

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

# Reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse

Andreas Kusterer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktor-Ingenieurs  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Johann Stichtmair

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz  
2. Univ.-Prof. Dr. med., Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel

Die Dissertation wurde am 18.09.2007 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen  
am 12.12.2007 angenommen.



## Vorwort

Die vorliegende Dissertation fasst die Ergebnisse meiner Arbeiten am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München zusammen. Die praktischen Laborarbeiten dazu fanden von November 2003 bis März 2007 statt. Dabei stand mir die hervorragende und moderne technische Ausstattung der großzügig eingerichteten Labore, des Technikums und der Werkstätten des Lehrstuhls zur Verfügung.

Zudem wäre diese Dissertation ohne die Mitwirkung einer ganzen Reihe weiterer Beteiligten nicht möglich gewesen. Bei allen Beteiligten möchte ich mich daher ganz herzlich für ihr Mitwirken bedanken:

Beim Ordinarius des Lehrstuhls Herrn Professor Dr.-Ing. Weuster-Botz für das mir entgegen gebrachte Vertrauen in meine Arbeit und meine Fähigkeiten. Es bestand jederzeit die Möglichkeit ihn auch kurzfristig zu sprechen und mit ihm zu diskutieren.

Bei den Projektpartnern: Dr.-Ing. Matthias Arnold und Dr.-Ing. Falk Schneider von der DASGIP aus Jülich, Dr. Christian Krause und Dr. Damian Andrzejewski von PreSens aus Regensburg, Dr.-Ing. Klaus Kaufmann und Dipl. Chem. Sven Mahlstedt für ihre wichtigen Beiträge zum parallelen Bioreaktorblock. Ohne sie wären viele Komponenten nicht realisierbar gewesen.

Bei Dr. Günter Wich und Dr. Rupert Pfaller vom Consortium für elektrochemische Industrie für die Bereitstellung des Hefestammes *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.

Bei Tobias Brinkmann von der ifu Hamburg für die Anpassung der Software Sabento®.

Bei Irma Einsle, die mich oft bei organisatorischen und bürokratischen Dingen am Lehrstuhl unterstützt hat.

Bei Markus Amann, der mich bei vielen Arbeiten entlastet hat und sich auch nicht zu schade ist Routinetätigkeiten zu übernehmen. Sowie bei Karl-Heinz Zacher und Norbert Werth aus der mechanischen Werkstatt für ihre Bereitschaft auch knifflige Ideen in Metall und Kunststoff zu realisieren. Ebenso bei Georg Kojro, dem Elektroniker und Systemadministrator des Lehrstuhls.

Bei den Studenten, die ich während meiner Zeit am Lehrstuhl betreut habe und die gute Arbeit geleistet haben: Axel Nestler, Hugo Torio und Stefan Hierlmeier.

Bei meinen ehemaligen und noch Kollegen Stefan Bräutigam, Stefanie Brüning, Helge Engelking, Michael Finke, Gabi Gebhardt, Jan Havel, Dr.-Ing. Dariusch Hekmat, Julia Hiller, Kathrin Hölsch, Michael Hofinger, Andreas Knepper, Bettina Knorr, Tanja Kurzrock, Hannes Link, Dominik Maslak, Holger Pfründer, Robert Puskeiler, Armin Tiemeyer, Maya Tiemeyer, Andrea Vester und Qytun Yavuz vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik für die Kollegialität und das gute Arbeitsklima.

Bei meinen Eltern und Schwiegereltern, die mich und meine Familie bei allen Gelegenheiten unterstützt haben.

Bei meiner Frau Ute und meinem Sohn Korbinian dafür, dass sie für mich da sind.

Danke!

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>7</b>
3.1	BIOREAKTIONSTECHNIK IN KLEINEN REAKTIONSVOLUMINA	7
3.1.1	Geschüttelte Mikrotiterplatten	7
3.1.2	Miniaturlasensäulen	10
3.1.3	Miniaturrührkesselbioreaktoren	11
3.1.4	Vergleich paralleler Miniaturbioreaktoren	15
3.2	WERKSTOFFTECHNIK	17
3.2.1	Materialwahl	17
3.2.2	Korrosion	20
3.3	MESS- UND REGELUNGSTECHNIK FÜR BIOLOGISCHE SYSTEME	23
3.3.1	Lineare zeitinvariante Regler für biologische Systeme	23
3.3.2	Nicht-invasive optische Messtechnik	29
3.4	ASYMMETRISCHE SYNTHESSEN MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	31
3.4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Biokatalysator	33
3.4.2	Biotransformation im Zweiphasensystem	35
<b>4</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>39</b>
4.1	BIOREAKTOREN	39
4.1.1	Parallelbioreaktor	39
4.1.2	Laborbioreaktor	50
4.2	REAKTOREN ZUR BIOTRANSFORMATION	52
4.2.1	„Deep-Well“-Platte	52
4.2.2	Rührkesselreaktor im 400 ml-Maßstab	53
4.3	MEDIEN UND PUFFERLÖSUNGEN	54

---

4.3.1	CSL-Medium	54
4.3.2	CSP-Medium	54
4.3.3	Modifiziertes LB-Medium	55
4.3.4	Umsetzungspuffer	55
4.3.5	Substratvorlage	56
4.3.6	Extraktionsmittel mit internem Standard	56
4.3.7	Sonstige Chemikalien	56
4.4	ANALYTIK UND MESSTECHNIK	56
4.4.1	Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration	56
4.4.2	Messung der optischen Dichte von Zellsuspensionen	57
4.4.3	Korrelation OD – BTM	57
4.4.4	Gaschromatographie mit Probenvorbereitung	61
4.4.5	Parallele pH- und pO <sub>2</sub> -Messung	62
4.4.6	Charakterisierung der pO <sub>2</sub> -Messung	62
4.4.7	Charakterisierung der pH-Messung	62
4.4.8	Referenzmessungen des pH	63
4.4.9	Bestimmung des k <sub>L</sub> a	63
4.5	MIKROORGANISMEN	64
4.5.1	<i>Escherichia coli</i>	64
4.5.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
4.6	KULTIVIERUNG VON MIKROORGANISMEN	65
4.6.1	Vorkultur	65
4.6.2	Prozessvorbereitung paralleler Kultivierungen	65
4.6.3	Parallelkultivierung von Mikroorganismen	67
4.6.4	Kultivierung im Litermaßstab	69
4.7	BIOTRANSFORMATION	69
4.8	PROZESSOPTIMIERUNG	71
4.8.1	Parallele Optimierung	71
4.8.2	Genetischer Algorithmus	71
<b>5</b>	<b>AUTOMATISIERUNG VON PARALLELBIOREAKTOREN</b>	<b>75</b>
5.1	OPTIMIERUNG DES PARALLELEN MILLILITER-BIOREAKTORS	75
5.1.1	Verlust der Magnetisierung und Korrosion der Dauermagnete	76
5.1.2	Verschleiß des Gleitlagers der Rührkörper	79
5.1.3	Optimierung der Sterilgasabdeckung	85
5.1.4	Absaugung der Reaktorabluft	87
5.1.5	Diskussion	90
5.2	KONTROLLE DES SAUERSTOFFPARTIALDRUCKS	92

---

5.2.1	Parallele Sauerstoffpartialdruck-Messung	92
5.2.2	Parallele Sauerstoffpartialdruck-Kontrolle	96
5.2.3	Diskussion	98
5.3	KONTROLLE DES PH	99
5.3.1	Parallele pH-Messung	99
5.3.2	Parallele pH-Regelung	104
5.3.3	Diskussion	107
<b>6</b>	<b>PROZESSOPTIMIERUNG ZUR BOKATALYSATORHERSTELLUNG</b>	<b>109</b>
6.1	PARALLELE BOKATALYSATORANZUCHT	110
6.2	PARALLELE BIOTRANSFORMATION	115
6.3	ERGEBNIS DER OPTIMIERUNG	118
6.4	MAßSTABSÜBERTRAGUNG	122
6.5	DISKUSSION	125
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>135</b>

---

<b>10 ANHANG A – BILANZIERUNG UND BEWERTUNG BIOTECHNOLOGISCHER PROZESSE</b>	<b>147</b>
10.1 THEORIE DER ÖKONOMISCHEN UND ÖKOLOGISCHEN BILANZIERUNG	147
10.1.1 Ökonomische Bilanzierung	148
10.1.2 Ökologische Bilanzierung	149
10.2 ÖKONOMISCHE UND ÖKOLOGISCHE BILANZIERUNG	151
10.2.1 Vergleichende ökonomische Bilanzierung	152
10.2.2 Vergleichende ökologische Bewertung	154
10.2.3 Diskussion	158
10.3 DATENBASIS DER ÖKONOMISCHEN UND ÖKOLOGISCHEN BILANZIERUNG	160
10.3.1 Biokatalysatorherstellung	160
10.3.2 Biotransformation	161
<b>11 ANHANG B – TABELLEN UND VERZEICHNISSE</b>	<b>163</b>
11.1 DATEN DES SUBSTRATS UND PRODUKTS DER BIOTRANSFORMATION	163
11.2 ABKÜRZUNGEN	164
11.2.1 Material- und Medienbezeichnungen	164
11.2.2 Mess- und Prozessgrößen	164
11.2.3 Sonstige Abkürzungen und Indizes	165
11.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	165
11.4 TABELLENVERZEICHNIS	169

# 1 Einleitung

Die Bedeutung biopharmazeutischer Wirkstoffe, also therapeutisch wirksamer Proteine und Peptide, hat in den letzten Jahren in der modernen Medizin massiv zugenommen (Reichert, 2006). Für eine zunehmende Anzahl derartiger Medikamente wurde die Zulassung beantragt. So kamen von 1996 bis 2005 in den USA 65 dieser Medikamente neu auf den Markt, allein von 2001 bis 2005 waren es 33 (Reichert, 2006). Im gleichen Zeitraum nahm jedoch die Dauer der klinischen Testphase von 83,9 auf 101,5 Monate zu (Reichert, 2006). In Europa zeigt sich eine vergleichbare Situation. Dort wurde allein im Zeitraum von September 1997 bis April 2000 für 38 Biopharmazeutika bei der European Medicines Evaluation Agency EMEA die Zulassung beantragt (Pignatti, 2002). Der notwendige Aufwand zur Entwicklung neuer Wirkstoffe und ihrer Herstellungsprozesse ist enorm. Viele dieser neuen Medikamente werden aufwändig mit Hilfe rekombinanter Mikroorganismen hergestellt (Pavlou und Reichert, 2004). Nicht selten beträgt die Entwicklungszeit dazu bis zu 15 Jahre und die verursachten Kosten belaufen sich auf 800 Millionen US\$ (Weng und deLisi, 2002; diMasi *et al.*, 2003).

Diese gesamte Entwicklung wäre ohne den entsprechenden Fortschritt in der Forschung jedoch nicht möglich gewesen. Die oben genannten Zahlen belegen allerdings auch, dass eine weitere Entwicklung und Beschleunigung dringend notwendig ist.

Neben der heute üblichen Genmanipulation zur Erzeugung mikrobieller Stämme zur Produktion von Biopharmazeutika spielt die Prozessentwicklung zur Kultivierung der Produktionsstämme und die damit verbundene Herstellung der Wirkstoffe eine zunehmend wichtige Rolle (Gupta und Lee, 2007). Moderne Werkzeuge der Hochdurchsatz-Prozessentwicklung helfen dabei. Insbesondere Miniatur-Bioreaktoren haben sich zunehmend in diesem Bereich etabliert und zu einer beschleunigten Entwicklung geführt (Betts und Baganz, 2006). So werden Mikrotiterplatten bereits routinemäßig in Parallelversuchen zur Primärauswahl von Mikroorganismen, die als Kandidaten zur Produktion in Frage kommen, verwendet.

Die anschließende Sekundärauswahl und Prozessentwicklung führt zum fertigen Produktionsprozess. Die Anzahl der in der Primärauswahl identifizierten Kandidaten muss jedoch groß genug sein, um die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines ökonomischen Prozesses zu erhöhen. Die Identifizierung der optimalen Reaktionsbedingungen der Mikroorganismen ist dabei nicht vorhersagbar. Der Einfluss der Prozessbedingungen (beispielsweise pH, Temperatur, Medienzusammensetzung) auf den mikrobiellen Metabolismus lässt sich nicht im Modell vorausberechnen. Vielmehr ist eine breit angelegte Suche notwendig. Dabei hat sich der Einsatz von Methoden zur statistischen Versuchsplanung, wie beispielsweise genetische Algorithmen, bewährt (Weuster-Botz, 2000). Zur Durchführung bieten sich Methoden an, die experimentelle Untersuchungen im Parallelansatz ermöglichen. Bisher wurden dazu zumeist Schüttelkolben und konventionelle Rührkessel-Bioreaktoren verwendet. Schüttelkolben lassen sich zwar einfach parallel betreiben, generieren jedoch nur einen beschränkten Satz prozessrelevanter Daten. Diese lassen sich mit Rührkessel-Bioreaktoren gewinnen, allerdings ist die Parallelisierung nur mit erheblichem Aufwand realisierbar. Auch hier ermöglichen neue Technologien die effiziente parallele Prozessentwicklung im Miniaturmaßstab und ermöglichen die Gewinnung wertvoller prozessrelevanter Daten (Micheletti und Lye, 2006).

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Die moderne Bioprozessentwicklung versucht in zunehmend kürzerer Zeit immer mehr Daten zu gewinnen. Bioreaktoren sind dabei eines der wichtigsten Werkzeuge und müssen entsprechend leistungsfähig sein. Dabei muss der Bioreaktor mehreren Anforderungen genügen. Ein Bioreaktor, der beispielsweise der aeroben Kultivierung von Mikroorganismen dient, sollte in der Lage sein den Zellen ausreichend Sauerstoff zur Verfügung zu stellen, den pH zu kontrollieren, die vorgegebene Temperatur zu kontrollieren sowie die Möglichkeit der Probenahme zu geben.

Unter dieser Vorgaben wurde in jüngster Vergangenheit ein Prototyp eines Bioreaktorblocks mit 48 parallelen Rührkesselbioreaktoren im Milliliter-Maßstab zur Kultivierung von Mikroorganismen unter technischen Reaktionsbedingungen entwickelt (Puskeiler, 2004; Puskeiler *et al.*, 2005a). Die Gewinnung der Prozessdaten, wie beispielsweise der pH, erfolgte bei diesem Prototyp durch eine *atline* durchgeführte Analytik, lediglich in acht Reaktoren konnte bereits *online* die gelöstsauerstoffkonzentration gemessen werden. Die Automatisierung erfolgte mit Hilfe eines Pipettierroboters. Mit diesem Prototyp eines Bioreaktorblocks konnten bereits erfolgreich Mikroorganismen im Satz- und Zulaufverfahren kultiviert werden. Ebenso wurde ein industrieller mikrobieller Prozess zur Produktion von Riboflavin mit Erfolg in den Millilitermaßstab übertragen (Knorr *et al.*, 2007).

Es zeigte sich jedoch, dass dieser Prototyp nur eingeschränkt nutzbar war. Von 48 zur Verfügung stehenden parallelen magnetisch-induktiv angetriebenen Reaktoren fielen über einen Zeitraum von 48 Stunden 50% der Rührer aus. Da es sich um selbstansaugende (gasinduzierende) Rührorgane handelt, fiel damit auch die Sauerstoffversorgung aus.

Daneben zeigte der mit Mikroorganismen, Medium und pH-Korrekturmitteln in Kontakt kommende Teil des Prototyps des Bioreaktors bereits nach wenigen Monaten Nutzungsdauer starke Korrosionserscheinungen. Diese traten sowohl an der im Betrieb sterilen Unterseite als auch an der offen zugänglichen Oberseite auf.

Des Weiteren wurden im Betrieb erhebliche Mengen mit Mikroorganismen beladenes Aerosol gebildet und an die Umgebung abgegeben. Das kann in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 noch toleriert werden, ist nach allen anderen Sicherheitsstandards jedoch nicht zulässig.

Die Messung des pH wurde beim Prototypen *atline* mit einer Abtastzeit von ein bis zwei Stunden bei einer Messzeit von rund zehn Minuten für alle 48 Reaktoren durchgeführt. Die auf der *atline* pH-Messung basierenden Stelleingriffe zur Beeinflussung des pH erfolgten alle 30 Minuten. Damit war eine dynamische und effektive pH-Regelung für biologische Anwendungen in den einzelnen Parallelreaktoren nur schwer möglich.

Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit sind daher zum einen die Identifikation der Ursachen für den häufigen Ausfall von Rührern und die Erarbeitung von technischen Lösungen. Ebenso soll das Korrosionsproblem analysiert und Lösungen zur Behebung der Korrosionserscheinung gefunden werden. Darüber hinaus sollen technische Lösungen zur Reduzierung der Aerosolfreisetzung erarbeitet und realisiert werden.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit ist die Etablierung einer neuen parallelen *online* Messung von pH und Gelöstsauerstoffkonzentration für alle 48 Parallelreaktoren und einer individuellen pH-Regelung in allen 48 Reaktoren.

Diese reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse soll an Beispielprozessen mit *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* experimentell verifiziert werden.

Im Einzelnen waren folgende Arbeitspakete geplant:

- Weiterentwicklung und Optimierung des bestehenden Prototyps des Bioreaktorblocks und seiner Komponenten für den zuverlässigen Betrieb, der die Grundvoraussetzung für eine Parallelisierung und Automatisierung ist.
- Bereitstellung und Evaluierung von Methoden und Techniken für die Bioprozessentwicklung mit Hilfe des optimierten Bioreaktorblocks, insbesondere eine zuverlässige parallele Messung von pH und Gelöstsauerstoffkonzentration, sowie eine effektive pH-Regelung.
- Beispielhafte Demonstration der Einsetzbarkeit des parallelen Bioreaktorblocks als Werkzeug zur Prozessentwicklung.

- Maßstabsübertragung und Validierung der Ergebnisse der Optimierung aus dem Millilitermaßstab in den standardisierten Labor-Rührkesselbioreaktor im Litermaßstab.



## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Bioreaktionstechnik in kleinen Reaktionsvolumina

Unter dem Druck der gestiegenen Anforderungen an Bioreaktoren als Werkzeug der Bioprozessentwicklung wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe verschiedenartiger Bioreaktoren im Mikroliter- bis zum Millilitermaßstab entwickelt. Das Ziel dieser Entwicklungen waren zumeist hoch integrierte Miniaturreaktoren. Ein Teil dieser Bioreaktoren ist dabei als Parallelreaktor konzipiert, ein Teil existiert als Einzelreaktor.

Eines der wichtigsten Kriterien zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit eines Bioreaktors ist sein volumetrischer Stoffübergangskoeffizient  $k_{La}$ . Dieser ist ein Maß für das Vermögen Sauerstoff aus der gasförmigen in die flüssige Phase des Reaktors einzutragen, das heißt den Stoffübergang über die Phasengrenze hinweg zu bewirken.

Im Folgenden werden hier lediglich Bioreaktoren für die Kultivierung von Bakterien und Hefen betrachtet, deren Nennvolumen weniger als 50 Milliliter beträgt und bei denen wenigstens zwei Reaktoren parallelisiert sind. Daneben sollten die Reaktoren über die Möglichkeit der *online*-Erfassung von Prozessparametern wie pH und Gelöstsauerstoffkonzentration verfügen.

Die den genannten Kriterien entsprechenden Reaktoren können in drei Gruppen eingeteilt werden: geschüttelte Mikrotiterplatten, Miniaturblasensäulen und Miniaturrührkesselbioreaktoren.

#### 3.1.1 Geschüttelte Mikrotiterplatten

Durch den zunehmenden Bedarf an Daten in der Bioprozessentwicklung werden seit einiger Zeit Mikrotiterplatten als parallele geschüttelte Bioreaktoren verwendet. Sie stellen vom Prinzip her miniaturisierte Schüttelkolben dar.

Mikrotiterplatten für die Mikrobiologie werden mit 6, 12, 24, 48, 96, 384 und 1536 Kavitäten angeboten wobei lediglich Platten mit bis zu 96 Aufnahmen vermehrt Verbreitung gefunden haben. Der Querschnitt der Kavitäten ist meist kreisförmig wobei auch 96er Platten mit quadratischem Querschnitt erhältlich sind. Der Boden kann als Flachboden (F-Form), Rundboden (U-Form) oder Spitzboden (V-Form) ausgebildet sein. Die Bauhöhe beträgt in der Regel ca. 14 mm, sogenannte „Deep-Well“-Plates“ haben eine Bauhöhe von bis zu 44 mm. Das Arbeitsvolumen beträgt je nach Art der Platte zwischen 0,01 ml (1536 Vertiefungen) und 6 ml (6 Vertiefungen). Sie werden im Spritzgussverfahren aus Polystyrol (PS) und Polypropylen (PP) sowohl naturfarben als auch eingefärbt, meist schwarz, hergestellt und sind einzeln steril verpackt erhältlich. Für Spezialanwendungen gibt es sie mit opaker Wandung und transparentem, teilweise aus Glas bestehendem, Boden.

Für die einfache Kultivierung von Mikroorganismen in der breiten Anwendung werden hauptsächlich Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet (Betts und Baganz, 2006; Kumar *et al.*, 2004).

Die Sauerstoffeintragsleistung von Mikrotiterplatten mit zylindrischen und quadratischen Vertiefungen wurde von mehreren Arbeitsgruppen intensiv untersucht.

**Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Arbeiten zum Sauerstoffeintrag in Mikrotiterplatten**

Quelle	Typ Mikrotiterplatte	Schüttel- frequenz	Schüttel- durchmesser	Flüssigkeits- volumen	$k_L a$
Hermann <i>et al.</i> , 2003	96 rund	0 – 1000 min <sup>-1</sup>	3 – 50 mm	200 µl	0,008 – 0,044 s <sup>-1</sup>
John <i>et al.</i> , 2003	9 rund	87 – 350 min <sup>-1</sup>	1 – 7 mm	45 - 180 µl	0,003 - 0,006 s <sup>-1</sup>
Duetz und Witholt, 2004	96 Deep-Well quadratisch 96 Deep-Well rund	300 min <sup>-1</sup> 300 min <sup>-1</sup>	25 – 50 mm 25 – 50 mm	500 µl 260 µl	0,021 – 0,046 s <sup>-1</sup> 0,007 – 0,023 s <sup>-1</sup>
Doig <i>et al.</i> , 2005	24, 96, 384 rund	60 – 1400 min <sup>-1</sup>	3, 4,5, 8 mm	72 - 1182 µl	0,005 – 0,055 s <sup>-1</sup>
Kensy <i>et al.</i> , 2005b	48, rund	0 – 2000 min <sup>-1</sup>	1 – 50 mm	300 – 600 µl	0,008 – 0,097 s <sup>-1</sup>

Der Stoffübergang des Sauerstoffs kann in Mikrotiterplatten nur über die Phasengrenzfläche der Flüssigkeit in der Vertiefung erfolgen. Die Größe dieser Grenzfläche ist bei ruhenden beziehungsweise nur langsam oder mit geringer Exzentrizität schüttelnden Platten, unter Vernachlässigung eines

Flüssigkeitsmeniskus, identisch mit dem freien Querschnitt der Vertiefung. Erst ab einer minimalen Schüttelfrequenz und Exzentrizität kommt es unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft zur Ausbildung einer charakteristischen, meist sichelförmigen, Flüssigkeitsströmung entlang der Wandung der Vertiefung (Hermann *et al.*, 2003; Kensy *et al.*, 2005a). In Abhängigkeit der Geometrie der Vertiefung und der Faktoren Schüttelfrequenz, Schütteldurchmesser und Flüssigkeitsvolumen können  $k_{La}$  bis zu  $0,1 \text{ s}^{-1}$  erreicht werden.

Neuere Entwicklungen haben zur Einführung von Sensoren in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten geführt, die die *online*-Erfassung von Prozessdaten ermöglichen. Dabei handelt es sich meist um berührungslos arbeitende optische Sensoren. Diese können mit vertretbarem Aufwand parallelisiert und automatisiert werden. Aus geometrischen Gründen und dem Wunsch nach größeren Volumina der Kultivierungen wurden dabei zumeist Mikrotiterplatten mit 48 beziehungsweise 24 Vertiefungen an Stelle der bisher verwendeten Platten mit 96 Vertiefungen verwendet. Die gebräuchlichsten Analyten sind der pH und die Gelöstsauerstoffkonzentration (John *et al.*, 2003; Kensy *et al.*, 2005b). Eine Kontrolle beziehungsweise Regelung von Prozessparametern wie beispielsweise des pH ist nicht möglich. Mit derart ausgestatteten Mikrotiterplatten konnte die erfolgreiche Kultivierung von Mikroorganismen im Satzverfahren demonstriert werden.

**Tabelle 3.2: Vergleich der Ergebnisse von Kultivierungen in geschüttelten Mikrotiterplatten**

	John <i>et al.</i> , 2003	Kensy <i>et al.</i> , 2005b
Organismus	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Escherichia coli</i> JM109
Mikrotiterplatte	24, rund	96, rund
Analyten	pH, $pO_2$ , OD	$pO_2$ , OD
Schüttelfrequenz	$250 \text{ min}^{-1}$	$1020 \text{ min}^{-1}$
Schütteldurchmesser	25 mm	1 mm
Volumen	400 – 1200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
Laufzeit	14 h	30 h
maximale Biotrockenmassekonzentration	n.b.	$5 \text{ g l}^{-1}$

Ein erstes Gerät zur Nutzung von geschüttelten Mikrotiterplatten als paralleler Bioreaktor ist kommerziell erhältlich (BioLector, m2p-labs GmbH, Aachen).

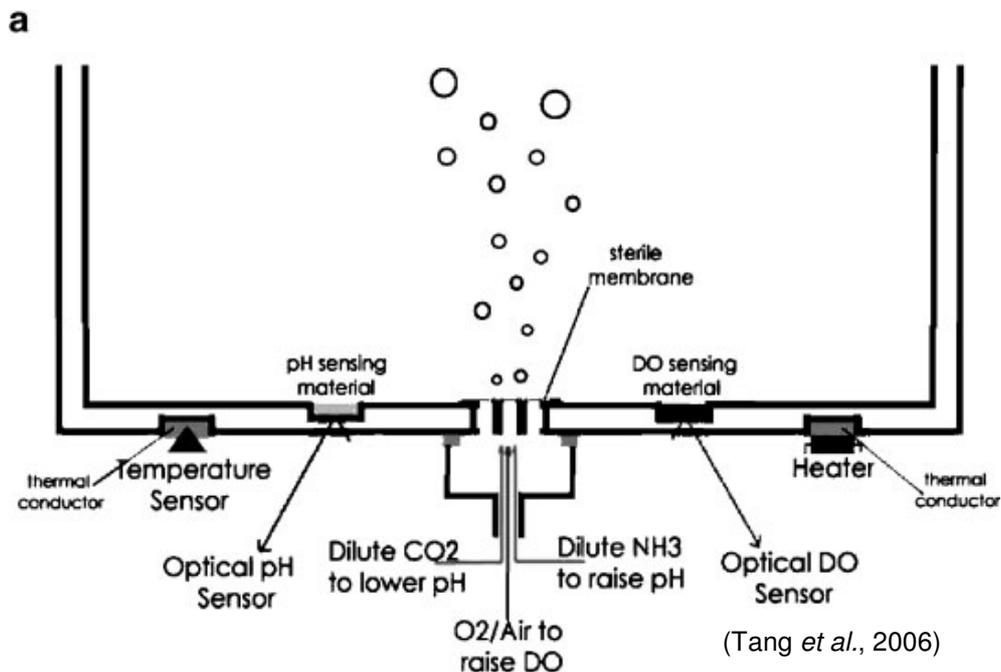
### 3.1.2 Miniaturblasensäulen

Eine weitere Art miniaturisierter Bioreaktoren stellen Miniaturblasensäulen dar. Mehrere Arbeitsgruppen stellten derartige Reaktoren vor (Maharbiz *et al.*, 2004; Doig *et al.*, 2005; Tang *et al.* 2006). Technisch weit entwickelt ist dabei der letztgenannte Reaktor. Es handelt sich um 24 parallele Miniaturblasensäulen mit einem Volumen von 10 ml bei einem Arbeitsvolumen von 3 ml. Die Reaktoren sind in einem 6x4 Raster angeordnet und werden vorsterilisiert verwendet.



**Abbildung 3.1: 24-fache parallele Miniaturblasensäule**  
Die 24 Miniaturblasensäulen werden im Spritzgussverfahren hergestellt und sind in einem 6x4 Raster angeordnet.

Die Gaseinleitung erfolgt über eine im Boden eingelassene Sterilmembran. Zur *online*-Bestimmung des pH und  $pO_2$  verfügt jeder der Reaktoren über optische Sensoren. Zur Temperaturkontrolle sind ein Thermo- und ein Heizelement eingebaut. Die pH-Kontrolle wird durch die Zugabe von Kohlenstoffdioxid  $CO_2$  bzw. Ammoniak  $NH_3$  zur Zuluft durchgeführt. Zusätzlich kann die gesamte Anordnung bei einer Frequenz von bis zu  $500 \text{ min}^{-1}$  bei einem Schütteldurchmesser von 2 mm bewegt werden. Dies dient dem Leistungseintrag und damit der Durchmischung des Reaktorinhalts.



**Abbildung 3.2: Arbeitsprinzip der 24-fache parallele Miniaturblasensäule**

Jeder der Miniaturbioreaktoren verfügt über einen Gasanschluss zur Versorgung mit Sauerstoff und zur pH-Korrektur mittels beigemischem  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_3$ . Der Messung des pH und  $\text{pO}_2$  dienen optische Sensoren am Boden. Dort sitzt ebenfalls der Sensor und ein Heizelement für die Temperaturkontrolle.

Publizierte Kultivierungen im Satzverfahren mit *Shewanella oneidensis* MR-1 erreichten nach einer Dauer von 25 Stunden eine Zunahme der optische Dichte von etwa 1,3 OD-Einheiten, der pH wurde auf pH 7, der  $\text{pO}_2$  auf einen Wert über 20% Luftsättigung geregelt (Tang *et al.*, 2006).

Die 24-fache parallele Miniaturblasensäule wurde bereits kommerzialisiert (Cellerator™, Micro Reactor Technologies, Mountain View, USA; in Lizenz  $\mu$ -24, Applikon Biotechnology B.V., Schiedam, Niederlande). Nach Angaben des Herstellers kann ein  $k_L a$  von bis zu  $0,028 \text{ s}^{-1}$  erreicht werden.

### 3.1.3 Miniaturrührkesselbioreaktoren

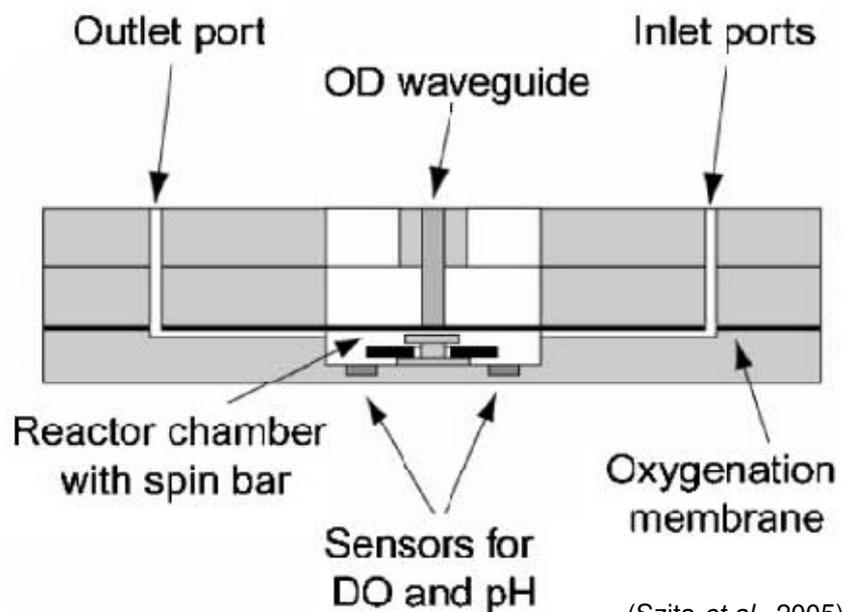
Die letzte große Gruppe fasst alle Arten miniaturisierter Rührkesselbioreaktoren zusammen.

- *Mikroliter-Rührkesselbioreaktoren*

Ein Mikroliter-Rührkesselbioreaktor wurde von Jensen und Mitarbeitern publiziert. Dabei handelt es sich um einen Rührkesselbioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 150  $\mu\text{l}$ . Der eigentliche Reaktor wird durch einen Stapel dünner Platten aus

verschiedenen Polymerwerkstoffen mit entsprechenden Aussparungen gebildet. Das Medium wird mit einem magnetisch gekoppelten Rührer bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 200 - 1500  $\text{min}^{-1}$  durchmischt. Jeder Reaktor ist mit einer 100  $\mu\text{m}$  dicken gasdurchlässigen Membrane verschlossen durch die auch die Oberflächenbegasung erfolgt. Zur *online*-Messung von pH und  $\text{pO}_2$  dienen wiederum optische Sensoren. Daneben besteht die Möglichkeit *in-situ* die optische Dichte der Zellsuspension bei 600 nm zu messen. (Szita *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Der  $k_{\text{La}}$  des Reaktors beträgt 0,006 – 0,021  $\text{s}^{-1}$  (Zhang *et al.*, 2006).

Parallele Kultivierungen in drei dieser Reaktoren erreichten im Satzverfahren mit *E. coli* nach etwa 5 Stunden eine optische Dichte  $\text{OD}_{600}$  von bis zu  $6,2 \pm 0,17$ . *Saccharomyces cerevisiae* erreichten in vergleichbaren Kultivierungen nach einer Versuchsdauer von 15 Stunden eine optische Dichte  $\text{OD}_{600}$  von  $6,87 \pm 0,07$ .



(Szita *et al.*, 2005)

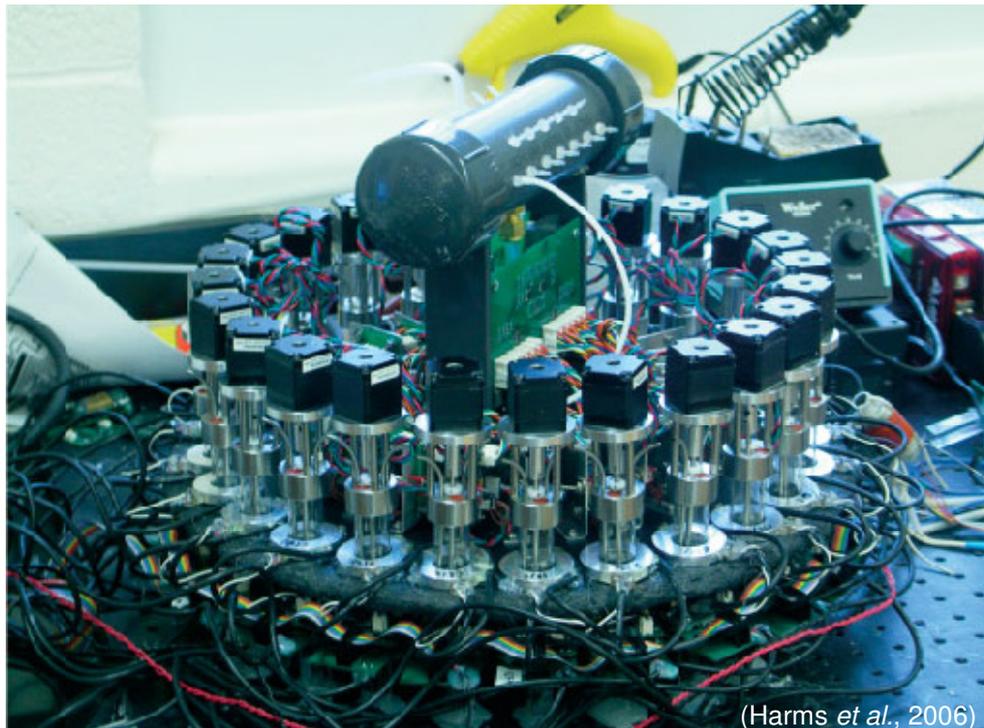
**Abbildung 3.3: Schema des Mikroliter-Rührkesselbioreaktors**

Eine Tasche in der untersten Schicht bildet den eigentlichen Reaktor. Dieser wird mit einer sauerstoffdurchlässigen Membran verschlossen. Die darüber liegenden Kunststoffschichten dienen zur Fixierung des magnetisch angetriebenen Rührers und als Lichtleiter zur Messung der optischen Dichte der Zellsuspension. Zur Messung des pH und  $\text{pO}_2$  dienen optische Sensoren am Boden des Reaktors.

- *Milliliter-Rührkesselbioreaktoren*

Eine kreisförmige Anordnung von 24 Milliliter-Rührkesselbioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von einem Milliliter wurde von Rao und Mitarbeitern vorgestellt. Jeder dieser Reaktoren verfügt über einen Schrittmotor zum Antrieb des Rührers und

eine eigene Sensoreinheit. Diese dient zum Auslesen der am Boden der Reaktoren befindlichen optischen Sensoren zur Messung des pH und  $pO_2$  sowie der optischen Dichte der Zellsuspension. Zusätzlich besteht die Möglichkeit die Konzentration des oft als Marker verwendeten grün fluoreszierenden Proteins (green fluorescent protein) GFP fluorometrisch zu bestimmen. Die möglichen Drehzahlen des Rührers liegen im Bereich von  $10 - 1000 \text{ min}^{-1}$ , die Begasung erfolgt über die Flüssigkeitsoberfläche (Kostov *et al.*, 2001; Harms *et al.*, 2006).



(Harms *et al.*, 2006)

**Abbildung 3.4: Parallelbioreaktor mit 24 Rührkesselbioreaktoren**

Die Reaktoren sind kreisförmig angeordnet und verfügen jeweils über einen eigenen Rührerantrieb und eine Sensoreinheit zur Messung der optischen Dichte der Zellsuspension sowie des pH,  $pO_2$  und des grün fluoreszierenden Proteins GFP.

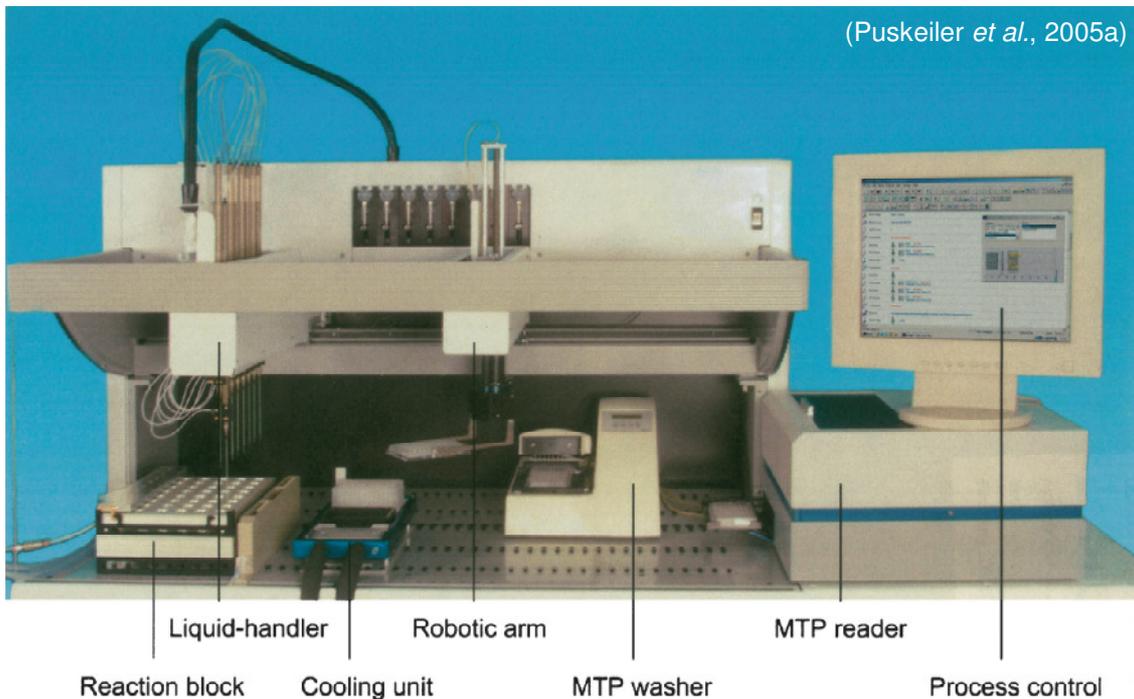
Mit diesem Parallelreaktor wurden *Escherichia coli* in den 24 parallelen Reaktoren über einen Zeitraum von etwa 26 Stunden von einer anfänglichen optischen Dichte OD 1 bis zu einer OD von  $1,3 \pm 0,15$  kultiviert.

Der 24-fache Parallelbioreaktor wird kommerziell beworben (CellStation™, Fluorometrix, Baltimore, USA).

- *Bioreaktorblock*

Die unbefriedigenden und teilweise nicht ausreichenden Einsatzmöglichkeiten bestehender verfügbarer Technologien für die parallele Kultivierung von Mikroorganismen (Weuster-Botz *et al.* 2005) führten zur Entwicklung eines neuen

parallelen Bioreaktorblocks (Puskeiler, 2004; Puskeiler *et al.*, 2005a). Dieser verfügt über 48 parallele Rührkesselbioreaktoren im Milliliterformat.



**Abbildung 3.5: Bioreaktorblock mit 48 parallelen ml-Bioreaktoren**

Der Bioreaktorblock vereint in einem 6x8 Raster 48 parallele ml-Rührkesselbioreaktoren. Der Pipettierarm eines Laborroboters dient der Handhabung von Flüssigkeiten für die Reaktoren. Auf einer kühlbaren Station können Proben in Mikrotiterplatten abgelegt und Lösungen vorgehalten werden. Ein Roboterarm bewegt die Probenplatten für eine *atline*-Analytik zu einem MTP-Lesegerät. Ein zusätzlich vorhandener MTP-Waschautomat ermöglicht die Wiederverwendung von Mikrotiterplatten während einer Kultivierung.

Jeder einzelne Reaktor weist mit einem Reaktorgefäß mit Strömungsbrechern und einem Rührer für die Durchmischung des Mediums und die Dispergierung der Gasphase die bekannten Einzelkomponenten eines klassischen Rührkesselbioreaktors auf. Bei dem eingesetzten Rührer handelt es sich um ein neu entwickeltes, selbst Gas ansaugendes, magnetisch-induktiv angetriebenes Rührorgan. Das Arbeitsvolumen der Reaktoren liegt zwischen 8 und 16 Millilitern. In einzelnen Reaktoren besteht die Möglichkeit optische Sensoren für die Messung des  $pO_2$  zu nutzen. Die Bestimmung des pH erfolgt *atline* fluorometrisch mit pH-sensitiven Sensorpunkten in Mikrotiterplatten. Ebenso wird die optische Dichte der Zellsuspensionen *atline* photometrisch ermittelt. Eine gemeinsame Abdeckung aller Reaktoren dient der gleichmäßigen Verteilung und Versorgung mit sterilem Prozessgas und stellt gleichzeitig den Verschluss der Reaktoren zur Wahrung der Sterilität dar. Die im Spritzgussverfahren gefertigten Reaktoren sind steril einzeln verpackt erhältlich. Alternativ können sie auch chemisch sterilisiert werden. Für alle

48 Reaktoren verfügt der Bioreaktorblock über eine gemeinsame Temperaturkontrolle und Abluftkühlung in der Abgasstrecke. Die Probenahme, die Probenbehandlung und Zufuhr von Flüssigkeiten in die Reaktoren übernimmt ein Laborroboter. Dazu verfügt er über einen Pipettierarm und einen Plattengreifer. Zur mehrfachen Nutzung von Mikrotiterplatten, insbesondere den pH-sensitiven Mikrotiterplatten, ist eine MTP-Waschstation eingebunden.

Das neu entwickelte Rührorgan erreicht je nach den Betriebsbedingungen einen  $k_{La}$  bis über  $0,4 \text{ s}^{-1}$  (Puskeiler, 2004). Der geschätzte Leistungseintrag liegt mit  $2,9 \text{ W l}^{-1}$  im Bereich dessen, was Standard-Rührkesselbioreaktoren mit maximalen  $8 \text{ W l}^{-1}$  leisten (Weuster-Botz *et al.*, 2005).

