



## 1 Einleitung und Zielsetzung

Nach Schätzungen sind bisher weniger als 5 % der in der Natur vorkommenden Mikroorganismen bekannt und beschrieben [5]. Dieser Sachverhalt verdeutlicht das enorme Potential in der weiteren Erforschung biologischer Systeme, wobei großes Interesse u. a. an der möglichen Entdeckung neuer Wirk- und Wertstoffe und der Nutzbarmachung und Optimierung effizienter Stoffwechselwege von Mikroorganismen besteht. Die Umsetzungen und Reaktionskinetiken biologischer Prozesse sind von verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern, wie Temperatur, pH-Wert und der Verfügbarkeit von Nährstoffen abhängig. Die Etablierung und Optimierung von biotechnologischen Prozessen zur Wertstoffproduktion bedarf daher umfangreicher Prozessinformationen, die in vielen verschiedenen Experimenten gewonnen werden müssen.

Konventionelle Laborsysteme, wie die batch- oder fed-batch-Kultivierung in Mikrotiterplatten oder Schüttelkolben bieten dabei nur zeitabhängige, unkontrollierte Umgebungsbedingungen, eine begrenzte Prozesszeit sowie eine limitierte online-Analytik. Eine vielversprechende Alternative besteht in der Verwendung von kostengünstigen, automatisierten, multiparametrischen Mikrobioreaktor(MBR)-Systemen, die im kontinuierlichen und parallelisierten Betrieb unter stationären Bedingungen eingesetzt werden können. Diese Systeme erlauben die unabhängige Variation einzelner Prozessparameter und liefern reproduzierbare, belastbare, experimentelle Daten in Echtzeit über einen langen Zeitraum. Die geringen Dimensionen dieser Systeme resultieren jedoch typischerweise in laminare Strömungsbedingungen und hohen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnissen [9, 15, 76, 108, 124]. Molekulare Effekte treten in den Vordergrund und nehmen Einfluss auf die Ausbildung von Konzentrationsgradienten bzw. die Homogenität im System. Da Gasblasen schnell einen großen Teil der Mikrostrukturen einnehmen, im System verbleiben und oftmals zu Fehlfunktionen führen, werden sie in MBR-Systemen üblicherweise vermieden [44, 76] und ein Gasaustausch findet passiv über permeable Membrane statt [53].



## 1 Einleitung und Zielsetzung

---

Unter Berücksichtigung der genannten Aspekte wurde im Rahmen der DFG-Forschergruppe FOR 856 „Mikrosysteme für partikuläre Life-Science-Produkt-mikroPART“ an der Technischen Universität Braunschweig ein Konzept eines mehrphasig betriebenen Mikrobioreaktorsystems (mMBR) auf der Basis einer Blasensäule im Mikromaßstab entwickelt [24, 25].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung und Anpassung des mMBR zur Aufnahme reaktionskinetischer Parameter bei der kontinuierlichen, aeroben und submersen Kultivierung des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*.

Dies beinhaltet die folgenden Arbeitspunkte und Teilziele:

- Anpassung des Reaktordesigns und der Versuchssperipherie für den langfristigen und stabilen Betrieb des mMBR-Systems sowie die Integration von Messtechnik (Inkubationskammer, Anschlusstechnik, online-Messtechnik und Probenahme),
- verfahrenstechnische Charakterisierung des mMBR-Systems hinsichtlich der Prozessparameter, der Hydrodynamik und des Stoffaustauschs (Begasungsrate, Mischcharakteristik, integraler Gasgehalt, Blasengrößen und Sauerstoffeintrag),
- Kultivierung des Modellorganismus *S. cerevisiae* im batch- und kontinuierlichen Modus des mMBR-Systems,
- experimentelle Bestimmung und Modellierung reaktionskinetischer Daten,
- Überprüfung der Vergleichbarkeit der reaktionskinetischen Parameter zum Labormaßstab sowie
- die Entwicklung von bienzymatisch-photonischen Mikrosensoren zur Analyse von Glucose und Ethanol als geeignete on-chip-Überwachungswerkzeuge im mMBR-System.



## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Motivation der Mikrobioverfahrenstechnik

Die Entwicklung von biotechnologischen Prozessen beinhaltet das Screening von Mikroorganismen und die Ermittlung optimaler Prozesszustände für die effektive Produktion der Zielsubstanzen. Biologische Reaktionskinetiken und das Biomassewachstum hängen von verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern, wie Temperatur, pH-Wert und die Verfügbarkeit von Nährstoffen ab. Eine homogene Verteilung der Zellen und Medien während der Kultivierung ist daher eine wichtige Voraussetzung, um belastbare und reproduzierbare Prozessdaten zu erhalten. Um die umfassenden Prozessinformationen zu generieren, sind viele verschiedene, meist auch simultane Experimente notwendig. In diesem Zusammenhang besteht eine große Nachfrage nach effektiven, kostengünstigen, parallelen, multiparametrischen und automatisierten Untersuchungsmethoden, die mit hohen Durchsätzen im sogenannten „High-Throughput“ betrieben werden können [12, 127].

Bei traditionellen Reaktoren im Labormaßstab, wie beispielsweise bei instrumentierten Rührkesselreaktoren, erfolgt eine Kontrolle und Regulation der Prozesszustände, wie Temperatur, pH-Wert, Gelöstsauerstoffkonzentration (DO) und Homogenisierung. Daher können mit ihnen informationsreiche Daten hinsichtlich der physiologischen und metabolischen Zustände des biologischen Systems bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ermittelt werden. Die Montage, Sterilisation, Reinigung, Kalibrierung von Sensoren, die eingesetzten Chemikalien sowie die benötigte Energie, die sogenannten Rüstzeiten und der Betrieb steigern die Kosten für derartige Prozesse in beträchtlichem Maße und wirken sich auf die Wirtschaftlichkeit des Gesamtprozess äußerst nachteilig aus.

Andere konventionelle Methoden, wie die Versuchsdurchführung in Mikrotiter-Platten oder Schüttelkolben ermöglichen durch das reduzierte Volumen eine erhöhte Parallelisierung und sind damit kosteneffektiver [38]. Da diese Versuche aber meist nur im batch- oder fed-batch-Modus mit offline-Analysen arbeiten und die hydrodynamischen und Stofftransportprozesse von denen des Makromaßstabs abweichen, ist die Menge und Qualität der gewonnenen Daten oftmals gering. Eine direkte Maßstabsübertragung (scale-up) der biologischen Prozesse aus den



## 2 Theoretische Grundlagen

---

geschüttelten Systemen in beispielsweise einen Rührkesselreaktor ist aufgrund dieser reaktionstechnischen Unterschiede oftmals nicht möglich [122].

Um die ablaufenden Prozesse denen des Makromaßstabs anzugleichen bzw. anzunähern, wurden konventionelle Reaktorprinzipien (u. a. Rührkessel und Blasensäule) miniaturisiert. Beispielsweise wurde ein Rührkesselreaktor nachgebildet, indem ein Magnetrührer und optische Sensoren in eine begaste 2 mL-Küvette implementiert wurden [55]. Andere Beispiele miniaturisierter, mechanisch gerührter Systeme mit Reaktionsvolumina im Bereich zwischen 5 und 12 mL beinhalten kleine Rührer [45, 84] oder magnetisch gerührte Scheiben [54]. Das Prinzip der Blasensäule wurde ebenfalls im 2 mL-Maßstab realisiert [26, 27]. Einen Überblick über Studien von miniaturisierten Reaktoren für den High-Throughput-Einsatz geben u. a. Betts und Baganz [10] sowie Kirk und Szita [53].

