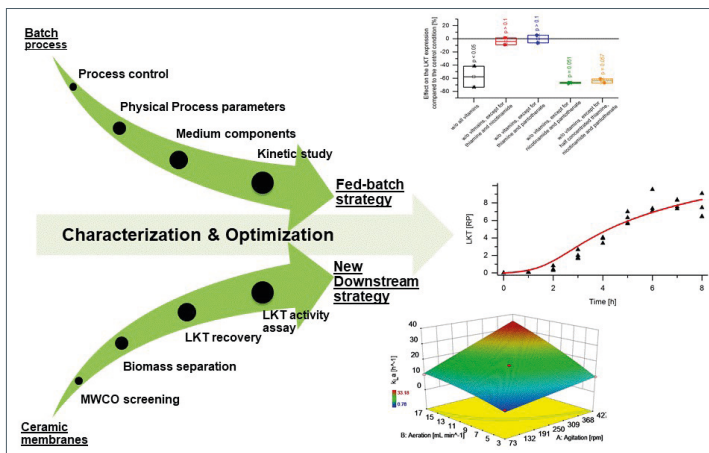


Tobias Oppermann

Mannheimia haemolytica – Bioprocess improvement of leukotoxin production using a fed-batch process and a ceramic membrane based downstream strategy



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie | Band 6

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

***Mannheimia haemolytica* - Bioprocess improvement
of leukotoxin production using a fed-batch process
and a ceramic membrane based downstream
strategy**

Dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des Grades:

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Dissertation vorgelegt von:

Tobias Oppermann

geboren in Göttingen

Gießen, 2018

Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) durch den Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Rühl

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 9

Tobias Oppermann

***Mannheimia haemolytica* – Bioprocess improvement
of leukotoxin production using a fed-batch process
and a ceramic membrane based downstream strategy**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Aachen 2018

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2018

Copyright Shaker Verlag 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-6234-2

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

“The best way to predict the future is to create it.”

Abraham Lincoln

Acknowledgments

Even if sometimes, while infinite hours of lab work, thinking or writing one can feel alone, a Ph.D. thesis is not a lonely journey. It is a path full of people, inspiring guides and mentors, challenges and obstacles, ups and downs, and of knowledge and experience. There are many people that in different ways have contributed to this journey and I have to thank each of them for the guidance, help, and inspiration that they gave to me.

First and foremost, I want to thank my supervisor team Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak and Dr. Nadine Busse for their outstanding guidance, inspiration, and motivation throughout my research. I learned much more than scientific concepts from them and both contributed significantly to my professional and personal development. I could not have imagined having better supervisors for my Ph.D. thesis. In addition, I am very grateful to Prof. Dr. Martin Ruehl for supporting this Ph.D. Thesis and accepting to be my second reviewer.

Furthermore, this Ph.D. thesis greatly benefited from regular exchanges with Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., St. Joseph MO, USA. I enjoyed many stimulating discussions with Dr. Bernd Eichenmueller, Dr. Fuad Haddadin, and Dr. Alexander Brix on various topics related to large scale vaccine development and manufacturing. Their advice and encouragement were greatly appreciated and I would like to express my sincere gratitude for the trust they have placed in my work and knowledge.

Special thanks go to Stefan Schwarz, Christian Finger, Harry Brakowski, and Andreas Neubrech who helped me to accomplish this Ph.D. thesis. Being their supervisor for the Bachelor/Master theses was a unique experience and I would not trade it for any money in the world.

I naturally want to thank my colleagues for the great working environment, friendly atmosphere, and support during all these years. They ensured that I was constantly motivated and entertained along the way.

I would also like to express my gratitude to the Hessen State Ministry of Higher Education, Research and the Arts for the financial support within the Hessen initiative for scientific and economic excellence (LOEWE). In addition, I thank Mann+Hummel GmbH, Ludwigsburg, Germany for providing the ceramic hollow fiber membranes.

Last but not least, it would have been impossible to arrive until this point of my journey without the love of my family and friends and therefore, this Ph.D. thesis is dedicated to them.