Mit dem parallelen Bioreaktorblock wurden erfolgreich *E. coli* im Zulaufverfahren binnen 16 Stunden bis zu einer maximalen Biotrockenmassekonzentration von  $20,3 \text{ g l}^{-1}$  kultiviert und im Litermaßstab reproduziert (Puskeiler *et al.*, 2005b). Ebenso wurde ein industrieller Prozess zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin mit *Bacillus subtilis* erfolgreich in den Millilitermaßstab übertragen (Knorr *et al.*, 2007).

### 3.1.4 Vergleich paralleler Miniaturbioreaktoren

Im Folgenden werden die wichtigsten Daten der zuvor dargestellten Parallelbioreaktoren tabellarisch zusammengefasst und verglichen. In den Publikationen einiger Arbeiten werden keine Biotrockenmassekonzentrationen sondern stattdessen lediglich die optischen Dichten der Zellsuspensionen genannt.

Mit allen aufgeführten Reaktortypen ist es möglich Kultivierungen im Satzverfahren durchzuführen. Der Mikroliter-Rührkesselbioreaktor und der Bioreaktorblock bieten als einzige weitergehende Möglichkeiten. Alle Reaktoren verfügen über eine *online*-Messung von zumindest pH und  $pO_2$ , oftmals auch OD. Lediglich der Bioreaktorblock ist jedoch in der Lage Proben für eine *atline*-Analytik zur Verfügung zu stellen.

Tabelle 3.3: Vergleich paralleler Miniaturbioreaktoren

Typ	Reaktoren	Volumen	$k_L a$	Analytik	Kontrolle	Kultivierung	Organismus	max. BTM/OD
Mikrotiterplatte	6 – 384	45 – 1182 $\mu$ l	0,003 – 0,097 $s^{-1}$	online pH, pO <sub>2</sub> , OD	-	Satzverfahren	<i>C. glutamicum</i>	n.b.
Miniatur- blasensäule	24	3 ml	0,028 $s^{-1}$	online pH, pO <sub>2</sub> , T	pH, pO <sub>2</sub> , T	Satzverfahren	<i>E. coli</i> <i>S. oneidensis</i>	5 g l <sup>-1</sup> 1,3 OD-Einh.
Mikroliter- Rührkessel- bioreaktor	3	150 $\mu$ l	0,006 – 0,021 $s^{-1}$	online pH, pO <sub>2</sub> , OD	-	Satzverfahren kontinuierlich	<i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i>	6,2 OD-Einh. 6,9 OD-Einh.
Milliliter- Rührkessel- bioreaktor	24	1 ml	n.b.	online pH, pO <sub>2</sub> , OD	pO <sub>2</sub>	Satzverfahren	<i>E. coli</i>	1,3 OD-Einh.
Bioreaktorblock	48	8 – 16 ml	>0,4 $s^{-1}$	online pH, pO <sub>2</sub> , atline OD, sonstige	pH	Satzverfahren Zulaufver.	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	20,3 g l <sup>-1</sup> >30 g l <sup>-1</sup>

## 3.2 Werkstofftechnik

Im bioverfahrenstechnischen Apparatebau werden traditionell hauptsächlich Edelstahl, Glas und wenige ausgesuchte Polymerwerkstoffe verwendet. Diese Materialien haben sich auf Grund ihrer Biokompatibilität und chemischen Beständigkeit bewährt. Beim Bau von sehr kleinen Reaktoren, insbesondere bei neuen innovativen Ansätzen, ist es notwendig neue Wege zu gehen und bisher nicht oder kaum verwendete Werkstoffe in Betracht zu ziehen.

### 3.2.1 Materialwahl

Ein Aspekt beim Bau von bioverfahrenstechnischen Anlagen ist die Wahl der richtigen Werkstoffe. Es besteht der Wunsch, Materialien des klassischen Anlagenbaus wegen ihrer bekannten und gewohnten Eigenschaften zu verwenden. Dem stehen jedoch oft beispielsweise konstruktive oder auch ökonomische Gründe entgegen.

Materialien, die für bioverfahrenstechnische Komponenten verwendet werden müssen mehreren Kriterien entsprechen:

- Dauereinsatztemperatur über 121 °C zur Möglichkeit der Sterilisation mittels Autoklavieren
- Hydrolysebeständigkeit zur Sterilisation im Heißdampf
- Chemische Beständigkeit gegenüber Alkoholen für die Desinfektion
- Chemische Beständigkeit gegenüber schwachen und starken Säuren und Basen
- Korrosionsbeständigkeit gegen Heißdampf
- Beständigkeit gegenüber mikrobiellen Angriffen

Beim Einsatz von Metall als Konstruktionswerkstoff sollten nach DIN EN 10088 bevorzugt ausschließlich wenige Sorten der Sortennummern 43 bis 45 innerhalb der Werkstoffhauptgruppe 1 verwendet werden.

**Tabelle 3.4: Liste der im bioverfahrenstechnischen Apparatebau zu verwendenden Stähle nach DIN EN 10088**

Stahl-Nr. / Typ		Legierungsanteil / Massen-%				
DIN	AISI	C	Cr	Mo	Ni	Sonstige
1.4301	304	≤0,07	17,0 – 19,0	-	8,5 – 10,5	-
1.4306	304L	≤0,03	18,0 – 20,0	-	10,0 – 12,5	-
1.4401	316	≤0,07	16,5 – 18,5	2,0 – 2,5	10,5 – 13,5	-
1.4404	316L	≤0,03	16,5 – 18,5	2,0 – 2,5	11,0 – 14,0	-
1.4435	316L	≤0,03	17,0 – 18,5	2,5 – 3,0	12,5 – 15,0	S≤0,025
1.4439	316L	≤0,03	16,5 – 18,5	4,0 – 5,0	12,5 – 14,5	N=0,12 – 0,22, S≤0,025
1.4541	321	≤0,08	17,0 – 19,0	-	9,0 – 12,0	Ti=5C-0,8
1.4571	316Ti	≤0,08	16,5 – 18,5	2,0 – 2,5	10,5 – 13,5	Ti=5C-0,8

Im Prototypenbau wird statt dessen oft versucht beispielsweise Aluminiumlegierungen zu verwenden, da diese preiswerter und wesentlich besser zu bearbeiten sind. Zum einen sind die Standzeiten der verwendeten Werkzeuge weit höher im Vergleich zur Edelstahlbearbeitung. Zum anderen sind die realisierbaren Schnittgeschwindigkeiten höher und folglich die Bearbeitungszeiten geringer. Daraus resultieren wesentlich geringere Kosten für Apparatekomponenten aus Aluminium.

Darüber hinaus können manchen Ideen und Konzepte nur mit bestimmten Materialien verwirklicht werden. So sind keine spannungsfreien oder zumindest spannungsarmen Edelstahlplatten erhältlich. Alle diesbezüglich auf dem Markt befindlichen Halbzeuge führen bei der Bearbeitung unweigerlich zu einer gewissen planparallelen Toleranz. Damit wäre es nicht möglich, die Sterilgasabdeckung des Bioreaktorblocks zu fertigen. Jeder Versuch würde in einem wannen- bzw. sattelförmig verzogenen Werkstück mit einer nicht tolerierbaren Abweichung von mehreren 1/10 mm enden. Bei den Aluminiumgusslegierungen existieren dagegen Sorten, wie z.B. Alplan<sup>®</sup> und Unidal<sup>®</sup> (Gleich GmbH, Kaltenkirchen), aus denen nahezu spannungsfreie Platten gegossen werden.

Aluminium ist jedoch gerade im Kontakt mit Mikroorganismen problematisch. Das Metall liegt nahezu nie in blanker Form vor, da es durch die Ausbildung einer dünnen Oxidschicht passiviert wird (Riedel, 1994). Dieses amphotere Aluminiumhydroxid  $\text{Al}(\text{OH})_3$  kann in starken Säuren und Basen gelöst werden. Bei zunehmender  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des dreiwertigen Aluminiumions  $\text{Al}^{3+}$  (Illmer und Erlebach, 2003; Piña und Cervantes, 1996). Dieses wirkt generell toxisch auf Bakterien und Hefen (Piña und Cervantes, 1996). Gerade

bei Kultivierungen mit Hefen kann sich das besonders stark auswirken, da diese Kultivierungen gerne bei vergleichsweise niedrigem pH durchgeführt werden.

Weiterhin ist die Art der Paarung verschiedener Werkstoffe zu beachten. Eine Verbindung zweier Materialien mit sehr unterschiedlichem Ausdehnungskoeffizienten kann bei der Sterilisation durch Autoklavieren, die bei biologischer Anwendung meist notwendig ist, problematisch werden. So hat beispielsweise Edelstahl im betreffenden Temperaturbereich einen Ausdehnungskoeffizienten  $\alpha$  von  $\sim 16 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ , Polytetrafluorethylen (PTFE) dagegen  $60\text{-}100 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ . Das bedeutet, dass zwei 300 mm lange Materialproben der genannten Werkstoffe bei der maximalen Autoklaviertemperatur von  $121^\circ\text{C}$  eine Längendifferenz von bis zu 2,5 mm aufweisen können. Dadurch treten Spannungen auf, die unter Umständen auch zur Beschädigung einer Bauteilverbindung oder eines Bauteils führen können.

Daneben führt gerade die Kombination verschiedener Metalle zu provozierte Korrosion und sollte daher unbedingt vermieden werden (European Hygienic Engineering & Design Group, 2007). Dies ist insbesondere zu beachten, wenn ein direkter Kontakt zweier Metalle entsteht und sie in einer wässrigen Lösung ein Kontaktelement bilden (Spähn und Fäßler, 1966).

Neben Edelstahl wird gerade beim Bau von Laborbioreaktoren oftmals Glas verwendet. Glas ist jedoch in seiner Verwendung auf Grund seiner spröden Eigenschaften limitiert. Die im Apparatebau üblichen Verarbeitungsmöglichkeiten wie Drehen, Fräsen und Schleifen sind nicht möglich. Gerade beim Prototypenbau kleiner Parallelreaktoren scheidet Glas damit als Werkstoff aus.

Eine Alternative zu Glas und teilweise auch zu Metallen bieten Polymerwerkstoffe. In der Gruppe dieser Werkstoffe finden sich neben den bereits seit längerem bewährten Kunststoffen Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyethylen (PE) und Polyoxymethylen (POM) auch neuere Werkstoffe wie beispielsweise Polyetheretherketon (PEEK). Wegen dessen positiven Eigenschaften lässt es sich oftmals als Ersatz für Edelstahl oder Aluminium verwenden (siehe auch Tabelle 3.5).

Als Gleitlagerwerkstoff für biologische Anwendungen eignet sich ZEDEX-530<sup>®</sup>. Es handelt sich hierbei um einen Kompositwerkstoff aus PTFE mit einer Einlagerung aus Keramikpartikeln. Es vereint die positiven Eigenschaften des PTFE mit denen einer modernen Keramik ohne deren jeweilige negative Eigenschaften mitzubringen. Seine Beständigkeit gegen chemische und thermische Beanspruchung ist ähnlich gut wie die des PTFE mit einer der Keramik vergleichbaren mechanischen Belastbarkeit. Daneben bietet es einen sehr niedrigen Gleitreibungskoeffizienten auch im offenen, nicht gekapselten Nasslauf.

**Tabelle 3.5: Vergleich ausgewählter Materialeigenschaften von PEEK, Aluminium und Edelstahl**  
(Beständigkeit: + gut, o mäßig, - schlecht)

Eigenschaften		PEEK	Aluminium	Edelstahl
mechanisch	Zugfestigkeit /N mm <sup>-2</sup>	97	430	950
	E-Modul /10 <sup>3</sup> N mm <sup>-2</sup>	3,6	60 – 80	196 – 216
thermisch	Schmelz- bzw. Glas- übergangstemperatur /°C	340	660	1450
	Dauereinsatztemp. /°C	<250	<340	<550
chemisch	aliphatische Kohlenwasserstoffe	+	+	+
	aromatische Kohlenwasserstoffe	+	+	+
	schwache min. Säuren	+	+	+
	starke min. Säuren	-	-	o
	schwache org. Säuren	+	+	+
	starke org. Säuren	o	-	+
	schwache Basen	+	o	+
	starke Basen	+	-	+
	Alkohole	+	+	+
	Hydrolysebeständigkeit	+	nb	nb
sonstige	Dichte /kg m <sup>3</sup>	1320	2700	7800 8000
	Wasseraufnahme /%	< 0,5	0	0

Problematisch kann bei den Polymerwerkstoffen sein, dass ihnen für pharmazeutische und industrielle Anwendung unter Umständen die Zulassung der U. S. Food and Drug Administration (FDA) fehlt. Ohne diese Zulassung ist ein den Prinzipien der Good-Laboratory-Practice (GLP) beziehungsweise Good-Manufacturing-Practice (GMP) konformes Arbeiten mit den entsprechenden Geräten kaum möglich.

### 3.2.2 Korrosion

Ein weiterer zu berücksichtigender Sachverhalt ist die Korrosion der verwendeten Werkstoffe. Die DIN EN ISO 8044 1999-11 definiert Korrosion wie folgt: „Korrosion ist die Reaktion eines metallischen Werkstoffs mit seiner Umgebung, die eine messbare Veränderung des Werkstoffs bewirkt und zu einer Beeinträchtigung der Funktion eines mechanischen Bauteiles oder eines ganzen Systems führen kann. In den meisten Fällen ist diese Reaktion elektrochemischer Natur, in einigen Fällen kann sie

*jedoch auch chemischer oder metallphysikalischer Natur sein.*“ Durch die Korrosion werden folglich sowohl die Eigenschaften der korrodierten Materialien als auch deren Umgebung verändert. Insbesondere die Freisetzung von Ionen und Verbindungen durch Korrosion kann sich bei biologischen Anwendungen als problematisch erweisen. Außerdem wird die Korrosion durch die nahezu ständige Anwesenheit wässriger Lösungen, die als Elektrolyt wirken, begünstigt.

Bei der Korrosion müssen mehrere für den bioverfahrenstechnischen Apparatebau relevante Arten (siehe Tabelle 3.6) unterschieden werden.

**Tabelle 3.6: Auflistung verschiedener Korrosionsarten und deren Gegenmaßnahmen**

Korrosionsart	Ursache	Gegenmaßnahmen
Flächenkorrosion, meist Oxidation („Rosten“)	großflächiger chemischer Angriff auf den Werkstoff mit Zerstörung der Oberfläche	Passivierung durch schützende Oxidschichten bei z.B. Edelstahl und Aluminium, Korrosionsschutzbeschichtung
Lochfraßkorrosion (auch Muldenkorrosion)	örtlich begrenzte, meist durch Halogenide und beschädigte passivierende Oberflächenbeschichtung begünstigte Korrosion von Chrom-Nickel-Stählen, die zur Ausbildung von Lokalelementen führen kann	Verwendung hochlegierter stabilisierter Stähle
Spannungs- und Schwingungsrissskorrosion	trans- und interkristalline Rissbildung auf Grund von statischen oder dynamischen Spannungszuständen bei Anwesenheit von spezifischen Angriffsmitteln, z.B. Halogenide	konstruktionstechnische Vermeidung von Spannungen und Schwingungen Verwendung spezifischer Stähle
interkristalline Korrosion	Ausbildung von korrosiven Lokalelementen zwischen unterschiedlichen Kristalliten innerhalb des metallischen Gefüges	Verwendung hochlegierter stabilisierter Stähle Verwendung qualitativ höherwertiger homogener Stähle mit kleinem Korn
Kontaktkorrosion (auch Bimetallkorrosion)	Ausbildung von korrosiven Kontaktelementen zwischen zwei oder mehr Metallen mit unterschiedlichem elektrochemischem Spannungspotenzial	Vermeidung ungünstiger Materialpaarungen Veränderung der Verhältnisse der freien Metalloberflächen

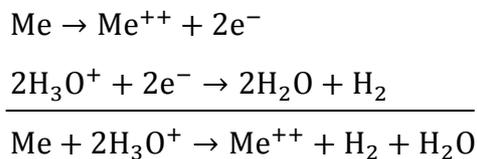
Besondere Beachtung sollte die Thematik der Kontaktkorrosion finden, da sie oftmals bei der Konzeptionierung nicht hinreichend beachtet wird und es eine Vielzahl verschiedener Parameter gibt, die die Entstehung der Korrosion beeinflussen. Zusätzlich zur Kontaktkorrosion können außerdem an beiden Korrosionspartnern noch lokale Korrosionsvorgänge ablaufen. Besonders groß ist die Gefahr der Kontaktkorrosion beim Mischbau, d.h. der Kombination von Leicht- und Schwermetallen (Spähn und Fäßler, 1966).

Neben der Art der beteiligten Metalle spielen der pH und die freien benetzten Flächen der Metalle eine Rolle. Besonders zu beachten ist die Kontaktkorrosion bei der Verwendung von hochlegierten Stählen, da diese gemeinhin als inert und absolut Korrosionsbeständig gelten.

Beim Kontakt zweier Metalle, hier also Edelstahl und ein weiteres Metall, kann es zur sogenannten Bimetallkorrosion kommen, wenn drei Voraussetzungen gegeben sind (Informationsstelle Edelstahl Rostfrei, 2005):

- Unterschiedliches elektrochemisches Spannungspotenzial
- Elektronenleitende Verbindung zwischen den Metallen, z.B. direkter Kontakt oder eine Schraubverbindung
- Verbindung beider Metalle durch einen leitfähigen Elektrolyten, beispielsweise atmosphärische Feuchtigkeit oder das Medium in einem Bioreaktor

Prinzipiell laufen an den beiden Elektroden des Kontaktelements die Reaktionen einer galvanischen Zelle ab, das heißt der unedlere Partner geht in Lösung, der edlere gibt die frei werdenden Elektronen an einen Reaktionspartner, meist Oxonium-Ionen, ab:



Der zwischen den Partnern des Kontaktelements fließende Elementstrom  $I_{KE}$  ist von mehreren Faktoren abhängig:

$$I_{KE} = \frac{A_K}{A_A} \cdot \frac{\Delta U}{R_{EL} + R_{P,A} + R_{P,K}} \quad (3-1)$$

Das sind neben der Potentialdifferenz  $\Delta U$  zwischen den Partnern auf Grund des elektrochemischen Potentials das Verhältnis der Elektrodenflächen von Kathode zu Anode, der Widerstand  $R_{EL}$  des Elektrolyten und die Polarisationswiderstände  $R_P$  an der Anode bzw. Kathode. Dieser Elementstrom des Kontaktelements beeinflusst nun in entscheidendem Maße die Korrosion des unedleren Metalls, da er zu einer zusätzlichen Oxidation des Metalls führt. Aus Gleichung (3-1) folgt nun, dass die Zersetzung des unedleren Metalls umso schneller von statten geht, je größer die

Kathodenfläche ist. In der Praxis bedeutet das, dass es somit sehr wohl sinnvoll ist, beispielsweise ein großflächiges verzinktes Stahlblech mit wenigen Edelstahlschrauben in Kontakt zu bringen, da der auftretende Elementstrom so klein ist, dass die basale Korrosion des Zinküberzugs kaum beeinflusst wird. Für die praktische Anwendung bei der Konstruktion von Bioreaktoren müssen diese Gegebenheiten berücksichtigt werden.

Durch Korrosion lösen sich auch in der Legierung vorhandene Schwermetalle. In ionischer Form haben diese allgemein eine toxische Wirkung auf Mikroorganismen (Giller *et al.*, 1998; Hassen *et al.*, 1998). Insbesondere Chrom, ein nahezu immer verwendeter Legierungsbestandteil von Stählen, hat in Abhängigkeit von der Oxidationsstufe einen antimikrobiellen Effekt (Cervantes *et al.*, 2001). Das ist auch in sofern zu beachten, da Chromatierungen eloxierter Aluminiumteile unter Umständen für den Korrosionsschutz notwendig sind. Dieses Chromat kann nun bei der Verwendung ausgewaschen werden und je nach dem herrschenden Oxidations- bzw. Reduktionspotential toxisch wirken.

### 3.3 Mess- und Regelungstechnik für biologische Systeme

Die Mess- und Regelungstechnik stellt in der modernen Bioverfahrenstechnik einen wichtigen Part dar. Dabei ist eine zuverlässige Messung die Grundlage einer jeden Regelung.

#### 3.3.1 Regelungstechnik für biologische Systeme

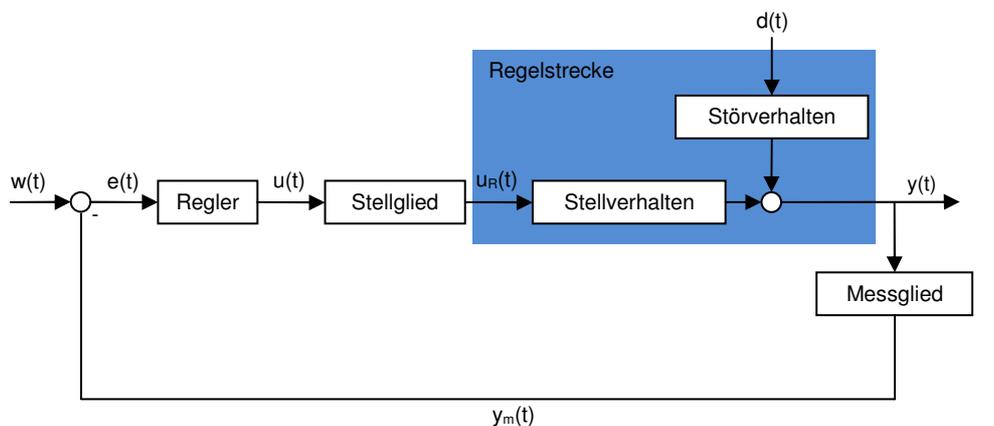
Die Regelungstechnik befasst sich mit der selbsttätigen Regelung von Zuständen eines dynamischen Systems. Nach DIN 19226 ist „[...] die *Regelung*, [...] ein Vorgang, bei dem fortlaufend eine Größe, die *Regelgröße* (zu regelnde Größe), erfasst, mit einer anderen Größe, der *Führungsgröße*, verglichen und im Sinne einer *Angleichung an die Führungsgröße beeinflusst wird*.“ Sie umfasst wie in Abbildung 3.6 dargestellt immer wenigstens eine Regelstrecke und eine Regeleinrichtung.

Bei der Klassifizierung der Regelung müssen verschiedene Modellsysteme und deren Kombinationen untereinander unterschieden werden: lineare und nichtlineare zeitvariante und –invariante Systeme. Lineare Systeme umfassen Vorgänge, bei denen zwischen der Eingangs- und Ausgangsgröße Proportionalität herrscht. Nichtlineare Systeme dagegen verletzen das Prinzip der Proportionalität. Zeitinvariante Systeme gehorchen dem Prinzip der Kausalität, das bedeutet, dass auf eine Änderung der Stellgröße nach einer festen Zeitspanne die Reaktion der

Regelgröße erfolgt. Zeitvariable Systeme reagieren dagegen innerhalb variabler Zeiträume.

Die Aufgabe der Regelung ist es, ein dynamisches System, die Regelstrecke, über eine von außen beeinflussbare Größe so zu manipulieren, dass die Regelgröße am Ausgang der Regelstrecke einer vorgegeben Führungsgröße bestmöglich entspricht. Die Regeleinrichtung (Regler) berechnet dazu basierend auf einem Messwert und der Führungsgröße die Stellgröße, die über ein Stellglied Einfluss auf die Regelgröße nimmt. Zusätzlich kann eine externe Störgröße die Stellgröße beeinflussen, was der Regler zusätzlich kompensieren muss (Lunze, 2006).

Die Verhältnisse der einzelnen Glieder und Größen sind in dem in Abbildung 3.6 gezeigten Schema zusammengefasst.



(Lohmann, 2006; Lunze, 2006)

**Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der erweiterten Grundstruktur eines Regelkreises**

Anhand der Führungsgröße  $w(t)$  und der gemessenen Regelgröße  $y_m(t)$  wird eine Regelabweichung  $e(t)$  berechnet. Der Regler berechnet daraus eine Stellgröße  $u(t)$  so, dass im Idealfall für die Regelgröße  $y(t) = w(t)$  gilt. Das Stellglied wandelt die Stellgröße  $u(t)$  in einen im Prozess wirksamen Stelleingriff  $u_R(t)$  um. Zusätzlich kann sich eine Störgröße  $d(t)$  über ein Störverhalten auf die Regelgröße  $y(t)$  auswirken.

Die prinzipielle Funktionsweise der Regelung ist wie folgt (Lunze, 2006):

1. Messen: die Regelgröße  $y(t)$  wird direkt oder indirekt über einen Messwert  $y_m(t)$  bestimmt
2. Vergleichen: die Regelgröße  $y(t)$  oder ihr Messwert  $y_m(t)$  wird mit der Führungsgröße  $w(t)$  verglichen und die Regelabweichung  $e(t)$  berechnet

$$e(t) = w(t) - y_{(m)}(t) \quad (3-2)$$

3. Stellen: die Stellgröße  $u(t)$  wird aus der Regelabweichung mit dem Reglergesetz  $k_R$  berechnet

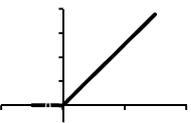
$$u(t) = k_R(e(t)) \quad (3-3)$$

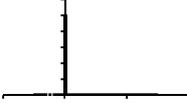
Die in der industriellen Anwendung oftmals eingesetzten PID-Regler werden als Standardregler bezeichnet. Sie sind sogenannte lineare stetige Regler und gehören damit zu den linearen zeitinvarianten Reglern. Es werden drei elementare Regelglieder, sogenannte Übertragungsglieder, unterschieden: Proportional- (P-), Integral- (I-) und Differential- (D-) Glied. Diese Glieder können sowohl einzeln als auch in Kombination als Regler arbeiten (Lunze, 2006). Die Kombination eines P-, I- und D-Reglers, der bereits genannte PID-Regler, vereinigt die Eigenschaften aller drei Elementarregler.

Mit Hilfe der Übergangsfunktion  $h(t)$  ist eine „Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Eingangs- und Ausgangsgröße eines linearen zeitinvarianten Übertragungssystems“ möglich (Horn und Dourdoumas, 2004). Die Übergangsfunktion gibt das Verhalten eines Reglers auf eine sprunghafte Eingangsgröße wieder.

Eine Übersicht der einzelnen Übertragungsglieder eines PID-Reglers mit ihren Übertragungsfunktionen, der Arbeitsweise und den Vor- und Nachteilen ist in Tabelle 3.7 dargestellt.

**Tabelle 3.7: Übersicht über Wirkungsweise von P-, I- und D-Reglern**

Regelglied	Regler und Übergangsfunktion	Arbeitsweise und Auswirkungen	Vor- und Nachteile
P-Glied	$y(t) = K_p \cdot u(t)$ 	<p>ausschließlich proportionaler Anteil</p> <p>Eingangswert wird mit Proportionalbeiwert <math>K_p</math> multipliziert</p>	<p>bleibende Regelabweichung</p> <p>unmittelbare Reaktion auf Veränderungen</p> <p>Schwingungsneigung bei großem <math>K_p</math></p>
I-Glied	$y(t) = \frac{1}{T_I} \cdot \int_0^t u(\tau) d\tau + y_0$ 	<p>zeitliche Integration der Regelabweichung mit Gewichtung <math>\frac{1}{T_I}</math> durch Nachstellzeit <math>T_I</math></p>	<p>Vergrößerung des I-Anteils bei konstanter Regelabweichung</p> <p>Gefahr des „Wind-Up“-Effekts bei nicht unmittelbarer Reaktion</p>

D-Glied	$y(t) = T_D \cdot \frac{du}{dt}$ 	Ausgangswert proportional zur Änderung der Regelabweichung Gewichtung mittels Vorhaltezeit $T_D$	Stellgröße nur bei Änderung der Regelabweichung Verstärkung von Rauschen
---------	--	---	---

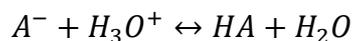
In der Bioverfahrenstechnik können die meisten dieser Regler, insbesondere PI- und PD-Regler gut eingesetzt werden (Shimizu, 1993). Dies geschieht beispielsweise bei der kontinuierlichen Regelung der Temperatur oder dem eintretenden Gasvolumenstrom eines Bioreaktors. Bei zeitlich kontinuierlicher Erfassung und der entsprechenden Möglichkeit des Eingriffs können auch langsame dynamische Größen wie der  $pO_2$  gehandhabt werden.

Biologische Systeme zeigen jedoch oft ein nichtlineares Verhalten. Dies zeigt sich beispielsweise während einer Kultivierung bei der Antwort des pH auf titrierende Eingriffe von außen. Die meist eingesetzten Puffer führen hierbei zu einem nichtlinearen Verlauf. Die Pufferwirkung eines Puffers beruht auf dem Gleichgewicht zwischen einer schwachen Säure HA und ihrer (meist in Form eines Salzes zugegebenen) konjugierten Base  $A^-$ .

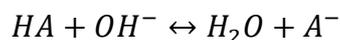


Die Säure und die konjugierte Base liegen nun in so großer Anzahl vor, dass sie eine zugegebene kleine Anzahl zugesetzter  $H_3O^+$  beziehungsweise  $OH^-$

durch Reaktion abfangen können, so dass sich der pH der Lösung nur geringfügig ändert.



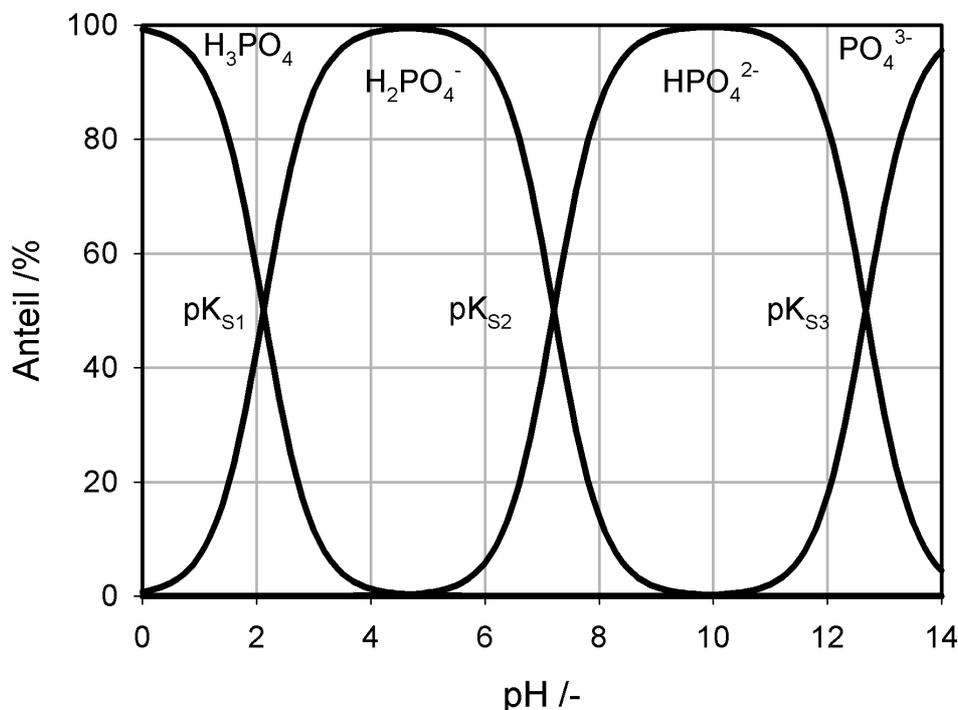
beziehungsweise



Der häufig verwendete Phosphatpuffer verfügt so über drei Pufferbereiche. Die dem Phosphatpuffer zugrunde liegende Phosphorsäure kann insgesamt drei Protonen abspalten bzw. das Phosphat bis zu drei Protonen aufnehmen. Alle diese Reaktionen stehen miteinander im Gleichgewicht:



Das bedeutet, dass in Abhängigkeit der anwesenden  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen, also folglich des pH, die einzelnen Dissoziationsstufen der Phosphorsäure, wie Abbildung 3.7 zeigt, nebeneinander in unterschiedlichen Anteilen vorhanden sind:



**Abbildung 3.7:** Anteile der Dissoziationsstufen der Phosphorsäure in Abhängigkeit des pH bei 25°C

**Am Äquivalenzpunkt  $\text{pK}_{\text{S}2}$  bei pH 7,21 haben  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  und  $\text{HPO}_4^{2-}$  den gleichen Anteilen von annähernd 50%. Die undissoziierte Phosphorsäure und das vollständig dissoziierte Phosphat liegen nur in Spuren vor.**

Im Pufferbereich um die Äquivalenzpunkte  $\text{pK}_{\text{S}}$  führen zugegebene Mengen an Säure beziehungsweise Base nur zu einer geringen pH-Änderung, da in beide Reaktionsrichtungen in etwa äquivalente Mengen der Ionen vorliegen und die jeweiligen Gleichgewichte nur in geringem Maße beeinflusst werden. So liegen im dem für biologische Anwendungen wichtigsten Bereich des Phosphatpuffers um den  $\text{pK}_{\text{S}2}$  bei pH 7,21 nahezu ausschließlich  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ - und  $\text{HPO}_4^{2-}$ -Ionen in vergleichbaren Konzentrationen vor. Zwischen den Äquivalenzpunkten außerhalb des Pufferbereichs dagegen liegt nahezu nur eine einzige Dissoziationsstufe vor. Bei einem pH von 4,67 gibt es fast ausschließlich  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -Ionen. Zugegebene  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen beispielsweise führen nun zu einer Bildung von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  wodurch es zu einer massiven Verschiebung des pH kommt.

Dieses nichtlineare Verhalten ist nun mit linearen Reglern schwer zu handhaben. Zusätzlich kann sich während einer Kultivierung der Metabolismus der Mikroorganismen ändern, da beispielsweise eine Kohlenstoff- und Energiequelle

vollständig verbraucht wurde und auf eine neue umgestellt wird. Dadurch kommt es meistens zu einer veränderten Aufnahme und Ausscheidung von sauren oder basischen Stoffen, was wiederum eine Auswirkung auf den pH des Mediums hat.

Zur Bewältigung der genannten Problematik besteht die Möglichkeit den PID-Standardregler zu modifizieren.

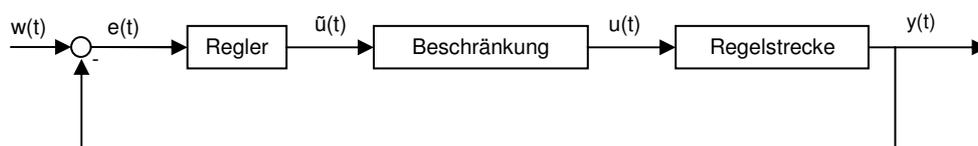
In vielen Fällen ist ein prompter Stelleingriff nicht nötig. Sind bei einer Kultivierung beispielsweise geringe Abweichungen vom Sollwert des pH tolerabel, da die Mikroorganismen sie ohne weiteres verkraften, kann mit Hilfe eines sogenannten Toleranzbandes ein unnötiger Stelleingriff vermieden werden (Reuter und Zacher, 2004). Ist die Abweichung  $e(t)$  der Regelgröße  $y(t)$  von der Führungsgröße  $w(t)$  kleiner als eine vorgegebene Mindestabweichung  $e_0$  so wird  $e(t)$  gleich Null gesetzt.

$$e(t) = \begin{cases} 0 & , e(t) < e_0 \\ e(t) & , e(t) \geq e_0 \end{cases}$$

Die Ansprechempfindlichkeit des Reglers wird durch das Toleranzband beeinflusst. Die Regeleinrichtung gibt trotz einer Regelabweichung innerhalb des Toleranzbandes keinen Wert aus.

Eine weitere Möglichkeit bietet eine sogenannte Stellgrößenbeschränkung. Diese limitiert beispielsweise den maximal möglichen Stelleingriff um die Regelstrecke nicht zu überlasten (Horn und Dourdoumas, 2004).

$$u(t) = \begin{cases} -u_{max} & , \tilde{u}(t) < -u_{max} \\ \tilde{u}(t) & , |\tilde{u}(t)| \leq u_{max} \\ u_{max} & , \tilde{u}(t) > u_{max} \end{cases}$$



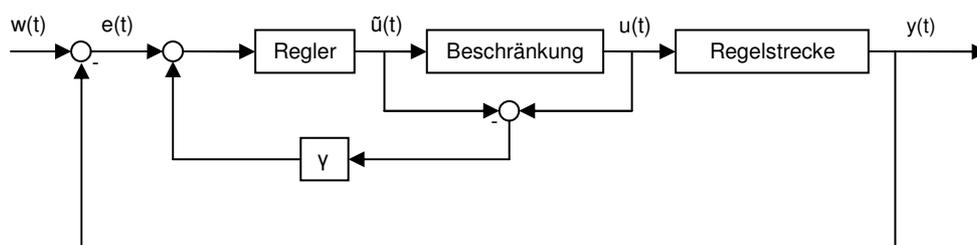
**Abbildung 3.8: Schema einer Stellgrößenbeschränkung**

**Eine zu große Stellgröße  $u(t)$  am Ausgang des Reglers wird mit einer Stellgrößenbeschränkung auf einen Wert  $u_{max}$  beschränkt.**

Im Beispiel der pH-Regelung einer Kultivierung bedeutet das, dass die maximal zugegebene Menge an Titrationsmittel beschränkt wird. Dadurch kann es nicht zum Übertitrieren kommen. Anderweitig bestünde sonst die Gefahr, dass durch den Stelleingriff der Pufferbereich des verwendeten Puffers verlassen werden würde und eine pH-Regelung nicht mehr möglich wäre. In gleicher Weise wie die eben gezeigte

obere Schranke kann auch eine untere Schranke  $u_{\min}$  definiert werden, die eine minimale Stellgröße vorgibt.

Aus einer Stellgrößenbeschränkung kann sich allerdings ein anderer unerwünschter Effekt ergeben. Am Ausgangspunkt liegt ein zu geringer Wert der Regelgröße  $y(t)$  vor. Auf Grund der großen Regelabweichung  $e(t)$  erreicht die Stellgröße  $\tilde{u}(t)$  schnell die Beschränkung  $u_{\max}$ . Der Wert der Regelgröße  $y(t)$  nimmt zu und übersteigt ihren Sollwert. Die Regelabweichung  $e(t)$  nimmt dadurch ab und erreicht schließlich negative Werte. Nachdem die Regelabweichung  $e(t)$  ihren Nullpunkt erreicht hat, integriert das I-Glied des Reglers weiterhin unnötig auf. Eigentlich sollte der Regler dem Überspringen entgegenwirken, er kann es jedoch nicht, da  $\tilde{u}(t)$  immer noch durch  $u_{\max}$  beschränkt wird. Als Gegenmaßnahme kann eine sogenannte „Anti-Windup“-Technik verwendet werden. Die Differenz der Stellgröße  $\tilde{u}(t)$  und der beschränkten Stellgröße  $u(t)$  wird mit einem Faktor  $\gamma$  gewichtet an den Regler zurückgeführt (Horn und Dourdoumas, 2004).



**Abbildung 3.9: Schema eines „Anti-Windup“-Mechanismus**

Die Differenz aus Stellgröße  $u(t)$  und beschränkter Stellgröße  $\tilde{u}(t)$  wird mit einem Faktor  $\gamma$  gewichtet an den Regler zurück geleitet.

Mit den genannten Modifikationen sollte es möglich sein, seit langem verwendete, zuverlässige Industrie-Standardregler auch für dynamische biologische Anwendungen einzusetzen.

### 3.3.2 Nicht-invasive optische Messtechnik

In vielen Bereichen ist die direkte Messung einer Messgröße mittels einer Messsonde nicht möglich oder unerwünscht. So ist beispielsweise die Bestimmung der Temperatur flüssiger Metalle mittels klassischer Thermometer oder Thermoelemente oft nicht möglich, da die entsprechenden Temperaturen zu hoch sind. In diesem Fall kommen optische Thermometer, die die Infrarotstrahlung des heißen Objekts messen, zum Einsatz (Komanduri und Hou, 2001).

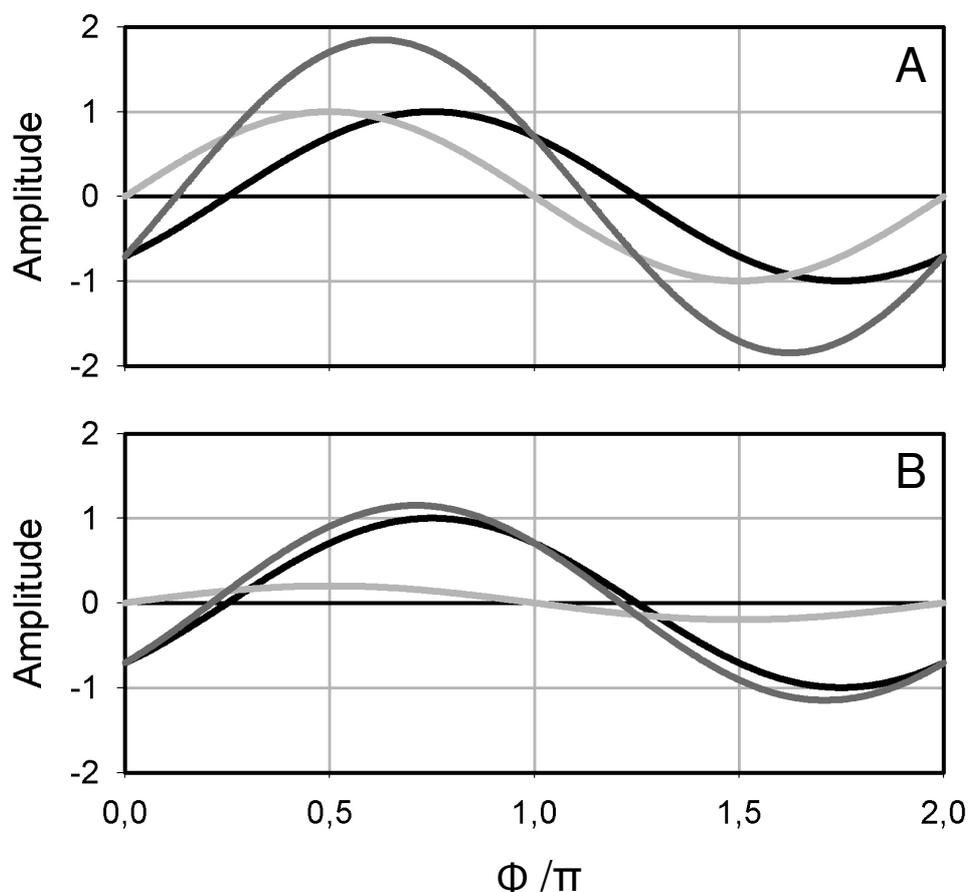
Ähnlich verhält es sich bei sehr geringen Abmessungen. Hier fehlt oftmals der Platz, um die entsprechenden Sonden platzieren zu können. Das gilt ebenso für parallele

Systeme, auch hier ist die Messtechnik meist nur schwer anzuordnen. In diesem Fall bieten optische Verfahren ebenfalls einen Ausweg. Zum einen kann bei optisch vermittelten Messungen leicht der Ort der Messung und das eigentliche Messgerät mittels optisch leitender Fasern entkoppelt werden. Zum anderen können die Sensoren sehr klein gehalten werden, die Lichtleiter sind das ohnehin.

In der Bioverfahrenstechnik gibt es neben einigen anderen zwei elementare Messgrößen: den pH und die Gelöstsauerstoffkonzentration (Alford, 2006). Mittels dieser beiden Größen sind viele Rückschlüsse auf den Zustand einer Kultivierung möglich. Gerade hier ist eine Miniaturisierung und Parallelisierung der klassisch elektrochemisch arbeitenden Messtechnik nur schwer möglich. Erst neue Messtechniken bieten die Möglichkeit zur Umsetzung.

Die berührungslose optische Messung des pH und  $pO_2$  beruht auf der Auswertung der Lumineszenzantwort eines pH- bzw.  $pO_2$ -sensitiven Farbstoffs auf eine äußere Anregung im Vergleich zu einer Referenz (Huber *et al.*, 2001; Mayr *et al.*, 2002; DE19829657A1). Bei diesem Messverfahren, dem sogenannten „Dual Lifetime Referencing“ (DLR), sind zwei Luminophore in den Sensorpunkt eingebettet. Der eigentliche sensitive Luminophor hat eine kurze Abklingzeit  $\tau_{ind}$  der Lumineszenzantwort, der nicht sensitive Referenz-Luminophor eine lange Abklingzeit  $\tau_{ref}$ . Beide Luminophore haben überlappende Anregungs- und Emissionsspektren, wodurch sie beide mit derselben Wellenlänge angeregt werden und das konstruktiv überlagerte Antwortsignal mit demselben Detektor ausgelesen werden kann. Das Referenzsignal kann als konstant und invariant betrachtet werden. Das Antwortsignal weist, wie in Abbildung 3.10 gezeigt, nun eine Phasenverschiebung  $\Phi_m$  in alleiniger Abhängigkeit der Amplitude des pH- bzw.  $pO_2$ -sensitiven Luminophors und folglich des pH bzw.  $pO_2$  auf. Die Verschiebung des Phasendurchgangs des Gesamtsignals auf Grund der veränderten Indikatoramplitude kann mit entsprechend empfindlicher Elektronik zeitlich aufgelöst und gemessen werden.

