

# Gradienten im Visier

## Optimieren von industriellen Bioprozessen

Bioprozesse lassen sich nicht ohne weiteres von einem kleinen Labormaßstab auf ein Produktionsvolumen übertragen und umgekehrt. Das kann die Bioprozessoptimierung erschweren – muss es aber nicht. Zwei-Kompartiment-Scale-down-Bioreaktoransätze können wichtige Informationen liefern. CLAUDIA HÜTHER-FRANKEN\*

**B**ioprozesse werden üblicherweise im kleinen Labormaßstab entwickelt. Die so etablierten Verfahren werden nach und nach auf größere Maßstäbe übertragen bis sie das finale, industrielle Produktionsvolumen erreicht haben. Dieser Prozess wird als Scale-up bezeichnet.

### Skalieren – eine wichtige Säule in der Biotechnologie

Viele Faktoren spielen bei der zuverlässigen Maßstabsvergrößerung von Bioprozessen eine Rolle. Während die Kinetik und Thermodynamik eines Prozesses vom Arbeitsvolumen nahezu unbeeinflusst sind, ist der Stofftransport in hohem Maße davon abhängig. So haben sowohl die Geometrie des Bioreaktors und dessen Einbauten Einfluss auf den Sauerstoffeintrag und die gleichmäßige Verteilung von Substraten, als auch Parameter wie der Leistungseintrag durch das Rührwerk oder die Begasungsrate. In der Praxis werden daher in Bezug auf die Geometrie meist einheitliche Bioreaktorformate für gerührte Systeme verwendet. Bei mikrobiellen Prozessen ist das häufig ein Höhe-zu-Durchmesser-Verhältnis von 3:1, für das Kultivieren von tierischen Zellen ein Verhältnis von 2:1.

Um den Herausforderungen des Stofftransports zu begegnen, bedient sich die Biotechnologie üblicherweise einiger Hilfsmittel aus der Mathematik. Anhand dimensionsloser Kennzahlen werden dynamische Prozesseigenschaften beschrieben, welche im Verlauf des Scale-up-Prozesses konstant gehalten werden. Die Reynoldszahl, Schmidtzahl und Sherwoodzahl werden beispielsweise verwen-



Bilder: Eppendorf

**1 Paralleles Bioreaktorsystem für flexible Scale-down-Untersuchungen.**

det, um die Turbulenz des Flüssigkeitsstroms, den Stofftransport und die Effektivität des Stoffüberganges in einem Bioprozess zu beschreiben. Andere Kennzahlen, die häufig bei der Maßstabveränderung herangezogen werden, beschreiben meist Eigenschaften zum Sauerstoffeintrag, zur Begasung oder zum Leistungseintrag. Details hierzu sind im LP-Tipp-Kasten zusammengestellt.

### Bioprozessoptimierung – im großen Maßstab läuft es anders

Insbesondere im industriellen Prozessmaßstab hat der Grad der Durchmischung einen bedeutenden Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des biotechnologischen Prozesssystems. Die großen Arbeitsvolumina, die je nach Anwendung weit über 50 000 L pro Gefäß liegen können, bedingen, dass der Stofftransfer aufgrund des

geringeren volumetrischen Leistungseintrags häufig limitiert ist. Selbst in gerührten Bioreaktoren reichen dann die rheologischen Eigenschaften auch nicht aus, um ein zuverlässiges und vollständiges Durchmischen zu gewährleisten. Als Resultat des geringeren Leistungseintrags und der schlechteren Durchmischung finden sich in großen Maßstäben oft Gradienten, die wichtige Prozessparameter wie den pH-Wert, die Substratkonzentration oder den Gelöstsauerstoff betreffen. So entstehen inhomogene Umgebungsbedingungen innerhalb eines Bioreaktors, die das Wachstum und die Produktivität der Zellen und damit den gesamten Produktionserfolg beeinflussen können.

Für eine effektive Maßstabvergrößerung ist es daher sinnvoll bereits im kleinen Entwicklungsmaßstab den Einfluss von Gradienten zu berücksichtigen. Eine Methode dies zu tun, ist das definierte

\* C. HÜTHER-FRANKEN: Wissenschaftskommunikation Hüther-Franken, 52076 Aachen, Tel. +49-2408-7195880

Simulieren von Prozessinhomogenitäten während der Bioprozessentwicklung. In Bioreaktorsystemen mit zwei Kompartimenten werden die Zellen hierzu im Wechsel über- und unterversorgt. Großtechnische Phänomene lassen sich mit solchen Scale-down-Ansätzen bereits in der Entwicklungsphase zuverlässig vorhersagen.