Zusammenfassung

Die Atemwegserkrankung von Rindern (BRD) ist in der Rinderzuchtindustrie die wirtschaftlich bedeutendste Krankheit mit sehr hohen jährlichen finanziellen Verlusten. *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) ist dabei als primärer bakterieller Krankheitserreger eingestuft und das produzierte Leukotoxin (LKT) ist der Hauptvirulenzfaktor. Impfstoffe, basierend auf dem Kulturüberstand von *M. haemolytica* (LKT als immunstimulierendes Antigen), sind seit den 1980ziger Jahren kommerziell erhältlich und bieten den vielversprechendsten Ansatz um BRD Ausbrüche einzudämmen. Sehr geringe LKT Ausbeuten deuten auf mangelnde wissenschaftliche Grundlagen über die optimalen Prozessbedingungen und Mediums-Anforderungen von *M. haemolytica* zur LKT Produktion hin.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Steigerung der LKT Ausbeute in der Impfstoffproduktion und die Entwicklung einer Aufreinigungsstrategie basierend auf keramischen Membranen. Zur Überwindung der Wissenslücken wurde ein kommerziell erhältlicher *M. haemolytica* Stamm verwendet. Um einen praktikablen, reproduzierbaren und robusten LKT Produktionsprozess sicher zu stellen wurden die Effekte der kritischen physikalischen Prozessparameter (pH, Temperatur, Animpfzellichte, Rührergeschwindigkeit und Begasungsrate) charakterisiert. Die Prozesskontrolle des pH- und gelöst Sauerstoff-Levels war notwendig um die Biomasse und LKT Produktion zu maximieren und gleichzeitig einen inhibitorischen pH Drift, aufgrund der Produktion von Essigsäure als Hauptstoffwechselnebenprodukt, zu vermeiden. Weiterhin führte die Begasung mit Luft zu einer starken Schaumbildung und einem damit verbundenen signifikanten Verlust des Arbeitsvolumens. Die Schaumbildung konnte durch anpassen der Rührergeschwindigkeit und Begasungsrate minimiert werden. Durch Zugabe von Antifoam C konnte die Schaumbildung komplett unterbunden werden, allerdings mit negativen Effekten für den Aufreinigungsprozess. Neben den physikalischen Prozessparametern hatte vor allem die Optimierung des Fermentationsmediums einen bedeutenden Einfluss auf die LKT Produktion.

Zusammenfassung

Das allgemein verwendete RPMI-1640 Medium war nicht in der Lage das Wachstum und die LKT Produktion optimal zu unterstützen. Aus diesem Grund war die Supplementierung mit Komplexmedium notwendig. Besonders die geringen Konzentrationen an Glucose und Aminosäuren im Standard RPMI-1640 Medium führten zu einer sehr frühen Prozesslimitierung. Zur Steigerung der LKT Produktion war die Zugabe von essentiellen Mediums-Bestandteilen zwingend notwendig. Das Screening von Medien-Bestandteilen deutete darauf hin, dass Aminosäuren und Thiamin als essentiell für die LKT Produktion angesehen werden können, wobei Serin und Eisen inhibitorisch wirkten. Die LKT Ausbeute konnte durch anpassen der Thiaminkonzentration und etablieren einer Fed-Batch Strategie (Glukose und Aminosäure Zufütterung) optimiert werden. Insgesamt konnte durch den optimierten Fed-Batch Prozess die volumetrische LKT Ausbeute um das 5-fache, die LKT Ausbeute pro Zelle um das 2-fache und die allgemeine LKT Produktivität um das 3.5-fache gesteigert werden gegenüber dem Standard Batch Prozess.

Diese Arbeit befasste sich auch mit der Anwendung von keramischen Membranen für die Aufreinigungsstrategie. Keramische Membranen sind vor allem aufgrund ihrer sehr guten chemischen und thermischen Stabilität in Kombination mit einer verlängerten Nutzungsdauer und hoher Filtrationsperformance vorteilhaft und reduzieren somit Kapital- und Betriebskosten. Die Aufreinigungsstrategie basierte auf einem 2-Stufen Prozess mit Biomasseabtrennung und anschließender LKT Aufkonzentrierung. Membranen mit verschiedenen Molekulargewichtsgrenzwerten (MWCOs) wurden in Bezug auf den Biomasse und LKT Rückhalt hin untersucht. Die am besten geeigneten Membranen wurden entsprechend ihres Fluss- und Fouling-Verhaltens charakterisiert. Zur Optimierung der kritischen Filtrationsparameter wurde mittels des „Resistance-in-series“ Models eine Fouling-Analyse durchgeführt. Für die Biomasseabtrennung zeigten die Daten auf, dass der irreversible Widerstand und damit der Filterkuchen-Widerstand, der Hauptfiltrations-Widerstand war (bis zu ~60% des gesamten hydraulischen

Widerstandes). Bei der LKT Aufkonzentrierung war der Gel-Widerstand der Hauptfiltrations-Widerstand und machte ~50% des gesamten hydraulischen Widerstandes aus. Die Varianzanalyse der Antwortflächenmethode deutet darauf hin, dass das Fluss- und Fouling-Verhalten für beide Filtrationsschritte hauptsächlich von der Überströmungsgeschwindigkeit beeinflusst werden konnte.

