Abschnitt, nachdem der technisch maximal zu realisierende Sauerstoffeintrag erreicht worden ist, mit Hilfe der pO_2 -Regelung durch Glukose-Dosierung bei sinkender submaximaler spezifischer Wachstumsrate weiterfermentieren.

Der Vollständigkeit halber sei auch angemerkt, daß man die Konzentration an Biotrockenmasse dadurch variieren kann, daß man

- das Verhältnis der Dauer des Batch-Abschnitts zur Dauer des Fed-Batch-Abschnitts und/oder
- im Fed-Batch-Abschnitt die Höhe der etwa konstant zu haltenden submaximalen spezifischen Wachstumsrate variiert. So können mindestens etwa 95 g X/l, beispielsweise bei einer Kultivierung von *E. coli* TG 1 bei $\mu = 0,107 \text{ 1/h} = \text{const}$, im Fed-Batch-Abschnitt erreicht werden.

Nachdem für das jeweilige Fermentorsystem die Sauerstoffeintragsleistung nicht mehr gesteigert werden kann, erlaubt überraschender Weise das vorliegende Verfahren ein weiteres Wachstum; allerdings bei fallendem μ ohne eintretenden Mangel an Sauerstoff für die Zellen in der Kulturlösung mittels der vorliegenden pO_2 -Regelung. In dem oben beschriebenen Medium wurde auf diese Weise mit *E. coli* TG 1 eine Biotrockenmassekonzentration von mindestens 110 g X/l erhalten, wobei das Endvolumen zu 76% des Fermentornettovolumens nicht überschritten wird.

Nachstehend wird die Erfindung durch eine Figur und ein Ausführungsbeispiel näher erläutert.

Ausführungsbeispiel

Das Hochzelldichte-Fermentationsverfahren soll am Beispiel der Kultivierung von *E. coli* TG 1 im 72-l-Fermentor (B. Braun Melsungen AG, Typ 8015.1.01) näher beschrieben werden.

Die zu beimpfende Nährlösung von 37 l enthielt folgende Bestandteile: Glukose (25 g/l), KH_2PO_4 (13,3 g/l), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (4 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,2 g/l), Eisen-(III)-zitat (60 mg/l), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,5 mg/l), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (15 mg/l), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,5 mg/l), H_3BO_3 (3 mg/l), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,5 mg/l), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8 mg/l), Thiamin (4,5 mg/l), Titriplex III (8,4 mg/l), Zitronensäure (1,7 g/l) und Ucolub N 115 (0,1 ml/l). Die Zubereitung dieser Nährlösung wurde folgendermaßen vorgenommen: Zunächst wurden 148 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 492,1 g KH_2PO_4 und 62,9 g Zitronensäure als Trockensubstanz in ca. 30 l deionisiertem Wasser im Fermentor gelöst; dann folgten der Zusatz von 257,4 ml Spurengemischlösung, der Zusatz einer Eisen(III)-zitratlösung (2,22 g Eisen(III)-zitat in 300 ml) und von 3,7 ml Ucolub N 115. Die Spurengemischlösung wurde aus Stammlösungen in nachfolgender

Weise hergestellt: 62,2 ml Titriplex III (5 g/l), 34,3 ml $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,7 g/l), 34,7 ml $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,6 g/l), 34,7 ml $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (16 g/l), 27,8 ml H_3BO_3 (4 g/l), 30,8 ml $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l) und 32,9 ml $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (9 g/l). Die Lösung im Fermentor wurde auf übliche Weise sterilisiert. Anschließend wurden zur Komplettierung noch separat sterilisierte Glukoselösung (1,0175 kg Glukosemonohydrat in 2,5 l H_2O), sterilisierte Magnesiumsulfatlösung (44,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 1 l H_2O), steriltfiltrierte Thiaminlösung (166,5 mg in 100 ml H_2O) zugesetzt, der pH-Wert mit wässriger Ammoniaklösung (25%) auf 6,8 eingestellt, und schließlich mit sterilem H_2O bis zum Erreichen von 36,8 l aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Beimpfung mit 200 ml einer aufgetauten Glycerin-Kulturkonserve (20% v/v) von *E. coli* TG 1.

Die Kultivierung von *E. coli* TG 1 wurde bei einer Temperatur von 28°C, einem Druck von 1,5 bar, einem pH-Wert von 6,8 und einer Begasungsrate von 85 l/min vorgenommen. Der pH-Wert wurde während der gesamten Fermentation durch geregelte Dosierung von 25% NH_3 konstant gehalten. In Abb. 1 sind die zeitlichen Verläufe der Rührerdrehzahl, der Konzentration der Biotrockenmasse X, der Glukosekonzentration und der Gelöstsauerstoffkonzentration dargestellt.