Die Verwendung von Reaktionsvolumina im mL-Maßstab mag jedoch für einige Anwendungen immer noch als zu groß erachtet werden. Dies betrifft vor allem Verfahren, bei denen finite und/oder kostenintensive Substanzen, wie z. B. für metabolische Flussanalysen, pharmakokinetische Studien oder Drug Delivery-Experimente zum Einsatz kommen. Für derartige Einsatzzwecke kann eine weitere Miniaturisierung in den  $\mu\text{L}$ -Maßstab erfolgen. Dafür können eine Vielzahl verschiedener funktionaler Elemente durch mikrotechnologische Fertigungsverfahren für den  $\mu\text{L}$ -Maßstab erzeugt und zu einem vollständigen Analysesystem, dem sogenannten „micro total analysis system“ ( $\mu\text{TAS}$ ) [69] oder „lab-on-a-chip“ (LoC) verknüpft werden. LoC-Systeme können neben einfachen, räumlichen Geometrien, auch Komponenten zur Handhabung der Fluide (z. B. Pumpen und Ventile) und/oder zur Signalerfassung für die online-Überwachung und Kontrolle von physikalischen, chemischen und biologischen Parametern beinhalten [56].

Die rasante Entwicklung des LoC-Konzepts ist auch dem parallelen, mikrotechnologischen Einsatz von polymeren Materialien, insbesondere Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) und im geringeren Umfang Poly(methylmethacrylat) (PMMA) zu verdanken. Beide Polymere ermöglichen aufgrund ihrer geringen Materialkosten, Biokompatibilität, optischen Transparenz im UV-NIR Bereich und ihrer Anwendbarkeit in Massenproduktionstechniken die Herstellung von mikrofluidischen Einwegartikeln [33, 56, 72, 76, 110, 123, 128].

Der Mikrobioreaktor kann als spezieller Typ derartiger Analysesysteme verstanden werden, der für Kultivierungsprozesse und die Untersuchung biologischer



Reaktionskinetiken entwickelt wurde. Übersichten über die unterschiedlichen Entwicklungen von Mikrobioreaktoren geben u. a. Hegab et al. [44], Kirk und Szita [53] sowie Schäpper et al. [89].

Die publizierten Mikrobioreaktoren im  $\mu\text{L}$ -Maßstab weisen teilweise integrierte Elemente zur online-Analyse der Optischen Dichte (OD) der Zellen, der Gelöstsauerstoffkonzentration (DO), des pH-Werts und der Temperatur auf, während die Kultivierungsexperimente im batch-, fed-batch- und kontinuierlichen Betrieb durchgeführt werden.

Das konvektive Mischen ist durch die Abwesenheit der Turbulenz in Mikrosystemen weniger effektiv und molekulare Effekte, wie Diffusion und die Wechselwirkung zwischen Fluiden, Zellen und Oberflächen kommen zum Tragen. Um dennoch isotrope Zustände in den Mikroreaktoren zu erreichen, sind entweder magnetisch angetriebene Elemente [12, 88, 107, 129] oder peristaltische Mischer [62] und Pumpen [37, 80] eingesetzt worden. Interessanterweise werden die meisten publizierten Mikroreaktoren während der Kultivierung in einer horizontalen Ausrichtung betrieben. Auftretende Blasen können daher in den Systemen verbleiben, die Flüssigkeit verdrängen, die Strömungen beeinflussen oder komplett blockieren sowie optische Messungen stören [76]. Konsequenterweise werden diese Reaktoren passiv mit Sauerstoff durch Membrandiffusion versorgt [12, 29, 30, 107, 127, 129], obwohl im Makromaßstab üblicherweise eine aktive Begasung erfolgt. Trotzdem können Blasen infolge von Medienwechsel, Inokulation oder Zellatmung entstehen.

Eine mögliche Verbesserung besteht in der Verwendung von Mikroreaktoren, die in einer vertikalen Ausrichtung betrieben werden und daher eine aktive Begasung ermöglichen, wie es auch im Makromaßstab üblich ist. Bei diesen mehrphasigen Mikrobioreaktoren werden die Homogenisierung/Vermischung und der Sauerstoffeintrag allein durch die Zuführung der Gasphase verstärkt, was wiederum eine einfache Konstruktion ohne mechanisch bewegte Bauteile und daher geringen Herstellungs- und Betriebskosten mit sich bringt [24, 25, 81].