Diese Phasenverschiebung kann nun mit dem pH korreliert werden und dient damit der berührungslosen optischen Messung des pH.



**Abbildung 3.10:** Lumineszenzantwort des sensitiven Sensors auf die Anregung

Das Indikatorsignal (—) überlagert sich mit dem Referenzsignal (—) und bildet konstruktiv das eigentliche Messsignal (—). Dieses weist in Abhängigkeit vom pH bzw.  $pO_2$  im Gegensatz zum ungedämpften Zustand (A) einen verschobenen Nulldurchgang auf (B).

Ein Beispiel für einen pH-sensitiven Luminophor ist Ruthenium(II)-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin. Kleine Partikel dieses Materials werden in einer entsprechenden Oxonium-Ionen durchlässigen Matrix eingelagert als Sensor verwendet. Als Referenz dient dabei Fluorescein (Liebsch *et al.*, 2001). Als sauerstoffsensitiver Sensor könnte Pt(II)-pentafluorphenylporphyrin mit Sulforhodamine B als Referenz in einer hydrophoben sauerstoffpermeablen Matrix verwendet werden (Araina *et al.*, 2006).

### 3.4 Asymmetrische Synthesen mit *Saccharomyces cerevisiae*

In der Chemie gibt es eine Vielzahl verschiedener Stoffe, die zwar alle dieselbe Summenformel aufweisen, jedoch Konstitutionsisomere und Stereoisomere mit unterschiedlicher Struktur bzw. räumlicher Anordnung darstellen. Die Stereoisomere

werden weiterhin in Enantiomere und Diastereomere unterteilt. Bei den Enantiomeren handelt es sich um Moleküle, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten. Dieses Verhalten ergibt sich aus so genannten Chiralitätszentren. Das sind Atome, die bezüglich ihrer Substituenten keine Drehspiegelachsen aufweisen. Alle nicht enantiomeren Stereoisomere werden den Diastereomeren zugeordnet.

Ein Beispiel für eine enantiomere Verbindung ist der 4Cl-3-Hydroxybuttersäureethylester (CHBE). Seine beiden R- und S-Enantiomere unterscheiden sich durch die räumliche Anordnung der Hydroxylgruppe.



**Abbildung 3.11: Enantiomere des (R/S)-4Cl-3-Hydroxybuttersäureethylesters (R/S-CHBE)**

Enantiomere haben in der Biochemie eine besondere Bedeutung, da auf Grund der räumlichen Anordnung des Moleküls eines der beiden Enantiomere physiologisch bevorzugt wird. Daher sind sie besonders für pharmazeutische Anwendungen interessant, da hierbei räumlich exakt passende Moleküle für die gewünschte Wirkung eines Medikaments benötigt werden. Beim Beispiel des 4Cl-3-Hydroxybuttersäureethylester (CHBE) zeigt nur das S-Enantiomer die gewünschte pharmakologische Wirkung.

Mit Hilfe asymmetrischer Synthesen ist es nun möglich, biologisch aktive Enantiomere einer Verbindung aus deren prochiralen Ausgangsverbindungen zu gewinnen. Diese Synthesen lassen sich zwar seit einiger Zeit auch mit klassischen chemischen Methoden durchführen (Knowles und Sabacky, 1968; Miyashita *et al.*, 1980; Katsuki und Sharpless, 1980), sind mit Enzymen als Biokatalysatoren aber im Allgemeinen wesentlich leichter zu bewerkstelligen (Liese und Filho, 1999).

Das Ergebnis einer Synthese von beispielsweise CHBE ist meist nicht das erwünschte reine S-Enantiomer sondern ein Gemisch beider Enantiomere. Das Maß für die Reinheit dieses Enantiomerengemisches aus S-CHBE und R-CHBE ist der auf den Anteil an S-CHBE bezogene Enantiomerenüberschuss und wird wie folgt definiert:

$$ee_{S-CHBE} \equiv \frac{c_{S-CHBE} - c_{R-CHBE}}{c_{S-CHBE} + c_{R-CHBE}} \cdot 100\% \quad (3-4)$$

Auf Grund dieser Definition kann sich bei Vorhandensein eines Überschusses des unerwünschten R-Enantiomers auch ein negativer Enantiomerenüberschuss  $ee_S$  ergeben.

### 3.4.1 *Saccharomyces cerevisiae* als Biokatalysator

Die Enzymsysteme des Wildtyps der Brau- oder Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* können nach Csuk und Glaenger (1991) verschiedene stereospezifische Reaktionen katalysieren. Die wichtigsten sind dabei die Reduktion von aliphatischen, cyclischen sowie polycyclischen Mono- und Bicarboxylverbindungen,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketoestern und weiteren einzelnen Verbindungen.

Besonders relevant sind hierbei die Reduktionen prochiraler Ketone zu ihren enantiomeren Alkoholen, da diese Verbindungen eine große pharmazeutische Relevanz aufweisen.

**Tabelle 3.8: Beispiele pharmazeutisch genutzter chiraler Intermediate mit deren Edukten und Endprodukten**

Edukt	Produkt	Endprodukt	Quelle
Acetessigsäure-ethylester	3-Hydroxy-Buttersäureethylester	Carbapenem-Antibiotika Sucatol	Oguni <i>et al.</i> (1988) Mori (1989)
Ethylbenzoylacetat (EBA)	3-Hydroxy-3-Phenyl-Propionsäureethylester (S-HPPE)	Fluoxetin	Chênevert <i>et al.</i> (1992)
4Cl-Acetessigsäure-ethylester (4Cl-ACE)	4-Chlor-3-Hydroxy-Buttersäureethylester (S-CHBE)	Atorvastatin <sup>®</sup>	Pereira <i>et al.</i> (1998)
Octyl-4-chloracetoacetat	Octyl-4-Chlor-3-hydroxybutanoat	L-Carnitin	Zhou <i>et al.</i> (1983)
4,4,4-Trifluor-Acetessigsäure-ethylester	Trifluor-3-Hydroxy-Buttersäureethylester L-Carbinol	Befloxaton	Bertau (2001) Davoli <i>et al.</i> (1999)
3-Chlorpropionphenon	3-Chlor-1-Phenylpropan-1-ol	Fluoxetin	Pereira <i>et al.</i> (1998)

Die Ganzzell katalysierte Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester (S-CHBE) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeiten durchgeführt und soll hier weiter betrachtet werden.

Die Verbindung (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethylester ist ein Intermediat bei der Synthese von Statinen. Die pharmakologische Substanzklasse der Statine wirken als 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase- (HMG-CoA-Reduktase-) Inhibitoren. Da die HMG-CoA-Reduktase, die die Geschwindigkeit bestimmende

Reaktion der Cholesterinsynthese katalysiert, werden Statine als Lipidsenker bei erhöhtem Cholesterinspiegel eingesetzt. Auf dem Markt sind unter anderem die Statine mit den Freinamen Atorvastatin<sup>®</sup>, Cerivastatin<sup>®</sup>, Fluvastatin<sup>®</sup>, Lovastatin<sup>®</sup>, Pravastatin<sup>®</sup>, Rosuvastatin<sup>®</sup> und Simvastatin<sup>®</sup> unter verschiedenen Handelsnamen erhältlich. Mit einem Gesamtumsatz von 12,9 Mrd. US\$ im Jahr 2006 (2006 Annual Report, Pfizer Inc., USA) gehört das verbreitetste Statin Atorvastatin<sup>®</sup> damit zu den sogenannten „Blockbustern“ mit mehr als 1 Mrd. US\$ Jahresumsatz.

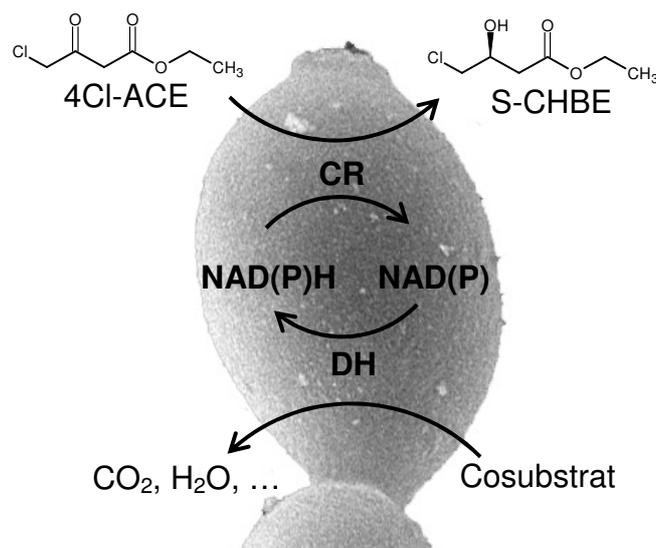
Die biochemische Synthese des sehr wichtigen Statin-Intermediats S-CHBE ist nun mit einem Keton reduzierenden Enzym möglich. Durch einen, auf einer Datenbank gestützten, DNA-Sequenzvergleich konnten nach Katz *et al.* (2003) 49 mutmaßlich Ketone reduzierende, potenziell vom Cofaktor NAD(P)H-abhängige, Enzyme in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden. Von diesen 49 Enzymen konnten insgesamt acht Enzyme mit einer Affinität für 4CI-ACE und unterschiedlichen Aktivitäten gefunden werden.

**Tabelle 3.9: In *Saccharomyces cerevisiae* (wt) identifizierte  $\beta$ -Ketoester-Reduktasen zur Reduktion von 4CI-ACE.**

**Die Aktivitäten sind auf die Biomasse bezogene geschätzte Enzymaktivitäten. (Nakamura *et al.* 1991; Pereira *et al.* 1998; Sybesma *et al.* 1998; Shieh *et al.* 1985)**

Enzym	Spezifität	$K_m$ [mmol L <sup>-1</sup> ]	$K_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	Aktivität [ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ]	pH Optimum
Fettsäuresynthase	S (> 99 % ee)	1,82	303	3,2	6,7
$\alpha$ -Acetoxyceton Reduktase	R (> 99 % ee)	0,22	5,0	3,3 – 9,3	5,9
D-Enzym	S (> 99 % ee)	1,0	0,21	nb	nb
L-Enzym	R (> 97 % ee)	1,0	6,6	nb	nb
Aldo-Keto Reduktase	R	0,13	6,2	0,7	6,7
Lakton Reduktase	S	nb	nb	0,6	7,0
Alkoholde- hydrogenase	R	nb	nb	nb	nb
Laktatdehydrogenase	R	nb	nb	nb	nb

Die biokatalysierte Reduktion von 4CI-ACE läuft bei *Saccharomyces cerevisiae* im vorliegenden Fall zellintern ab wobei an der gesamten Reaktion, wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, zwei Enzyme beteiligt sind. Das erste, die Carbonylreduktase (CR), reduziert das Substrat 4CI-ACE unter Verbrauch des Cofaktors NAD(P)H zu R/S-CHBE. Das zweite Enzym, eine Dehydrogenase (DH), dient der notwendigen Regenerierung des Cofaktors und verbraucht dabei ein ebenfalls notwendiges Cosubstrat.



**Abbildung 3.12: Schema der Biotransformation in *Saccharomyces cerevisiae***

Das 4Cl-ACE wird durch die Carbonylreduktase (CR) zu S-CHBE reduziert. Den dazu notwendigen Cofaktor regeneriert die Dehydrogenase (DH) unter Verbrauch des Cosubstrats.

Im vorliegenden Fall handelt es sich bei der Carbonylreduktase um die der Hefezelle eigene NADPH-abhängige Fettsäuresynthase. Nach Lynen (1969) ist sie bei einer um 75% reduzierten Aktivität jedoch auch in der Lage NADH zu verwenden. Die  $\beta$ -Untereinheit der Fettsäuresynthase wird unter dem Einfluss des Phosphoglyceratkinase-Promotors überexprimiert. Die dazugehörige  $\alpha$ -Untereinheit wird auf Grund eines regulatorischen Elements des Gens zusammen mit der  $\beta$ -Untereinheit überexprimiert. Die Cofaktorregenerierung erfolgt mit einer aus *Bacillus subtilis* klonierten thermostabilen Glucosedehydrogenase. Diese kann sowohl  $\text{NAD}^+$  als auch  $\text{NADP}^+$  regenerieren (Pfaller, 2004). Auch diese wird, unter der Kontrolle des Alkoholdehydrogenase-Promotors der Hefezelle, überexprimiert.

### 3.4.2 Biotransformation im Zweiphasensystem

Bei vielen Biotransformationen besteht das Problem, dass das Edukt und / oder das Produkt inhibierend wirkt bzw. toxisch für den Biokatalysator ist. Außerdem sind viele Edukte bzw. Produkte nicht oder nur schwer wasserlöslich. Dadurch ergibt sich eine unbefriedigende Verfügbarkeit des Edukts.

Durch die Einführung einer zweiten, wasserunlöslichen Phase können diese Probleme teilweise beseitigt werden. Zu Beginn einer Biotransformation liegt das Edukt bei einem geeigneten Verteilungskoeffizienten nahezu ausschließlich in der

zweiten organischen Phase und nur zu einem geringen Anteil in der wässrigen Phase vor. Auf Grund des Verbrauchs des Edukts bei der Synthese des Produkts durch den Biokatalysator sinkt die Konzentration des Edukts in der wässrigen Phase, im Gegenzug steigt die Konzentration des Produkts. Dadurch diffundiert weiteres Edukt aus der zweiten Phase nach, Produkt wandert in diese Phase und reichert sich an. Am Ende der Biotransformation ist im Idealfall das gesamte Edukt verbraucht und das Produkt liegt weitestgehend in der zweiten Phase gelöst vor. Die zweite Phase wirkt folglich als Depot für das Edukt und Produkt und schützt dadurch den Biokatalysator.

An die zweite Phase, meist ein organisches Lösungsmittel, werden mehrere Anforderungen gestellt (Bruce und Daugulis, 1991; die Reihenfolge der Auflistung stellt keine Wertung dar):

- Günstiger Verteilungskoeffizient des Edukts und Produkts
- Hohe Selektivität
- Geringe Neigung zur Emulsionsbildung
- Niedrige Wasserlöslichkeit
- Chemische und thermische Stabilität
- Günstige Eigenschaften für die Produktrückgewinnung
- Keine Bioabbaubarkeit
- Nicht toxisch
- Preiswert und in großen Mengen verfügbar
- Biokompatibilität

Einige der genannten Punkte sind besonders wichtig. Zum einen sollte der Verteilungskoeffizient für das Edukt und Produkt günstig sein. Dadurch liegt das Produkt nach Ablauf der Biotransformation nahezu ausschließlich im Lösungsmittel vor. Außerdem werden unter Umständen inhibitorische oder toxische Einflüsse durch niedrige Konzentrationen minimiert. Zum anderen ist die Biokompatibilität ein wichtiges Kriterium. Sie entscheidet über die Verwendbarkeit eines organischen Lösungsmittels. Die Vorhersage der Biokompatibilität ist nur bedingt möglich. Es wurden Größen wie der Hildebrand-Parameter, Polarität und Molekulargewicht herangezogen (Bruce und Daugulis, 1991). Weitaus verbreiteter ist jedoch der Hansch-Parameter, d.h. der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten  $\log P$ .

$$\log P = \log \frac{c_O}{c_W} \quad (3-5)$$

Mit steigendem logP nimmt nun die Biokompatibilität zu (Leon *et al.*, 1998). Zur Verwendung mit *Saccharomyces cerevisiae* sollte der logP eines Lösungsmittels mindestens 4 betragen (Bruce und Daugulis, 1991) für weiteres Zellwachstum gar 6 (Kawamoto *et al.* 2001). Einen vollständigen Rückschluss auf die Biokompatibilität lässt der Hansch-Parameter jedoch nicht zu. Er berücksichtigt in keiner Weise die Interaktion zwischen dem Lösungsmittel und der Zellmembran des Mikroorganismus und der sie umgebenden Hydrathülle. Diese Interaktion ist ursächlich für den Grad der Schädigung der Zelle und in hohem Maße von der Molekülstruktur des Lösungsmittels abhängig (Bruce und Daugulis, 1991; Leon *et al.*, 1998; Salter *et al.* 1995). Nikolova und Ward (1992) sowie Pfründer (2005) untersuchten die Biokompatibilität verschiedener wasserunlöslicher organischer Lösungsmittel:

**Tabelle 3.10: Biokompatibilität verschiedener organischer Lösungsmittel zur zweiphasigen Biotransformation mit *Saccharomyces cerevisiae***

Lösungsmittel	logP
2,5-Hexandiol	0,62
2,5-Hexandion	-0,27
2-Octanol	2,9
2-Oktanon	2,37
4-Cl-ACE	0,05
Decan	6,6
Ethylacetat	0,7
Hexan	4,1
n-Butylacetat	1,7
Toluol	2,5

Die Degradation der Zellen unter dem Einfluss des Lösungsmittels lässt jedoch keinen Schluss auf die Aktivität der an der Biotransformation beteiligten Enzymsysteme zu (Nikolova *et al.* 1992; Salter *et al.* 1995).

Shimizu *et al.* (1990) untersuchten organische Lösungsmittel hinsichtlich ihrer Eignung als Depot für 4Cl-ACE und R/S-CHBE bei Biotransformationen mit den isolierten Enzymen Aldehydreduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* und Glucosedehydrogenase aus *Bacillus sp.*:

**Tabelle 3.11: Vergleich der Verteilungskoeffizienten von 4Cl-ACE und R/S-CHBE in verschiedenen org. Lösungsmitteln**

Lösungsmittel	Verteilungskoeffizient	
	4Cl-ACE	R/S-CHBE
1,2-Dichlorethan	9,5	10,7
Benzylchlorid	3,0	8,9
Dichlormethan	17,4	9,5
Diisopropylether	2,2	3,9
Ethylacetat	16,2	23,5
n-Butylacetat	10,6	15,8
n-Octanol	5,3	4,0
Tetrachlormethan	1,1	2,3
Trichlormethan	17,2	7,7

Hierbei wiesen Ethylacetat und n-Butylacetat die höchsten Verteilungskoeffizienten für das Produkt auf. Die Enzymdeaktivierung erfolgte bei Ethylacetat sehr schnell, n-Butylacetat hatte dagegen fast keinen Effekt. Die restlichen Lösungsmittel hatten wesentlich schlechtere Verteilungskoeffizienten bzw. einen starken negativen Effekt auf die Enzymstabilität und –aktivität.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass sich die Wahl der optimalen zweiten Phase für Biotransformationen schwierig darstellt. Eine Vorhersage ist nur bedingt möglich, da jede Kombination aus organischem Lösungsmittel, Mikroorganismus und beteiligten Enzymsystemen ihre eigene Charakteristik hat. Eine experimentelle Überprüfung ist daher zumeist zwingend notwendig.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Bioreaktoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen für die Kultivierung von Mikroorganismen verschiedene Reaktorsysteme zum Einsatz.

#### 4.1.1 Parallelbioreaktor

Sämtliche parallelen Kultivierungen und die vollständige Optimierung wurden mit dem Parallelbioreaktor durchgeführt. Dieser besteht aus mehreren Hauptkomponenten:

- Bioreaktorblock
- Einweg-Bioreaktoren
- Laborroboter
- MTP-Lesegerät
- Computer mit fedbatch XP zur Systemkontrolle und –steuerung

Daneben verfügt der Aufbau über einen 150 l Vorratsbehälter für sterilfiltriertes VE-Wasser zur Versorgung des Laborroboters und der MTP-Waschstation sowie einen 150 l fassenden Abwasserbehälter (beide Schubert Kunststoff GmbH, München). Die Temperaturkontrolle und Kühlung des Bioreaktorblocks erfolgt über einen externen Durchlaufkühler (MULTIstar 400 W, Fryka Kältetechnik GmbH, Esslingen) und über ein Heizbad (Gefäß Haake W15 mit Thermostat Haake C 10, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich). Die Versorgung mit Prozessluft wird mit einem thermischen Massendurchflussregler (Brooks 5850S, Westphal Mess-und Regeltechnik GmbH, Ottobrunn) geregelt.

Der experimentelle Aufbau ist exemplarisch in Abbildung 4.1 zu sehen.

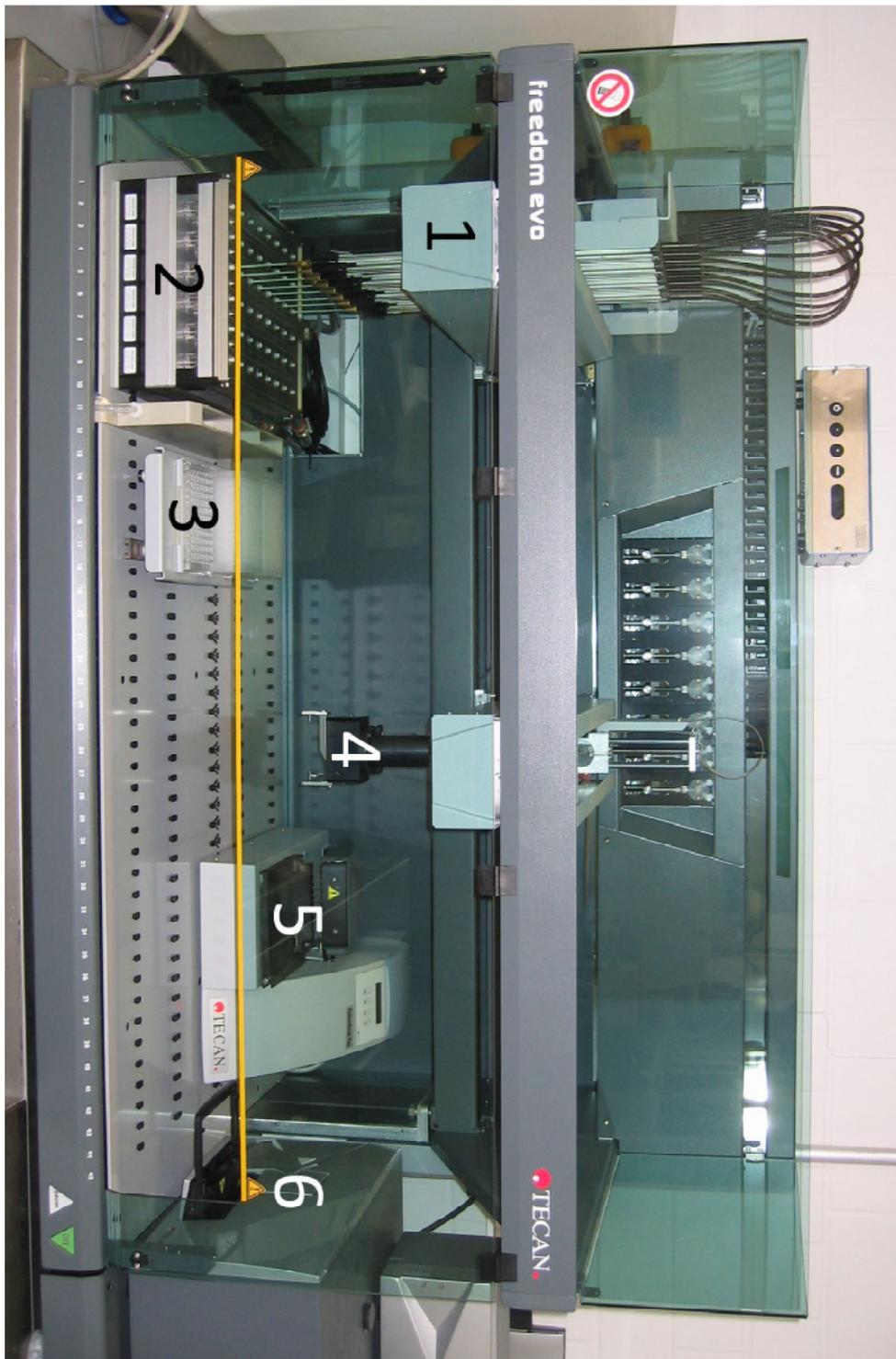


Abbildung 4.1: Experimenteller Aufbau des Parallelbioreaktors

Der Pipettierarm (1) des Laborroboters bedient den Bioreaktorblock (2). Dazu stehen ihm versch. Vorlagen- und Proben-Mikrotiterplatten zur Verfügung (3). Der MTP-Greifer (4) des Laborroboters dient zum Bewegen der Probenplatten zur MTP-Waschstation (5) und zum MTP-Lesegerät (6).

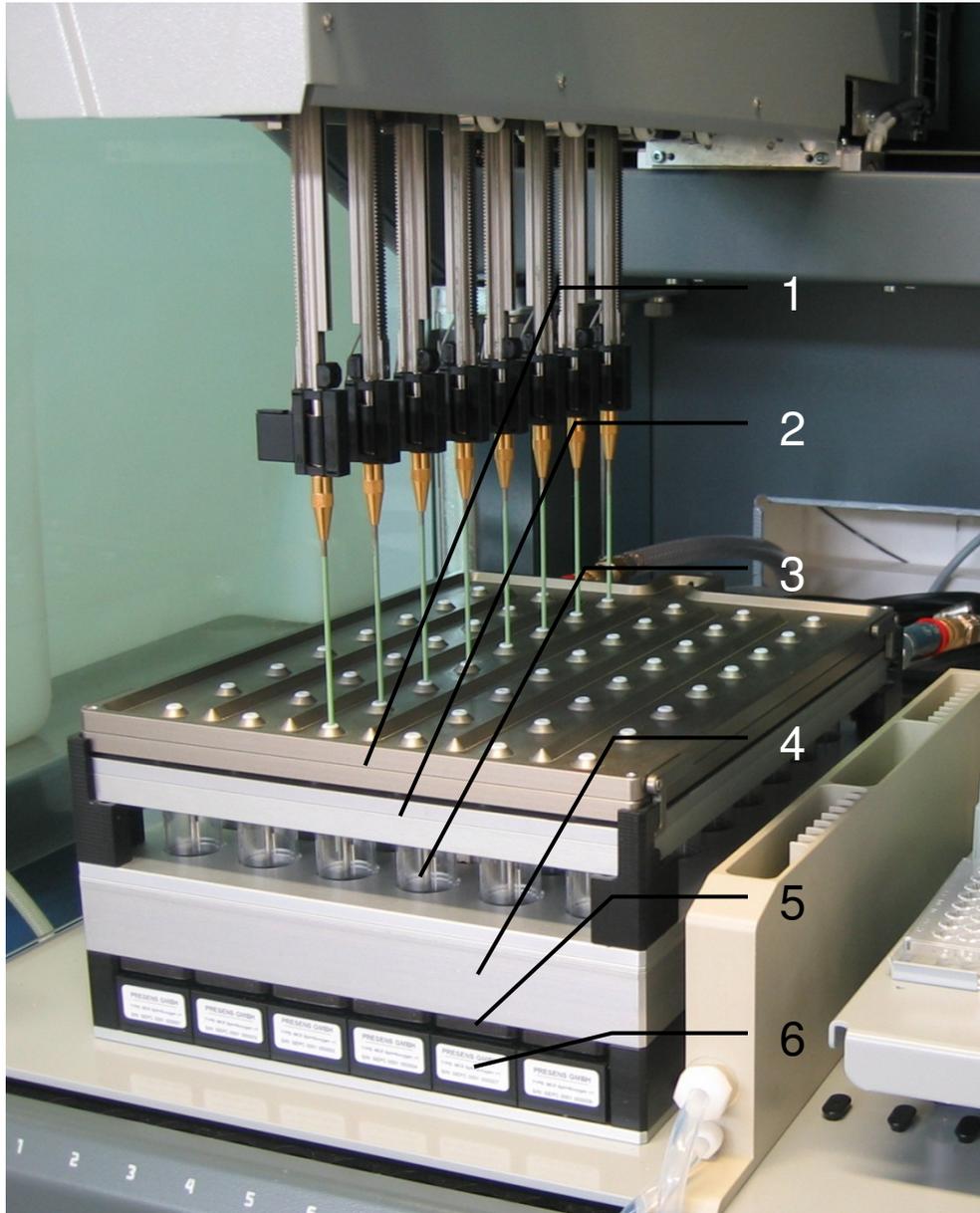
Die wichtigsten Komponenten werden im Detail erläutert.

- *Bioreaktorblock*

Der eigentliche Bioreaktorblock besteht, wie in Abbildung 4.2 zu sehen aus den Komponenten Sterilgasabdeckung, Kopfraumkühlung, Reaktorgefäß, Antrieb mit

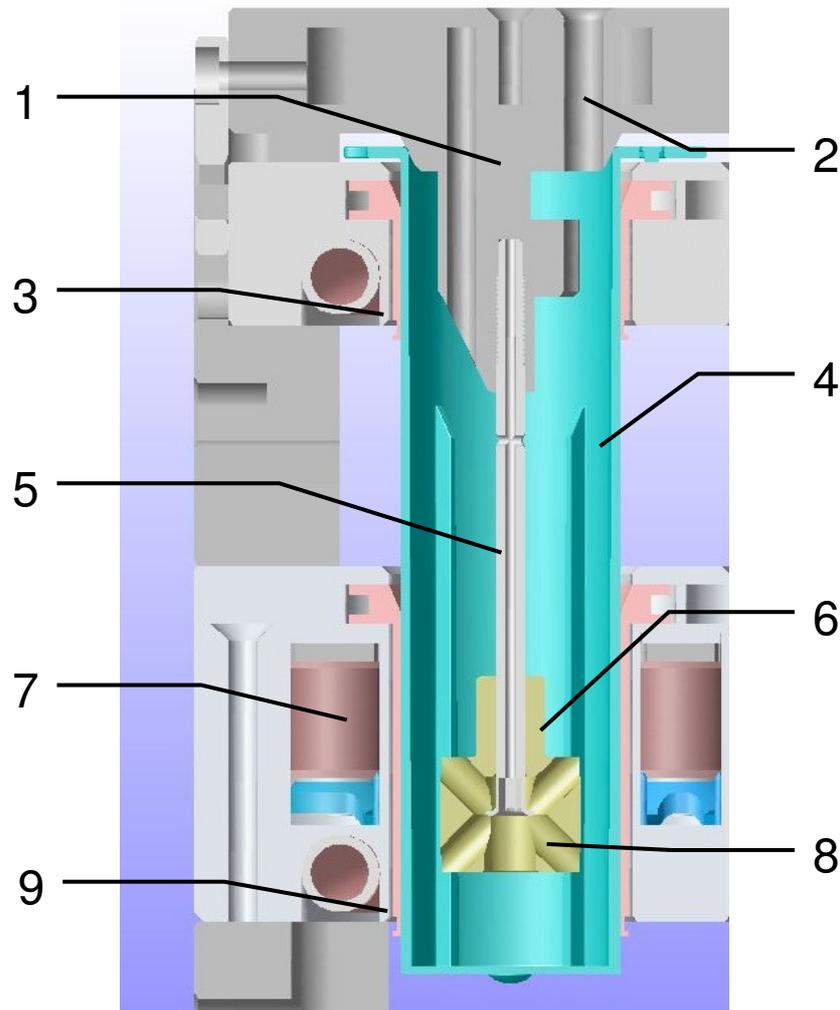
Temperaturkontrolle, Rührerüberwachung (Thermo Oberschleißheim GmbH, Oberschleißheim) sowie der Optosensorik (MultiChannel Reader for pH and oxygen, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg) zur Messung des pH und  $pO_2$ .

Die 48 ml-Bioreaktoren sind in einem 6 x 8 Muster angeordnet. Das Arbeitsvolumen der Reaktoren beträgt 8 – 14 ml. Jeder Reaktor verfügt über einen eigenen auf einer Hohlachse gleitend gelagerten Rührkörper. Alle Reaktoren werden mit einer gemeinsamen Sterilgasabdeckung gegenüber den benachbarten Reaktoren und der Umgebung abgedichtet. Zusätzlich dient die Sterilgasabdeckung der Gasversorgung der Reaktoren. Durch eine Bohrung strömt das an zentraler Stelle in die Sterilgasabdeckung eingeleitete sterile Prozessgas in den Kopfraum der Reaktoren. Durch eine weitere Bohrung kann es den Reaktor wieder verlassen. Durch diese Konstruktion wird der Kopfraum eines jeden Reaktors kontinuierlich mit sterilem Gas gespült. Unterhalb der Sterilgasabdeckung befindet sich die Kühleinrichtung des Kopfraumes und der Sterilgasabdeckung. Die Kopfraumkühlung hat eine Erniedrigung der Ablufttemperatur der Reaktoren und damit einhergehende Taupunktabsenkung zum Ziel. Dadurch wird Feuchtigkeit aus der Reaktorabluft abgeschieden und der Verdunstungsverlust verringert. Die Abkühlung der Abluft wird durch den als Verdrängungskörper ausgebildeten und in den Reaktor hineinragenden Teil der Sterilgasabdeckung nochmals verbessert. Dieser Verdrängungskörper verengt den freien Querschnitt des Reaktors bis auf einen vergleichsweise engen Spalt, wodurch die Abkühlung der Reaktorabluft effizienter wird. Der magnetisch-induktive Antrieb des Bioreaktorblocks ermöglicht Rührerdrehzahlen von  $500 - 4000 \text{ min}^{-1}$ . Mit Hilfe der Temperaturkontrolle sind Temperaturen in den Reaktoren von  $10 - 70^\circ\text{C}$  möglich. Der Antrieb, die Temperaturkontrolle der Reaktoren sowie die Kopfraumkühlung sind für alle 48 Reaktoren gemeinsam. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, bei einem Lauf verschiedene Temperaturen und Rührerdrehzahlen zu verwenden.



**Abbildung 4.2: Paralleler Bioreaktorblock**

Die Sterilgasabdeckung (1) sitzt auf der Kopfraumkühlung (2) und dichtet die Reaktoren (3) nach außen ab. An dem magnetisch-induktiven Antrieb (4) mit integrierter Temperaturkontrolle der Reaktoren ist die Sensorik für die Rührerüberwachung (5) angebracht. Direkt darunter befindet sich die Optosensorik (6) zur Messung des pH und  $pO_2$ .

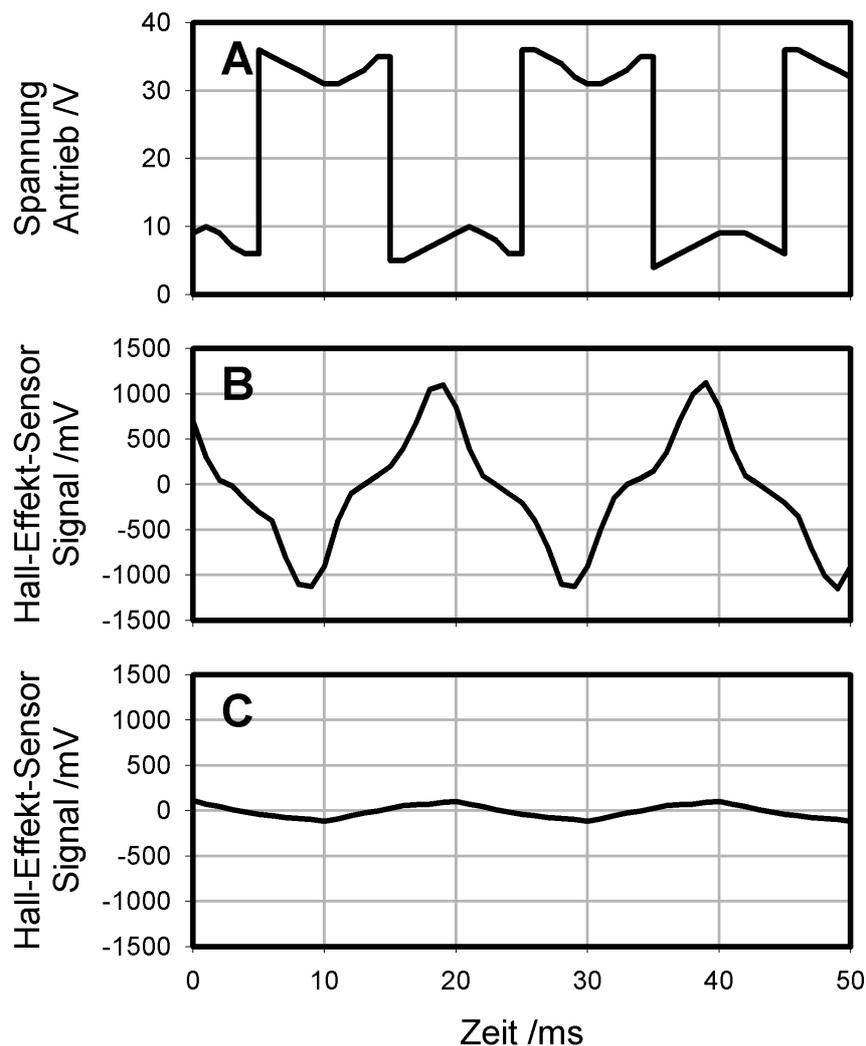


**Abbildung 4.3: Schnitt durch den Bioreaktorblock (Teilansicht)**

Die Sterilgasabdeckung ragt mit einem Verdrängungskörper (1) in den Reaktor (4) hinein und dichtet ihn ab. Durch eine Bohrung in diesem Verdrängungskörper strömt steriles Prozessgas aus der Sterilgasabdeckung in den Kopfraum des Reaktors. Der Zugang zum Reaktor ist über den Gasauslass (2) des Reaktors möglich. Der Kopfraum des Reaktors wird mit einer Kühlleitung und einem Wärmekontaktring (3) gekühlt um den Verdunstungsverlust zu verringern. Auf der Hohlachse (5) sitzt das Gas ansaugende Rührorgan (6). Dieses wird durch den magnetisch-induktiven Antrieb (7) in Rotation versetzt und transportiert Gasblasen durch die diagonalen Bohrungen (8) ins Medium. Die Temperaturkontrolle des Reaktors erfolgt über eine Wärmeleitung und einen weiteren Wärmekontaktring (9).

Zur Überwachung der rotierenden Rührer sind direkt unterhalb des Antriebs Sensoreinheiten angebracht. Eine Rührerüberwachung ist in sofern notwendig, da zum einen wegen der nur magnetisch erfolgten Kopplung des Rührers ein Ausfall nicht sicher ausgeschlossen werden kann wie das bei einer starren Welle der Fall ist. Zum anderen kann ein Rührerausfall auf Grund der Konstruktion des

Bioreaktorblocks visuell nicht erfasst werden kann, da viele Reaktoren durch metallische Komponenten verdeckt sind. Ein ausfallender Rührer muss jedoch erkannt werden, da durch den stehenden Rührer der Gaseintrag und damit die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen unterbrochen ist. Die Sensoreinheiten messen nun mit Hilfe von Hall-Effekt-Sensoren, die in die Rotationsebene der sich drehenden Rührer hineinragen, das im Betrieb rotierende Magnetfeld der Rührer. Dabei unterscheiden sich, wie Abbildung 4.4 zeigt, die Signalmuster eines drehenden und eines nicht drehenden Rührers signifikant wodurch eine Drehzahlüberwachung möglich ist.



**Abbildung 4.4: Spannungssignale des Rührerantriebs und der Hall-Effekt-Sensoren zur Rührerüberwachung**

Die Rechteckspannung des Antriebs (A) induziert ein drehendes Magnetfeld das die Rührer in Rotation versetzt. Die Hall-Effekt-Sensoren erfassen das Magnetfeld der rotierenden Rührer. Der charakteristische Verlauf des Signals ermöglicht die Unterscheidung zwischen einem rotierenden (B) und einem stehenden (C) Rührorgan.

Zusätzlich kann durch den Vergleich des rotierenden Magnetfelds eines drehenden Rührers mit dem bekannten Magnetfeld des magnetisch-induktiven Antriebs ein drohender Ausfall des Rührers erkannt werden.

Das Herzstück des Miniaturrührkesselbioreaktors stellt das in Abbildung 4.5 gezeigte neu entwickelte Rührorgan vom Typ B4 (Puskeiler, 2004) dar.



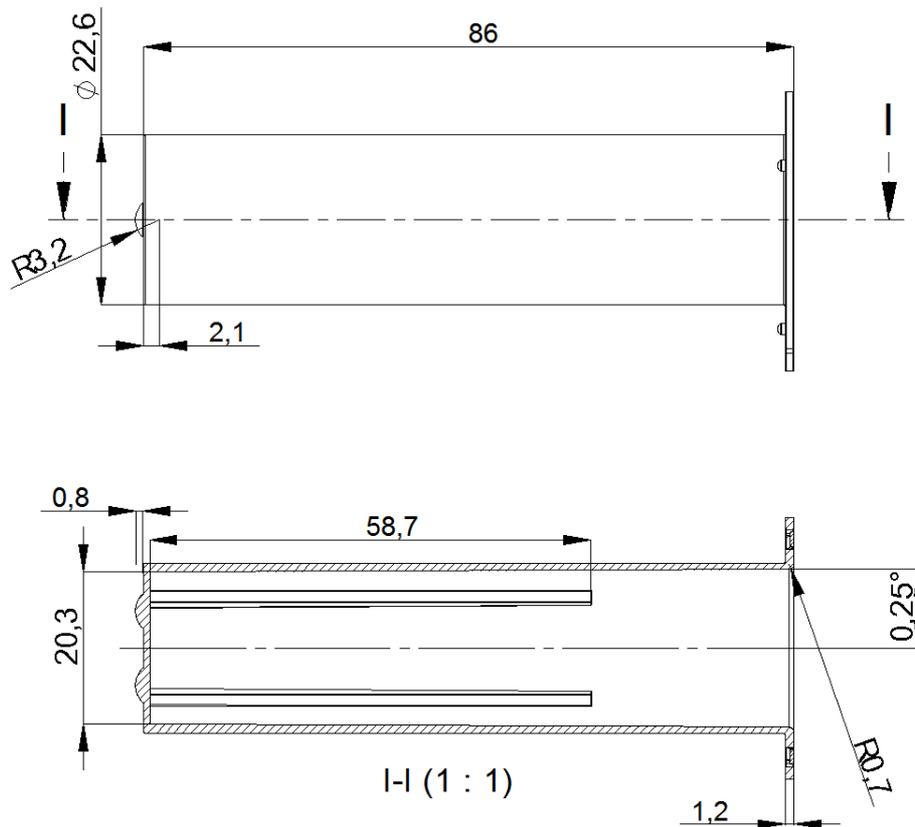
**Abbildung 4.5: Rührer des Typs B4**

**Der auch als „Kreuz-Stern“ bezeichnete Rührer (Puskeiler, 2004) verfügt über eine Laufbuchse zur Aufnahme der Hohlachse, diagonale Querbohrungen zum Austritt des Gas-Flüssigkeitsgemisches und eine in der Darstellung nicht sichtbare Bohrung an der Unterseite zum Ansaugen von Flüssigkeit.**

Das Rührorgan sitzt gleitend gelagert auf einer Hohlachse und wird magnetisch-induktiv angetrieben in Rotation versetzt. Dadurch wird das Medium im Inneren des Rührorgans auf Grund der Zentrifugalkraft durch die Diagonalbohrungen ausgeschleudert. Durch die achsiale Bohrung an der Unterseite fließt neues Medium nach. Im Medium, das durch den Rührer strömt, herrscht auf Grund der Fließgeschwindigkeit ein im Vergleich zur Umgebung hydrodynamisch verringerter Druck. Dadurch wird Gas aus der unteren Öffnung der im Inneren des Rührers endenden Achse gesaugt, zusammen mit dem Medium nach außen transportiert und durch die Rotation des Rührkörpers fein dispergiert. Über die oberhalb des Flüssigkeitsspiegels liegende Querbohrung der Hohlachse strömt weiteres, bedingt durch die kontinuierliche Spülung des Kopfraumes frisches, Gas nach.