Im Batch-Abschnitt der Hochzelldichte-Fermentation wuchs die Kultur nach der Beimpfung zum Zeitpunkt $t = 0$ nach einer kurzen lag-Phase von ca. 2 h mit maximaler spezifischer Wachstumsrate ($\mu_{\text{max}} = 0,456$ 1/h). Nach Erreichen des Wertes von 10% wurde der pO_2 durch geregelte Erhöhung der Rührerdrehzahl im weiteren Verlauf konstant gehalten. Nach Verbrauch der zu Beginn vorgelegten Glukose war der Batch-Abschnitt beendet. Der pO_2 stieg drastisch an. Danach erfolgte keine weitere Regelung des pO_2 über die Rührerdrehzahl. Zur Absenkung der spezifischen Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 0,456$ auf $\mu = 0,11$ 1/h wurde die Rührerdrehzahl von 420 U/min auf 250 U/min im Zeitraum von 30 Minuten abgesenkt. Anschließend wurde die pO_2 -Regelung über die Dosierung von mit Magnesiumsulfat (19,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /l) supplementierter Glukoselösung (700 g/l) in Betrieb genommen. Die Konstanzhaltung von μ in der Phase 1 des Fed-Batch-Abschnittes erfolgte durch Erhöhung des Sauerstoffeintrages. Zu diesem Zweck wurde die Drehzahl über einen PI-Regler mit der Regelgröße μ gestellt. Die spezifische Wachstumsrate wurde indirekt aus der Sauerstoffbilanz des Systems nach folgender Formel ermittelt:

$$\mu(t) = \frac{Q_{O_2}(t)}{K + \int_{t_0}^t Q_{O_2}(r) dr}$$

wobei: Q_{O_2} die Sauerstoffverbrauchsrate und

K der Quotient aus der Biotrockenmassekonzentration zum Zeitpunkt t_0 und dem Ertragskoeffizienten für Sauerstoff sind.

Am Ende der ersten Phase des Fed-Batch-Abschnittes wurde eine Konzentration an Biotrockenmasse von 95 g/l erreicht. Aufgrund des nicht mehr erhöhbaren Sauerstoffeintrages in die Kulturlösung nach Erreichen der technisch maximal möglichen Rührerdrehzahl wuchs die Kultur in der Phase 2 des Fed-Batch-Abschnittes dann mit ständig fallendem μ . Am Ende dieser Phase und somit zu Fermentationsabschluß konnte eine Biotrockenmasse von 110 g X/l erhalten werden.

Literatur

- Allen, B.R., und Luli, G.W. (1985) A gradient-feed process for obtaining high cell densities for recombinant *E. coli*. Zitiert in Lee und Mohler: EP 0315944 A2
- Bailey, F.J., Blankenship, J., Condra, J.H., Malgetter, R.Z., Ellis, R.W. (1987) High-cell-density fermentation studies of a recombinant *E. coli* that expresses atrial natriuretic factor. *J. Industrial Microbiol.* 2: 47-52
- Bauer, S., Shiloach, I. (1974) Maximal exponential growth rate and yield of *E. coli* obtainable in a bench-scale fermentor. *Biotechn. Bioeng.* 16: 933-941
- Bauer, S., White, M.D. (1976) Pilot scale exponential growth of *Escherichia coli* W to high cell concentration with temperature variation. *Biotechn. Bioeng.* 18: 839-846
- Bauer, S., Ziv, E. (1976) Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. *Biotechn. Bioeng.* 18: 81-94
- Cutayar, J.M., Poillon, D. (1989) High cell density culture of *E. coli* on a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. *Biotechnol. Lett.* 11: 155-160
- Eppstein, L., Shevitz, J., Yang, X.M., und Welsø, S. (1989) Increased biomass production in a benchtop fermentor. *Bio/Technology* 7: 1178-1181
- Fass, R., Clem, T.R., Shiloach, J. (1989) Use of a novel air separation system in a fed-batch fermentative culture of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1305-1307
- Fleschko, J., Ritsch, T. (1986) Production of human alpha consensus interferon in recombinant *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Comm.* 45: 229-240
- Gleisner, I.E., Bauer, S. (1981) Growth of *E. coli* to high cell concentration by oxygen level linked control of carbon source concentration. *Biotechn. Bioeng.* 23: 1015-1021
- Jung, G., Deneffe, P., Becquart, J., Mayaux, J.F. (1988) High cell density fermentation studies of recombinant *Escherichia coli* strains expressing human Interleukin-1 β . *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 139: 129-146
- Krüger, B. (1989) Ausbeutesteigerung in der Fermentation durch Computereinsatz. *BioTec Meßtechnik*, Okt. 65-67
- Lee, S., und Mohler, R.D. (1989) Controlled growth rate fermentation. EP 0315944 A2
- Mizutani, S., Mori, H., Shimizu, S., Sakaguchi, K., Kobayashi, T. (1986) Effect of amino acid supplement on cell yield and gene product in *Escherichia coli* harboring plasmid. *Biotechn. Bioeng.* 28: 204-209
- Mori, H., Yano, T., Kodayashi, T., Shimizu, S. (1979) High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-stat. *J. Chem. Eng.* 12: 313-319
- Pan, J.G., Rhee, J.S., Lebeault, J.M. (1987) Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* 9: 89-94
- Reiling, H.E., Laurila, H., Fiechter, A. (1985) Mass culture of *Escherichia coli*: Medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. *J. Biotechnol.* 2: 191-206
- Shiloach, J., Buer, S. (1976) High-yield growth of *E. coli* at different temperature in a bench scale fermentor. *Biotechn. Bioeng.* 17: 227-239
- Tsai, L.B., Mann, M., Morris, F., Rotgers, C., Fenton, D. (1987) The effect of organic nitrogen and glucose on the production of recombinant human insulinlike growth factor in high cell density *Escherichia coli* fermentations. *J. Industrial Microbiol.* 2: 181-187
- Zabriskie, D.W. and Arcuri, E.J. (1986) Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 706-717

Abb. 1: Hochzellidichte-Fermentation