Die Etablierung und Charakterisierung dieser vertikalen, mehrphasigen MBR-Systeme zur Aufnahme reaktionskinetischer Prozessparameter, u. a. der maximalen spezifischen Wachstumsrate, Monod-Konstante, Ertragskoeffizienten sowie endogener Erhaltungsstoffwechselfkoeffizienten für Daten von submersen, aeroben Kultivierungen werden in der vorliegenden Arbeit vorgestellt.



### 2.2 Reaktionsführung und -kinetik in idealisierten Bioreaktoren

Das Wachstum und der Stoffwechsel von Mikroorganismen sind wesentlich von den Umgebungsbedingungen abhängig. Um belastbare, kinetische Informationen zu erhalten, ist es daher notwendig, die experimentellen Untersuchungen in einem möglichst ideal durchmischten Bioreaktor durchzuführen. Die Reaktionsführung des Bioprozesses kann dabei, je nach Anwendung oder gewünschter Information, auf unterschiedliche Art und Weise stattfinden. Die unterschiedlichen Prozessführungsvarianten bei der batch- und der kontinuierlichen Kultivierung werden im Folgenden genauer erläutert (vgl. hierzu [11, 19, 58, 95, 96]).

#### 2.2.1 Batch-Kultivierung

Technisch am einfachsten zu realisieren ist der „batch“ oder auch Satzbetrieb der Reaktoren. Die notwendigen Nährstoffe werden steril in einem Behälter vorgelegt, der Mikroorganismus als Inokulum hinzugefügt und für eine definierte Reaktionszeit kultiviert. Die Konzentrationen der Zellen, Nährstoffe (u. a. Kohlenstoffquelle, Vitamine, Nährsalze) und Metabolite ändern sich während dieser Reaktionszeit. Der Prozess gilt als (quasi-) geschlossen, da mit Ausnahme der Gasphase, keine Stoffströme zu- oder abgeführt werden. Der zeitliche Verlauf der Biomasse- und Substratkonzentration sowie der spezifischen Wachstumsrate während einer batch-Kultivierung ist exemplarisch in Abb. 2-1 gezeigt.