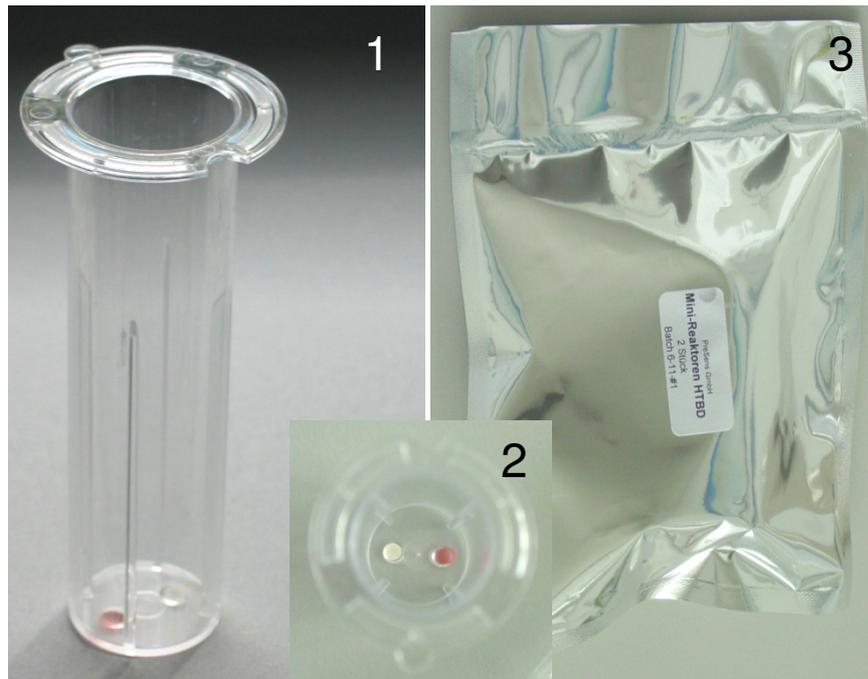
- *Einweg-Bioreaktoren*

Die Reaktoren des ml-Bioreaktors sind Einweggefäße aus Polystyrol. Sie haben einen Außendurchmesser von 22,6 mm bei einer Höhe von 86 mm. Der leicht konische Innenraum hat am Boden einen Durchmesser von 20,3 mm. Die vier Strömungsbrecher haben eine Höhe von 58,7 mm bei einer Erhebung von 2 mm gegenüber der Reaktorwand. Die geometrischen Details und Ansichten der Reaktoren sind in den Abbildungen Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7 dargestellt.



**Abbildung 4.6: Geometrie der Einweg-Bioreaktoren**

Das Reaktorgefäß besteht aus einem schlanken Hohlzylinder an dessen innerer Wandung sich vier Strömungsbrecher befinden. An der Außenseite des Bodens sind zwei Linsen zur Bündelung des Fluoreszenzsignals integriert.



**Abbildung 4.7: Einweg-Bioreaktoren mit Sensorpunkten zur pH- und pO<sub>2</sub>-Messung**

Die Einweg-Bioreaktoren (1) werden als Massenartikel im Spritzgussverfahren aus Polystyrol gefertigt. Nach dem Anbringen der Sensorpunkte (2) werden die Reaktoren verpackt (3) und mittels  $\beta$ -Strahlen sterilisiert.

In den Reaktoren sind am Boden chemische Sensoren zur optischen Messung von pH und pO<sub>2</sub> angebracht (PreSens, Regensburg). Die Reaktoren werden sterilisiert und zu zwei Stück verpackt gebrauchsfertig geliefert (PreSens, Regensburg).

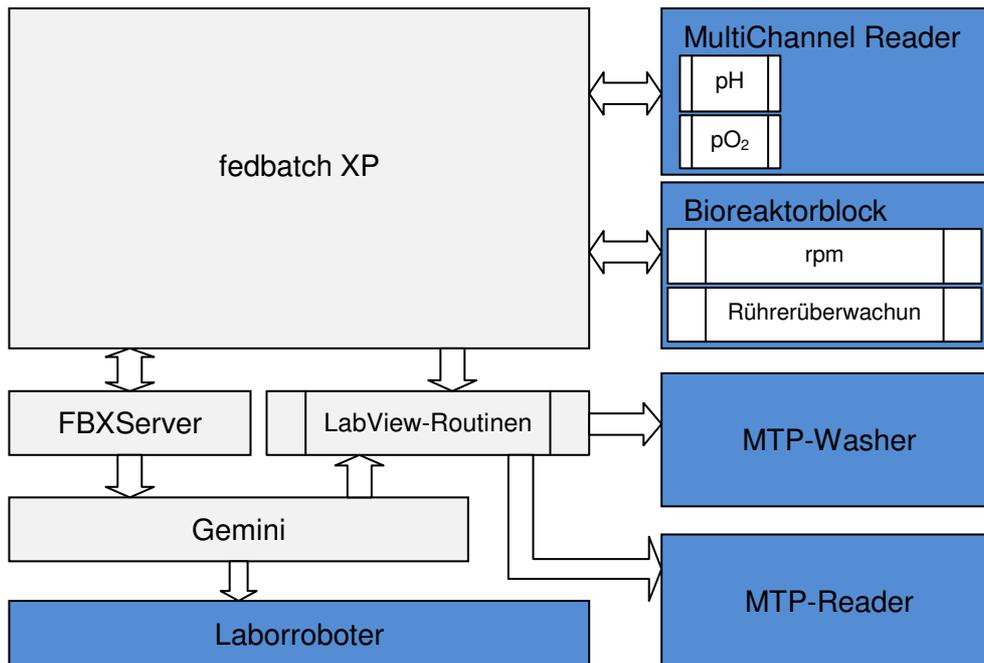
- *Laborroboter*

Bei dem Laborroboter handelt es sich um eine Genesis Workstation 150 beziehungsweise das fast baugleiche Nachfolgemodell Freedom Evo 150 (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim).

Der Roboter verfügt über einen 8-fach Pipettierarm mit einem Pipettiervolumen von 0,5 – 480  $\mu$ l. Die Nadeln des Arms können entsprechend den Anforderungen gespreizt und einzeln abgesenkt werden. Daneben ist ein Greifarm zum Bewegen von Mikrotiterplatten vorhanden. Die direkte Ansteuerung des Roboters erfolgt über die Software Gemini 3.40 SP2 (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim).

- *Prozessleitsystem*

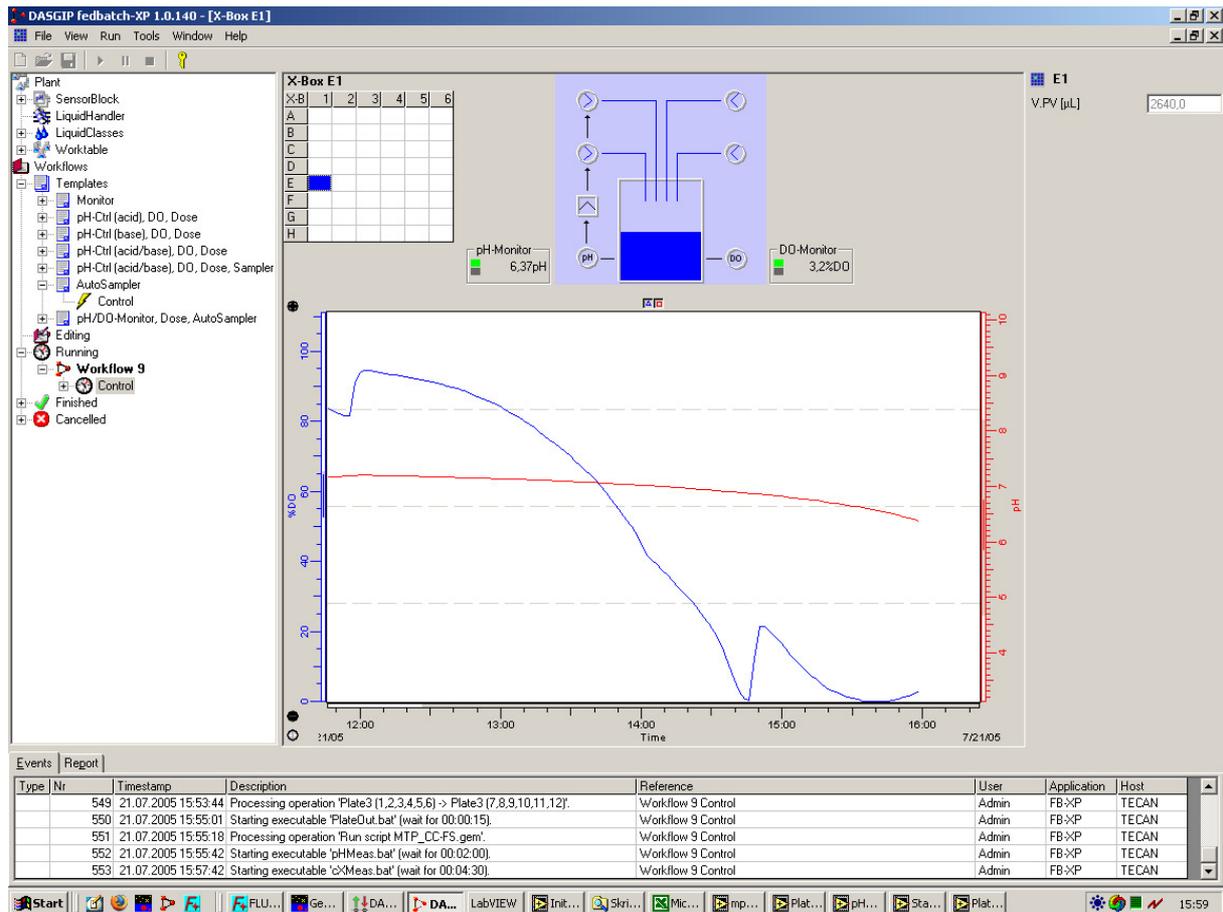
Das eigentliche Prozessleitsystem ist in der Software fedbatch XP (DASGIP AG, Jülich) realisiert. Diese besteht aus zwei Teilen, der eigentlichen Prozesssoftware fedbatch XP und dem als Schnittstelle zum Roboter dienenden FBXServer.



**Abbildung 4.8: Schema des Prozessleitsystems**

Mehrere Programme (grau hinterlegt) kommunizieren untereinander und steuern die einzelnen Geräte (blau hinterlegt). Das zentrale Element ist dabei die fedbatch XP von der alle Befehle ausgehen und entsprechend weitergereicht oder ausgeführt werden.

Die eigentliche Benutzeroberfläche ist in zwei unabhängige Darstellungen aufgeteilt. Zum einen kann eine Übersichtsdarstellung aller Reaktoren des Bioreaktorblocks ausgewählt werden (siehe Abbildung 4.9). In ihr werden für den jeweils selektierten Reaktor die aktuellen grundlegenden Prozessparameter wie pO<sub>2</sub> oder pH als Zahlenwert angezeigt. Darunter kann der zeitliche Verlauf der Parameter in einer zoombaren Grafik visualisiert werden.



**Abbildung 4.9: Individuelle Übersichtsanzeige eines einzelnen ml-Bioreaktors**

Für jeden Reaktor des parallelen ml-Bioreaktorblocks kann der aktuelle Zustand angezeigt werden. Dabei werden neben gemessenen Prozessdaten pH und  $pO_2$  auch die Werte der virtuellen Pumpen für die pH-Titration und die Substrate angegeben (hier nicht gezeigt).

Daneben gibt es eine parallele Darstellung selektierter Reaktoren. In ihr kann der zeitliche Verlauf einer Prozessgröße in bis zu 48 Reaktoren gleichzeitig verfolgt werden. Zusätzlich ist es hier möglich, detailliertere Informationen darzustellen. So kann auch der zeitliche Verlauf der Ausgänge der jeweiligen Regler gezeigt werden.

Die Einstellung der Vorgaben einer Kultivierung, z.B. die Sollwerte des pH, werden in einer, der eben genannten sehr ähnlichen, Darstellung getätigt (siehe Abbildung 4.10). Auch hier werden die gewünschten Reaktoren ausgewählt, das pH-Profil bestimmt und den Reaktoren zugewiesen.

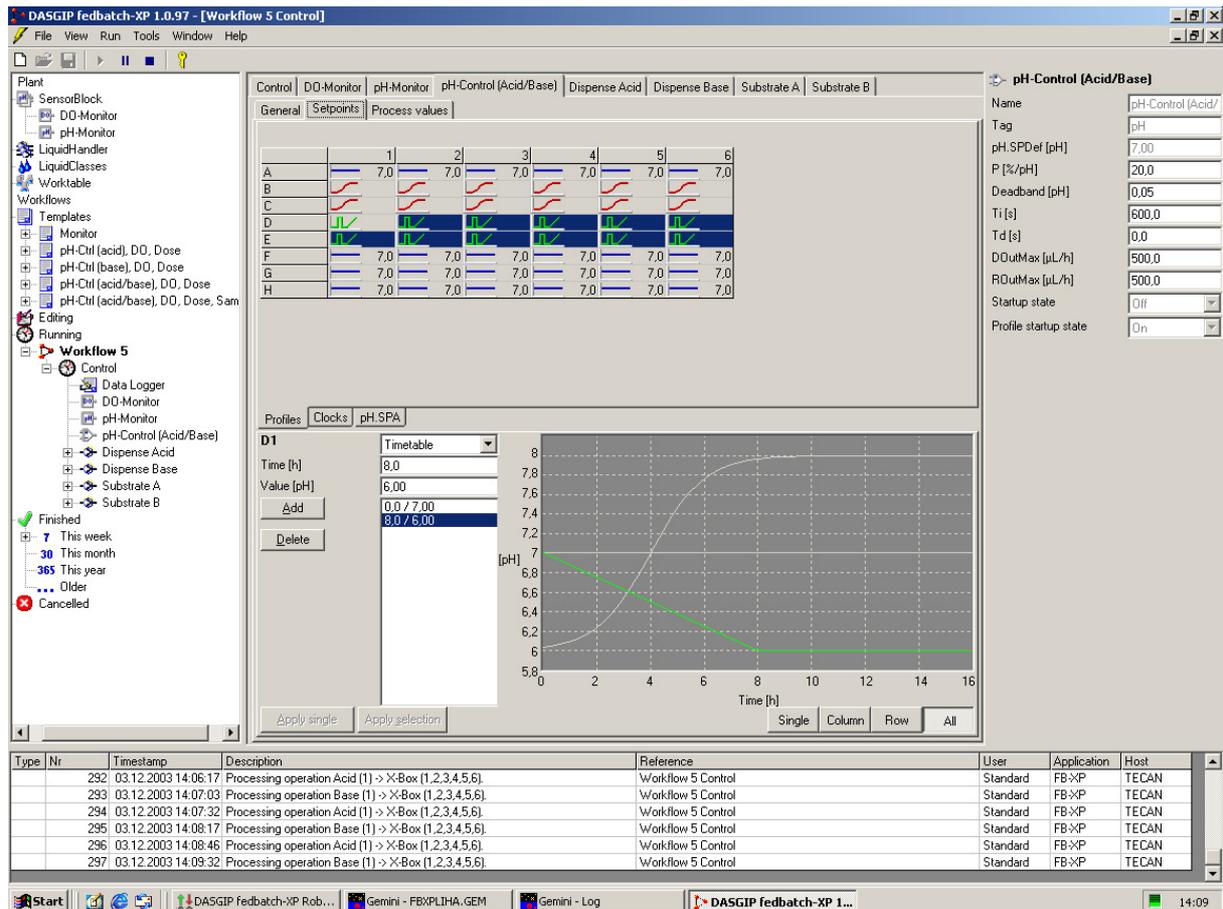
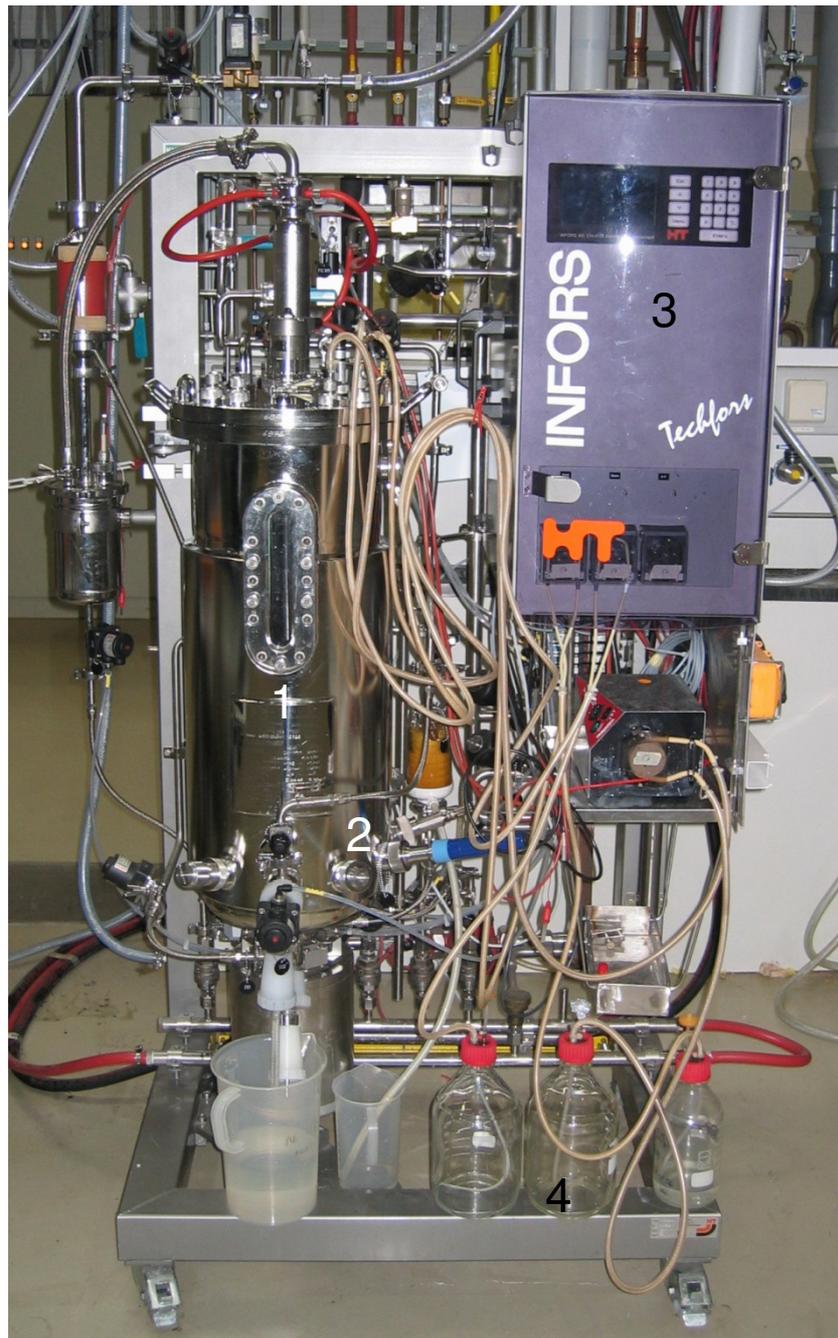


Abbildung 4.10: Individuelle Einstellung des pH-Profiles

Für jeden der 48 parallelen ml-Reaktoren kann das pH-Profil der pH-Regelung einzeln eingestellt werden. Dabei besteht die Möglichkeit neben einfachen konstanten Werten auch Rampen und Sprünge auszuwählen.

#### 4.1.2 Laborbioreaktor

Alle Kultivierungen im Litermaßstab wurden in einem Laborbioreaktor (Techfors, Infors GmbH, Einsbach) mit einem Nennvolumen von 42 l durchgeführt. Der mit drei Rushton-Turbinen ausgestattete Edelstahl-Rührkesselbioreaktor wird mit Heißdampf über den Doppelmantel beheizt und ist mit Sonden zur Messung von pH,  $pO_2$ , Temperatur und Druck versehen. Zur schnellen und unkomplizierten Probenahme ist eine Probenahmesonde (DE102005049226A1) installiert. Der Laborbioreaktor wird über einen Gasverteiler begast, kann bei einem maximalen Überdruck von 1,5 bar betrieben werden und verfügt über Sterilization-in-Place (SIP) Fähigkeiten.



**Abbildung 4.11: 42 Liter-Laborbioreaktor Techfors**

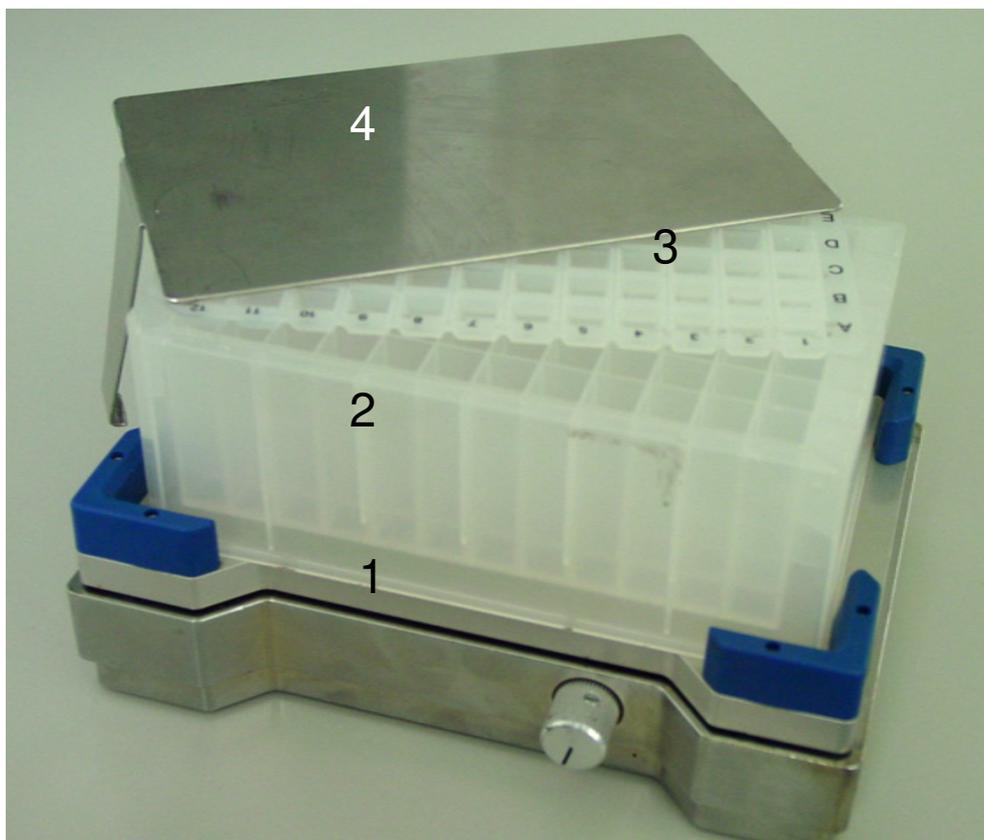
In Bodennähe des Rührkessels (1) sind die Messsonden (2) eingebaut. Der Reaktor wird von der Steuereinheit (3) aus bedient. Für die Titration des pH und für die Zugabe des Inokulums stehen mehrere Vorlagen (4) zur Verfügung.

Das maximale Arbeitsvolumen ist 32 l wobei das minimale Volumen für eine etwa zwei Tage dauernde Kultivierung im Satzverfahren 23 l beträgt. Die Rüstzeit beträgt inkl. Vorbereitung und abschließender Reinigung 4 – 5 Stunden.

## 4.2 Reaktoren zur Biotransformation

Für die biokatalysierte Umsetzung von 4Cl-ACE zu S-CHBE wurden je nach Anforderungen mehrere Reaktoren verwendet.

### 4.2.1 „Deep-Well“-Platte

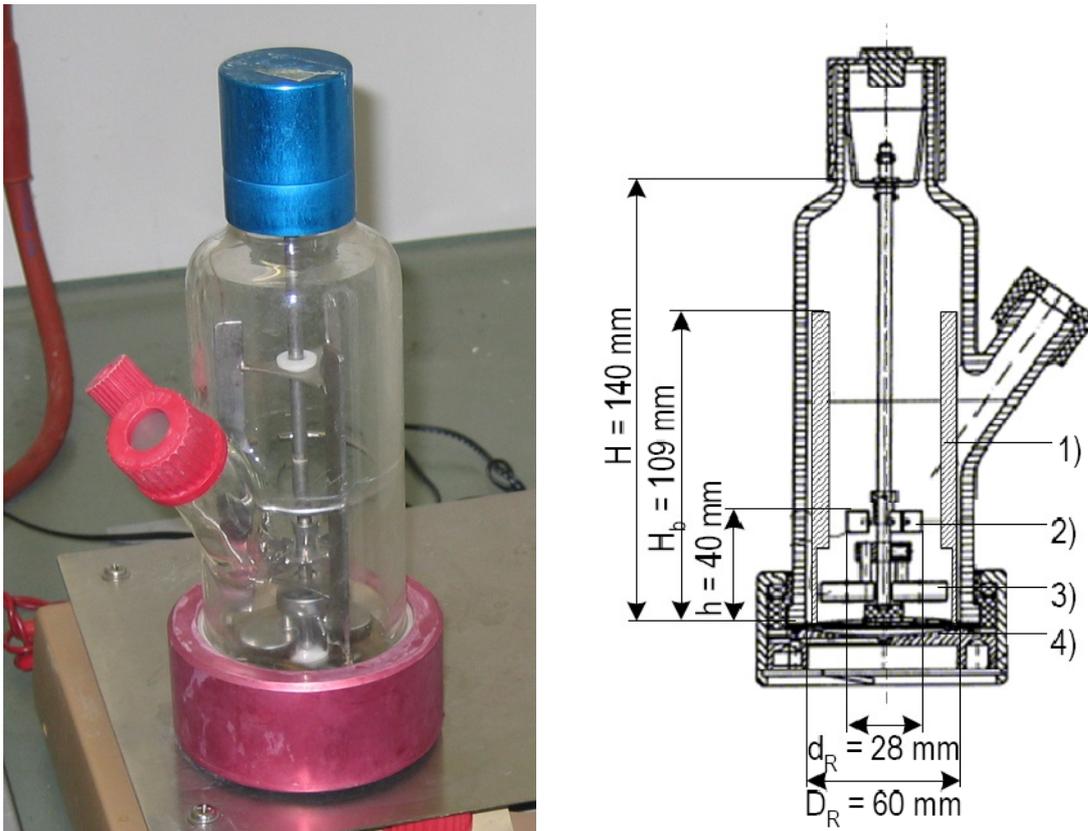


**Abbildung 4.12:** „Deep-Well“-Platte mit MTP-Schüttler für parallele Biotransformationen

Auf dem MTP-Schüttler (1) ist die „Deep-Well“-Platte (2) eingerastet. Zur Minimierung von Verdunstungsverlusten während der 20 Stunden dauernden Biotransformation ist die Platte mit einer Abdeckung (3) verschlossen. Diese wird mit einer Edelstahlplatte (4) gesichert.

Parallele Biotransformationen im  $\mu\text{l}$ -Maßstab wurden in einer „Deep-Well“-Platte mit 2 ml Volumen (nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe), durchgeführt. Auf Grund der verwendeten organischen Lösungsmittel musste diese aus Polypropylen (PP) gefertigt sein. Die Platten wurden mit einem Mikrotiterplattenschüttler (Variomag Monoshake, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bei etwa  $1000 \text{ U min}^{-1}$  geschüttelt. Die Platte wurde im Betrieb mit einer Lösungsmittel beständigen Abdeckung (Whatman GmbH, Dassel) aus Polyethylen (PE) verschlossen.

## 4.2.2 Rührkesselreaktor im 400 ml-Maßstab



**Abbildung 4.13: 400 ml-Reaktor für Biotransformationen**

Zur Minimierung des Verdunstungsverlustes wurde die Alu-Kappe mit mehreren Lagen Parafilm abgedichtet. Die zusätzlichen Anschlüsse des Reaktors wurden nicht genutzt.

Neben „Deep-Well“-Platten kam auch ein kleiner Laborreaktor (Rührfors, Infors GmbH, Einsbach) zum Einsatz. Das nominale Volumen des Reaktors beträgt 400 ml, er verfügt über drei Strömungsbrecher anstelle der sonst üblichen vier und wird durch eine magnetisch angetriebene einfache Rushton-Turbine durchmischt. Die bei diesem Reaktor sonst übliche Begasung durch eine Sinterbodenplatte wurde nicht genutzt.

Der Rührfors-Reaktor wurde nur für die Biotransformation verwendet. Das Volumen war nicht ausreichend für die anschließende Extraktion. Diese wurde daher in einem Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen durchgeführt.

## 4.3 Medien und Pufferlösungen

### 4.3.1 CSL-Medium

Ein Maisquellwasser-Medium (Corn-Steep-Liquor, CSL) ist das Standardmedium bei Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6.

**Tabelle 4.1: CSL-Medium**

Komponente	Konzentration
Hefeextrakt	10 g L <sup>-1</sup>
Pepton	20 g L <sup>-1</sup>
CSL	20 ml l <sup>-1</sup>
Glucose	30 g l <sup>-1</sup>

Alle Medienbestandteile mit Ausnahme von Glucose werden in VE-Wasser gelöst, autoklaviert und anschließend bis zur Verwendung bei 4°C steril gelagert. Die Glucose wird als separat sterilisierte Lösung unter sterilen Bedingungen unmittelbar vor der Verwendung zugegeben. Die Einstellung des pH ist nicht notwendig, da sich ein pH um 6,0 ergibt.

### 4.3.2 CSP-Medium

Das CSP-Medium (Corn-Steep-Powder) ist ein abgewandeltes CSL-Medium, statt des flüssigem CSL wird hier pulverförmiges CSP verwendet. Der Austausch des flüssigen Maisquellwassers durch die sprühgetrocknete Variante wurde notwendig, da CSL nur begrenzt haltbar und nicht in gleichbleibender Qualität zu beziehen war. Das längere Zeit haltbare und stabile CSP konnte hingegen in einer ausreichenden Menge beschafft werden.

**Tabelle 4.2: CSP-Medium**

Komponente	Konzentration
Hefeextrakt	10 g l <sup>-1</sup>
Pepton	20 g l <sup>-1</sup>
CSP	10 g l <sup>-1</sup>
Glucose	30 g l <sup>-1</sup>

Die Herstellung des Mediums erfolgt analog zur Herstellung des CSL-Mediums.

### 4.3.3 Modifiziertes LB-Medium

**Tabelle 4.3: Modifiziertes LB-Medium**

Komponente	Konzentration
Pepton	20 g l <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	20 g l <sup>-1</sup>
Glucose	30 g l <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.0 g l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 g l <sup>-1</sup>
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6 g l <sup>-1</sup>
NaCl	5 g l <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	0.2 g l <sup>-1</sup>

Alle Medienbestandteile mit Ausnahme der Glucose und des Magnesiumsulfats wurden in VE-Wasser gelöst, der pH auf 6,8 eingestellt, autoklaviert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die separat autoklavierten Stammlösungen der Glucose bzw. des Magnesiumsulfats wurden unter sterilen Bedingungen kurz vor der Verwendung zugegeben.

### 4.3.4 Umsetzungspuffer

Der Umsetzungspuffer (siehe Tabelle 4.4) wird frühestens eine Stunde vor der Verwendung frisch angesetzt.

**Tabelle 4.4: Puffermedium für Biotransformation von 4Cl-ACE zu S-CHBE**

Komponente	Konzentration
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,42 g l <sup>-1</sup>
Glucose	198,17 g l <sup>-1</sup>
NaCl	5,84 g l <sup>-1</sup>
NADP <sup>+</sup>	0,0787 g l <sup>-1</sup>

Alle Bestandteile werden in VE-Wasser gelöst, der pH auf 7 eingestellt und das fertige Medium bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

### 4.3.5 Substratvorlage

Das verwendete Substrat 4Cl-ACE wird mit einer Konzentration von 1,7 M in n-Butylacetat als Lösungsmittel gelöst. n-Butylacetat dient bei der Biotransformation als zweite flüssige Phase zur Vorhaltung des Substrats und zur Aufnahme des Produkts. Die Substratvorlage wird frühestens 30 Minuten vor der Verwendung in einem Maßkolben mit Schliff angesetzt.

### 4.3.6 Extraktionsmittel mit internem Standard

Das Extraktionsmittel Ethylacetat enthält als internen Standard 36 mM Acetophenon. Das Extraktionsmittel wird frühestens 30 Minuten vor der Verwendung angesetzt und in einem Maßkolben mit Schliff aufbewahrt.

### 4.3.7 Sonstige Chemikalien

- *Antischaum-Mittel*

Die Wahl des richtigen Entschäumers hat einen entscheidenden Einfluss auf das Gelingen einer Kultivierung. Je nach Prozess kann das falsche Antischaum-Mittel nur eine geringe oder keinen Einfluss auf die Schaumbildung haben. Im ungünstigsten Fall werden die Mikroorganismen direkt beeinträchtigt.

**Tabelle 4.5:Übersicht über die verwendeten Antischaum-Mittel**  
**Das Antischaummittel J633 verfügt gegenüber dem J673 über einen zusätzlichen Lösungsvermittler, weswegen es besser für Kultivierungen im ml-Maßstab geeignet ist.**

Kultivierung	Entschäumer
<i>Escherichia coli</i>	Clerol FBA 265 (Cognis GmbH, Düsseldorf)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	J633 (ml-Maßstab) (Schill + Seilacher J673 (Litermaßstab) „Struktol“ AG, Hamburg)

## 4.4 Analytik und Messtechnik

### 4.4.1 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Zur Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration (BTM) wurden zunächst 2 ml Zellsuspension in ausgeheizt gewogenen Probenröhrchen (PR) abzentrifugiert. Nach Abnahme des wässrigen Überstands wurde das Zellpellet für mindestens 48 Stunden bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet und anschließend zusammen mit dem

Probenröhrchen erneut gewogen. Aus der Gewichts Differenz und dem Probenvolumen errechnet sich nach Gleichung (4-1) die Biotrockenmasse.

$$BTM = \frac{m_{PR} - m_{PR+Pellet}}{V_{Probe}} \quad (4-1)$$

#### 4.4.2 Messung der optischen Dichte von Zellsuspensionen

- *Einstrahl-Photometer*

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte in einem Photometer (Spectronic Genesys 20, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bei 650 nm in Polystyrol-Einmalküvetten gegen PBS-Puffer. Zur Verdünnung der Zellsuspensionen auf eine maximale OD von 0,3 wurde ebenfalls PBS-Puffer verwendet.

- *MTP-Lesegerät*

Die parallele Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspensionen im Bioreaktorblock wurde mit einem MTP-Reader (Fluostar Galaxy, BMG Labtech GmbH, Offenburg) durchgeführt. Die jeweils 20 µl bemessenden Proben wurden im Photometer unmittelbar vor der Messung vollautomatisch 1:10 durch die Zugabe von 180 µl PBS-Puffer verdünnt. Die Messung erfolgte bei 650 nm in Polystyrol Rundboden Mikrotiterplatten.

#### 4.4.3 Korrelation OD – BTM

Die direkte Bestimmung der BTM während einer Kultivierung ist einerseits zeitnah nicht möglich. Andererseits ist sie bei parallelen Kultivierungen auf Grund des limitierten Volumens und der großen Anzahl an Proben kaum praktikabel. Daher wurde eine BTM-OD-Korrelation durchgeführt, die für ein möglichst breites Spektrum an Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae* anwendbar ist. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit von Proben aus dem Bioreaktor und dem Laborbioreaktor und deren Messungen im MTP-Photometer und Einstrahlphotometer wurde die Korrelation der optischen Dichte der Zellsuspensionen mit den entsprechenden Biotrockenmasse-konzentrationen durchgeführt. Das Signal der OD-Messung ist jedoch stark abhängig von der Morphologie bzw. der Größe der Zellen und damit von den Kultivierungsbedingungen und der jeweiligen Phase einer Kultivierung (Rupes, 2002; Wheals, 1982; Lord und Wheals, 1981). Somit ist die Aussagekraft dieser

Messgröße aber auch beschränkt, da eine unerwartet veränderte OD oftmals auf eine – in der Realität nicht vorhandene – veränderte BTM schließen lässt.

Zur Bestimmung der Parameter wurden zum Teil auf konzentrierte Zellsuspensionen aus Kultivierungen direkt im Einstrahl-Photometer und MTP-Photometer vermessen. Dabei wurde gezielt der lineare Messbereich überschritten, d.h. die Messung wurde in den Bereich der Sättigung geführt. Dadurch lässt sich zum einen für das Einstrahlphotometer der lineare Bereich feststellen, zum anderen ergibt sich für den MTP-Reader ein nichtlinearer Zusammenhang, der den Messbereich vergrößert. Die direkt gemessene optische Dichte nimmt dabei mit zunehmender realer OD weniger stark zu, die Kurven der OD-Messung verlaufen entsprechend einer Sättigungskurve. Es kommt zu Abschattungen und Sekundärstreuungen in der dichten Zellsuspension. Die Parameter der den physikalischen Zusammenhängen der Messung zugrundeliegenden Sättigungskurve wurden bestimmt und dienen der Korrelation der direkten Messungen der OD aus dem MTP-Lesegerät mit der im Einstrahlphotometer bestimmten realen optischen Dichte. Die Messung folgt dabei folgendem Zusammenhang:

$$OD_{1S} = \frac{a \cdot OD_{\text{real}}}{b + OD_{\text{real}}} \quad (4-2)$$

bzw.

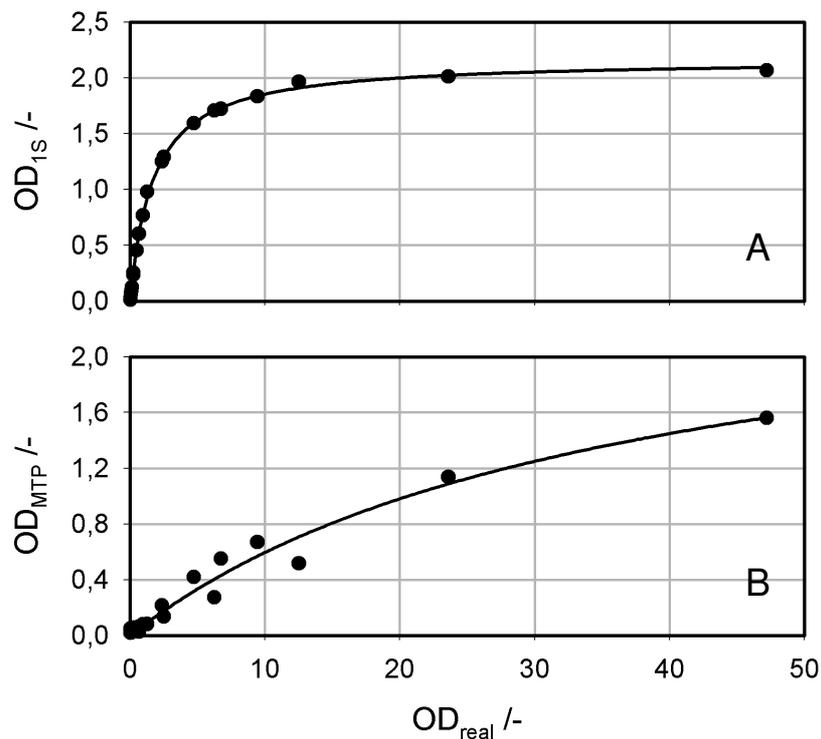
$$OD_{\text{MTP}} = \frac{a \cdot OD_{\text{real}}}{b + OD_{\text{real}}} \quad (4-3)$$

Die im MTP-Photometer durchgeführte 1:10 Verdünnung wird als systemimmanente Konstante betrachtet und wird bei allen Berechnungen nicht explizit beachtet. Somit sind sämtliche Einflüsse und Fehler, die durch die Verdünnung entstehen Teil der Messung.

Die Korrelation zwischen der realen im Küvettenphotometer gemessenen OD und der Biotrockenmassekonzentration dieser Proben wurde über eine lineare Regression bestimmt:

$$BTM = m \cdot OD_{\text{real}} + t \quad (4-4)$$

Über den zuvor bestimmten Zusammenhang zwischen der gemessenen OD im MTP-Photometer und der realen OD kann somit die BTM der Proben aus dem Bioreaktorblock geschätzt werden.



**Abbildung 4.14: Korrelation zwischen der gemessenen OD und der realen OD des Einstrahlphotometers und des MTP Readers**  
Der lineare Bereich der OD-Messung des Einstrahlphotometers (A) erstreckt sich bis etwa 0,3. Die Messung im MTP-Photometer (B) verlässt bewusst den linearen Bereich.

Zudem wurde, entgegen der sonst üblichen Praxis, darauf verzichtet die für die Messung der OD notwendige Verdünnung mit Medium durchzuführen. Normalerweise ist dies erforderlich um Matrixeinflüsse des Mediums zu minimieren. Stattdessen wurde PBS-Puffer verwendet, da zum einen bei parallelen Kultivierungen mit verschiedenen Medien die automatisierten Messungen nicht mit unterschiedlichen Medien zur Verdünnung durchgeführt werden können. Andererseits werden Medien, die zur Verdünnung vorgehalten werden, innerhalb kurzer Zeit von Luftkeimen bewachsen und beeinflussen somit die OD-Messungen der bis zu 44 Stunden dauernden Kultivierungen nicht unerheblich.

Das Signal der OD-Messung mit dem Einstrahl-Photometer geht vergleichsweise früh in die Sättigung. Ab einer realen OD von etwa 10 ergibt sich kaum noch eine Änderung des Messwerts. Die Messung im MTP-Reader verlässt zwar auch den linearen Bereich, erreicht dagegen noch keine Sättigung. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Messung im MTP-Photometer immer eine 1:10 Verdünnung beinhaltet. Das könnte auch einer der Gründe für den größeren Fehler

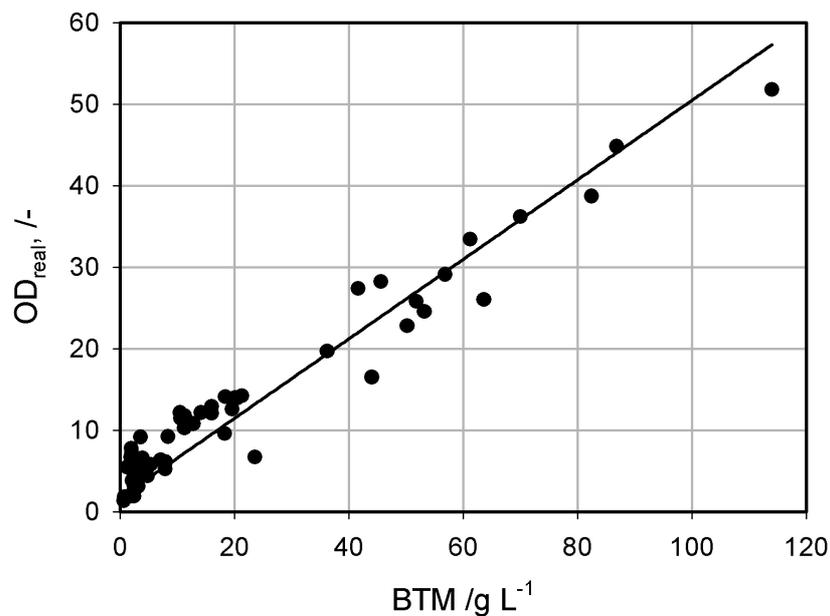
der Messung im Plattenphotometer im Vergleich zum Einstrahlphotometer sein. Beide Messungen wurden ja mit identischen Proben durchgeführt.

Die Parameteranpassungen der einzelnen Parameter der Gleichungen (4-2) und (4-3) erbrachten folgendes:

**Tabelle 4.6: Parameter der Korrelation der verschiedenen OD-Messungen mit der realen optischen Dichte**

	a	b
Korrelation $OD_{1S}-OD_{real}$	$2,17 \pm 0,01$	$1,70 \pm 0,04$
Korrelation $OD_{MTP}-OD_{real}$	$2,77 \pm 0,34$	$36,44 \pm 7,57$

Die Korrelation der Biotrockenmasse mit der realen OD der Zellsuspensionen führte zu dem in Abbildung 4.15 dargestellten Ergebnis.



**Abbildung 4.15: Korrelation von BTM und  $OD_{650}$**   
**Der Wert der optischen Dichte ist etwa zweimal größer als der der korrespondierenden Biotrockenmasse.**

Die weite Streuung der einzelnen Punkte um die Gerade der linearen Regression ist auf die Verwendung von Zellen aus unterschiedlichen Kultivierungen zurück zu führen.

Die lineare Regression der Parameter aus Gleichung (4-4) führt zu dem in Tabelle 4.7 aufgeführten Ergebnis.