Abschliessend wurde die Aufreinigungsstrategie durch die Etablierung eines neuartigen LKT Aktivitätsassays vervollständigt. Der entwickelte LKT Assay ist besonders für die Prozess und die Qualitätskontrolle hilfreich um die Sicherheit des Impfstoffes weiter zu erhöhen. In Kombination mit der thermischen Inaktivierungskinetik des LKTs ist eine gleichzeitige Aufreinigung und thermische Inaktivierung des LKTs möglich, welches die Prozesseffizienz weiter steigert.

Schlüsselwörter:

Filtrationsparameter, Fouling-Analyse, Keramische Membranen, kritische physikalische Prozessparameter, Leukotoxin Produktion, Leukotoxin Aktivitätsassay, *Mannheimia haemolytica*, Mediumsoptimierung, RPMI-1640, Zellwachstum

Abstract

Bovine respiratory disease (BRD) is the most important disease in the cattle industry with serious annual economic losses. *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) is classified as the primary bacterial pathogen causing BRD and its leukotoxin (LKT) is the predominant virulence factor. Vaccines based on the culture supernatant of *M. haemolytica* (LKT as immunostimulating agent) offer the most promising measure to contain BRD outbreaks and are commercially available since the 1980s. However, insufficient LKT yields, predominantly reflecting a lack of knowledge about the optimal bioprocess conditions and medium requirements of *M. haemolytica* for LKT production.

The primary objective of this work was to improve the LKT yield of the vaccine manufacturing process and to develop a downstream strategy based on ceramic membranes. A commercially available *M. haemolytica* strain was used to overcome the lack of knowledge for optimal LKT production. In order to achieve a practical, reproducible and robust LKT production process the effect of critical process parameters (pH, temperature, inoculum density, agitation speed, and aeration rate) were characterized. Process control of pH and dissolved oxygen (DO) was required to maximize the biomass and LKT production and avoided inhibitory pH levels due to the production of acetic acid (Ac) as the major metabolic byproduct. Sparging of air further led to a significant loss in the working volume due to foaming but could be minimized by adjusting the agitation and aeration strategy. Foaming could be completely avoided by the addition of antifoam C, but with the drawback of a negative effect on the downstream process. In addition to the physical process parameters, the optimization of the fermentation medium had a dramatic effect on LKT production. The commonly utilized RPMI-1640 medium was not capable to support optimal growth and LKT expression, therefore, an initial supplementation of complex medium was necessary. Especially the low concentrations of glucose and amino acids in the standard RPMI-1640 medium led to an early limitation of the LKT production process. Feeding of essential medium components was mandatory to further

Abstract

increase the LKT yield. The screening of medium components indicated that amino acids and thiamine can be considered as essential for LKT production, whereas serine and ferric iron were even inhibitory. The LKT yield was optimized by adjusting the initial thiamine concentration and establishment of a fed-batch strategy (amino acid and glucose feed). Overall, the optimized fed-batch process had a 5-fold higher final volumetric LKT yield, a 2-fold higher LKT yield per optical density (OD), and a 3.5-fold higher overall maximum LKT productivity compared to the standard batch process.

This work also addressed the application of ceramic membranes as a new downstream strategy. Ceramic membranes were favorable due to their high chemical and thermal stability in combination with a prolonged life cycle and high filtration performance, which reduces the capital and operational costs. The downstream strategy was based on a two-stage process with an initial biomass separation and subsequent LKT recovery. Membranes with various molecular weight cut-offs (MWCOs) were screened regarding their biomass and LKT retention characteristics. The most suitable membranes were further characterized regarding their flux and fouling behavior. In order to optimize the critical filtration parameters, a fouling analysis was carried out using the “resistance-in-series model”. The analysis suggested that the irreversible fouling and therefore, the cake resistance, was the predominant filtration resistance (up to ~60% of the total hydraulic resistance) for the biomass separation. Regarding the LKT recovery, the gel resistance was the major hydraulic resistance and accounting for ~50% of the total hydraulic resistance. The analysis of variance results, obtained by the response surface method, indicated that the cross-flow velocity was the predominant factor affecting the flux and fouling behavior for both filtration steps.