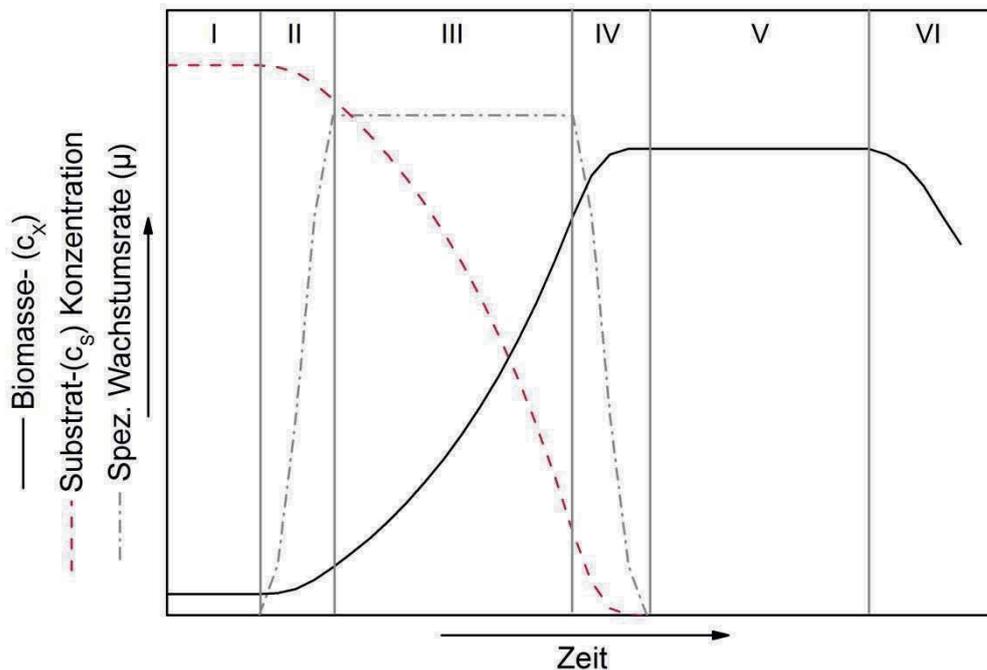


Abb. 2-1: Zeitlicher Verlauf der Biomasse- ( $c_x$ ) und Substratkonzentration ( $c_s$ ) sowie der spezifischen Wachstumsrate ( $\mu$ ) während einer batch-Kultivierung, Bereiche I-VI zeigen unterschiedliche Wachstumsphasen (Diskussion siehe Text).

Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  ist wie folgt definiert

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \frac{d(c_x)}{dt} \quad (2.1)$$

und ist eine Funktion der Kultivierungsbedingungen. Der Ablauf der absatzweisen Kultivierung lässt sich in unterschiedliche Phasen unterteilen [58, 95, 96]:

In der Lag-Phase I adaptieren sich die Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen. Nach Anpassung des Stoffwechsels in der Beschleunigungsphase II beginnen die Zellen sich zu vermehren. Phase III stellt das unlimitierte, exponentielle Wachstum dar. Die Zellen wachsen mit einer konstanten, maximalen, spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$ , die unter den gegebenen Bedingungen möglich ist. Ist das Substrat allmählich verbraucht oder häufen sich inhibierende oder toxische Stoffwechselprodukte an, verlangsamt sich das Wachstum in Übergangsphase IV. In



## 2 Theoretische Grundlagen

---

der stationären Phase V ist kein Biomassewachstum mehr messbar, da sich Wachstums- und Absterberate das Gleichgewicht halten. In der Absterbephase IV überwiegen letztendlich der Zelltod und die Zellyse.

In der Phase III des unlimitierten, exponentiellen Wachstums lässt sich die Geschwindigkeit der Biomassezunahme  $r_X$  mathematisch beschreiben durch

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu_{\max} \cdot c_X \quad (2.2)$$

Der Ausbeutekoeffizient für die substratspezifische Biomassebildung ist folgendermaßen definiert

$$Y_{X/S} \equiv - \frac{dc_X/dt}{dc_S/dt} \quad (2.3)$$

Häufig besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Wachstums- und Substratverbrauchsrate und  $Y_{X/S}$  kann als konstant angenommen werden. Somit kann der Substratverbrauch beschrieben werden mit

$$r_S = \frac{dc_S}{dt} = - \frac{\mu \cdot c_X}{Y_{X/S}} \quad (2.4)$$

In den meisten biotechnologischen Prozessen ist außerdem die Produktsynthese, also die Herstellung von Wertstoffen von eigentlichem Interesse. Diese kann auf unterschiedliche Art und Weise mit der Zellmasse, als Biokatalysator und deren Wachstum assoziiert sein. Eine einfache und allgemeine Beschreibung der volumenbezogenen Produktbildungsrate  $r_P$  kann durch das empirische Modell nach Luedeking und Piret (1959)

$$r_P = \frac{dc_P}{dt} = \alpha \cdot r_X + \beta \cdot c_X \quad (2.5)$$

erfolgen [19, 58, 95, 96].  $\alpha$  und  $\beta$  stellen dabei die Koeffizienten der wachstumsassoziierten ( $\alpha \cdot r_X$ ) bzw. -unabhängigen, jedoch von der Biomassekonzentration abhängigen ( $\beta \cdot c_X$ ) Produktbildungsrate dar. Die Koeffizienten  $\alpha$  und  $\beta$  erhält man aus der Auftragung der spezifischen Produktbildungsrate als Funktion von der spezifischen Wachstumsrate  $q_P = r_P/c_X = f(\mu)$ . Die Steigung  $\alpha$  ist definiert als der auf die Biomasse bezogene Produktertragskoeffizient

$$Y_{P/X} \equiv \frac{dc_P/dt}{dc_X/dt}. \quad (2.6)$$

Der Koeffizient  $\beta$  stellt die wachstumsunabhängige, spezifische Produktbildungsrate dar, d. h.  $\beta = r_P(\mu=0)$ .