**Tabelle 4.7: Parameter der Korrelation von BTM und realer optischer Dichte der Zellsuspensionen**

Parameter	Wert
m	$0,49 \pm 0,11 \text{ g l}^{-1}$
t	$1,70 \pm 0,62 \text{ g l}^{-1}$

#### 4.4.4 Gaschromatographie mit Probenvorbereitung

Mit Hilfe der chiralen Gaschromatographie wurden das Edukt 4Cl-ACE, der interne Standard Acetophenon und die Produkte R/S-CHBE getrennt und die Konzentration bestimmt.

**Tabelle 4.8: Parameter der gaschromatographischen Bestimmung von S-CHBE**

**(Methode nach Engelking (2004) und Pfründer (2005))**

Gaschromatograph	CP-3800 (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt)
Chromatographiesäule	Lipodex E (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Probeninjektion	1 $\mu\text{L}$ , Split 50
Trägergasvolumenstrom	$5,0 \text{ ml min}^{-1}$ Helium 5.0
Ofentemperatur	$110^\circ\text{C}$ für 15 min

Zur gaschromatographischen Bestimmung wurden den einzelnen Umsetzungen das doppelte Volumen des zuvor beschriebenen Extraktionsmittels zugegeben, d.h. der 500  $\mu\text{l}$  Ansatz in der „Deep-Well“-Platte wurde mit 1000  $\mu\text{l}$  extrahiert. Lediglich die Umsetzungen im Rührfors-Reaktor wurden extern in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben extrahiert. Um das Edukt und die Produkte quantitativ zu erfassen wurde nach der Überführung der Umsetzungs-suspension in den Erlenmeyerkolben der Rührfors-Reaktor mit dem Extraktionsmittel gespült. Die Analyten wurden eine Stunde lang durch schütteln bzw. rühren extrahiert, eine Phasentrennung von organischer und wässriger Phase durch vorsichtiges Rühren bzw. kurzzeitiges Zentrifugieren erreicht. Die 100  $\mu\text{l}$  bemessenden Proben zur Analyse wurden in Rollrandprobengläschen überführt und dort mit 400  $\mu\text{l}$  mit Kaliumcarbonat getrocknetem Ethylacetat verdünnt. Anschließend wurden die Probengefäßchen mit Alu-Crimpdeckeln verschlossen und bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### 4.4.5 Parallele pH- und pO<sub>2</sub>-Messung

Bei Kultivierungen im Bioreaktorblock wurden pH und Sauerstoffpartialdruck pO<sub>2</sub> mit Hilfe der optosensorischen Einheiten (MultiChannel Reader for pH and oxygen, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg) gemessen. Am Reaktorboden sind dazu chemische pH- bzw. Sauerstoffsensoren immobilisiert, die mit einem Lichtblitz spezifischer Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Das Abklingverhalten des Fluoreszenzsignals ist eine Funktion der jeweiligen Analytkonzentration im Reaktor und kann mit den elektronischen Einheiten erfasst und ausgewertet werden.

Zur Messung gibt der Hersteller die entsprechenden Daten der herstellerseitigen Kalibrierung an. Diese Kalibrierung ist für alle Reaktoren einer Charge gültig.

#### 4.4.6 Charakterisierung der pO<sub>2</sub>-Messung

Zur Charakterisierung der pO<sub>2</sub>-Messung mittels der parallelen optosensorischen Einheiten wurden die Phasenwinkel bei bekannten, eingestellten pO<sub>2</sub> in der Lösung gemessen. Die Messungen wurden mit 48 zufällig ausgewählten Reaktoren durchgeführt, die Medientemperatur betrug 30°C und die Rührerdrehzahl 2800 U min<sup>-1</sup>. Zur Bestimmung des 100%-pO<sub>2</sub> wurde das Medium mit Luftsauerstoff aufgesättigt. Der 0%-Wert wurde durch die Zugabe von 5 mM Co<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Sulfit im Überschuss erreicht.

Der lineare Zusammenhang zwischen dem gemessenen Phasenwinkel  $\varphi$  und dem pO<sub>2</sub> ist wie folgt:

$$\varphi = x \cdot pO_2 + y \quad (4-5)$$

Die beiden Parameter Steigung  $x$  und Achsenabschnitt  $y$  werden durch lineare Regression ermittelt.

#### 4.4.7 Charakterisierung der pH-Messung

Die Charakterisierung der parallelen pH-Messung erfolgte mit 48 zufällig ausgewählten Reaktoren einer Charge bei sechs festen pH. Die Messungen wurden bei 30°C und einer Rührerdrehzahl von 500 U min<sup>-1</sup> zur Durchmischung durchgeführt. Der pH der verwendeten Lösungen wurde vor Beginn der Messungen auf pH 4, 5, 6, 7, 8 und 9 eingestellt und nach der Messung nochmals überprüft.

Der Zusammenhang zwischen dem gemessenen Phasenwinkel  $\varphi$  und dem pH ist eine Sigmoide:

$$\varphi = \frac{\varphi_{min} - \varphi_{max}}{1 + e^{\left(\frac{pH - pH_0}{dpH}\right)}} + \varphi_{max} \quad (4-6)$$

Die die Sigmoiden festlegenden Parameter minimale Phase  $\varphi_{min}$ , maximale Phase  $\varphi_{max}$ , Wendepunkt  $pH_0$  und Steigung im Wendepunkt  $dpH$  werden mit einer nichtlinearen Regression nach dem Newton-Verfahren berechnet.

#### 4.4.8 Referenzmessungen des pH

Als Referenzmethode zur pH-Messung wurde eine pH-Einstabmesskette (Glaselektrode) (N 6000 A, SCHOTT Instruments GmbH, Mainz) an einem pH-Meter (CG 843, SCHOTT Instruments GmbH, Mainz) durchgeführt. Die 96 mm lange und 3 mm dicke Miniatur-Glaselektrode kann durch die Reaktorauslassbohrung bis ins Medium gelangen. Dazu muss der Roboter während der Messung angehalten werden um eine Beschädigung der Roboternadeln oder der Sonde zu vermeiden. Die Sonde wurde vor der Messung mit 70%-iger Ethanollösung desinfiziert.

#### 4.4.9 Bestimmung des $k_L a$

Der volumetrische Stoffübergangskoeffizient  $k_L a$  wurde mit Hilfe der dynamischen Sulfitmethode (DSM) (Linek *et al.*, 1987; Havelka *et al.*, 1998) bestimmt. Die dazu nötige Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration erfolgte mit einer faseroptischen Sauerstoffoptode (MicroxTX, Presens GmbH, Regensburg). Die Ansprechzeit  $t_E$  der Optode wurde durch Eintauchen in eine sauerstofffreie 0,5 M  $Na_2SO_4$ -Lösung bestimmt. Dabei ist die Ansprechzeit  $t_E$  die Zeit, die das Signal benötigt um einen  $pO_2$  von 90% zu erreichen. Die jeweils dreifache Messung des  $k_L a$  erfolgte in einer frisch hergestellten 0,5 M  $Na_2SO_4$ -Lösung mit 1 mM  $CoSO_4$  als Katalysator. Nach dem Einstellen der gewünschten Versuchsbedingungen (Drehzahl des Rührers und Temperatur) wurde die Messung durch die Zugabe von frisch bereiteter 0,5 M  $Na_2SO_3$ -Lösung gestartet. Das zugegebene Volumen war so bemessen, dass eine Sauerstoffkonzentration von 0% zuverlässig detektiert werden konnte. Die Messdaten der nach der vollständigen Oxidation des zugegebenen Sulfits einsetzenden Aufsättigung der Lösung mit Sauerstoff dienten der anschließenden Auswertung. Die Berechnung des  $k_L a$  erfolgte durch nichtlineare Regression mit dem Newton-Verfahren (Solver-Funktion in Microsoft Excel) nach Gleichung (4-7):

$$\frac{c_O^* - c_O(t)}{c_O^* - c_O(0)} = \left( \frac{1}{1 - t_E \cdot k_L a} \right) \cdot \left( e^{-t \cdot k_L a} - t_E \cdot k_L a \cdot e^{-\frac{t}{t_E}} \right) \quad (4-7)$$

Die verwendeten Parameter haben folgende Bedeutung:

$c_{O^*}$	Gleichgewichtskonzentration des Sauerstoffs /%
$c_{O(t)}$	gemessene Sauerstoffkonzentration /%
$c_{O(0)}$	Sauerstoffkonzentration zu Beginn der Auswertung /%
$t_E$	Ansprechzeit der Optode, hier $t_{90}$ /s

## 4.5 Mikroorganismen

### 4.5.1 *Escherichia coli*

Für alle Kultivierungen mit *Escherichia coli* wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Promega GmbH, Mannheim) verwendet. Dieser Stamm produziert bei Vorhandensein von ausreichend Sauerstoff im Medium weniger Acetat als der oftmals verwendete K12 (Phue und Shiloach, 2005; van Walle und Shiloach, 1998).

Die Stammhaltung erfolgte in 500  $\mu$ l fassenden  $-80^\circ\text{C}$  Kryokulturen, die aus *E. coli* Zellen hergestellt wurden, die in der exponentiellen Phase aus LB-Medium geerntet und mit 17% Glycerol versetzt wurden. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Verwendung auf Eis aufgetaut.

### 4.5.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 wurde bei Kultivierungen mit Hefen verwendet. Er überexprimiert eine organismuseigene Fettsäuresynthase und eine Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis*. Die entsprechenden Gene sind homolog in das Genom der Hefe integriert.

Die Stammhaltung erfolgte in 1000  $\mu$ l fassenden  $-80^\circ\text{C}$  Kryokulturen, die aus *Saccharomyces* Zellen hergestellt wurden, die in der exponentiellen Phase aus CSL-Medium geerntet und mit 21% Glycerol versetzt wurden. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Verwendung auf Eis aufgetaut.

## 4.6 Kultivierung von Mikroorganismen

### 4.6.1 Vorkultur

- *Escherichia coli*

Für die Vorkultur im 1000 ml Schüttelkolben wurden 100 ml der für die Parallelkultivierung vorbereiteten 1000 ml des modifizierten LB-Mediums verwendet. Entsprechend der Vorlaufzeit wurde für eine Ziel-OD von etwa 3 – 3,5 angeimpft und bei 37°C und 250 U min<sup>-1</sup> bei einer Exzentrizität von 50 mm inkubiert.

- *Saccharomyces cerevisiae*

Die Vorkultur erfolgte in 100 ml CSL- bzw. CSP-Medium im 1000 ml Schüttelkolben. Zum Animpfen wurde jeweils eine vollständige Kryokultur je Schüttelkolben verwendet. Die Inkubation erfolgte für 20 Stunden bei 30°C und 250 U min<sup>-1</sup> bei einer Exzentrizität von 50 mm. Die Zellen befinden sich nach dieser Zeit in einer ersten stationären Phase nach dem vollständigen Verbrauch der vorgelegten Glucose.

### 4.6.2 Prozessvorbereitung paralleler Kultivierungen

Zur Vorbereitung paralleler Kultivierungen wird der Bioreaktorblock unter sterilen Bedingungen in der Sterilarbeitsbank mit sterilen Reaktoren versehen. Das Wärmebad und das Kühlaggregat werden zum Erreichen der Soll-Temperaturen etwa eine Stunde vor Beginn des Versuchs eingeschaltet und die Begasungsrate des Bioreaktorblocks wird eingestellt.

In der Software fedbatch XP wird der dem durchzuführenden Prozess entsprechende „Workflow“ ausgewählt (siehe Abbildung 4.16) und die Startparameter eingegeben.

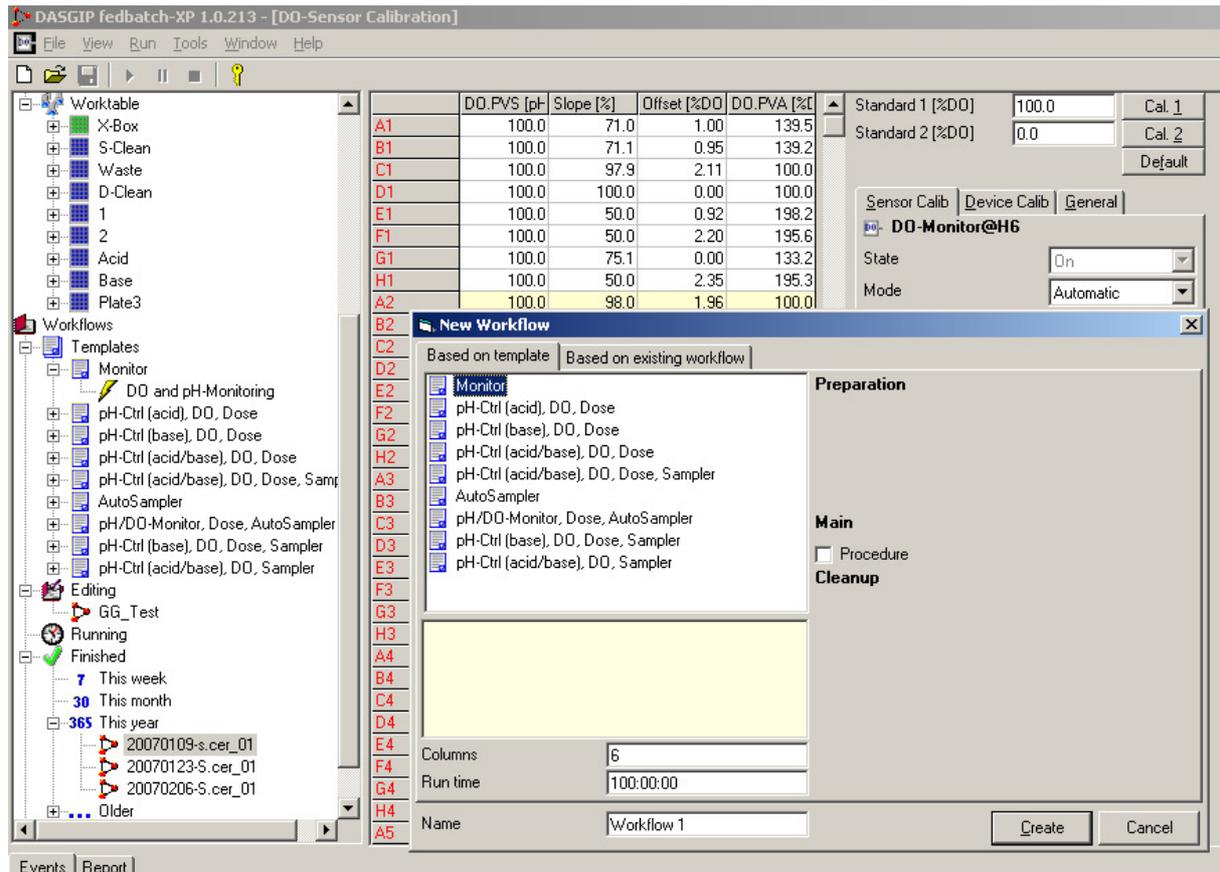
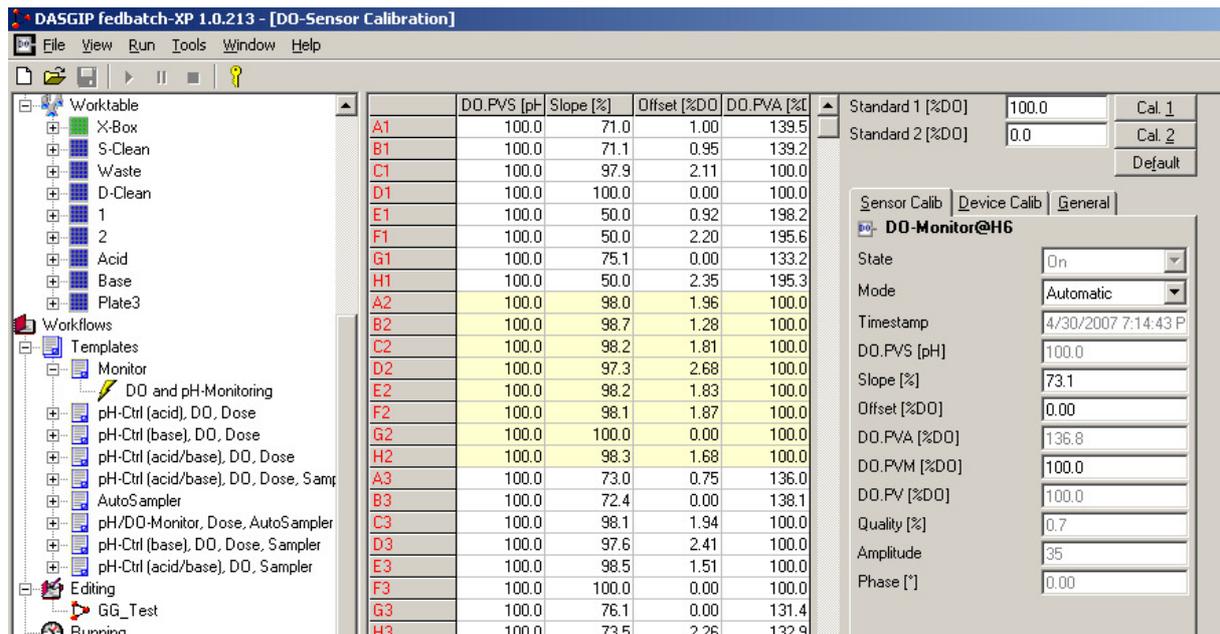


Abbildung 4.16: Eingabemaske zur Auswahl eines „Workflow“ in der Software fedbatch XP (Ausschnitt)

Entsprechend den Anforderungen des durchzuführenden Prozesses wird ein „Workflow“ gewählt, der beispielsweise eine zweiseitige pH-Regelung („pH-Ctrl (acid/base)“), die Messung des  $pO_2$  („DO“) und eine automatische Probenahme („Sampler“) enthält.

Nach dem in der Sterilarbeitsbank zu erfolgenden Befüllen und Animpfen der Reaktoren wird die autoklavierte Sterilgasabdeckung aufgesetzt. Anschließend kann der Bioreaktorblock an seine Position auf der Arbeitsfläche des Laborroboters gesetzt werden. Zu diesem Zeitpunkt kann bereits, sofern nötig, ein individueller Abgleich des 0%  $pO_2$ -Signals aller 48 Reaktoren durchgeführt werden (siehe Abbildung 4.17). Nach der Verbindung alle elektrischen Anschlüsse und der Herstellung der Medienversorgung, wird der Antrieb mit der voreingestellten Drehzahl gestartet. Der individuelle Abgleich der pH-Messung und des 100%  $pO_2$ -Signals aller Reaktoren ist nach einer Wartezeit von etwa 10 Minuten möglich. Nach dieser Zeit sind zum einen die Sensorpunkte in den Reaktoren vollständig konditioniert und zum anderen haben die Reaktoren weitestgehend ihre Soll-Temperatur erreicht.



**Abbildung 4.17: Eingabemaske der Software fedbatch XP zur individuellen Anpassung der  $pO_2$ -Messung aller 48 Reaktoren (Ausschnitt)**

Nach der Selektion der Reaktoren, für die eine Anpassung der  $pO_2$ -Messung notwendig ist, wird durch drücken des entsprechenden Knopfes eine individuelle Anpassung durchgeführt. So kann beispielsweise eine Anpassung des Messwertes für 100% Luftsättigung („Standard 1 [%DO] 100.0“) durch die Betätigung des Knopfes „Cal. 1“ ausgeführt werden.

Zum Abgleich des pH ist eine externe Bestimmung des pH des Mediums bzw. der verwendeten Zellsuspension notwendig.

#### 4.6.3 Parallelkultivierung von Mikroorganismen

- *Escherichia coli*

Für parallele Kultivierungen mit *E. coli* im Satzverfahren wurde beim Erreichen der Ziel-OD der Vorkultur 900 ml steriles Medium mit 100 ml der Vorkultur vereinigt. Zusätzlich wurde die notwendige Menge der  $600 \text{ g l}^{-1}$  Glucoselösung und 0,2 Vol.-% Entschäumer zugegeben. Diese Zellsuspension wurde mit einem Flaschenaufsatzdispenser (Dispensette III, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim) zu je 12 ml in die Reaktoren des Parallelbioreaktors aliquotiert.

Die Kultivierung fand bei  $37^\circ\text{C}$  und einer Anfangsrührergeschwindigkeit von  $2800 \text{ U min}^{-1}$  statt. Der extern gemessene pH der initialen Zellsuspension wurde in der Software fedbatch XP zur individuellen Anpassung des pH aller Reaktoren (entsprechend 4.6.2) gleichzeitig verwendet. Während der Kultivierung wurden *online* der pH und  $pO_2$  gemessen sowie automatisiert Proben zur Bestimmung der OD genommen.

- *Saccharomyces cerevisiae*

Bei parallelen Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae* fasB His6 im Satzverfahren wurde entsprechend der Zielsetzung ein anderes Protokoll angewandt. Die Kultivierungen fanden generell bei 30°C und einer Anfangsrührergeschwindigkeit von 2800 U min<sup>-1</sup> statt. Während der Kultivierungen wurden *online* der pH und pO<sub>2</sub> gemessen sowie automatisiert Proben zur Bestimmung der OD genommen.

Bei parallelen Kultivierungen mit 48 identischen Ansätzen wurden wiederum 100 ml der Vorkultur bei Erreichen der Ziel-OD zu 900 ml sterilem Medium gegeben. Zusätzlich wurde die notwendige Menge der 600 g l<sup>-1</sup> Glucoselösung zupipettiert. Diese Zellsuspension wurde ebenfalls mit einem Flaschenaufsatzdispenser (Dispensette III, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim) zu je 12 ml in die Reaktoren des Parallelbioreaktors pipettiert. Der extern gemessene pH der initialen Zellsuspension wurde in der Software fedbatch XP zur individuellen Anpassung des pH aller Reaktoren verwendet.

Bei Kultivierungen im Rahmen der Prozessoptimierung wurden jeweils 3 Reaktoren mit 10,75 ml desselben Mediums befüllt. Das restliche Medium diente zur Bestimmung des pH für den späteren pH-Abgleich. Als Inokulum wurden unter aseptischen Bedingungen 1,32 ml Antischaum-Mittel, 33 ml Glucoselösung mit einer Konzentration von 600 g l<sup>-1</sup> sowie 35,75 ml Vorkultur vermischt. Von dieser Suspension wurden mit einer Mehrfachpipette (Multipette plus, Eppendorf AG, Hamburg) mit einer sterilen Spitze jeweils 1,25 ml in die Reaktoren gegeben.

Zur Regelung des pH bei Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 mit Hilfe der in der Software fedbatch XP implementierten Regelung wurden die in Tabelle 4.9 zusammengefassten Parameter verwendet.

**Tabelle 4.9: Parameter des PI-Reglers zur pH-Kontrolle in parallelen automatisierten Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae***

Parameter	Wert
K <sub>P</sub>	10% pH <sup>-1</sup>
T <sub>I</sub>	730 s
Toleranzband	0,2 pH
Stellgrößenbegrenzung u <sub>max</sub>	60 µl
Stellgrößenbegrenzung u <sub>min</sub>	20 µl
„Anti-Windup“-Faktor γ	5

Als Titrationsmittel wurden 5 M NaOH und 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verwendet. Die Titrationsmittel wurden in Reagenzreservoirs im MTP-Format mit einem maximalen Füllvolumen von 290 ml (nerbe plus, Winsen/Luhe) vorgelegt. Zum Schutz der Lösungen vor Fremdkörpern wurden die Behälter mit Deckeln, die über Bohrungen für den Zugang der Pipettieradeln des Laborroboters verfügten, abgedeckt. Auf eine explizite Sterilisierung wurde verzichtet, da es nicht anzunehmen ist, dass in einer derart starken Base beziehungsweise Säure Mikroorganismen überleben können.

#### 4.6.4 Kultivierung im Litermaßstab

Kultivierungen im 23 L-Maßstab im Rührkesselbioreaktor dienen im Allgemeinen der Validierung von parallelen Kultivierungen im Milliliter-Maßstab. Daher wurde zumeist eine direkte Maßstabsvergrößerung durchgeführt, das heißt alle Volumina der verwendeten Medien und Lösungen wurden entsprechend vergrößert, die Konzentrationen wurden dabei beibehalten. Der Sollwert der pH-Regelung und die Mindestsauerstoffkonzentrationen wurden beibehalten, lediglich die Drehzahlen und die Begasungsrate unterschieden sich auf Grund der unterschiedlichen Prinzipien der verwendeten Reaktoren.

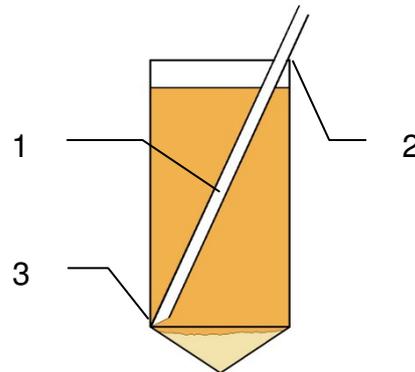
Bei Kultivierungen mit *E. coli* konnte das Volumen der Vorkultur nicht direkt vergrößert werden da bei einer direkten Maßstabsvergrößerung ein Volumen von 2,3 l bzw. 23 Schüttelkolben à 100 ml notwendig gewesen wären. In diesem Fall wurden 600 ml Vorkultur verwendet und die Glucosemenge entsprechend der geringeren zugegebenen Zellmasse vergrößert. Dabei wurde ein Zellertrag  $Y_{X,Glucose}$  von 0,5 g g<sup>-1</sup> zu Grunde gelegt. Zusätzlich verlängert sich dadurch die Dauer der Kultivierung.

Im Fall der Kultivierungen mit *S. cerevisiae* wurde auch das Vorkulturvolumen im Maßstab vergrößert, da hierbei lediglich 1250 ml notwendig sind. Es wurden zur Vorkultur sechs 1000 ml-Schüttelkolben mit 210 ml angesetzt und für 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit befanden sich die Zellen in einem der Vorkultur für Parallelkultivierungen vergleichbaren Zustand.

### 4.7 Biotransformation

Für die parallele Biotransformation in „Deep-Well“-Platten wurden automatisiert durch den Laborroboter 2 ml Zellsuspension aus den Reaktoren geerntet und in eine „Deep-Well“-Platte überführt. Zur Vermeidung des Einsaugens von Blasen durch die

Nadeln des Pipettierroboters und der Sedimentierung der Zellen wurde die Drehzahl der Rührer auf  $500 \text{ U min}^{-1}$  verringert. Bei dieser niedrigen Drehzahl kommt es noch nicht zum Gaseintrag durch den Rührer, eine ausreichende Durchmischung der Zellsuspension ist dennoch gewährleistet. Anschließend wurden die Zellen in einer Standzentrifuge (Hettich Rotixa 50 RS, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen) bei  $4500 \text{ U min}^{-1}$  bzw.  $4528 \text{ g}$  in der Kälte abzentrifugiert. Der Medienüberstand wurde manuell mit einer 10 ml Spritze und einer 2,1 mm Kanüle abgenommen.



**Abbildung 4.18: Abnahme des Medienüberstands in „Deep-Well“-Platten zur Gewinnung der Zellpellets für Biotransformationen**

Die Kanüle (1) wird oben in eine Ecke der Kavität platziert (2) und die Spitze der Kanüle an die diagonal gegenüberliegende Kante am Übergang der senkrechten Wandung zum schrägen Boden angesetzt (3). Dabei zeigt die Öffnung der Kanüle zum Pellet.

Mit der Spritze kann das Medium vorsichtig abgesaugt und auf Grund der Oberflächenspannung des Wassers fast der gesamte Medienüberstand abgenommen werden. Mit dieser Methode ist es möglich den Überstand verhältnismäßig reproduzierbar abzunehmen. Der Verlust an Zellmasse ist bei sorgsamer Arbeit selbst bei sehr weichen Pellets gering.

Die feuchten Zellpellets wurden mit einem Mikrospatel manuell in  $450 \mu\text{l}$  Umsetzungspuffer resuspendiert und die Reaktion durch die Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  Substratvorlage gestartet. Die Zugabe der Flüssigkeiten erfolgte dabei mit einer Mehrfachpipette (Multipette plus, Eppendorf AG, Hamburg).

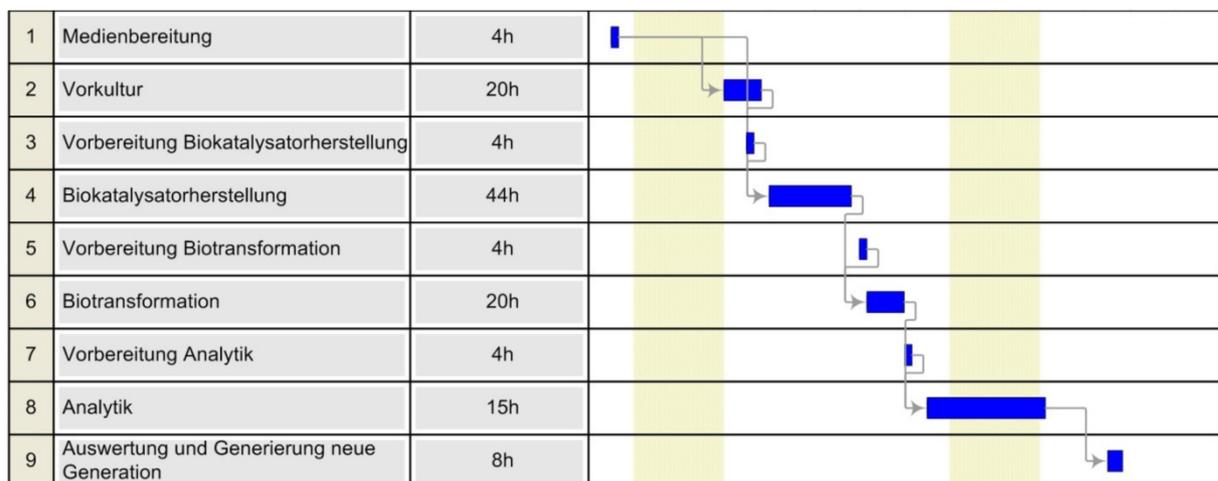
Die Biotransformation erfolgte während der Inkubation bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 20 Stunden.

Für Biotransformationen in größerem Maßstab mit Zellmasse aus dem Rührkesselbioreaktor wurden die Volumina entsprechend vergrößert. Die Zeiten und die prinzipielle Vorgehensweise erfolgten analog der Biotransformation im Mikroliter-Maßstab.

## 4.8 Prozessoptimierung

### 4.8.1 Parallele Optimierung

Jeder Parallelansatz während der experimentellen Optimierung folgte dem in Abbildung 4.19 gezeigten festen Ablauf, der sich über einen Zeitraum von zwei Wochen erstreckte.



**Abbildung 4.19: Zeitplan der Optimierung**

**Zur optimalen Nutzung der vorhandenen Ressourcen mussten die Abläufe der einzelnen Schritte aufeinander abgestimmt werden.**

Für die parallele Optimierung wurden jeweils 15 verschiedene Medien hergestellt. Zusätzlich wurde ein 16. Medium als Standard mitgeführt. Die parallelen Biotransformationen wurde für alle 48 Reaktoren standardisiert gemäß Abschnitt 4.7 durchgeführt, ebenso die anschließende Probenvorbereitung und Analytik nach Abschnitt 4.4.4.

### 4.8.2 Genetischer Algorithmus

Zur Versuchsplanung wurde die Software GAME.opt (Link und Weuster-Botz, 2006) genutzt. Diese verwendet einen genetischen Algorithmus (GA) des Typs „Strength Pareto Evolutionary Algorithm“ (SPEA) (Zitzler und Thiele, 1999). Genetische Algorithmen sind eine Nachbildung der in der Biologie auf genetischer Ebene

stattfindenden Evolution. Sie stellen Methoden zur heuristischen Optimierung dar und können für Probleme ohne geschlossene Lösung eingesetzt werden. Das bedeutet, dass genetische Algorithmen für Probleme, für die mit klassischen Strategien keine oder nur sehr aufwändig Lösungen gefunden werden können, zufriedenstellende Ergebnisse mittels einer Mehrzieloptimierung ermöglichen. Das Ziel des GA ist die Findung des Pareto-Optimums. Eine Lösung eines Problems ist dann pareto-optimal, wenn keine Veränderung möglich ist, die eines der Ziele der Optimierung schlechter stellt und gleichzeitig ein anderes Ziel besser stellt.

Bei der Anwendung generiert der GA zunächst eine initiale Population an Lösungskandidaten. Mittels eines „Fitness“-Tests wird für jeden dieser Lösungskandidaten entschieden, ob er an der Generierung der nächsten Generation teilnimmt. Diese nächste Generation wird durch Operationen wie Mutation oder Rekombination gebildet. Der GA des Typs SPEA nutzt zusätzlich eine weitere Population, die sogenannte externe Population. Die externe Population stellt eine Art Archiv dar, das Lösungskandidaten enthält, die den „Fitness“-Test besonders gut bestanden haben. Beim Überschreiten einer maximalen Populationsgröße wird die externe Population durch Clusterbildung verkleinert.

Zur Generierung der Populationen benötigt der GA eine handhabbare Darstellung des Suchraumes. Dazu wird der Variationsbereich der variierten Prozessgrößen quantisiert und als Binärcode dargestellt. Das bedeutet, dass die mögliche Bandbreite der Variation in feste Intervalle unterteilt und die Anzahl der Intervalle binär angegeben wird. Die Binärcodes aller variierten Prozessgrößen werden anschließend hintereinander aufgereiht und bilden den Bitstring eines Lösungskandidaten. Damit ist dann auch eine Mutation möglich, die mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zur Änderung einer 1 in eine 0 beziehungsweise einer 0 in eine 1 führt. Bei der Rekombination kommt es zum Austausch ganzer Bereiche eines Bitstrings zwischen einzelnen Mitgliedern einer Population.

Als Ausgangsbasis der Medienoptimierung diente die Zusammensetzung des CSP-Mediums. Dieses wurde um die Komponenten Phosphat, Magnesium und Kalium erweitert. Die Variationsbereiche der variierten Prozessgrößen sowie das CSP-Medium sind in Tabelle 4.10 wiedergegeben.

**Tabelle 4.10: Zusammenfassung der Optimierungsparameter**

Parameter	CSP-Medium	Einheit	minimal	maximal	Binärcode-Darstellung	Niveaus
Pepton	20	g l <sup>-1</sup>	0	50	5	32
Hefeextrakt	10	g l <sup>-1</sup>	0	50	5	32
CS-Pulver	10	g l <sup>-1</sup>	0	50	5	32
Phosphat	-	g l <sup>-1</sup>	0	30	5	32
Magnesium	-	g l <sup>-1</sup>	0	2	4	16
Kalium	-	g l <sup>-1</sup>	0	2	4	16
pH Kultivierung	-	-	5,5	7,5	3	8
pH Biotransformation	-	-	5,5	7,5	3	8

Die angegebenen Konzentrationen an Magnesium, Kalium und Phosphat geben die tatsächlichen Massen wieder und wurden in entsprechende Konzentrationen der Salze MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O umgerechnet.

Die experimentelle Optimierung mittels genetischem Algorithmus hatte eine Maximierung der Biotrockenmassekonzentration  $c_X$  während der Biokatalysatoranzucht und eine Maximierung der Produktkonzentration  $c_{S-CHBE}$  sowie des Enantiomerenüberschusses an  $ee_{S-CHBE}$  zum Ziel.

Der genetische Algorithmus wurde mit den in Tabelle 4.11 gelisteten Einstellungen verwendet:

**Tabelle 4.11: Parametereinstellungen GAME.opt**

Parameter	Wert
Mutationsrate	3% Wahrscheinlichkeit
„Crossover“-Punkte	2 / Bitstring
externe Population	max. 8 Populationsmitglieder
Anzahl der Cluster	8

Die nach der Durchführung der Biokatalysatoranzucht und Biotransformation vorliegenden Daten wurden nach einem festen Muster vorselektiert. Bei Ansätzen, deren  $ee_{S-CHBE}$  weniger als 2/3 des im Referenzansatz erreichten betrug, wurden die Werte für  $c_X$  und  $c_{S-CHBE}$  manuell auf Null gesetzt.

$$c_{X,i} = \begin{cases} 0, & ee_{S-CHBE,i} < \frac{2}{3} \cdot ee_{S-CHBE,R} \\ c_{X,i}, & ee_{S-CHBE,i} \geq \frac{2}{3} \cdot ee_{S-CHBE,R} \end{cases} \quad (4-8)$$

$$c_{S-CHBE,i} = \begin{cases} 0, & ee_{S-CHBE,i} < \frac{2}{3} \cdot ee_{S-CHBE,R} \\ c_{S-CHBE,i}, & ee_{S-CHBE,i} \geq \frac{2}{3} \cdot ee_{S-CHBE,R} \end{cases} \quad (4-9)$$

Dieser Eingangsfiler des GA für die Daten zur Generierung der nachfolgenden Generation war in GAME.opt nicht implementiert und musste daher manuell durchgeführt werden. Das Ziel dieser Maßnahme war eine Forcierung der Optimierung in Richtung eines hohen  $ee_{S-CHBE}$ .

## 5 Automatisierung von Parallelbioreaktoren

Die gestiegenen Anforderungen an die schnelle und effektive Datengewinnung zur Prozessentwicklung und -optimierung können mit herkömmlichen Rührkesselbioreaktoren auf Grund des hohen Aufwands nur schwer befriedigt werden. Die Parallelisierung und Automatisierung der notwendigen experimentellen Untersuchungen ist daher wünschenswert. Zwar ist es möglich mehrere Rührkesselreaktoren parallel zu betreiben, es gibt dabei jedoch kaum Einsparungspotential und Synergieeffekte. So steigt der personelle und materielle Einsatz direkt mit der Anzahl an Reaktoren und ist ab einer gewissen Anzahl nicht mehr handhabbar. Erst ein paralleles automatisiertes System versetzt den Nutzer in die Lage mit nur gering gestiegenem Aufwand effektiv im Parallelansatz zu arbeiten. Daher wurden neue Technologien für dieses Anwendungsfeld entwickelt.

In einer vorangegangenen Arbeit (Puskeiler, 2004) wurde ein erstes paralleles Bioreaktorsystem im Milliliter-Maßstab entwickelt. Seine grundlegende Funktionsfähigkeit war gezeigt worden und es wurde bei ersten praktischen Anwendungen eingesetzt. Für einen effizienten und zuverlässigen Einsatz als Werkzeug zur Bioprozessentwicklung im automatisierten Parallelansatz musste das Reaktorsystem jedoch weiter entwickelt und optimiert werden.

Seit der Entwicklung und Realisierung dieses ersten Prototyps des Bioreaktorblocks waren mittlerweile zusätzliche neue optische Sensoreinheiten für die quasi-kontinuierliche Messung von pH und  $pO_2$  in allen Reaktoren verfügbar. Mit deren Hilfe sollte eine effektive pH- und  $pO_2$ -Kontrolle möglich sein.

### 5.1 Optimierung des parallelen Milliliter-Bioreaktors

Die in der vorangegangenen Arbeit entwickelten Rührer vom Typ B4 zeigten im Laufe der Zeit einige Unzulänglichkeiten, die einen zuverlässigen Dauerbetrieb erschwerten. So nahm die Anzahl der während einer Kultivierung ausfallenden Rührer stetig zu. Während einer 48 Stunden dauernden Kultivierung fielen bis zu

50% der zur Verfügung stehenden Rührer aus. Das hat zur Folge, dass in den betreffenden Reaktoren kein Sauerstoffeintrag mehr erfolgt und die untersuchten Prozesse zum Erliegen kommen. Damit ist ein automatisierter Betrieb kaum möglich und die gewonnenen Daten sind nicht mehr verwertbar. Zusätzlich wurde eine starke Korrosion der Magnete und damit verbundene Freisetzung von Schwermetallionen beobachtet. Die Korrosion führt zu einer Verringerung des Magnetmaterials was die zur Verfügung stehende Magnetkraft senkt. Die Schwermetallionen können einen negativen Effekt auf die kultivierten Mikroorganismen haben.

Ein weiteres Problem stellte die starke Korrosion der Sterilgasabdeckung dar. Diese trat sowohl an der zur Umgebung offen liegenden Oberseite als auch an den mit Medium und Mikroorganismen in Kontakt kommenden Flächen auf. Insbesondere diese Korrosion ist besonders problematisch, da sie direkt während der Kultivierung auftritt und in den Reaktoren große Mengen unerwünschter Metallionen freisetzen kann.

Ein letztes Problem stellt die Tatsache dar, dass mit der direkt in die Umgebung austretenden Abluft eine große Zahl Mikroorganismen aus den Reaktoren gelangt. Dies ist in mikrobiologischen Labors der Sicherheitsstufe 1 bei Kultivierungen mit beispielsweise *E. coli* oder *Saccharomyces* noch tolerabel, bei höheren Sicherheitsstandards jedoch nicht mehr zulässig.

Als Gegenmaßnahmen zu den aufgeführten Problemen wurden die im Folgenden beschriebenen Lösungen gefunden. Sie hatten zum Ziel, einen über eine lange Zeit zuverlässigen Betrieb der Rührer zu gewährleisten, da nur so eine zuverlässige und effektive Gewinnung von Daten möglich ist. Die Sterilgasabdeckung sollte, soweit möglich vor Korrosion bewahrt, ebenso die Freisetzung von Mikroorganismen während einer Kultivierung vermieden werden.

### 5.1.1 Verlust der Magnetisierung und Korrosion der Dauermagnete

Als Ursache für den häufigen Ausfall von Rührern wurde zum einen die nachlassende Magnetisierung der Magnetkerne der Rührer ermittelt. Zum anderen zeigten die Gleitlager der Rührer einen starken Verschleiß, der einen zuverlässigen Lauf auf der Hohlachse erschwerte. Die Korrosion lag in der nicht vorhandenen Versiegelung der korrosionsempfindlichen Magnete gegenüber den chemischen Bedingungen während einer Kultivierung begründet.

- *Wahl geeigneter Magnetkerne*

Die ursprünglichen Magnete bestanden aus Neodym-Eisen-Bor (NdFeB). Ihre dauerhafte Magnetisierung, die sogenannte Remanenz  $B_r$ , beträgt bis zu 1220 mT.

Damit stellen sie die stärkste Gruppe der Dauermagnete dar. Allerdings liegt ihre maximale Einsatztemperatur bei lediglich 130°C und sie verlieren daher durch wiederholtes Autoklavieren bei 121°C im Laufe der Zeit ihre Magnetisierung. Als Lösung bot sich Samarium-Cobalt ( $\text{Sm}_2\text{Co}_{17}$ ) an. Diese Dauermagnete haben eine Remanenz  $B_r$  von 1040 mT, die maximale Betriebstemperatur liegt mit 350°C oberhalb der maximalen Einsatztemperatur von 121°C.

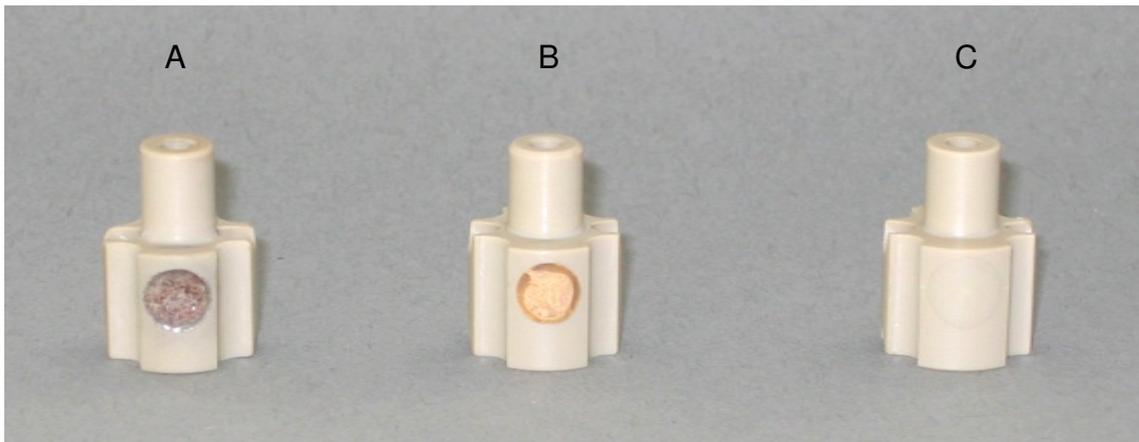
- *Verkapselung der Magnete*

Ein weiteres Problem stellte die mangelnde Kapselung der verwendeten Magnete aus den Materialien Neodym-Eisen-Bor und Samarium-Cobalt dar. Die Bestandteile der Magnete waren in den verwendeten wässrigen Lösungen nur unzureichend beständig. Es trat, besonders im Fall der Neodym-Eisen-Bor Magnete, eine nicht unerhebliche Korrosion auf. Auch die Samarium-Cobalt Magnete wiesen im Laufe der Zeit Veränderungen auf. Hinzu kommt, dass es sich bei den meisten durch Korrosion freigesetzten Bestandteilen der Magnete um Schwermetalle handelt. Diese Schwermetallionen können einen negativen Effekt auf kultivierte Mikroorganismen haben.