Finally, the downstream strategy was completed with the development of a novel LKT activity assay. The established LKT assay is beneficial for process control as well as final quality control (QC) release to further improve the safety of the vaccine. In combination with the determined thermal inactivation kinetics

of the LKT, a simultaneous recovery and thermal inactivation of the LKT is possible, which further increases the process efficiency.

Keywords:

Cell growth, critical physical process parameters, ceramic membranes, fouling analysis, filtration parameter, medium optimization, leukotoxin production, leukotoxin activity assay, *Mannheimia haemolytica*, RPMI-1640

Content

Zusammenfassung	I
Abstract.....	V
Content	IX
1 Introduction.....	1
1.1 Motivation	2
1.2 Scope	3
1.3 Aim	3
2 Theoretical Background.....	5
2.1 Bovine respiratory disease	5
2.2 <i>Mannheimia haemolytica</i>	5
2.2.1 LKT as primary virulence factor.....	6
2.2.2 Other virulence factors of <i>M. haemolytica</i>	8
2.3 Process conditions for cell growth and LKT production of <i>M. haemolytica</i>	9
2.3.1 Physical process parameters	10
2.3.2 Medium requirements and supplements for cell growth and LKT production.....	12
2.3.3 Process modes.....	14
2.4 LKT purification and recovery.....	23
2.4.1 Pressure-driven membrane processes	24
2.4.2 Membrane material	25
2.4.3 Mass transfer and membrane fouling.....	26
2.4.4 “Resistance-in-series-model”	27
2.4.5 Factors affecting the flux and fouling	30
2.5 In-process controls: LKT activity measurements	32
2.6 Statistical Design of Experiments (DoE)	33
3 Material and Methods	37
3.1 Bioprocess with <i>M. haemolytica</i> for LKT production	37
3.1.1 Culture medium	37
3.1.2 Master cell bank (MCB) and working cell bank (WCB).....	38
3.1.3 Cell propagation	39
3.1.4 Fermentation process in a controlled stirred tank reactor (STR) ..	39
3.1.5 Batch experiments.....	41

Content

3.1.6	Fed-batch experiments.....	43
3.2	LKT purification and recovery.....	44
3.2.1	Ceramic membranes	44
3.2.2	Experimental set-up for the downstream process	45
3.2.3	General filtration procedure	47
3.2.4	Fermentation broth clarification	48
3.2.5	LKT recovery after biomass separation	48
3.2.6	Membrane cleaning procedure.....	49
3.3	Offline analytics	50
3.3.1	Optical density (OD) determination	50
3.3.2	Glucose and lactate determination.....	50
3.3.3	Acetic acid determination	50
3.3.4	Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA).....	52
3.3.5	Amino acid determination.....	53
3.3.6	Leukotoxin activity assay.....	53
3.3.7	Particle size distribution determination.....	55
3.3.8	Cell dry weight (CDW) determination	55
3.4	Calculations.....	56
3.4.1	Cell-specific parameter determination.....	56
3.4.2	Filtration parameter	57
3.4.3	Error analysis	57
4	Results and Discussion	59
4.1	Bioprocess with <i>M. haemolytica</i> for LKT production	59
4.1.1	Definition of initial process parameters	59
4.1.2	Physical process parameters – a parametric study	64
4.1.3	Screening of essential medium components for LKT expression ..	78
4.1.4	Growth kinetics of <i>M. haemolytica</i>	86
4.1.5	Definition of the fed-batch process.....	96
4.2	LKT purification and recovery.....	111
4.2.1	Microfiltration for biomass separation	112
4.2.2	Evaluation of a 40 nm ceramic hollow fiber membrane for LKT recovery.....	131
4.2.3	LKT activity measurements for process and quality control.....	145
5	Conclusions and Outlook.....	153
6	References	159
7	Nomenclature and Abbreviations	173

8	List of Figures	177
9	List of Tables	187
10	Appendix.....	191
10.1	Batch fermentations of <i>M. haemolytica</i> with NaOH and NH ₃ as pH control	191
10.2	Fed-batch fermentations of <i>M. haemolytica</i> with NaOH and NH ₃ as pH control	192
10.3	Effect of various cysteine concentrations in the amino acid feed.....	193
10.4	Correlation between CDW and OD	195
10.5	Mathematical modeling of the fed-batch process: Source code	197
10.6	DoE software diagnostic plots	198
10.6.1	Biomass separation.....	198
10.6.2	LKT recovery	200
11	Publications	203