Als weiterer, wichtiger Ausbeutekoeffizient lässt sich analog der auf das Substrat bezogene Produktertragskoeffizient definieren

$$Y_{P/S} \equiv \frac{dc_P/dt}{dc_S/dt}. \quad (2.7)$$

### 2.2.2 Kontinuierliche Kultivierung

Eine alternative Reaktionsführung des Bioprozesses stellt das substratlimitierte Wachstum in einer kontinuierlichen Kultivierung dar. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass ein Teil des Reaktorinhalts permanent durch frisches Medium mit konstanter Zusammensetzung ersetzt wird. Das Reaktionsvolumen wird dabei konstant gehalten ( $dV/dt = 0$ ), indem die ein- und austretenden Volumenströme  $\dot{V}$  gleich groß sind. Diese Kultivierung wird auch als „Chemostat“ bezeichnet, da sich stabile, stationäre Zustände selbstregulierend einstellen, wobei der Wachstumsprozess durch die gleichbleibende Konzentration einer wachstumslimitierenden (chemischen) Substanz über den Feed-Volumenstrom sichergestellt ist. Abb. 2-2 zeigt das verfahrenstechnische Schema der kontinuierlichen Prozessführung im Chemostat-Modus.

## 2 Theoretische Grundlagen

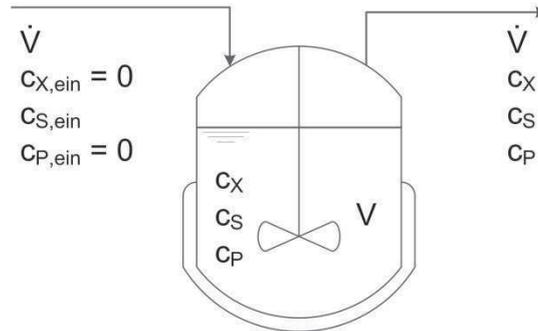


Abb. 2-2: Verfahrenstechnisches Schema des kontinuierlich betriebenen Rührreaktors im Chemostat-Modus. Das Volumen  $V$  des Reaktors ist konstant. Die ein- und austretenden Volumenströme  $\dot{V}$  mit den jeweiligen Konzentrationen an Biomasse ( $c_X$ ), Substrat ( $c_S$ ) und Produkt ( $c_P$ ) sind gekennzeichnet. Der Index „ein“ kennzeichnet den eintretenden Stoffstrom.

Der Rührreaktor wird als ideal durchmischt angenommen, es treten daher keine Konzentrationsgradienten auf und die Konzentrationen des entnommenen Volumenstroms entsprechen denen innerhalb des Reaktionsvolumens  $V$ .

Im stationären Zustand sind die Akkumulationsterme  $\frac{dc_i}{dt} = 0$  und die Massenbilanzen der Biomasse ( $c_X$ ), des Substrats ( $c_S$ ) und des Produkts ( $c_P$ ) ergeben sich zu [11]

Akkumulation = 0 = Konvektion + Reaktion

$$\frac{dc_X}{dt} = 0 = D \cdot (c_{X,\text{ein}} - c_X) + \mu \cdot c_X \quad (2.8)$$

$$\frac{dc_S}{dt} = 0 = D \cdot (c_{S,\text{ein}} - c_S) - \left( \frac{\mu}{Y_{X/S}} - m_S \right) \cdot c_X - \frac{r_P}{Y_{P/S}} \quad (2.9)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = 0 = D \cdot (c_{P,\text{ein}} - c_P) + r_P \quad (2.10)$$

Die Durchflussrate  $D$  entspricht dem Quotienten aus Volumenstrom  $\dot{V}$  und Reaktionsvolumen  $V$  und ist gleich dem reziproken Wert der mittleren, hydraulischen Verweilzeit  $\bar{\tau}$