Das Ziel bestand daher in einer möglichst vollständigen hermetischen Verkapselung der Magnetkerne. Die Kapselung sollte bioverträglich, inert gegenüber den während des Einsatzes herrschenden chemischen und thermischen Bedingungen und mit vertretbarem Aufwand herzustellen sein.

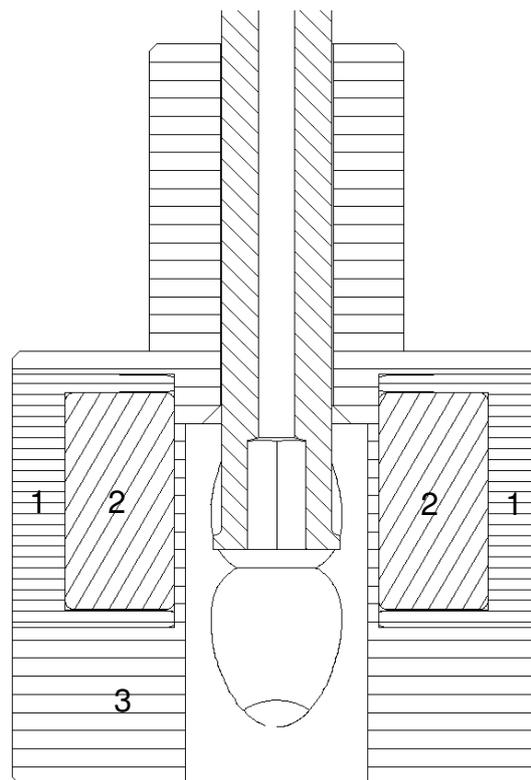
Zunächst wurde die Kapselung durch einen Verschluss der Bohrung zur Aufnahme des Magneten mit flüssigem selbstvernetzendem Silikonkleber (siehe Abbildung 5.1 A) (RS 692-542, RS Components, Mörfelden-Walldorf) und einem industriellen Zweikomponentenkleber (siehe Abbildung 5.1 B) (Scotch-Weld DP 760, 3M, Neuss) auf Epoxydharz-basis mit eingebetteten Keramikpartikeln versucht. Das Ergebnis war auf Grund der mangelnden Verbindung der Kleber mit dem Rührkörper und der Diffusion durch die Klebermaterialien nicht befriedigend.

Eine zufriedenstellende Lösung stellt eine eigens gefertigte Kappe aus PEEK zur Kapselung der Magnete dar (siehe Abbildung 5.1 C). Diese umschließt die Magnete auf einer Stirnfläche und in Umfangsrichtung und wird zusammen mit dem Magnetkern mit Hilfe einer kleinen Kniehebel-Pressen in den Rührer eingepresst. Die Fixierung und Abdichtung erfolgt auf Grund der kraftschlüssigen Verbindung (siehe Abbildung 5.2). Zur Vermeidung eines Luftpolsters, das sich durch die Erwärmung während des Autoklavierens ausdehnen könnte, werden die Kappen unter Vakuum eingesetzt.



**Abbildung 5.1: Vergleich verschiedener Lösungen zur Kapselung der Magnete**

Die Kapselung wurde mit einer Silikonmembran (A) und einer Schicht aus Epoxidharz (B) durchgeführt. Beide Methoden erwiesen sich auf Grund der weiterhin auftretenden Korrosion (dunkle Stellen) als nicht zufriedenstellend. Eine kraftschlüssig dichtende Kappe (C) isoliert den Magneten zuverlässig.



**Abbildung 5.2: Schnitt durch einen Rührer mit gekapselten Magneten**

Die Kappen (1) werden mit den Magneten (2) in den Rührkörper (3) eingepresst und umfassen die Magnete von drei Seiten.

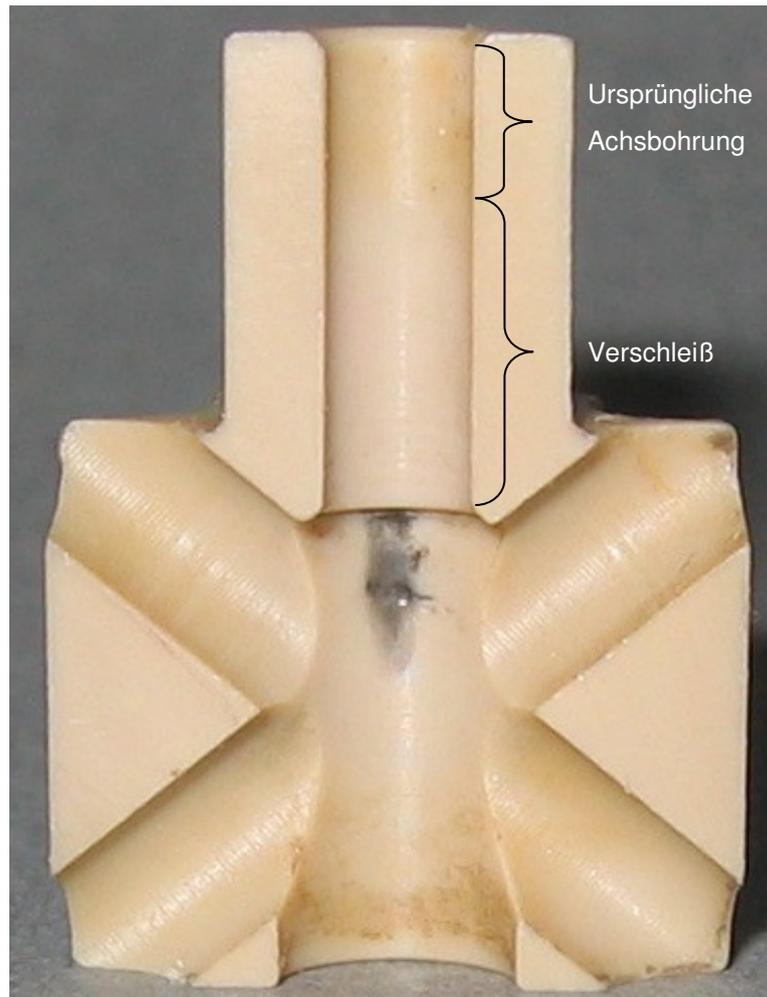
Mit diesen zusätzlichen Kappen ist es außerdem möglich die Rührkörper im Bereich der Magnetbohrungen an den allgemeinen Radius des Rührkörpers anzupassen. Die eingepressten Kappen sitzen dabei so fest in den Bohrungen, dass ein Überdrehen der Kappen problemlos möglich ist.

### 5.1.2 Verschleiß des Gleitlagers der Rührkörper

- *Einsatz einer Lagerbuchse*

Nach etwa 800 Betriebsstunden mit den zunächst eingesetzten Rührern stieg während laufender Kultivierungen die Anzahl ausgefallener Rührer zunehmend an. Bei genauerer Analyse zeigte sich, dass die Rührer ein erhebliches Spiel auf der Achse hatten und die Rührer somit mit den Strömungsbrechern der Reaktoren kollidieren konnten. Mit Hilfe eines aufgeschnittenen Rührers konnte die genaue Ursache ermittelt werden. Es zeigte sich, dass das im zylindrischen Aufsatz des Rührers integrierte Gleitlager einem starken Verschleiß unterlag. Das obere Drittel der Bohrung hatte noch seinen ursprünglichen Durchmesser, die unteren zwei Drittel waren nach unten hin kegelig erweitert (siehe Abbildung 5.3).

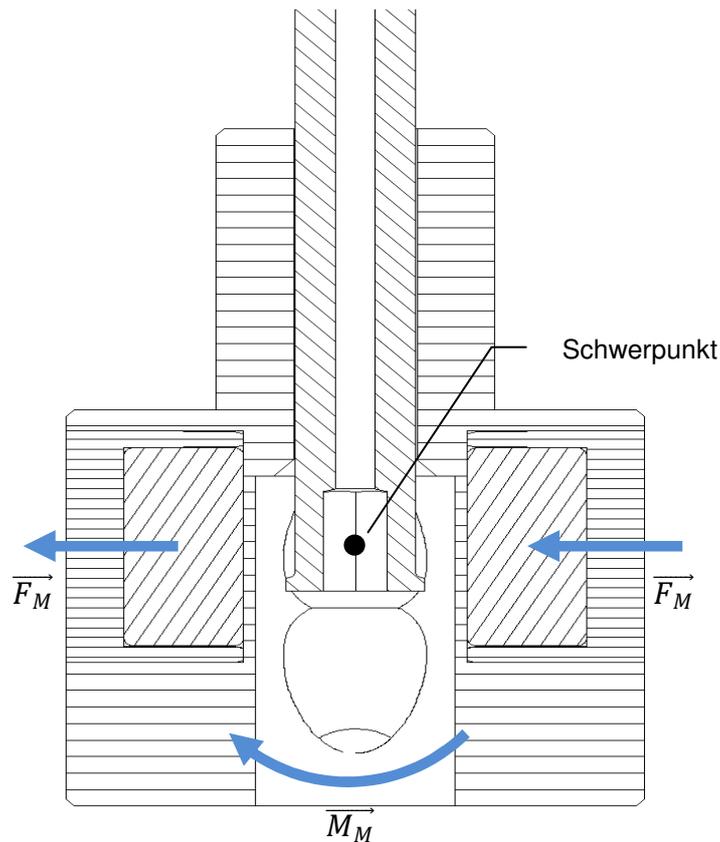
Die Ursache für den Verschleiß ist zum einen eine ungünstige Geometrie der Rührer (siehe Abbildung 5.4). Das Magnetfeld wirkt in der Achse der beiden Magnetkerne und damit genau im Schwerpunkt des Rührers. Dieser liegt jedoch unterhalb der Achsbohrung und damit der Lagerung. Damit wirkt auf die Achsaufnahme ein ständiges Moment. Zusätzlich erfolgt die Kraftübertragung durch das äußere rotierende induktive Magnetfeld nicht kontinuierlich sondern auf Grund der Rechteckspannung des Antriebs (siehe 4.1.1) gepulst.



**Abbildung 5.3: Verschleißbild eines Rührers nach 1000 Betriebsstunden**

Das obere Drittel der Achsbohrung ist nahezu unverändert und weist lediglich Verschleißspuren in Umfangsrichtung auf. Die restliche Bohrung ist dagegen kegelig aufgeweitet. Der Durchmesser am unteren Ende hat sich um fast 0,4 mm vergrößert.

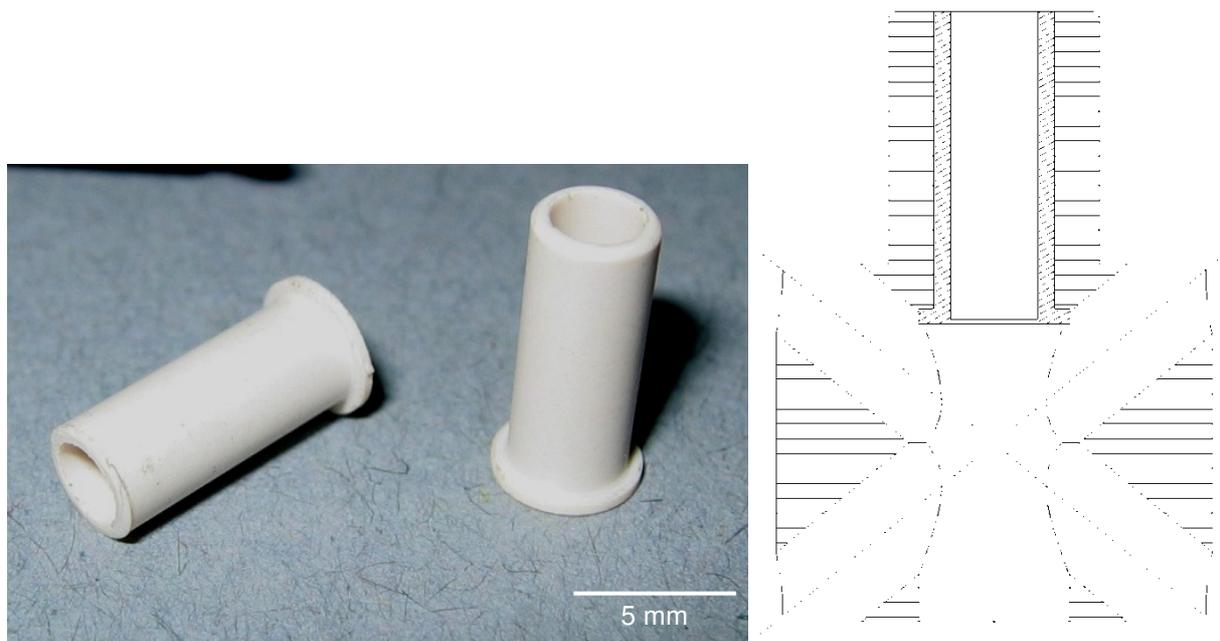
Zusätzlich hat sich das Material der Rührorgane als ungeeignet für diese Art der Lagerung herausgestellt. Zwar findet PEEK als Lagermaterial in speziellen Fällen Verwendung, es ist jedoch eher für den Trockenlauf geeignet. Erschwerend kommt hinzu, dass viele Medien einen gewissen Anteil an Feststoffen, beispielsweise in Form von ungelösten Salzkristallen, haben. Diese gelangen in den Lagerspalt zwischen dem Achslager und der Achse und wirken auf Grund der Bewegung des Rührers abrasiv.



**Abbildung 5.4: Schnitt durch einen Rührer mit Magneten und Achse**

Die gleitende Lagerung des Rührers befindet sich oberhalb des Schwerpunktes des Rührers und der dort ansetzenden Kraft  $\vec{F}_M$  des magnetisch-induktiven Antriebs. Daraus resultiert ein bei der Rotation des Rührers wirkendes Drehmoment  $\vec{M}_M$ .

Als Lösung des Problems bot sich der Einsatz einer expliziten Lagerbuchse aus einem geeigneten nicht abrasiven Material an. Mit einem Verbundwerkstoff (ZEDEX<sup>®</sup> ZX-530, Wolf Kunststoff-Gleitlager GmbH, Kerpen-Türnich, Deutschland) wurde ein den Anforderungen genügender Lagerwerkstoff gefunden. Er ist weitgehend chemikalienbeständig, dampfsterilisierbar und verfügt eine FDA-Zulassung. Seine hervorragenden Gleiteigenschaften ergeben sich aus der Kombination von Polytetrafluorethylen PTFE mit Nano-Keramikpartikeln. Er vereinigt die guten Gleiteigenschaften des PTFE mit einer weit höheren Festigkeit der Keramik bei beinahe nicht mehr vorhandener Fließneigung.



**Abbildung 5.5: Lagerbuchsen aus ZEDEX-530® zum Einpressen in Rührkörper und Schnitt durch einen Rührer mit Lagerbuchse**

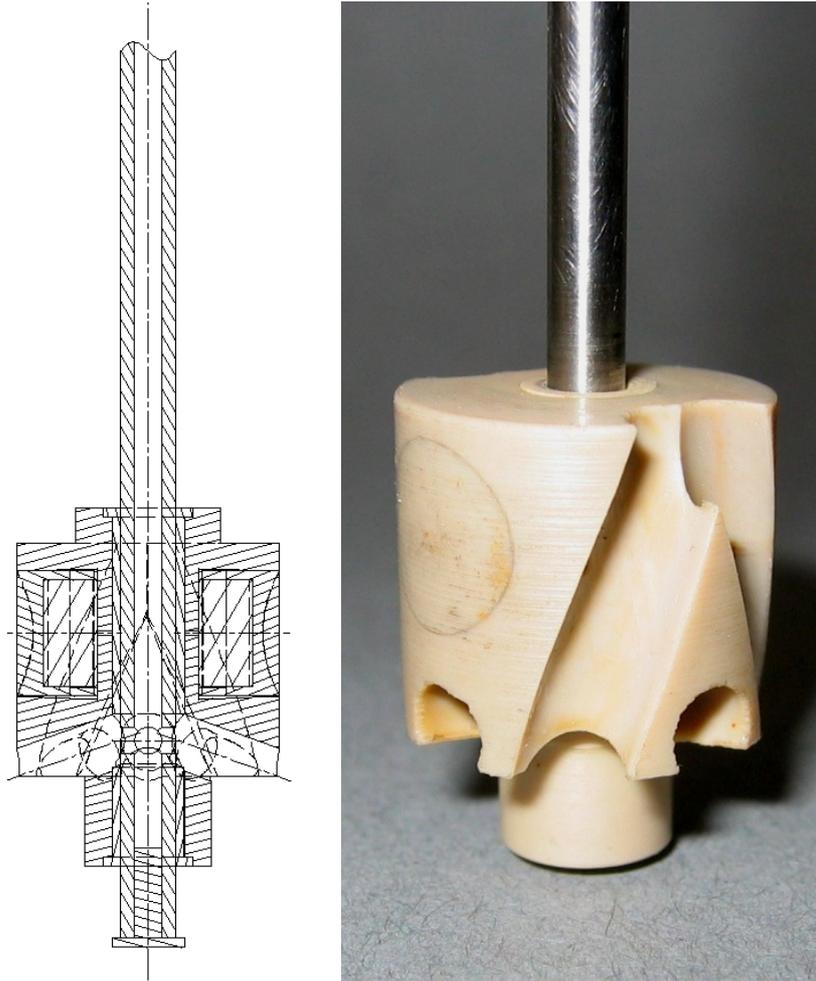
Die Lagerbuchsen haben eine Wandstärke von 0,5 mm und werden von unten in die Aufnahmebohrung des zylindrischen Aufsatzes des Rührers eingepresst. Der kleine Ansatz am unteren Rand sorgt dabei für einen definierten Sitz beim einpressen.

Die mit diesen Gleitlagern ausgerüsteten Rührer konnten nach dem Einbau ohne Beeinträchtigung über mindestens 2500 weitere Stunden betrieben werden.

- *Neues Rührerdesign*

Der Einsatz einer expliziten Laufbuchse mindert lediglich den Verschleiß des Rührers, behebt allerdings nicht das Problem der einseitigen Lagerung, das sich als die hauptsächliche Ursache dafür herausstellte. Von dieser Problemstellung ausgehend und auf den Erfahrungen mit den bekannten Rühren basierend wurde ein neues Rührorgan entwickelt.

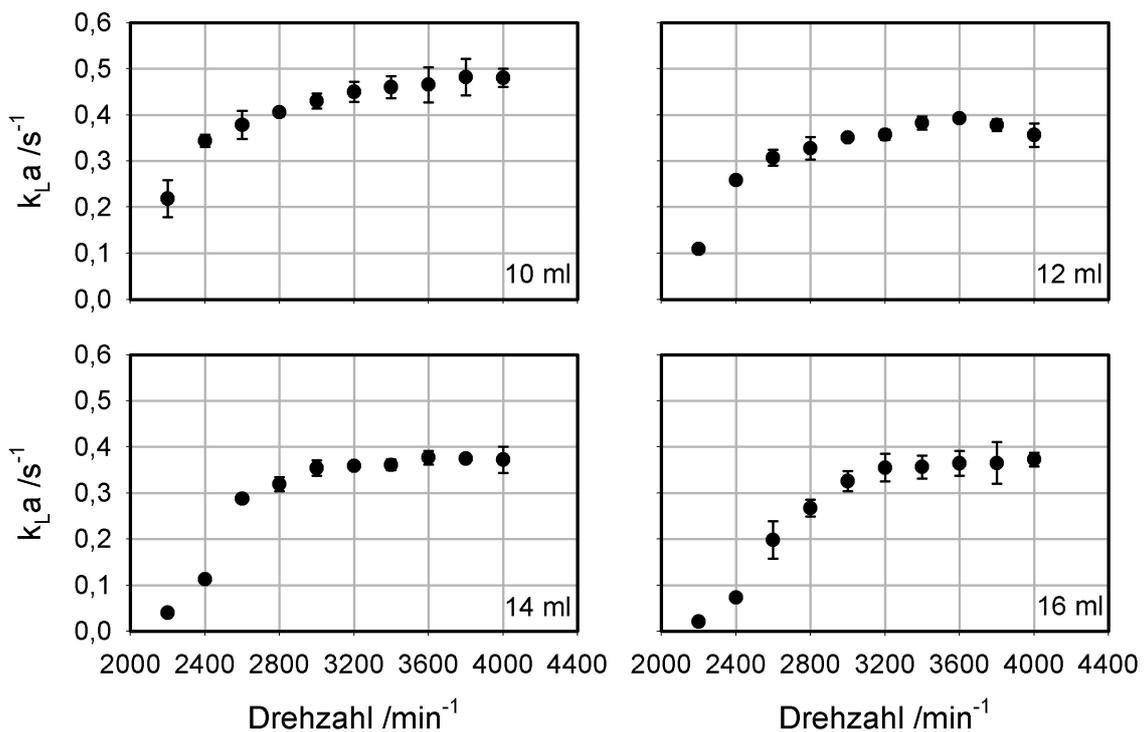
Die wichtigste Neuerung des neu entwickelten Rührers besteht in der definierten zweiseitigen Lagerung. Dadurch wird ein zuverlässiger Betrieb über eine lange Zeit gewährleistet. Ein erster Prototyp aus PEEK konnte über einen Zeitraum von über 1000 Stunden kontinuierlich bei  $2000 \text{ U min}^{-1}$  betrieben werden ohne die sonst üblichen Verschleißerscheinungen zu zeigen. Des Weiteren sind die äußeren Nuten schräg angeordnet. Das bewirkt eine Förderung von Fluid nach oben beziehungsweise nach unten und führt zu einer intensiven Durchmischung des Reaktors.



**Abbildung 5.6: Schnitt und Darstellung des verbesserten neuen Rührertyps**

Der neu entwickelte Rührer ist zweifach gelagert und verfügt nur noch am unteren Ende über Gasauslassöffnungen. Im Betrieb wird der Rührer entlang der Achse etwas angehoben und legt dadurch die Querbohrungen in der Achse frei. Die außen liegenden schräg verlaufenden Nuten erhöhen den Energieeintrag und verbessern die Durchmischung des Zweiphasengemisches.

Die Bestimmung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten  $k_{La}$  wurde bei 10, 12, 14 und 16 ml Füllvolumen und Drehzahlen von 2200 – 4000 U min<sup>-1</sup> durchgeführt und erbrachte das in Abbildung 5.7 gezeigte Ergebnis.



**Abbildung 5.7:** volumetrischer Stoffübergangskoeffizient  $k_{L,a}$  des neuen Rührertyps bei verschiedenen Drehzahlen und Volumina

Bei einem Arbeitsvolumen von 10 ml kann ein  $k_{L,a}$  von bis zu  $0,48 \text{ s}^{-1}$  bei  $4000 \text{ U min}^{-1}$  erreicht werden. Bei den Volumina 12, 14 und 16 ml sind  $k_{L,a}$  bis etwa  $0,37 \text{ s}^{-1}$  bei Drehzahlen ab etwa  $3400 \text{ U min}^{-1}$  möglich.

Der neue Rührer erreicht einen maximalen  $k_{L,a}$  von  $0,48 \text{ s}^{-1}$  in 10 ml Arbeitsvolumen bei einer Drehzahl von  $4000 \text{ U min}^{-1}$ . Bei größeren Volumina sind  $k_{L,a}$  bis etwa  $0,37 \text{ s}^{-1}$  ab einer Drehzahl von etwa  $3400 \text{ U min}^{-1}$  möglich.

Zusätzlich ist die Gaseintragsleistung dieses Rührers nur noch in geringem Maße von seinem Abstand zum Reaktorboden abhängig. Im Gegensatz zum alten Modell benötigt er keinen definierten Abstand zum Boden (Puskeiler, 2004), da er nicht über eine zentrale Ansaugöffnung am unteren Ende verfügt. Der neu entwickelte Rührer saugt keine flüssige Phase mehr an, der Kontakt von angesaugter Gasphase und Medium findet erst außerhalb des Rührorgans statt. Dadurch besteht ein weiterer Vorteil. Unter bestimmten Umständen kam es bei Kultivierungen mit dem alten Rührer zum Verstopfen der Hohlachse und in der Folge zum Abbruch des Gaseintrags und damit der Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen. Besonders häufig trat dies bei einem maßstabsverkleinerten industriellen Prozess zur mikrobiellen Produktion von Riboflavin auf (Knorr, 2005). Die Verstopfung wurde im vorliegenden Fall durch Kristalle des während des Prozesses gebildeten, schlecht wasserlöslichen Riboflavins sowie Medienbestandteile verursacht. Wahrscheinlich kam es während des Prozesses immer wieder dazu, dass von unten durch die

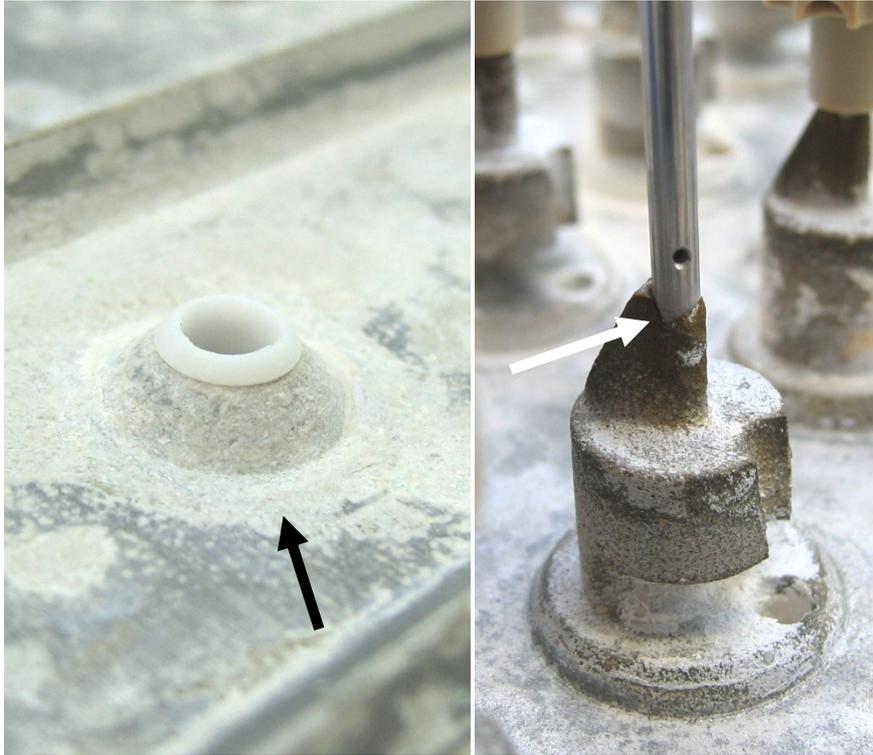
Ansaugöffnung angesaugtes Medium mit Riboflavinkristallen in die Hohlachse gelangte. Dort haftete die Flüssigkeit an der Innenseite der Achse und trocknete im Strom des angesaugten Gases wodurch der Querschnitt verengt wurde. Durch mehrfaches Auftreten des Ereignisses kam es dann zum vollständigen Verschluss der Achse. Der neu entwickelte Rührer kann dieses Verhalten nicht zeigen. Im Betrieb wird jegliche Flüssigkeit durch die Zentrifugalkräfte am Eindringen gehindert, eine zentrale Ansaugöffnung existiert nicht. Im Stillstand senkt sich der Rührer ohne das äußere Magnetfeld etwas ab wodurch die Querbohrungen in der Hohlachse durch die obere Laufbuchse verschlossen werden.

### 5.1.3 Optimierung der Sterilgasabdeckung

Die bisher verwendete Sterilgasabdeckung wurde aus Aluminium gefertigt. In jeden Verdrängungskörper der Sterilgasabdeckung ist eine Achse aus Edelstahl 1.4571 geschraubt. Während des regulären Betriebs zeigten sich starke Korrosionserscheinungen an der Oberseite der Abdeckung, den Verdrängungskörpern und insbesondere an den Achsaufnahmen. Dabei war sowohl der obere Rand der Gewindebohrung stark angegriffen als auch sehr viel korrodiertes Material nach dem Herausschrauben in den Gewindegängen der Achsen zu finden. In einzelnen Fällen war die Gewindetiefe der Innengewinde in den Verdrängungskörpern um bis zu 2/3 reduziert. Dadurch ist die sichere Befestigung der Hohlachsen in den Verdrängungskörpern der Sterilgasabdeckung nicht länger gewährleistet.

Das Problem lag nun zum einen in der mangelnden Korrosionsbeständigkeit des Aluminiums und zum anderen in der Materialkombination Edelstahl und Aluminium. Aluminium ist besonders bei einem pH größer 7 nicht beständig und unterliegt korrosiven Angriffen. Zwar finden viele Kultivierungen von Mikroorganismen bei einem pH < 7 statt, jedoch kann der pH bei unregelmäßigen Kultivierungen ohne Weiteres über pH 7 steigen. Daneben werden oft mehr oder weniger starke Basen als Titrationsmittel zur pH-Regelung eingesetzt.

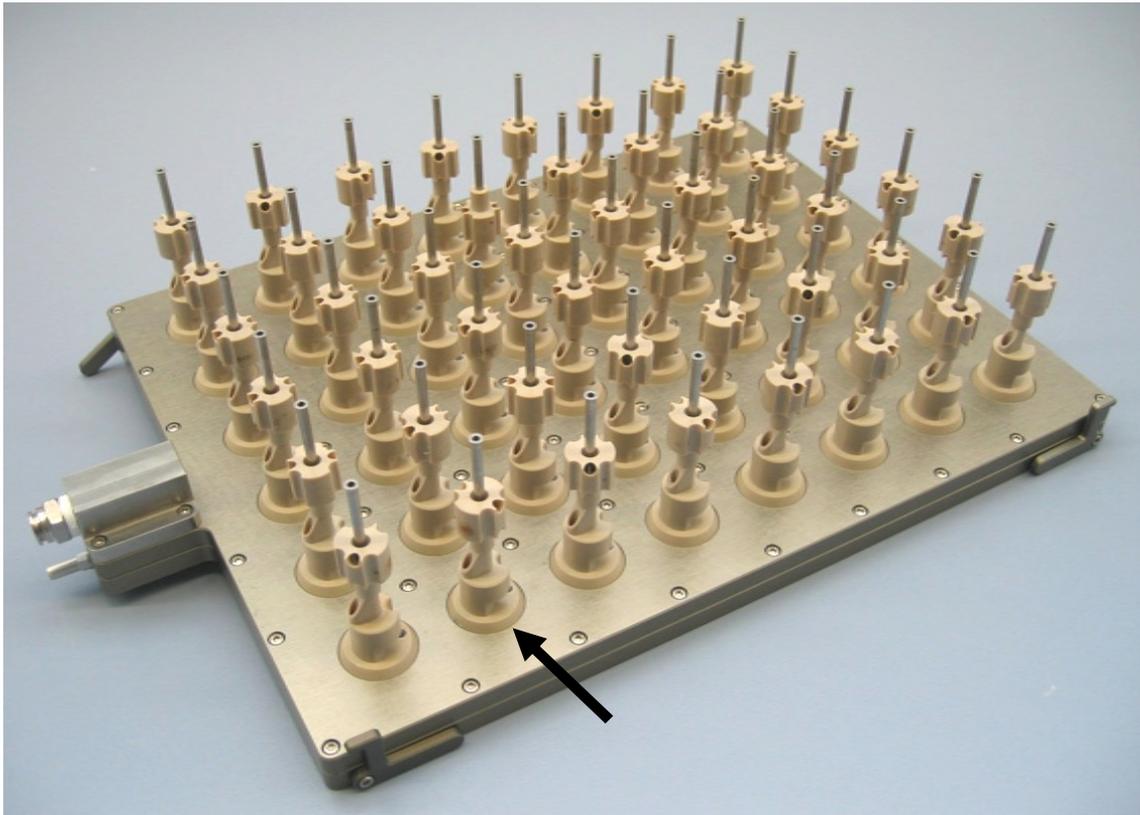
Zudem kommt es durch die Kombination aus einem nur teilweise benetztem Aluminium-Verdrängungskörper und einer damit direkt verschraubten vollständig benetzten Edelstahllachse zur Ausbildung eines Kontaktelements. Dies führt dann zur Bimetallkorrosion, in deren Folge das Aluminium verstärkt angegriffen wird (Spähn und Fäßler, 1966).



**Abbildung 5.8: Korrosionsbilder der Aluminium-Sterilgasabdeckung**  
Die Reaktorauslässe sind auf Grund herabgetropften Titrationsmittels stark korrodiert. Um die Kegel hat sich teilweise eine Rinne gebildet. Die Korrosion an der Achsaufnahme ist bereits soweit fortgeschritten, dass die Passung am unteren Ende beinahe nicht mehr vorhanden ist und der erste Gewindegang teilweise frei liegt.

Zur Behebung des Problems der korrodierten Verdrängungskörper wurde die Sterilgasabdeckung vollständig neu konstruiert. Dabei wurde das in die Reaktoren eingebrachte Metall auf die aus Edelstahl gefertigte Hohlachse beschränkt. Es gibt keinen direkten Kontakt mehr zwischen dem Reaktorinneren und der Aluminiumoberfläche der Sterilgasabdeckung. Auch die Auslassbohrung der Reaktoren ist mit einer PTFE-Hülse verkleidet.

Die bisherigen Verdrängungskörper der alten Sterilgasabdeckung wurden aus dem vollen Material gefräst. In der neuen Version wurden sie als Drehteil aus PEEK gefertigt und dann mit der weiterhin aus Aluminium gefertigten Basisplatte verbunden. Ebenso wurde die Achse nicht mehr geschraubt sondern mit einem Steckmechanismus versehen. Das hat den zusätzlichen Vorteil, dass die Achsen leichter zu reinigen sind, auch werden durch den Wegfall der Gewinde Toträume minimiert.

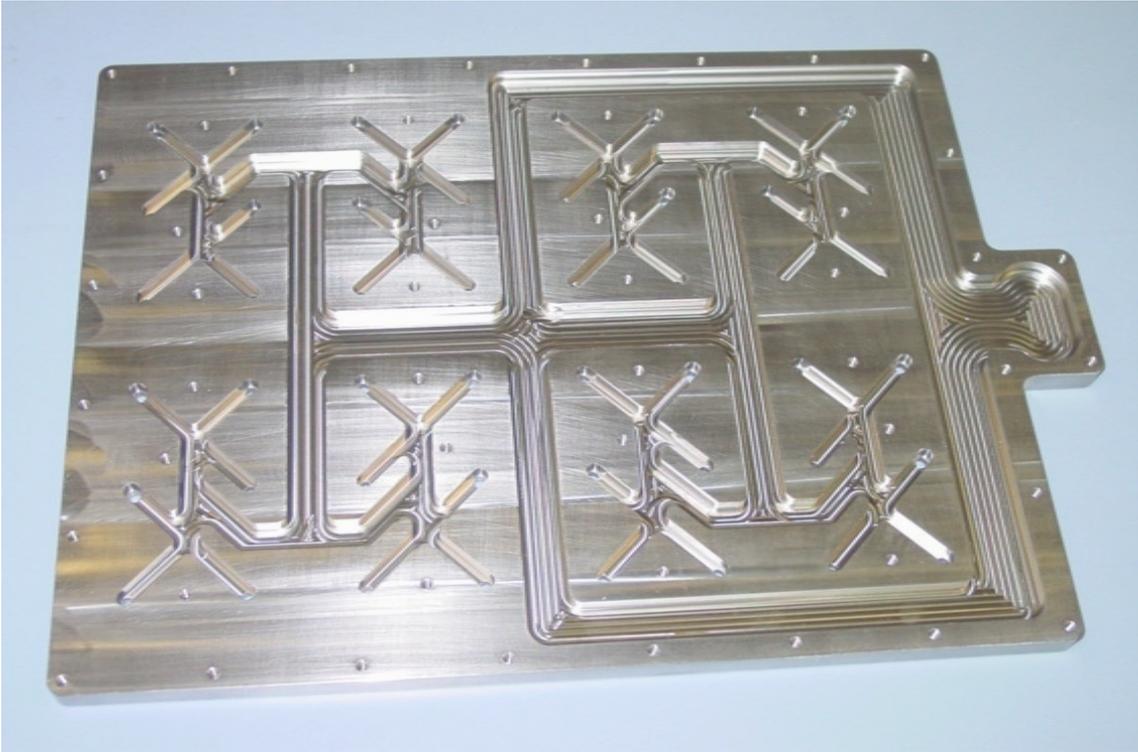


**Abbildung 5.9: Neu gestaltete Sterilgasabdeckung mit PEEK Einsätzen**  
Die bisher aus dem vollen Material gefrästen Verdrängungskörper wurden durch Kunststoffeinsätze ersetzt.

#### 5.1.4 Absaugung der Reaktorabluft

Ein weiteres großes Problem des Parallelbioreaktors stellt seine im Betrieb hohe Aerosolbildung dar. Das eingesetzte Rührorgan erzeugt einen für den Sauerstoffeintrag gewünschten hohen Gaseintrag. Das führt in der Folge, verursacht durch die an der Flüssigkeitsoberfläche in großer Zahl zerplatzenden Gasblasen, zu einer hohen Flüssigkeitsbeladung der Gasphase im Kopfraum. Auf Grund des für eine ausreichende Sauerstoffversorgung notwendigen ständigen Spülens des Kopfraumes mit sterilem Gas wird das eine große Anzahl Mikroorganismen enthaltende Aerosol fortwährend ausgetragen. In Laboren, die nach dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (GenTG) für mikrobielle Arbeiten nach den Bedingungen der Sicherheitsstufe S1 zugelassen sind, soll austretendes, mit Mikroorganismen beladenes Aerosol vermieden werden. Bei höheren Sicherheitsstufen ist eine Aerosolbildung in keiner Weise gestattet.

Als Abhilfe wurde eine Vorrichtung zur individuellen Absaugung der Reaktorabluft konstruiert und gefertigt (Abbildung 5.10).

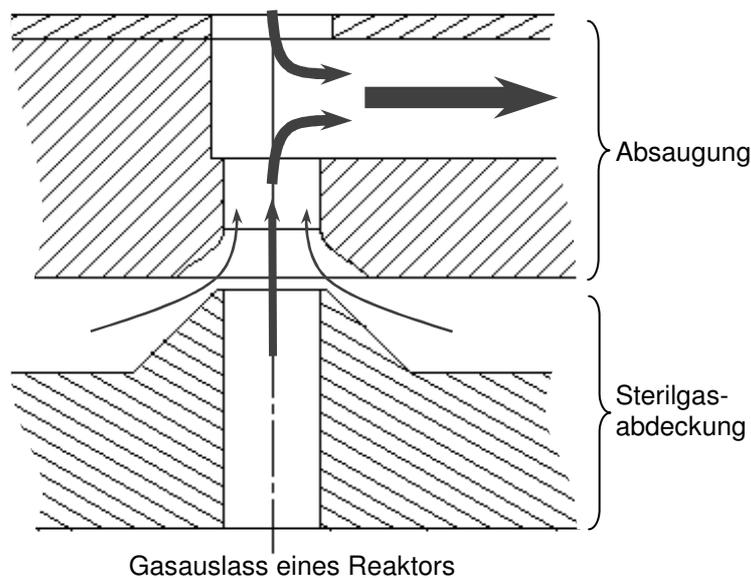


**Abbildung 5.10: Vorrichtung zur individuellen Absaugung der Reaktorabluft**

**Der Weg vom Reaktorauslass (unterhalb der Platte) zum zentralen Anschluss der Vakuumversorgung ist für alle Reaktoren gleich lang. Die obere Abdeckplatte mit den Durchgangsbohrungen ist auf der Abbildung noch nicht montiert.**

Die Absaugvorrichtung zieht die Abluft direkt am Auslass eines jeden Reaktors ab (Abbildung 5.11). Der Weg zwischen den Absaugstellen und dem zentralen Anschluss der externen Absaugung ist für alle Reaktoren gleich lang. Dadurch werden Druckunterschiede weitestgehend vermieden. Um weiterhin den Zugang zu den Reaktoren zu ermöglichen wurden Durchgangsbohrungen angebracht.

Die zentrale Absaugung wurde so ausgelegt, dass pro Reaktor mindestens der doppelte Gasvolumenstrom der Reaktorabluft abgezogen wird. Da die untere Bohrung zum Reaktor hin und die obere Einlassbohrung den gleichen Durchmesser haben, sollte jeweils die Hälfte des Volumenstroms oben und unten abgesaugt werden. Der gesamte Abluftvolumenstrom wird zur Abscheidung mitgeführter Flüssigkeitströpfchen durch eine Flüssigkeitsfalle geleitet. Ein anschließend in der Leitung sitzender Sterilfilter hält die Mikroorganismen zurück. Die gesamte Vorrichtung kann zur Sterilisierung autoklaviert werden.



**Abbildung 5.11: Schnitt durch eine Absaugposition der Absaugvorrichtung mit den entsprechenden Volumenströmen**

Die Vorrichtung zur Absaugung der Abluft der Reaktoren verfügt je Absaugposition über eine reaktor- und roboterseitige Bohrung. Der insgesamt abgesaugte Volumenstrom ist so groß, dass an jeder Bohrung mehr Gas abgesaugt wird als den Reaktor verlässt. Dadurch wird der Austritt von Reaktorabluft verhindert.

Die Abluft der Reaktoren ist mit einer großen Menge Flüssigkeit beladen. Diese schlägt sich an der Wandung der Auslassbohrung der Sterilgasabdeckung und in der Absaugvorrichtung nieder und kann so in die Reaktoren zurück tropfen. Zur Vermeidung dieses ungewollten Vorgangs ist die reaktorseitige Bohrung der Absaugung trichterförmig erweitert. Der Übergang von der Bohrung zur Erweiterung hin ist gleitend ausgeführt um eine Abrisskante, an der sich Tropfen lösen können, zu vermeiden. Diese Kante befindet sich erst weiter außen, außerhalb der Auslassbohrung. Dort können die Tropfen gefahrlos neben den Kegel der Auslassbohrung fallen.

Daneben dient die Absaugvorrichtung als Schutz der empfindlichen Sterilgasabdeckung. Diese kann aus fertigungstechnischen und wirtschaftlichen Gründen nur sehr schwer aus dem eigentlich bevorzugten Werkstoff Edelstahl gefertigt werden. Ein sehr wichtiges Kriterium der Sterilgasabdeckung ist ihre unbedingte Planarität. Diese kann Edelstahl oder auch Kunststoff nicht bieten, sondern ist nur beim Aluminium verhältnismäßig kostengünstig verfügbar. Die Oberseite der Sterilgasabdeckung aus Aluminium ist während des Einsatzes ohne Absaugung der Korrosion z.B. durch Basen zur pH-Titration ausgesetzt. Eine

Absaugung, die mit vertretbarem Aufwand aus Edelstahl gefertigt werden kann, ist unempfindlich gegenüber den auftretenden Beanspruchungen und stellt somit einen wirkungsvollen Schutz der wertvollen Sterilgasabdeckung dar.

### 5.1.5 Diskussion

- *Optimierung der Rührkörper*

Der Austausch der Magnete ist für einen zuverlässigen Betrieb über lange Zeit sicherlich notwendig. Allerdings wird die Stabilität gegenüber thermischer Beanspruchung der Dauermagnete auf Grund der etwas geringeren Remanenz der  $\text{Sm}_2\text{Co}_{17}$ -Magnete und damit im Vergleich zu den alten NdFeB-Magneten verringerten Energieübertragung mit einer etwas höheren Ausfallwahrscheinlichkeit erkaufte. Die neuen Samarium-Cobalt-Magnete beheben nicht das Problem der Korrosion und Freisetzung von Schwermetallionen. Sie sind zwar mit einem schützenden Nickelüberzug versehen, dieser stellt aber nur einen geringen Korrosionsschutz dar.