## Zwei Kompartimente für Scale-down-Bioreaktoren

Die Wissenschaftler Michael Limberg und Marco Oldiges der Gruppe für Bioprozesse und Bioanalytik am Forschungszentrum Jülich haben ein Zwei-Kompartiment-Bioreaktorsystem genutzt, um den Einfluss von oszillierenden Substrat- und Gelöstsauerstoffkonzentrationen auf ihren Bioprozess zu untersuchen. Mithilfe von zwei miteinander verbundenen, gerührten Bioreaktoren haben sie die inhomogenen Kultivierungsbedingungen, wie sie im Produktionsmaßstab auftreten, erfolgreich im Labormaßstab imitiert.

## Corynebacterium glutamicum – ein Klassiker als Fallbeispiel

Die Jülicher Wissenschaftler beschäftigen sich intensiv mit dem Optimieren von mikrobiellen Bioprozessen. Dabei arbeiten sie unter anderem mit *Corynebacterium glutamicum*, einem wohlbekanntem Bakterium, das als Plattformorganismus in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie häufig zur Produktion von Aminosäuren genutzt wird.

Ziel der hier vorgestellten Studie war es, ein zuverlässiges Scale-down-System zu etablieren, das Vorhersagen zu potenziellen Qualitätsverlusten und damit steigenden Produktionskosten bei einer Maßstabserhöhung ermöglicht. Solche Prognosen können genutzt werden, um bei einer Vielzahl von Prozessvarianten und Produktionsstämmen die Kombination zu ermitteln, die am besten für einen Transfer in den industriellen Produktionsmaßstab geeignet ist. Als Modellprozess wählten die Wissenschaftler einen C.-glutamicum-Fed-Batch-Prozess zur Produktion von L-Lysin.

Um ein geeignetes Bioreaktorsystem auszuwählen, haben die Wissenschaftler zuallererst einen Anforderungskatalog erstellt. Bei der Auswahl der geeigneten Kultivierungsplattform war es ihnen wichtig, für eine optimale Flexibilität mindestens vier parallel betriebene, gerührte

## LP-TIPP ■ Kennzahlen zu Bioprozessen

*Dimensionslose Kennzahlen – Parameter in einem dimensionslosen mathematischen Modell, die einen physikalischen Vorgang beschreiben, zum Beispiel:*

- Reynoldszahl (*Re*) beschreibt Turbulenz
- Schmidtzahl (*Sc*) beschreibt den Stofftransport
- Sherwoodzahl (*Sh*) beschreibt den effektiven Stoffübergang

*Klassische Kriterien – Parameter, die häufig für Scale-up-Prozesse herangezogen werden, zum Beispiel:*

- Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient
- Sauerstoffübertragungsrate
- Volumenspezifische Begasungsrate
- Volumenbezogener Leistungseintrag
- Mischzeit
- Rührerspitzen geschwindigkeit

Bioreaktoren nutzen zu können. Dies ermöglicht es, zeitgleich mehrere Zwei-Kompartiment-Bioreaktorsysteme mit unterschiedlichen Gefäßgrößen, verschiedenen Volumenverhältnissen, diversen Füllständen oder variabler Sensortechnik einzurichten. Ebenfalls war es Voraussetzung, dass die Prozessbedingungen in den einzelnen Kompartimenten des Systems unabhängig voneinander überwacht und kontrolliert werden können.

## Die Hardwarebasis: Ein paralleles Bioreaktorsystem

Mit den genannten Anforderungen fiel die Wahl auf ein vierfach paralleles Dasgip-Bioreaktorsystem von Eppendorf. Dieses System ermöglichte Duplikat-Ansätze von je zwei miteinander verbundenen Gefäßen. Zusammengenommen hatten beide Gefäße ein Arbeitsvolumen von 1 L, wobei der größere Bioreaktor (BR 1) mit 780 mL einen Volumenanteil von 78% beinhalten und der kleinere Bioreaktor (BR 2) mit 220 mL Arbeitsvolumen einen Anteil von 22%. Beide Bioreaktoren waren mit optischen Hamilton-Sauerstoffsensoren Visiform DO 225 und pH-Sensoren 405-DPAS-SC-K8S von Mettler-Toledo ausgestattet. Das Überwachen von pH und Gelöstsau-

erstoffkonzentration erfolgte mit einem Dasgip-PH4PO4-Modul von Eppendorf. Die Temperatur- und Agitationskontrolle sowie Titration und Substratzugabe erfolgten mit Dasgip-TC4SC4-Kontroll- bzw. MP8-Multipumpen-Modulen. Das größere BR-1-Gefäß wurde als aerobes Kompartiment zusätzlich mit einem Dasgip-MF4-Begasungsmodul ausgerüstet. Um ein konstantes volumetrisches Verhältnis in den beiden Bioreaktoren zu gewährleisten, wurde im kleinen Reaktor BR 2 ein Tauchrohr auf entsprechender Höhe montiert. Ein dauerhafter Austausch der Kulturflüssigkeit zwischen den beiden Kompartimenten wurde durch die Verwendung von zwei peristaltischen Watson-Marlow-Pumpen erreicht. Dabei wurde die Master-Pumpe auf eine definierte Flussrate von BR 1 nach BR 2 eingestellt. Die Rückflusspumpe von BR 2 nach BR 1 wurde mit einer um 30% schnelleren Rotation im Vergleich zur Master-Pumpe verwendet. Zur Bioprozesskontrolle wurde die Software Dasware control 5 von Eppendorf eingesetzt.