Die Kapselung der Magnete mittels einer PEEK-Kappe hat sich in der Praxis bewährt. Allerdings ist der Erfolg sehr stark von der Fertigungsqualität der Kappe und der Sorgfalt bei der Verkapselung abhängig. Die Kappe hat, im Vergleich zur Aufnahmebohrung im Rührkörper, nur geringes Übermaß. Umso mehr machen sich dadurch zu großzügige Toleranzen bemerkbar und korrosive Medien können unter Umständen eindringen. Ebenso könnte eine zu große Kappe zu Spannungen und in der Folge zur Verformung des Rührkörpers führen.

Das gleiche gilt auch für die Laufbuchse aus ZEDEX-530<sup>®</sup>. Diese muss zwar fest im Schaft des Rührers sitzen, darf jedoch ebenfalls keine Spannungen verursachen. Dadurch könnte der eigentlich notwendige freie Querschnitt der Achsbohrung verringert werden und der Rührer damit blockieren. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob nicht der gesamte Rührer aus ZEDEX-530<sup>®</sup> gefertigt werden könnte. Das Material hat einerseits die positiven Eigenschaften des PTFE und ist andererseits ein guter Lagerwerkstoff. Dadurch könnten sich jedoch neue Probleme ergeben. Eine Zerteilung von Rührer und eigentlicher Laufbuchse bringt den Vorteil der Austauschbarkeit des verschlissenen Lagers, bei einem homogenen Rührer ist das nicht gegeben. Außerdem ist die Funktionsfähigkeit und Langzeitstabilität des Gaseintrags nur für einen Rührkörper aus PEEK gezeigt. Für einen Rührer aus einem anderen Material müsste das erst noch gezeigt werden.

Eine veränderte Rührergeometrie mit doppelter Lagerung behebt die generelle Ursache des Verschleißes eines einseitigen Gleitlagers. Die im Vergleich zum alten

Rührer verbesserte Sauerstoffeintragsleistung ist dabei ein positiver Nebeneffekt. Der bisher verwendete Rührer von Typ B4 erreichte bei einem Volumen von 10 – 12 ml und einer Drehzahl von  $3400 \text{ U min}^{-1}$  zwar ebenfalls einen  $k_{La}$  von bis zu  $0,4 \text{ s}^{-1}$  (Puskeiler, 2004), jedoch bei einer stärkeren Abhängigkeit vom Füllvolumen und den geometrischen Verhältnissen des Rührers und Reaktors. Insbesondere die Messung des neuen Rührers in 10 ml zeigt bemerkenswert hohe Werte. Hierbei wurden  $k_{La}$  von bis zu  $0,48 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Die generell höhere Sauerstoffeintragsleistung bei diesem Volumen im Vergleich zu größeren Volumina wird durch einen zusätzlichen Sauerstoffeintrag durch die Oberflächenbegasung verursacht. Bei 10 ml Volumen sitzt der Rührer nur knapp unter dem Flüssigkeitsspiegel und es zeigt sich ab einer Drehzahl von etwa  $2000 \text{ U min}^{-1}$  eine zunehmend stärker werdende Bewegung der Oberfläche. Diese führt zu einem erhöhten Anteil der Oberflächenbegasung im Vergleich zur sonst vorherrschenden Volumenbegasung. Generell ist jedoch die Bestimmung derart hoher  $k_{La}$  mittels der dynamischen Sulfit-Methode problematisch. Es können nur  $k_{La}$ , die im Bereich  $t_E^{-1}$  liegen zuverlässig bestimmt werden, Werte, die darüber liegen werden zumeist zu niedrig bestimmt (Linek *et al.*, 1987). Bei einer minimalen gemessenen Ansprechzeit der verwendeten Optode von 2,5 s ergibt sich ein maximal messbarer  $k_{La}$  von  $0,4 \text{ s}^{-1}$ , der hier bestimmte maximale  $k_{La}$  liegt mit  $4,8 \text{ s}^{-1}$  darüber. Die reguläre gemessene Ansprechzeit  $t_E$  lag jedoch bei etwa 2,9 s, daraus ergibt sich ein maximaler  $k_{La}$  von  $0,34 \text{ s}^{-1}$ . Es ist daher anzunehmen, dass die volumetrischen Stofftransferraten  $k_{La}$  bei hohen Drehzahlen unterschätzt wurden und die tatsächlichen Werte darüber lagen.

Ein weiteres Problem des alten Rührers stellt die Neigung zum Verstopfen der Hohlachse dar. Beim neu entwickelten Rührer ist diese Problematik behoben. Der Kontakt zwischen flüssiger und gasförmiger Phase findet außerhalb des Rührers statt. Sowohl im Stillstand als auch während des Betriebs gelangt kein Medium in den Rührer und die beschriebenen Auswirkungen bleiben aus.

- *Optimierung der Sterilgasabdeckung*

Der direkte Kontakt zwischen dem Aluminium der Sterilgasabdeckung und dem Medium in den Reaktoren in Kombination mit der Edelstahlachse führte zu dem massiven Problem der Korrosion. Die konstruktive Änderung der Sterilgasabdeckung und die Einführung von Verdrängungskörpern aus PEEK beheben das Problem der Korrosion an dieser Stelle nachhaltig. Die verwendete Hohlachse aus Edelstahl ist der einzige metallische Werkstoff, der noch direkt mit dem Medium in Berührung kommt. Das Problem der durch basische pH-Korrekturmittel verursachten Korrosion der Oberfläche konnte bisher nicht direkt gelöst werden. Der vollständige Ersatz des Aluminiums durch einen beständigeren Baustoff war aus konstruktiven und

ökonomischen Gründen nicht möglich. Zum einen ist der eigentlich zu bevorzugende Edelstahl als Material und in der Bearbeitung zu teuer. Zum anderen können bisher nur mit dem verwendeten Aluminium die Ansprüche an die Planarität und Parallelität der fertigen Sterilgasabdeckung befriedigt werden.

- *Absaugung der Reaktorabluft*

Ein weiteres Problem des Bioreaktorblocks stellt seine hohe Aerosolbildung dar. Im Betrieb wird, verursacht durch den effizienten Rührkörper und die Spülung des Kopfraumes, eine Vielzahl an Mikroorganismen ausgetragen. Als Gegenmaßnahme wurde eine Vorrichtung zur Absaugung entworfen. Diese ist in der Lage, an jedem Reaktor die Abluft lokal abzusaugen. Dadurch wird die Freisetzung von Mikroorganismen effektiv vermieden.

Als Nebeneffekt schützt die Absaugung die wertvolle und empfindliche aus Aluminium gefertigte Sterilgasabdeckung. Die Absaugung kann aus Edelstahl gefertigt werden und ist daher unempfindlich gegenüber den verwendeten pH-Korrekturmitteln.

## 5.2 Kontrolle des Sauerstoffpartialdrucks

Bei der Mehrzahl aller Kultivierungen zur mikrobiellen Produktion von Stoffen handelt es sich um aerobe Prozesse. Das bedeutet, dass der nur begrenzt in das Medium einzubringende Sauerstoff ein limitiertes Substrat darstellt. Das wiederum hat zur Folge, dass die Mikroorganismen in Abhängigkeit vom herrschenden Sauerstoffpartialdruck  $pO_2$  ihren Metabolismus von Sauerstoffatmung auf Gärung umschalten. Dieses Verhalten ist unerwünscht, da die Zellerträge und zumeist auch der Produktertrag darunter massiv leiden. Daher ist eine Kontrolle des Sauerstoffpartialdrucks notwendig.

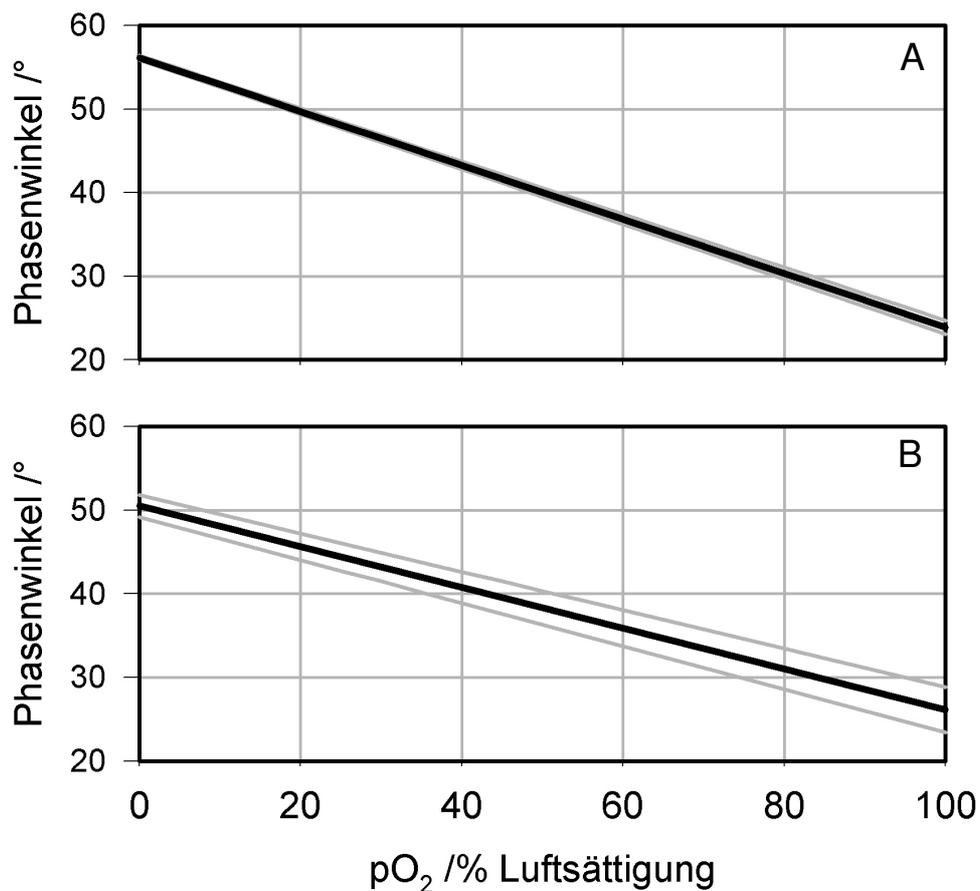
### 5.2.1 Parallele Sauerstoffpartialdruck-Messung

Die chemische Messung des Sauerstoffpartialdrucks  $pO_2$  im Medium mit optischer Auslesung während einer Kultivierung stellt eine sehr elegante Methode dar und lässt sich mit vertretbarem Aufwand parallelisieren. Die von PreSens (Regensburg) entwickelten und gefertigten Sensoreinheiten beinhalten für jeweils acht Reaktoren die Ausleseeinheiten für pH und  $pO_2$ . Für alle 48 Reaktoren werden somit sechs Einheiten benötigt. Die Messung des  $pO_2$  und pH in den Reaktoren ist mit den Sensoreinheiten in einem minimalen Zeitintervall von 15 Sekunden möglich.

Die herstellerseitigen Kalibrierwerte der  $pO_2$ -Messung wurden mit mehreren Reaktoren bestimmt und sollten daher für alle Reaktoren einer Charge Gültigkeit haben. Bei praktischen Arbeiten im Parallelansatz zeigte sich jedoch bei der Messung unter Verwendung der Herstellerdaten eine Diskrepanz zwischen einzelnen Reaktoren. Außerdem wurde ein Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Messung beobachtet.

Die hier gezeigte Charakterisierung der Einzelmessung der Sauerstoff sensitiven Sensorpunkte dient dem Vergleich mit den herstellerseitigen Kalibrierwerten und der Ermittlung einer Medienabhängigkeit der Messung. Dazu werden zwei verschiedene Lösungen als Modellmedien verwendet. Auf der einen Seite ist das ein 300 mM starker Phosphatpuffer als Substitut für definierte mineralische Medien. Auf der anderen Seite steht das auch im Rahmen der weiteren Arbeiten verwendete CSL-Medium für die große Gruppe der Komplexmedien mit einem großen Anteil an organischen Bestandteilen.

Der Zusammenhang zwischen dem  $pO_2$  der Lösung und dem gemessenen Phasenwinkel ist linear. Die Kalibrierung ist daher durch die beiden Parameter Steigung und Achsenabschnitt einer Geraden definiert. Für die Berechnung der Kalibrierung wurden für jeden Reaktor die beiden genannten Parameter bestimmt. Die Mittelwerte der Parameter legen die mittlere Kalibriergerade fest. Durch Addition beziehungsweise Subtraktion der Standardabweichungen der Parameter zu den Mittelwerten ergibt sich eine steilste und flachste Kalibriergerade, die die mittlere Kalibriergerade einschließen. Die Abbildung 5.12 zeigt das Ergebnis die der sich ergebende Kalibrierung der Sauerstoffpartialdruckmessung in beiden Medien.



**Abbildung 5.12: Kalibrierung der chemischen Sauerstoffsensoren im Milliliter-Bioreaktor**

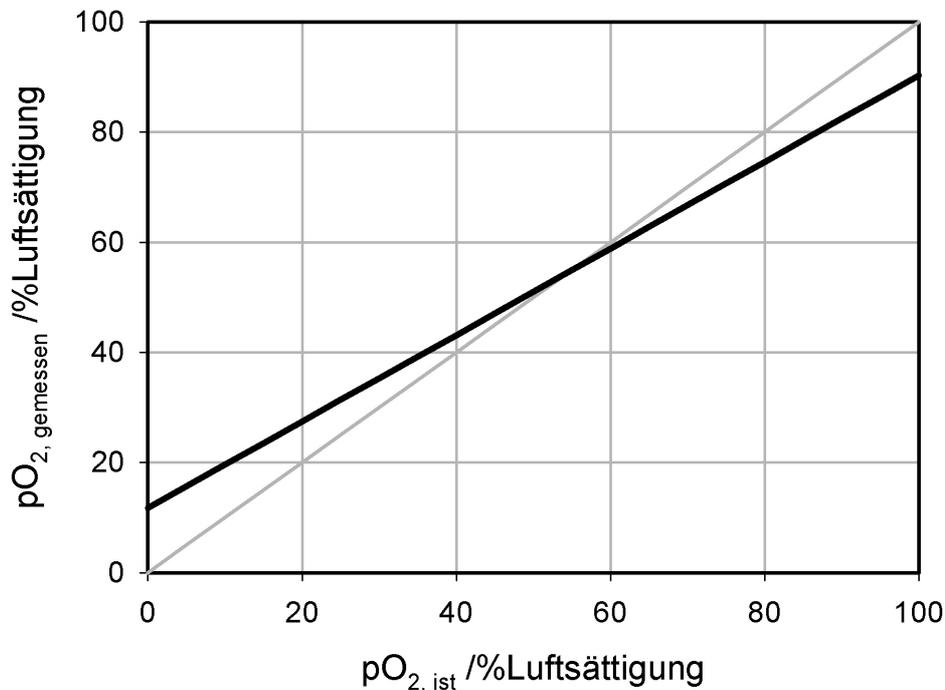
Die Messung des  $pO_2$  wurde in einem Phosphatpuffer (A) als Modell für Minimalmedium und in CSL-Medium (B) durchgeführt. Die Geraden zeigen jeweils den Mittelwert aller Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung.

Im Phosphatpuffer sinkt der gemessene Phasenwinkel von  $56,1^\circ$  bei 0%  $pO_2$  auf  $23,9^\circ$  bei 100% Sauerstoffsättigung. Der Fehler steigt im selben Bereich von  $0,5^\circ$  auf  $1,6^\circ$ . Im Komplexmedium erreicht der Phasenwinkel Werte von  $50,5^\circ$  bzw.  $26,2^\circ$  bei einer Erhöhung des Fehlers von  $2,6^\circ$  auf  $5,4^\circ$ . Die Werte sind im Vergleich zur herstellerseitigen Kalibrierung in Tabelle 5.1 nochmals zusammengefasst.

**Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Kalibrierdaten zur  $pO_2$ -Messung**

	Puffer	Komplexmedium	herst. Kalibrierung
Steigung	$-0,32 \pm 0,01$	$-0,24 \pm 0,01$	0,31
Achsenabschnitt	$56,15 \pm 0,26$	$50,50 \pm 1,30$	54,14

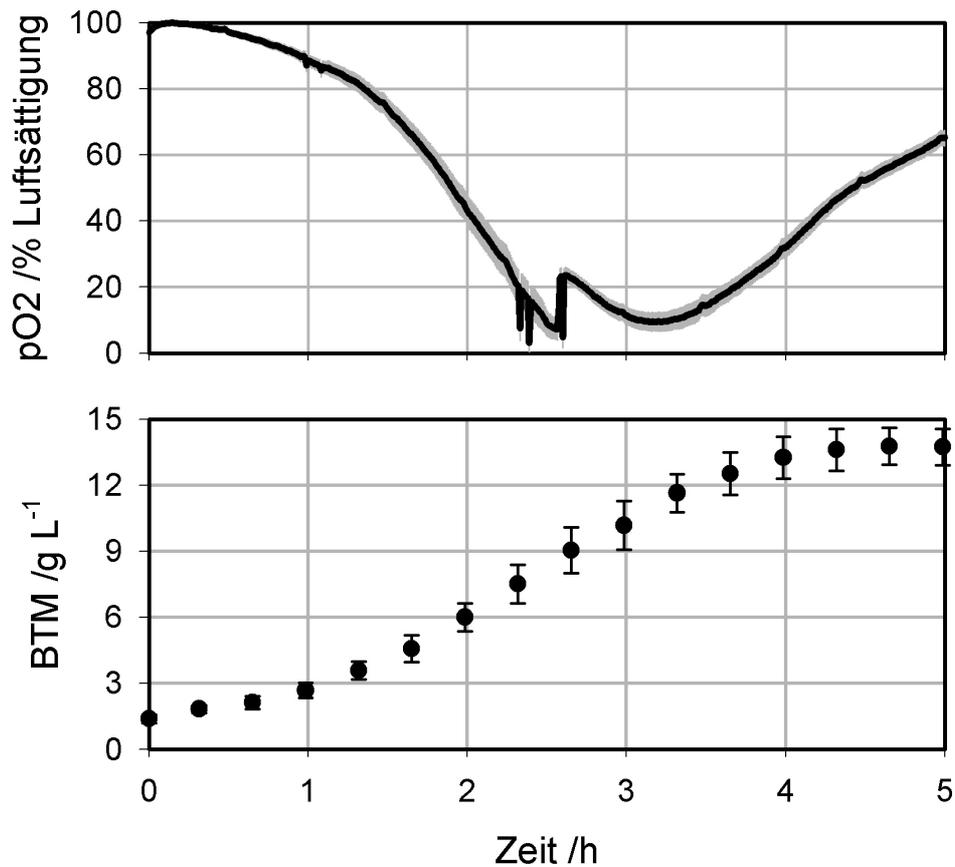
Insbesondere die  $pO_2$ -Messung in CSL-Medium ist auffällig. Die sich ergebenden Kalibrierdaten differieren im Vergleich zu den Herstellerdaten. Das wird besonders deutlich beim Vergleich des in CSL-Medium gemessenen  $pO_2$  unter Verwendung der herstellerseitigen Kalibrierung und des tatsächlich vorhandenen  $pO_2$ .



**Abbildung 5.13: Vergleich des in CSL-Medium gemessenen  $pO_2$  zum tatsächlichen  $pO_2$  bei Verwendung der herstellerseitigen Kalibrierung**

Die mittels der Herstellerdaten kalibrierte Messung überschätzt bei niedrigem  $pO_2$  den tatsächlich vorhandenen Wert. Ebenso wird der Wert bei tatsächlichem 100% unterschätzt. Nur Werte um etwa 55% werden real wiedergegeben. Das Ergebnis einer idealen Messung ist die Winkelhalbierende.

Unter optimalen Bedingungen kann mit einer sorgfältigen Kalibrierung eine sehr niedrige Reaktor-zu-Reaktor Abweichung erreicht werden. So kann, wie in Abbildung 5.14 zu sehen, bei einer parallelen Kultivierung mit *E. coli* in 48 Reaktoren unter identischen Bedingungen auch ein nahezu gleicher Verlauf des  $pO_2$  in allen Reaktoren erreicht werden. Die Kultivierung erfolgte dabei im Satzverfahren in einem Komplexmedium ohne pH-Kontrolle bei 37°C (siehe auch 4.3.3 und 4.6.3). Die anfängliche Rührerdrehzahl betrug 2800 U min<sup>-1</sup> und wurde nach 2,5 Stunden manuell auf 3000 U min<sup>-1</sup> erhöht. Während der Kultivierung wurde eine Rührerüberwachung verwendet, die beim Ausfall eines Rührers den automatischen Neustart der Rührer bewirkte.



**Abbildung 5.14:** Zeitlicher Verlauf des pO<sub>2</sub> und der Biotrockenmassekonzentration in 48 parallelen Reaktoren

In einer Kultivierung im Satzverfahren mit *E. coli* konnte eine niedrige maximale Standardabweichung über alle 48 Reaktoren von  $\pm 5,3\%$  Luftsättigung erreicht werden. Nach einer Prozessdauer von 5 Stunden wurde eine maximale BTM von  $13,8 \text{ g l}^{-1}$  erreicht. Die maximale Standardabweichung betrug  $0,98 \text{ g l}^{-1}$ .

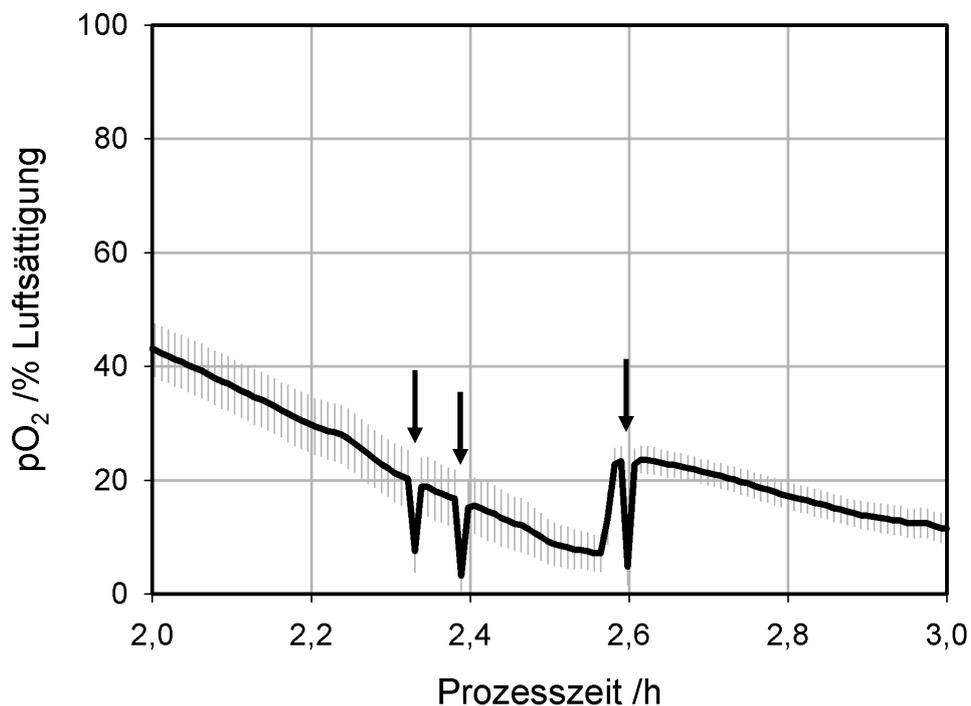
Die maximale Standardabweichung über alle 48 Reaktoren betrug  $\pm 5,3\%$  bei Erreichen des niedrigsten pO<sub>2</sub> nach gut drei Stunden. Dieses Verhalten spiegelt auch die Kalibrierung wieder, die für niedrige Sauerstoffkonzentrationen einen höheren Fehler der Messung ergibt.

### 5.2.2 Parallele Sauerstoffpartialdruck-Kontrolle

Neben der Messung ist auch die Kontrolle des pO<sub>2</sub> ein wichtiger Bestandteil der Technik konventioneller Rührkesselbioreaktoren. Gerade bei aeroben Prozessen ist beispielsweise die Einhaltung eines minimalen pO<sub>2</sub> zur Vermeidung von Gärungsprozessen unabdingbar. Die pO<sub>2</sub>-Kontrolle wird in klassischen Rührkesselreaktoren meist durch Variation der Drehzahl oder der Begasungsrate bewerkstelligt. Im Fall der parallelen Milliliter-Bioreaktoren gestaltet sich die Situation

anders. Zum einen werden die Rührer aller Reaktoren konstruktionsbedingt mit derselben Drehzahl betrieben. Dadurch ist eine individuelle  $pO_2$ -Kontrolle einzelner Reaktoren nicht möglich. Die einzige Möglichkeit besteht in einer Drehzahlregelung für alle Reaktoren, basierend auf dem Reaktor mit dem niedrigsten  $pO_2$ . Zum anderen verfügen die Milliliter-Reaktoren nicht über eine Zwangsbelüftung mit einem Gasverteiler sondern das verwendete Rührorgan saugt das notwendige Gas an und dispergiert es in das Reaktionsvolumen. Das verhindert ebenfalls eine  $pO_2$ -Kontrolle mittels Variation der Begasungsrate.

Mit der Rührerüberwachung steht jedoch ein Instrument zur Verfügung, das den Ausfall eines Rührers und damit das Ausbleiben der Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen detektieren kann. Im Fall des Stehenbleibens eines Rührers wird der Neustart aller Rührer initiiert. Bei der bereits in Abbildung 5.14 gezeigten Kultivierung wurde die Rührerüberwachung erfolgreich eingesetzt. Nach dem Ausfall eines Rührers wurden alle Rührer neu gestartet und ein zu lange anhaltender kritischer, zu niedriger  $pO_2$  vermieden.



**Abbildung 5.15: Rührerüberwachung mit Wiederanlauf nach Ausfall eines Rührers (Detailansicht)**

Nach der Detektion eines ausgefallenen Rührers wurde durch die Software zur Prozesssteuerung der Wiederanlauf aller Rührer initiiert (Markierungen). Die Rührerdrehzahl wurde nach 2,55 Stunden Prozessdauer zur Erhöhung des  $pO_2$  von 2800 auf  $3000 \text{ U min}^{-1}$  erhöht.

Durch die Wahl einer den maximalen Sauerstoffbedarf der Mikroorganismen deckenden Rührerdrehzahl und den Wiederanlauf aller Rührer bei Ausfall eines Rührers, konnte die ständige ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet werden.

### 5.2.3 Diskussion

Der Einfluss des Mediums auf die Messung des Sauerstoffpartialdrucks ist zunächst größer als erwartet. So ist die Steigung der sich ergebenden Kalibriergeraden in Puffer größer als im Komplexmedium. Damit ist auch die Messung empfindlicher, da eine größere Änderung der Sauerstoffkonzentration zu einem größeren Signal führt. Verglichen mit den herstellerseitigen Kalibrierwerten ist die Kalibrierung mit Phosphatpuffer dazu nahezu äquivalent, die Kalibrierung im Komplexmedium weicht dagegen ab. Außerdem beeinflusst das verwendete CSL-Medium die Einzelmessung stärker als der Puffer, die Standardabweichung im Komplexmedium ist daher größer.

Für die Praxis bedeutet dies, dass neben einer zuvor separat durchzuführenden Kalibrierung mit dem jeweiligen Medium auch eine, sofern möglich, je Reaktor individuelle Zweipunkt-Kalibrierung zu Beginn einer Kultivierung durchgeführt werden sollte. Dies gilt auf Grund des größeren Einflusses des Mediums insbesondere für Kultivierungen mit Komplexmedien. Die Zweipunktkalibrierung ist relativ einfach durchzuführen. Nach dem Beimpfen der Reaktoren mit aktiven Zellen wird auf dem Weg von der Sterilbank zur Arbeitsfläche des Roboters zumeist schon aller vorhandene Sauerstoff verbraucht. Wegen der noch nicht laufenden Rührer erfolgt auch kein weiterer Sauerstoffeintrag. Damit kann der Nullpunkt eingestellt werden. Nach dem Einschalten des magnetisch-induktiven Antriebs steigt der Sauerstoffgehalt auf seinen maximalen Wert. Dieser kann dann nach Erreichen eines quasistationären Zustands als 100% kalibriert werden. Unter besonderen Umständen ist auch eine Einpunktkalibrierung bzw. Anpassung auf 100% Sauerstoffkonzentration möglich, da der 0%-Wert zumeist nur gering variiert. Dann ist allerdings zuvor eine sorgfältige Kalibrierung im Kultivierungsmedium unabdingbar.

Eine je Reaktor individuelle  $pO_2$ -Kontrolle ist konstruktionsbedingt nicht möglich. Lediglich eine Kontrolle mit Orientierung an dem Reaktor mit dem niedrigsten  $pO_2$  ist denkbar. Die Rührerüberwachung mit dem Neustart der Rührer im Fall des Stehenbleibens funktionierte zuverlässig und brachte befriedigende Ergebnisse. Zusammen mit einer den maximalen Sauerstoffbedarf der Mikroorganismen deckenden Rührerdrehzahl ist es damit möglich, die Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten. Das entspricht zwar keiner vollständigen  $pO_2$ -Kontrolle wie sie im

konventionellen Rührkesselbioreaktor eingesetzt wird, ist jedoch oft ausreichend. Für die meisten Anwendungsfälle ist meist nur relevant, dass die Versorgung mit Sauerstoff nicht ausbleibt.

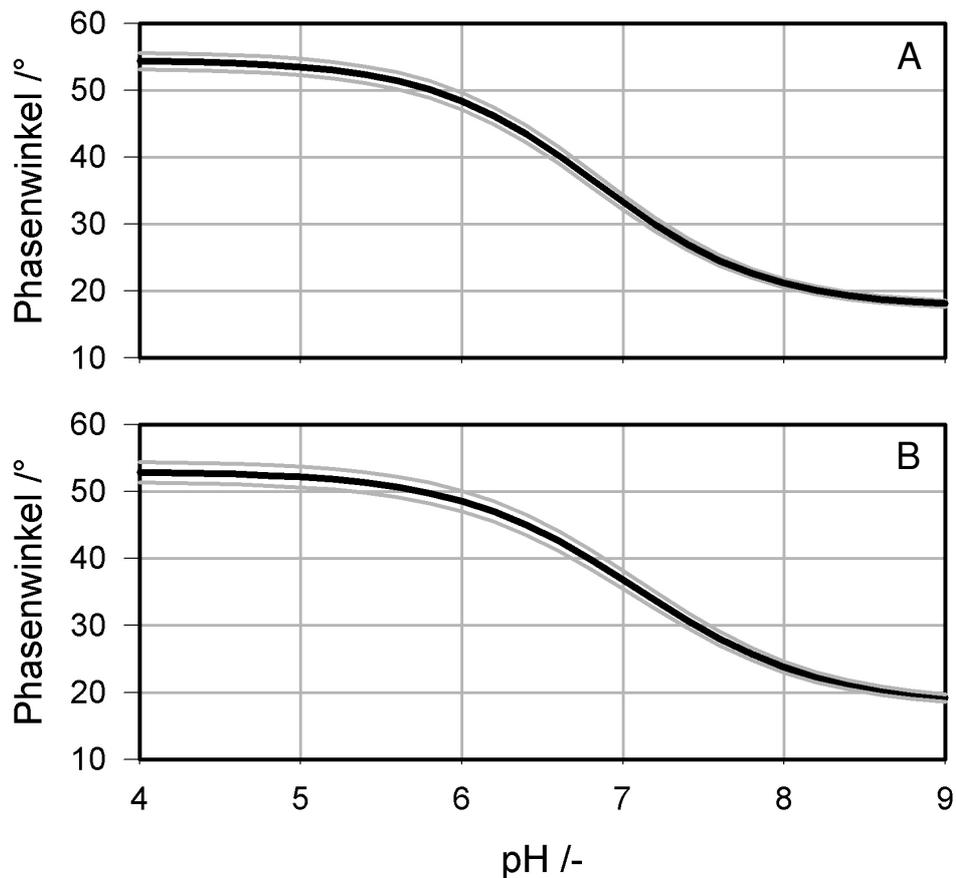
## 5.3 Kontrolle des pH

Neben dem  $pO_2$  ist der pH einer der wichtigsten Prozessparameter. Viele Mikroorganismen benötigen für ihr Wachstum beispielsweise einen festen pH-Bereich oder ein gewünschtes Produkt wird nur bei einem bestimmten pH gebildet.

### 5.3.1 Parallele pH-Messung

Bei Kultivierungen in 48 Milliliter-Bioreaktoren im Parallelansatz unter identischen Bedingungen wurden bei parallelen Messungen des pH zwischen einzelnen Reaktoren Abweichungen beobachtet. Zur Feststellung der Ursache wurde ebenfalls eine Charakterisierung der pH-Messung durchgeführt. Die korrekte Messung des pH ist in sofern wichtig, da diese die Basis einer pH-Regelung ist.

Die Charakterisierung und Kalibrierung wurde wiederum in 48 zufällig ausgewählten Reaktoren in den zwei Modellmedien im pH-Bereich von pH 4 bis 6 durchgeführt. Im Gegensatz zur  $pO_2$ -Messung ergibt die Messung des Phasenwinkels der Fluoreszenzantwort als Kalibrierkurve eine Sigmoide. Für alle 48 Reaktoren wurden nach der Messung die Parameter dieser Sigmoiden  $\varphi_{\min}$ ,  $\varphi_{\max}$ ,  $pH_0$  und  $dpH$  bestimmt. Als Ergebnis der Kalibrierung sind in Abbildung 5.16 die sich aus den Mittelwerten aller Parameter ergebenden Sigmoiden dargestellt. Die Standardabweichungen aller bestimmten Parameter führen zu jeweils zwei die mittlere Sigmoide einhüllenden Kurven.



**Abbildung 5.16: Charakterisierung der pH-Messung**

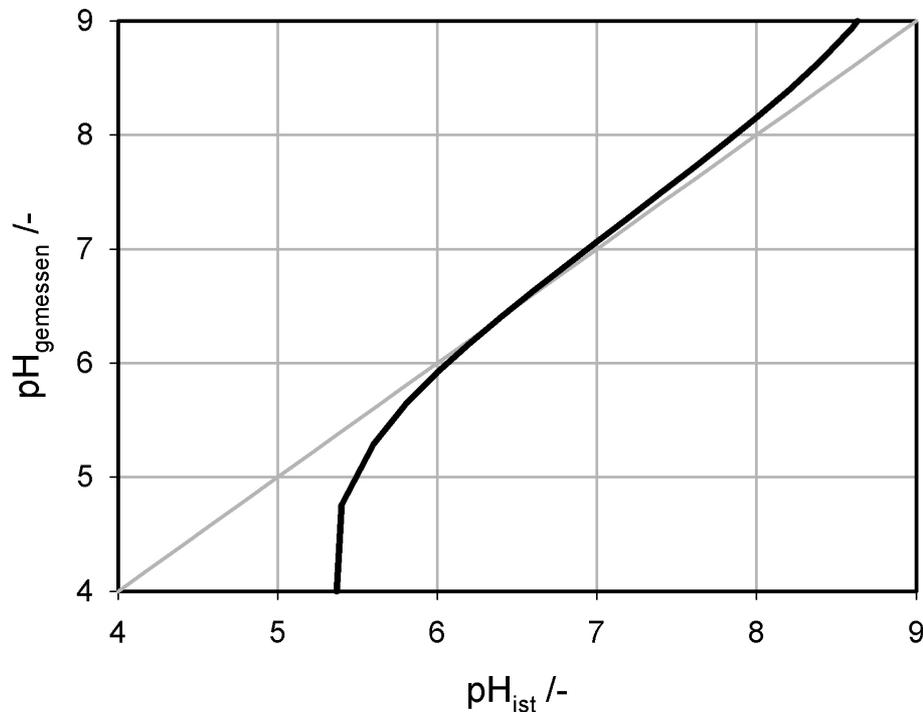
Das Signal der Messung des pH in Phosphatpuffer (A) und in CSL-Medium (B) umfasst vergleichbare Bereiche. Der effektiv nutzbare Bereich der Messung liegt zwischen pH 5 und 8,5. Darüber hinaus werden Änderungen des pH nur mehr mit einem größer werdenden Fehler detektiert.

Der Wendepunkt der Kalibrierkurve im Phosphatpuffer liegt bei pH 6,8; im Komplexmedium bei pH 7,1. Der Fehler der Messung im Phosphatpuffer sinkt von 2,6° bei pH 4 auf 1,0° bei pH 9. Die entsprechenden Werte liegen im Komplexmedium bei 3,1° und 1,1°. Die Parameter der sigmoidalen Kalibrierkurve sind für beide Modellmedien zusammen mit den Kalibrierdaten des Herstellers in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

**Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Kalibrierdaten der pH Messung**

Parameter	Puffer	Komplexmedium	herst. Kalibrierung
$\varphi_{\min}$	$54,54 \pm 0,33$	$53,03 \pm 0,54$	52,92
$\varphi_{\max}$	$17,54 \pm 0,44$	$18,02 \pm 0,49$	18,00
pH <sub>0</sub>	$6,84 \pm 0,02$	$7,08 \pm 0,02$	6,93
dpH	$0,52 \pm 0,00$	$0,56 \pm 0,00$	0,53

Besonders deutlich wird die Notwendigkeit einer medienspezifischen Kalibrierung angesichts der sich ergebenden Abweichungen des gemessenen zum tatsächlichen pH bei der Messung in CSL-Medium mit den herstellerseitigen Kalibrierdaten.

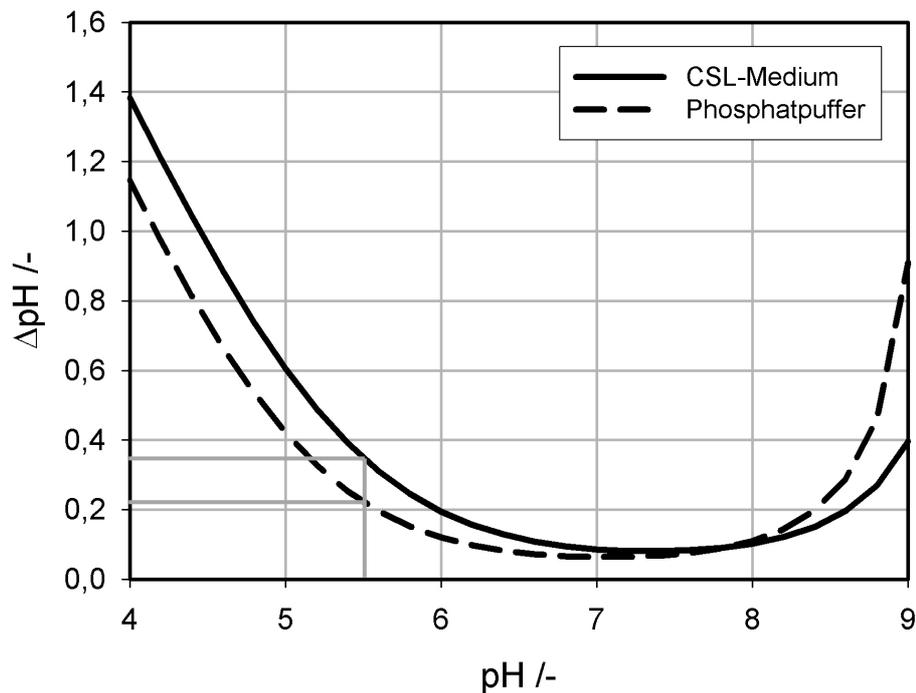


**Abbildung 5.17: Vergleich des in CSL-Medium gemessenen pH zum tatsächlichen pH bei Verwendung der herstellerseitigen Kalibrierung**

Die mittels der Herstellerdaten kalibrierte Messung zeigt bei niedrigem pH einen bei weitem zu niedrigen Wert an. Bei hohem pH wird der Wert überschätzt, wenn auch nicht so stark. Nur Werte um pH 6 bis 7 werden real wiedergegeben. Das Ergebnis einer idealen Messung ist die Winkelhalbierende.

Besonders drastisch wirken sich die Abweichungen bei niedrigem pH aus. Hier ist unterhalb von pH 6 keine sinnvolle Messung mehr möglich.

Trotz einer medienspezifischen Kalibrierung muss beachtet werden, dass die Messung auf Grund der nichtlinearen sigmoiden Kalibrierung und der Standardabweichung an den Messbereichsrändern mit einer größer werdenden Messungenauigkeit behaftet ist. Der sich in den verwendeten Modellmedien ergebende Messfehler ist in Abbildung 5.18 über dem tatsächlichen pH der Lösungen aufgetragen.



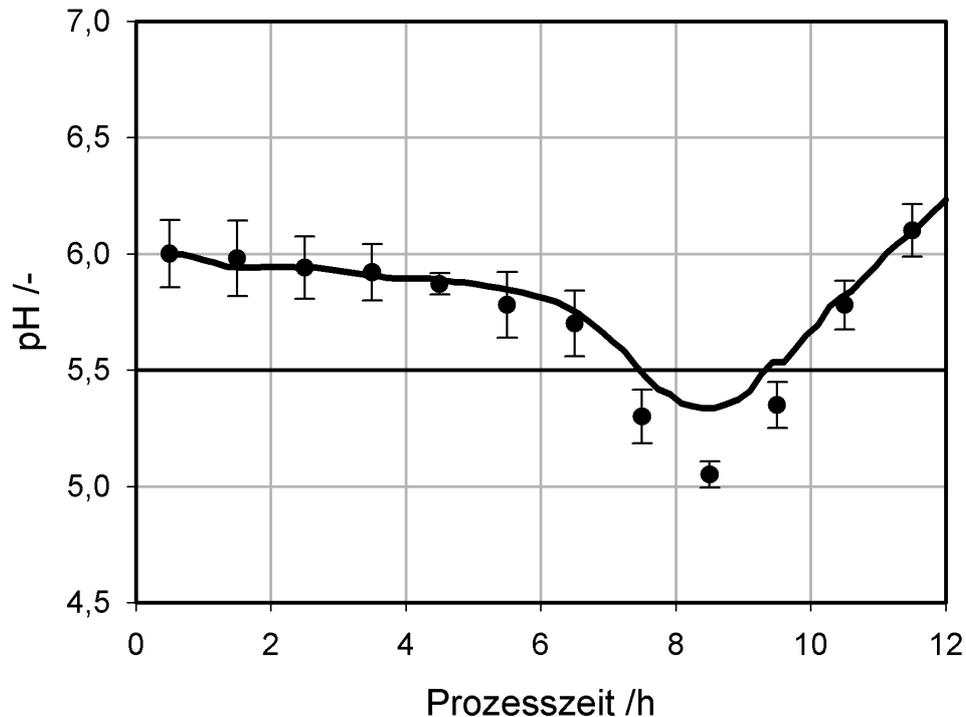
**Abbildung 5.18: Messfehler der optischen pH-Messung in Phosphatpuffer und CSL-Medium**

An den Rändern des Messbereichs von pH 4 bis 9 nimmt der Fehler stark zu. Bei pH 5,5 beträgt dieser für das CSL-Medium 0,35 pH, für den Phosphatpuffer dagegen nur 0,22.

Der für Kultivierungen von Mikroorganismen meist genutzte pH-Bereich beginnt etwa unter pH 7,5. So liegt das pH-Optimum für *Escherichia coli* bei pH 6,8. Die Kultivierung von Hefen wird oft bei einem pH von 5 – 6 durchgeführt. Vor dem Hintergrund der nicht konstanten, jedoch pH-abhängigen Messwertabweichung, muss die Entscheidung getroffen werden, welcher pH-Bereich bei der Messung als zuverlässig angesehen wird und welcher Fehler dabei noch tolerabel ist. Für die vorliegenden Arbeiten ist bei Kultivierungen mit Hefen ein nutzbarer pH-Bereich von pH 5 bis 8 wünschenswert. Als Messfehler kann eine Abweichung von  $\pm 0,3$  pH akzeptiert werden. Da der Fehler bei der Messung von pH 5 größer als 0,3 ist, wird als praktikabler Kompromiss der pH-Bereich der zuverlässigen Messung auf pH 5,5 – 8,5 eingegrenzt. Der maximale Fehler beträgt in diesem Intervall 0,35 pH bei pH 5,5. Damit ist eine pH-Regelung ebenfalls auf diesen pH-Bereich beschränkt.

Als Referenzmessmethode zur optischen Messung wurde eine konventionelle Mini-Glaselektrode während einer Kultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae* im Satzverfahren eingesetzt. Dabei wurden 48 parallele Reaktoren verwendet, als

Medium kam das CSL-Medium zum Einsatz und als Referenz wurden die Reaktoren 1 – 8 in regelmäßigen Zeitabständen gemessen. Die untere Grenze der Zuverlässigkeit der optischen pH-Messung wurde wie zuvor erläutert bei pH 5,5 gesetzt.