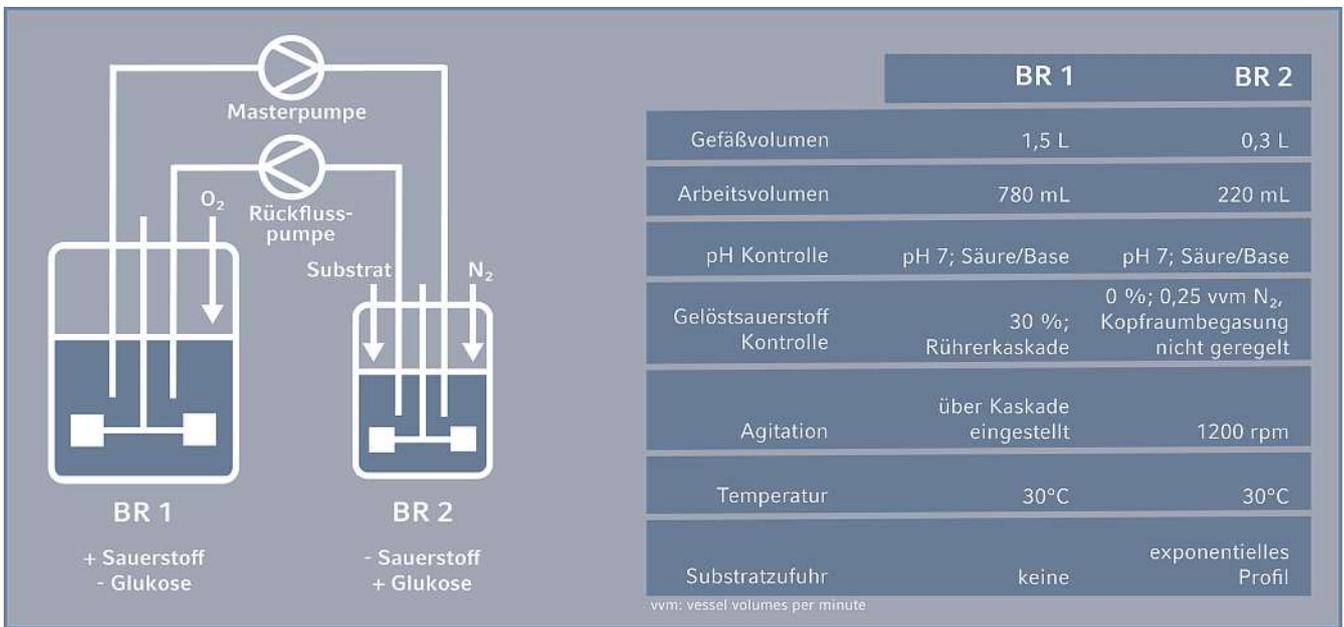
## Bioprozess in drei Phasen – Praxistest gelungen

Die durchgeführten C.-glutamicum-Scale-down-Kultivierungen lassen sich in drei Phasen unterteilen. Während der initialen Phase waren jeweils nur die großen BR-1-Gefäße in Benutzung. In diesen wurde der Prozess mit einem Volumen von 1 L gestartet. Ein Überfluss an Glukose und Sauerstoff charakterisieren diesen Kultivierungsabschnitt mit besten Wachstumsbedingungen für die Bakterien. In der zweiten Phase wurden die unbegasteten, kleineren BR-2-Gefäße angeschlossen,



**DIGITAL:** Mehr zu diesem Thema finden Sie unter dem Stichwort „Eppendorf Bioprozesse“ auf [www.laborpraxis.de](http://www.laborpraxis.de)

**SERVICES:** Die Fachgruppe Bioprozesstechnik der Dechema bietet eine Plattform für die Optimierung und Neuentwicklung biotechnischer Produktionsprozesse. Infos unter <http://dechema.de/Bioprozesstechnik.html>



2 Anordnung des Zwei-Kompartiment-Bioreaktorsystems und relevante Prozessparameter

und so die oszillierende Kultivierung zwischen dem aeroben und dem nicht begasteten Kompartiment gestartet. Die dritte Phase wurde mit dem Beginn der exponentiellen Substratzuführung in die nicht begasteten BR-2-Gefäße initiiert. Als Resultat lagen in den größeren BR-1-Gefäßen eine ausreichende Sauerstoffversorgung vor, während Glukose limitiert war. In den kleinen BR-2-Bioreaktoren hingegen war die Sauerstoffkonzentration limitiert und Substrat im Überschuss vorhanden.

Mit dem hier beschriebenen Scale-down-System ist es den Wissenschaftlern am Forschungszentrum Jülich gelungen, eine Gradientenbildung, ähnlich der im großtechnischen Maßstab, zu simulieren. Im BR 2 wurden unter Sauerstofflimitierung organische Säuren produziert und im BR 1 aufgrund der Glukoselimitierung re-assimiliert. Damit handelt es sich unter diesen Bedingungen um einen Mehrsubstratprozess. Das bakterielle Wachstum

wurde durch die Zirkulation zwischen unterschiedlichen Versorgungsbedingungen nicht negativ beeinflusst. Damit ist es nun möglich, schnell und zuverlässig weitere Korrelationen zwischen der Adaption des bakteriellen Stoffwechsels und inhomogenen Stoffverteilungen im Bioreaktor zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass Dasgip-Parallele-Bioreaktorsysteme und die Bioprozess-Kontrollsoftware Dasware control 5 ein flexibles und dabei leistungsstarkes Gespann bilden um Scale-down-Systeme zu etablieren. Die individuelle Kontrolle der Prozessparameter in jedem Gefäß war die Voraussetzung für das Einstellen von aeroben in einem und mikro-aeroben Bedingungen in dem anderen Bioreaktor. Die präzise pH-Kontrolle gewährleistete, dass der Einfluss von sauren Nebenprodukten ausgeglichen werden konnte und somit die reinen Effekte der Sauerstoff- und Substratinhomogenität untersucht wurden. Das Einbinden eines exponentiellen Substratzu-

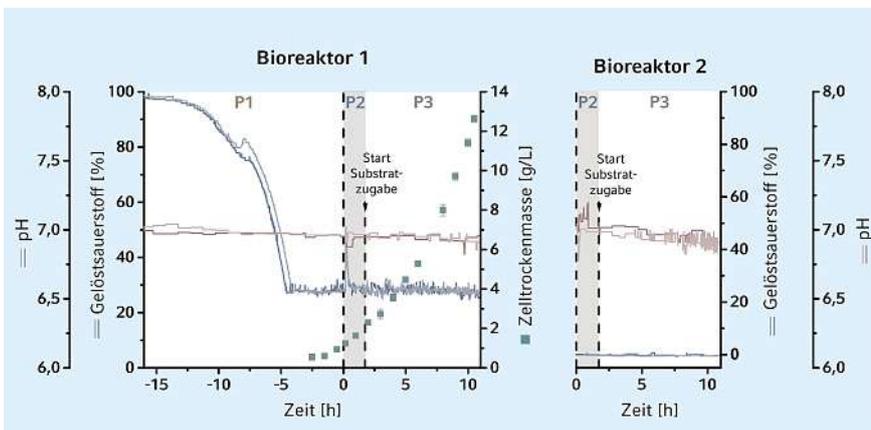
gabe-Profiles und damit das Sicherstellen einer konstanten Wachstumsrate wurden durch die Scripting-Funktion der Dasware-Software ermöglicht.

### Frühe Entwicklungsphase von Bioprozessen nutzen

Mit Zwei-Kompartiment-Scale-down-Bioreaktoransätzen lassen sich bereits in der frühen Entwicklungsphase von Bioprozessen Phänomene aufdecken, die nach klassischen Methoden möglicherweise erst im Produktionsmaßstab zu Tage getreten wären. Das spart Zeit und Geld und fördert die Wettbewerbsfähigkeit. Mit den richtigen Methoden steht der zuverlässigen Maßstabvergrößerung und einer erfolgreichen Bioprozess-Optimierung somit nichts mehr im Wege. ■

### Literatur

- [1] M.H. Limberg, S. Zelle, C. Schlottbom, and M. Oldiges. Simulating Process Limitations in Microbial Cultivation, Eppendorf Application Note 301. (2016)
- [2] M.H. Limberg, V. Pooth, W. Wiechert, M. Oldiges. Plug flow versus stirred tank reactor flow characteristics in two-compartment scale-down bioreactor: Setup-specific influence on the metabolic phenotype and bioprocess performance of *Corynebacterium glutamicum*. Eng. Life Sci. doi: 10.1002/elsc.201500142. (2016)
- [3] P. Neubauer, S. Junne. Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. Curr. Opin. Biotechnol. doi: 10.1016/j.copbio.2010.02.001. (2010)
- [4] R. Takors. Scale-up of microbial processes: impacts, tools and open questions. J. Biotechnol. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.12.010. (2012)



3 Fed-Batch-Kultivierung von *C. glutamicum* bei oszillierendem Sauerstoff- und Glukoseangebot