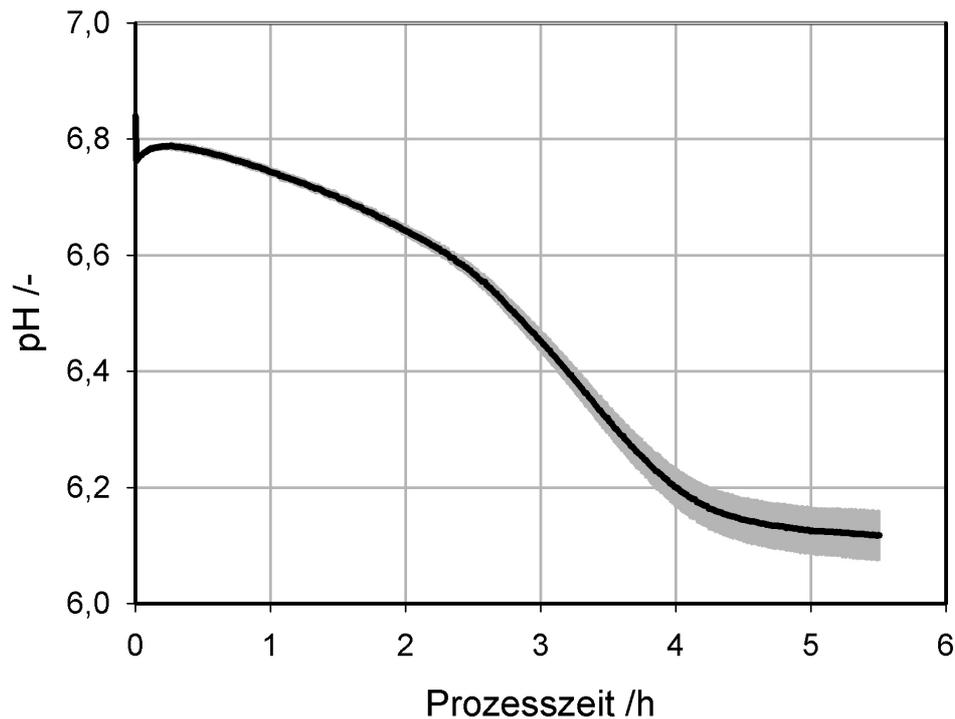


**Abbildung 5.19:** Verlauf des pH einer Satzkultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae* mit pH-Referenz

Der in 48 parallelen Reaktoren mit Hilfe der optischen pH-Messung gemessene Wert (—) wurde mit einer Mini-Glaselektrode (●) in acht Reaktoren kontrolliert. Zusätzlich ist die untere Grenze der Zuverlässigkeit der fluorometrischen pH-Messung bei pH 5,5 angegeben.

Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von knapp 12 Stunden wobei eine Referenzierung etwa alle 60 Minuten durchgeführt wurde. Während dieser Zeit sank der optisch gemessene pH von anfänglich pH 6,0 während etwa 8 Stunden auf pH 5,3 ab um anschließend wieder auf pH 6,2 zu steigen. Die elektrochemische Messung detektierte einen Verlauf von pH 6,0 über pH 5,1 auf pH 6,1. Standardabweichung der optischen Messung aller 48 Reaktoren betrug 0,43 pH. Die Glaselektrode hatte eine Standardabweichung von 0,11 pH.

Äquivalent zur  $pO_2$ -Messung kann auch bei der parallelen Messung des pH bei sorgfältiger Kalibrierung eine niedrige Reaktoren-zu-Reaktor Abweichung erreicht werden. In Abbildung 5.20 ist der zeitliche Verlauf des pH der bereits in Abbildung 5.14 gezeigten Kultivierung mit *E. coli* dargestellt.



**Abbildung 5.20:** Zeitlicher Verlauf des pH in 48 parallelen Reaktoren bei der Kultivierung von *E. coli*

In einer Kultivierung im Satzverfahren mit *E. coli* konnte eine niedrige maximale Standardabweichung über alle 48 Reaktoren von  $\pm 0,044$  pH erreicht werden.

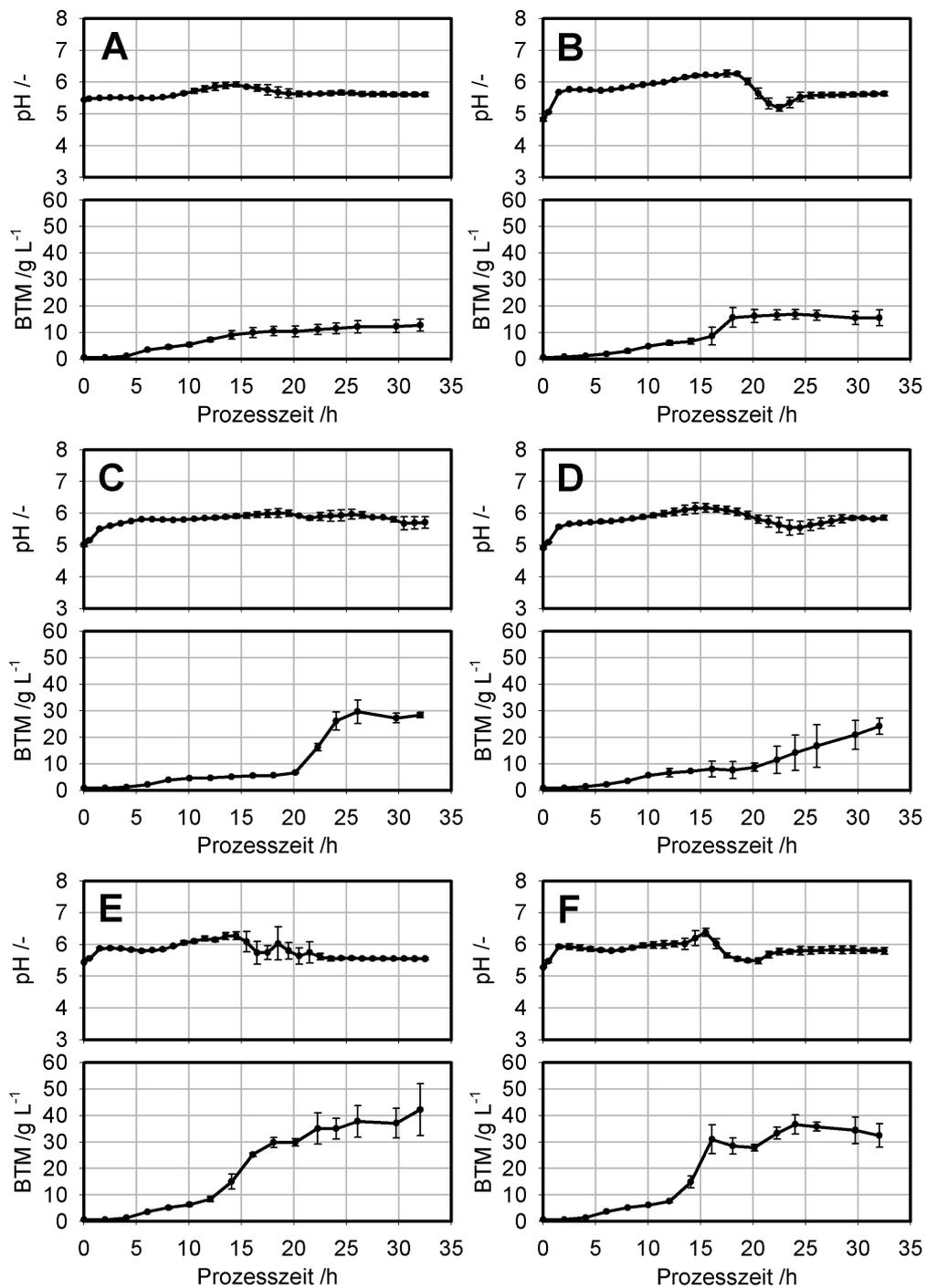
Bei der bereits in 5.2.1 gezeigten Kultivierung in einem Komplexmedium konnten gute Werte bei der Messung des pH mit einer maximalen Standardabweichung von  $\pm 0,044$  pH bei einem pH unter 6,2 erreicht werden.

### 5.3.2 Parallele pH-Regelung

Basierend auf dem optisch ermittelten pH der einzelnen Reaktoren wurde eine pH-Regelung durchgeführt. Als Regler kam ein modifizierter PI-Regler mit Toleranzband, Stellgrößenbegrenzung und „Anti-Windup-Technologie“ zum Einsatz. Die verwendeten Parameter sind bereits in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Die Abbildung 5.21 zeigt geregelte pH-Verläufe mit den dazugehörigen Biotrockenmasse-Verläufen von Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 im Parallelansatz. Die Daten sind eine zufällige Auswahl von Ansätzen und entstammen einer Generation der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Prozessoptimierung mittels genetischem Algorithmus. Jedes Diagramm zeigt die gemittelten Daten von jeweils drei parallel betriebenen Reaktoren mit identischen Prozessbedingungen, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Daten

der drei Reaktoren dar. Die Sollwerte der pH-Regelung wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt.



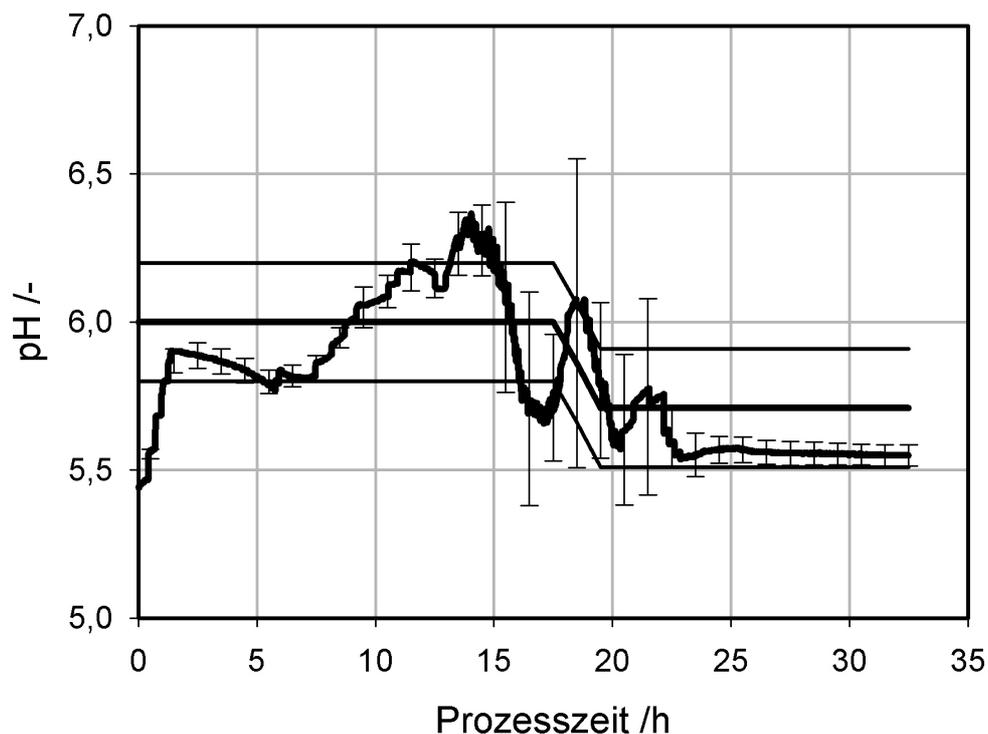
**Abbildung 5.21: Sechs zufällig ausgewählte Ansätze einer Kultivierung im Parallelansatz mit verschiedenen individuell geregeltem pH**

In einem parallelen Experiment wurden 16 verschiedene Kultivierungen im dreifachen Ansatz durchgeführt. Es wurde jeweils ein eigenes Medium mit entsprechender Pufferkapazität und ein eigenes pH-Profil verwendet. Entsprechend unterschiedlich sind daher auch die zeitlichen Verläufe.

Während der ersten 18 Stunden wurde auf einen ersten pH zur Kultivierung der Mikroorganismen geregelt. Der danach eingestellte pH diente der Konditionierung der Zellen für eine anschließende Biotransformation. Zur Titration wurde 5 M NaOH und 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verwendet.

Im Parallelansatz mit 48 Reaktoren konnten erfolgreich insgesamt 16 verschiedene Sollwerte mit einer pH-Regelung geregelt werden. Dabei hatten jeweils drei Reaktoren identische Prozessbedingungen. Zusätzlich gelang nach einer Prozessdauer von 18 Stunden eine Änderung der Sollwerte. Dadurch kam es zwar zu Schwankungen des pH, dem Regler gelang es jedoch diese auszugleichen. In jedem dieser 16 Ansätze wurde eine andere Medienzusammensetzung mit entsprechend anderer Pufferkapazität verwendet.

Die Abbildung 5.22 zeigt exemplarisch den pH-Verlauf des Ansatzes „E“ der Abbildung 5.22:



**Abbildung 5.22: Gemittelter zeitlicher Verlauf des geregelten pH in drei Reaktoren mit identischen Prozessbedingungen**

Der pH aller drei Reaktoren wurde auf einen Sollwert innerhalb des Toleranzbandes geregelt. Auf Grund der mikrobiell bedingten Änderung des pH kommt es nach ca. 14 Stunden zu einer Überschreitung des Toleranzbandes woraufhin der Regler entgegen arbeitet und in der Folge jedoch leicht unterschwingt. Nach 18 Stunden Prozessdauer wird der Sollwert der pH-Regelung abgesenkt woraufhin die Regelung reagiert und den pH nachführt.

Der geregelte pH bleibt während der ersten ca. 12 Stunden innerhalb des gesetzten Toleranzbandes von  $\pm 0,2$  pH. Erst dann bricht er nach oben aus, es wird jedoch effektiv dagegen gesteuert. Während des Übergangs vom ersten Sollwert pH 6,0 zum zweiten Sollwert pH 5,7 gerät das System leicht ins Schwingen. Dem Regler gelingt es dieses zu dämpfen und hält er anschließend den pH bis zum Schluss innerhalb des Toleranzbandes.

### 5.3.3 Diskussion

Im Fall der pH-Messung zeigt sich, im Vergleich zum  $pO_2$ , eine wesentlich geringere Abhängigkeit der Messung vom eingesetzten Medium. Der Wendepunkt der Sigmoiden liegt in beiden Fällen nahe pH 7. Das Komplexmedium weist in diesem Punkt eine geringfügig höhere Steigung und damit Empfindlichkeit auf. Die vier Kalibrierdaten beider Medien liegen im Bereich der mitgelieferten herstellerseitigen Angaben. Nach Überprüfung eines Mediums ist es damit möglich, zu Beginn einer Kultivierung eine einfache Einpunkt-Anpassung durchzuführen. Dazu kann in der Software fedbatch XP für jeden Reaktor der mittels optischer Sensorik gemessene pH mit einem extern referenzierten pH abgeglichen werden.

Die optische pH-Messung wird durch die mittels Glaselektrode referenzierte Messung im Bereich bis hinunter zu pH 5,5 bestätigt. Der Mittelwert über alle 48 Reaktoren liegt im Bereich der Standardabweichung der Referenzmessung. Wie erwartet nimmt die Sensitivität bei niedrigeren pH als etwa pH 5,5 ab. Das hat zur Folge, dass der tatsächlich vorliegende pH im Medium niedriger ist, als die optische Messung wiedergibt. So bestimmt die optische Messung bei einem vorliegenden pH von 5,1 einen pH von 5,3 und liegt damit 0,2 pH über dem tatsächlichen Wert.

Generell ist der nutzbare Messbereich von pH 5,5 – 8,5 sehr eng verglichen mit anderen Methoden, beispielsweise der galvanisch arbeitenden Glaselektrode mit einem Messbereich, der sich von pH 0 – 14 erstreckt. Allerdings deckt sich der Messbereich der optischen pH-Messung mit dem anvisierten Einsatzbereich der mikrobiellen Anwendung. Dabei liegt der pH meist im Bereich des sensitiven Fensters der Messtechnik.

Bei der parallelen Kultivierung mit *E. coli* wird, wie bei der parallelen  $pO_2$ -Messung zuvor, ein geringerer Fehler erreicht. Auch hier wird das auf Grund der Kalibrierung erwartete Verhalten wiedergegeben, wobei sich zwei Effekte zeigen. Zum einen wird der Fehler bei niedrigen pH auf Grund der Messung generell größer, zusätzlich werden bei niedrigen pH unter etwa 6,3 ein wesentlich flacherer Teil der

Kalibriersigmoide erreicht. In diesem Bereich ergibt sich aus einer kleinen Änderung des Messsignals eine größere Abweichung des resultierenden pH.

Die gezeigten Verläufe des pH der geregelten Ansätze folgen den Sollwerten nicht immer optimal. Teilweise treten Sollwertabweichungen auf, die nur mühsam wieder behoben werden können. Dem Regler gelingt es scheinbar nicht immer innerhalb des gesetzten Toleranzbandes zu bleiben. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Daten den gemittelten pH aller drei Reaktoren zeigen. Daher rühren auch die teilweise großen Fehler. Insbesondere zu den Zeitpunkten, zu denen starke pH-Schwankungen auftreten, zeigt sich ein besonders großer Fehler zwischen den drei eigentlich identischen Reaktoren des Ansatzes. Dies wird durch mehrere Faktoren verursacht. Zum einen wachsen die Hefen der Kultivierungen in den drei Reaktoren nicht vollkommen synchron und beeinflussen den pH daher unterschiedlich. Daneben werden die Reaktoren alle von derselben Nadel des Roboters bedient. Das hat zur Folge, dass die Zugaben von Titrationsmittel nicht gleichzeitig erfolgen, da der Pipettierroboter neben der reinen Liquidhandhabung weitere Aufgaben wie beispielsweise die Bewegung von Mikrotiterplatten zur *atline*-Analyse zu verrichten hat. Es kann durchaus vorkommen, dass zwischen den Base- beziehungsweise Säurezugaben benachbarter Reaktoren mehrere Minuten liegen. Das führt dann zu unterschiedlichen pH-Verläufen und damit großen Abweichungen.

In Abbildung 5.22 ist zu sehen, dass sich die Toleranzbänder des ersten und zweiten Sollwerts des pH überlappen. Das ist zunächst einmal problematisch, da es denkbar ist, dass der pH trotz geändertem Sollwert auf einem konstanten Wert bleibt und sich die Sollwertänderung nicht auswirkt. Die Ursache für die Überlappung liegt jedoch zum einen in den Vorgaben, die der genetische Algorithmus während der Generierung der einzelnen Generationen macht. Die beiden Sollwerte des Ansatzes liegen nur 0,29 pH auseinander. Zum anderen musste ein genügend breites Toleranzband gewählt werden, um einen zu häufigen, durch den Pipettierroboter durchgeführten Stelleingriff, zu vermeiden. Dies hätte sonst dazu geführt, dass der Pipettierroboter auf Grund der großen Anzahl an Pipettieraufgaben in zeitlichen Rückstand geraten wäre. Eine effiziente Prozessführung ist damit nicht mehr möglich. Letztlich handelt es sich bei dem vorliegenden Fall aber um eine Kultivierung von Mikroorganismen. Diese haben eine Eigendynamik, was dazu führt, dass der pH das Toleranzband verlässt und der Regler wieder eingreifen kann. Dadurch wird es ihm ermöglicht, auf den Sollwert zu regeln.

Unter der Voraussetzung, dass ein entsprechendes Toleranzband akzeptabel ist und größere Schwankungen und temporäre Abweichungen vom Sollwert des pH toleriert werden können, ist eine pH-Regelung im Parallelansatz gut möglich.

## 6 Prozessoptimierung zur Biokatalysatorherstellung

Chirale Verbindungen als pharmazeutische Wirkstoffe haben eine enorme wirtschaftliche Bedeutung erlangt. So machte der Pharmakonzern Pfizer mit dem Cholesterinsenker Atorvastatin<sup>®</sup> im Jahr 2006 einen Gesamtumsatz von 12,9 Mrd. US\$ (2006 Annual Report, Pfizer Inc., USA). Zur Synthese des Statins ist als Intermediat eine chirale Verbindung notwendig. Diese chiralen Verbindungen werden zumeist auf klassischem chemischen Weg hergestellt, allerdings bei oftmals energieintensiven, extremen Reaktionsbedingungen wie hohen Temperaturen und Drücken. Meist ist der Einsatz teurer Schwermetallkatalysatoren oder großer Mengen organischer Lösungsmittel notwendig. Ein Beispiel für eine derartige asymmetrische Synthese ist die chemisch katalysierte enantioselektive Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethyl-ester (S-CHBE) bei einem Druck von 100 bar und einer Temperatur von 95°C unter der Verwendung eines teuren Rutheniumkatalysators mit einem Lösungsmittelgemisch aus Ethanol und Dichlorethan (Pavlov *et al.*, 2000). Allein die Kosten für den verwendeten Schwermetallkatalysator betragen etwa 40000 US\$ kg<sup>-1</sup> (Rozell, 1999).

Dem gegenüber stehen Beispiele biokatalytischer Prozesse, die unter ökonomischen und ökologischen Aspekten betrachtet durchaus mit der klassischen chemischen Synthese konkurrieren können (Seebach *et al.*, 1998; Rissom *et al.*, 1999), da diese Prozesse in der Regel bei moderaten Temperaturen unter Normaldruck ablaufen können. Insbesondere die Bäcker- oder Brauhefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigt Stärken bei der stereoselektiven Reduktion prochiraler Ketone (Bertau *et al.*, 1999). Den hier genannten Vorteilen der stereoselektiven Reduktion mittels Hefen stehen jedoch einige Nachteile gegenüber. So sind die zellspezifischen Produktivitäten und die Ausbeuten meist gering und die erreichte Enantioselektivität befriedigt nicht.

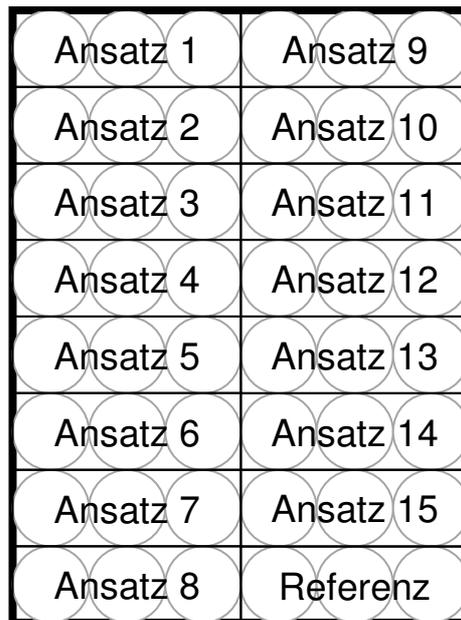
Vor diesem Hintergrund wurde der rekombinante Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 zur effizienteren enantioselektiven Reduktion entwickelt. Dieser überexprimiert eine Carbonylreduktase zur biokatalytischen Reduktion sowie eine Glucose-Dehydrogenase zur Cofaktor-Regenerierung. Damit konnten, im Vergleich

zum Wildtyp der Hefe, bei Ganzzell-Biotransformationen die Ausbeuten und der erzielbare Enantiomerenüberschuss gesteigert werden (Engelking, 2004). Es zeigte sich jedoch, dass die Qualität des Biokatalysators und damit das Ergebnis der Biotransformation in erheblichem Maße von den Kultivierungsbedingungen der Biokatalysatorherstellung abhängt (Bertau, 2002; Engelking, 2004).

Die Zielsetzung ist es nun, optimale Prozessbedingungen zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 im Satzverfahren zu finden, die eine Steigerung der erreichbaren Biotrockenmassekonzentration  $c_X$  während der Biokatalysatorherstellung und die Maximierung der erzielbaren Produktkonzentration  $C_{S-CHBE}$  sowie des Enantiomerenüberschusses  $ee_{S-CHBE}$  bewirken. Diese Optimierung soll mit Hilfe eines genetischen Algorithmus, der in der Lage ist, mehrere Optimierungsziele zu verfolgen, durchgeführt werden. Zur Bewältigung der dazu notwendigen großen Anzahl an Kultivierungen bieten sich Parallelansätze an. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu zeigen, dass es mit dem parallelen Milliliter-Bioreaktorblock möglich ist, in entsprechend kurzer Zeit die experimentellen Untersuchungen zur Prozessoptimierung durchzuführen. Außerdem soll die Skalierbarkeit der mit dem Bioreaktorblock durchgeführten Kultivierungen durch eine Maßstabsvergrößerung gezeigt werden. Dazu soll nach der erfolgreichen Optimierung das Ergebnis der Optimierung aus dem Milliliter- in den Litermaßstab übertragen werden.

## 6.1 Parallele Biokatalysatoranzucht

Die Prozessoptimierung wurde im Parallelansatz im Milliliter-Bioreaktor unter Zuhilfenahme eines genetischen Algorithmus durchgeführt. Jede Medienzusammensetzung mit den beiden Sollwerten der pH-Regelung der insgesamt 15 verschiedenen Populationsmitglieder der durch den GA erzeugten Generationen wurde in einem dreifachen Ansatz kultiviert. Zusätzlich wurde ein dreifacher Referenzansatz mit gleichbleibender Medienzusammensetzung mitgeführt und generell auf pH 6 geregelt. Die Anordnung der Reaktoren ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Sie wird auch so bei der Ernte und der anschließenden Biotransformation übernommen. Die einzelnen Ansätze tragen zur eindeutigen Identifizierung Bezeichnungen nach dem Muster „Generation.Ansatz“, die Referenz wird mit „Generation.R“ benannt.



**Abbildung 6.1: Anordnung der einzelnen Ansätze einer Generation im Bioreaktorblock**

**Jeweils drei horizontal nebeneinander liegende Reaktoren werden bei identischen Bedingungen betrieben. Unten rechts befindet sich immer die Referenz.**

Die Biokatalysatoranzucht gliedert sich in zwei Phasen. Während der ersten 20 Stunden dauernden Phase, in der der pH auf einen ersten Sollwert geregelt wird, wachsen die Zellen und verstoffwechseln dabei die vorgelegten  $30 \text{ g l}^{-1}$  Glucose. Die Glucosekonzentration wurde im Vergleich zu den Arbeiten von Egelking (2004) von  $20 \text{ g l}^{-1}$  auf  $30 \text{ g l}^{-1}$  erhöht um höhere Zelldichten zu erreichen. Mit  $20 \text{ g l}^{-1}$  waren die in Vorversuchen erzielten Zelldichten teilweise zu gering um ein effizientes Arbeiten im Parallelansatz bei der anschließenden Biotransformation in der „Deep-Well“-Platte zu ermöglichen. Zum Ende der ersten Phase hin wird der pH in einem einstündigen Übergang auf den zweiten Sollwert gebracht. Dieser wird während der restlichen 24 Stunden gehalten. Diese zweite Phase stellt für die Zellen, je nach Ablauf ihrer vorangegangenen Wachstumsphase, eine sich mehr oder weniger auswirkende Hungerphase dar und dient der Konditionierung der Zellen für die anschließende Biotransformation. Während der gesamten Zeit wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen von etwa zwei Stunden automatisiert Proben aus den Reaktoren genommen und *atline* deren optische Dichte im MTP-Photometer des Parallelbioreaktorsystems bestimmt. Die Berechnung der Biotrockenmassenkonzentration erfolgte nach Abschnitt 4.4.3. Ein expliziter Ausgleich der durch

Verdunstung verlorener Flüssigkeit wurde nicht durchgeführt, da die Volumina in der Regel durch die Zugabe von Titrationsmittel in etwa ausgeglichen wurden.

Die Biokatalysatoranzucht wurde vollautomatisiert durchgeführt. Dabei zeigten sich, wie beispielsweise in Abbildung 6.2 und Abbildung 6.3 zu sehen ist, in Abhängigkeit der jeweils verwendeten Medienzusammensetzung wie erwartet deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. Wie in den Abbildungen ebenfalls anhand der Verläufe zu sehen ist, beginnt eine Phase starken Wachstums nach unterschiedlichen Zeiten beziehungsweise bleibt sie auch aus. Ebenso wirken sich die Änderung des pH und die Hungerphase zur Konditionierung der Zellen in der zweiten Hälfte der Kultivierung unterschiedlich aus. Hierbei kommt es beispielsweise durch die notwendige Zudosierung von pH-Korrekturmittel zu einer Verdünnung der Zellsuspensionen. Ebenso kann es zur Aufkonzentrierung kommen, wenn kein Eingriff der pH-Regelung erfolgen muss und sich daher die Verdunstung während der 24 stündigen Hungerphase auswirkt.

Zur Auswertung wurden Ausreißer manuell aus der Berechnung entfernt. Als Kriterium diente zunächst der OD-Verlauf der einzelnen Reaktoren eines Dreifachansatzes. Einzeldaten, die mehr als die dreifache Standardabweichung vom Mittel des Dreifachansatzes abwichen wurden vernachlässigt. Bei mehr als 50% nicht beachteter Datenpunkte eines Reaktors, wurden zur Beurteilung die Daten des  $pO_2$  und der pH-Regelung, also die zudosierten Volumina an Säure und Base, herangezogen. So wäre beispielsweise die Verstopfung einer Hohlachse denkbar, die dann den Gaseintrag und folglich die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff verhindert hätte. Die Daten der entsprechenden Reaktoren wurden vollständig verworfen.

Die Maximierung der erreichbaren Biotrockenmassekonzentration war die erste Zielgröße der Optimierung. Daher wurde die jeweils während einer Kultivierung im Dreifachansatz erreichte gemittelte maximale Biotrockenmassekonzentration als Ergebnis verwendet und diente als eine Eingangsgröße des genetischen Algorithmus zur Generierung der nächsten Generation. Wie exemplarisch anhand der in Abbildung 6.2 gezeigten zeitlichen Verläufe der BTM der 2. Generation und der in Abbildung 6.3 abgebildeten zeitlichen Verläufe der 7. Generation zu sehen ist, gibt es einen deutlichen Trend hin zu höheren Biotrockenmassekonzentrationen der Ansätze. Die Optimierung mittels des genetischen Algorithmus hat effizientere Prozessbedingungen gefunden.

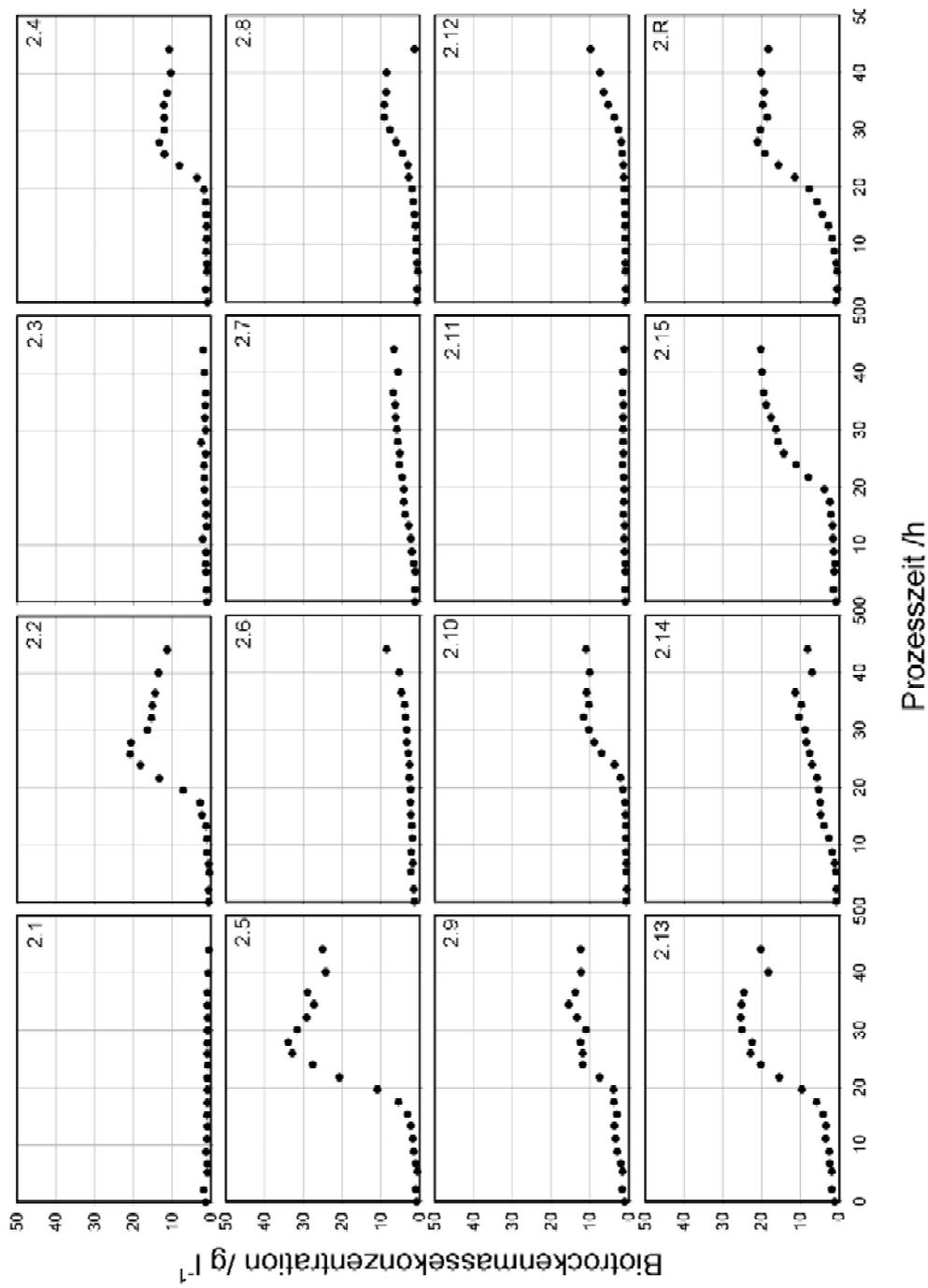


Abbildung 6.2: Zeitlicher Verlauf der BTM-Konzentration aller 15 Parallelansätze und des Referenzansatzes der 2. Generation  
 Die Verläufe geben die gemittelten Messwerte aller drei Reaktoren eines Ansatzes wieder. Je nach verwendeter Medienzusammensetzung und pH-Profil erreichen die Ansätze unterschiedliche Zellkonzentrationen am Ende der Kultivierung.

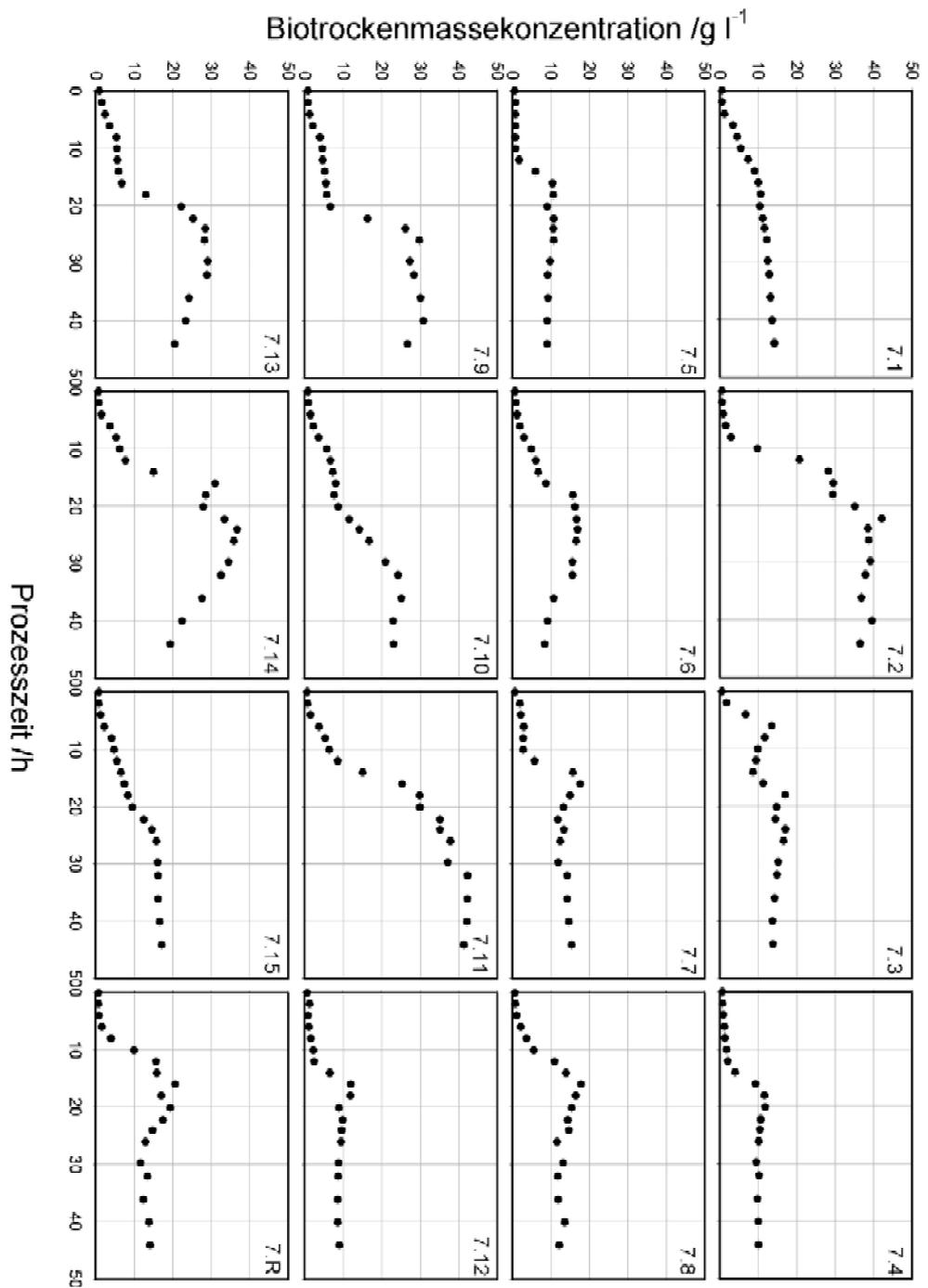
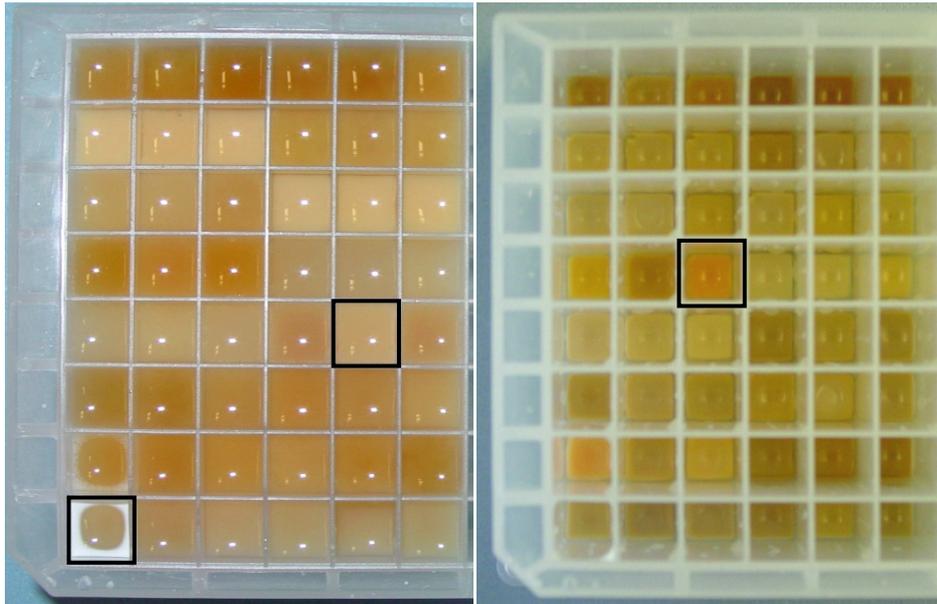


Abbildung 6.3: Zeitlicher Verlauf der BTM-Konzentration aller 15 Parallelansätze und des Referenzansatzes der 7. Generation  
 Die Verläufe geben die gemittelten Messwerte aller drei Reaktoren eines Ansatzes wieder. Je nach verwendeter Medienzusammensetzung und pH-Profil erreichen die Ansätze unterschiedliche Zellkonzentrationen am Ende der Kultivierung.

Der Einfluss des Mediums ist, wie in Abbildung 6.4 links gezeigt, auch bei den geernteten Zellsuspensionen und den Zellpellets nach der Abnahme des Überstandes optisch erkennbar. Hierbei können ein weiteres Mal Ausreißer eines Dreifachansatzes identifiziert werden. Als Kriterium dient die Farbe der Zellsuspensionen und -pellets und eine eventuelle Schaumbildung. Bei den betreffenden Ansätzen wurden dann nochmals die BTM- und  $pO_2$ -Verläufe sowie die Daten der pH-Regelung kontrolliert.



**Abbildung 6.4: Zellsuspensionen nach der Zellernte und Zellpellets nach der Abnahme des Überstands**

Die unterschiedlichen Medienzusammensetzungen machen sich in der Farbe der Zellsuspensionen und der Zellpellets bemerkbar. Ebenso sind Ausreißer (siehe Markierungen), das heißt im Vergleich zu den anderen Reaktoren eines Triplets abweichende Ansätze, anhand des unterschiedlichen Aussehens der Zellsuspension und der Farbe der Zellpellets zu identifizieren. Bei diesen Ansätzen müssen die während der Kultivierung aufgezeichneten Prozessdaten nochmals auf Auffälligkeiten hin untersucht werden und diese gegebenenfalls bei der Auswertung vernachlässigt werden.

Die Abbildung 6.4 rechts zeigt die Zellpellets nach der Abnahme des Überstandes. Hierbei ist der Einfluss der verschiedenen Medien noch stärker ersichtlich und äußert sich am auffälligsten in der Farbe. Während der Optimierung traten dabei Zellpellets auf, die von reinem weiß über intensiv orange-rot bis hin zu dunkelbraun variierten.

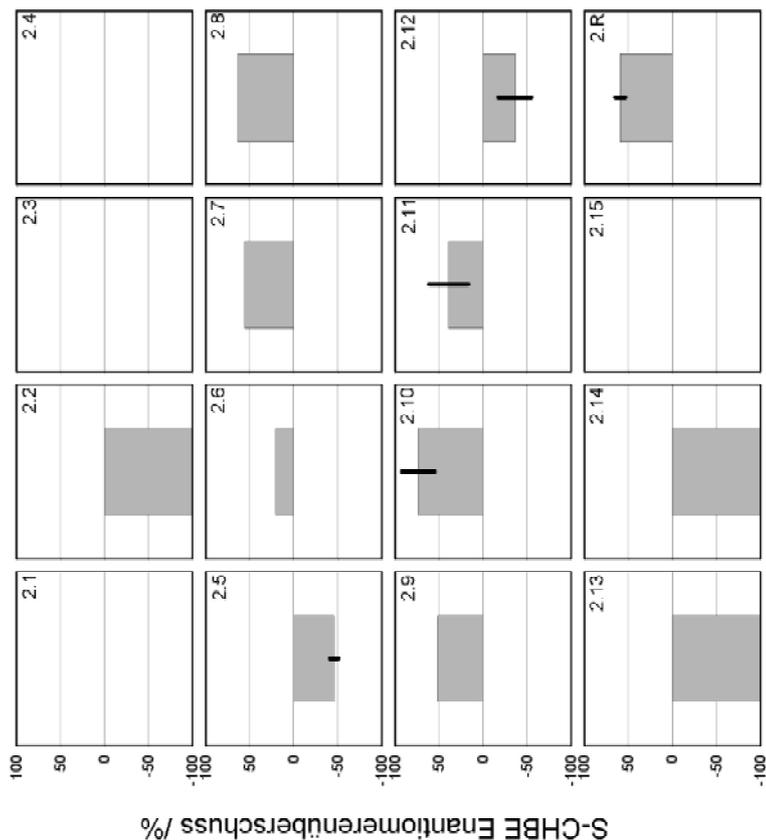
## 6.2 Parallele Biotransformation

Die ursprüngliche Idee, den gesamten Prozess voll zu automatisieren, ließ sich nicht gänzlich umsetzen. Die Vorbereitung der Biotransformation war trotz entsprechender Vorarbeiten nicht automatisierbar. Es scheiterte zum einen an der unterschiedlichen Konsistenz der Zellpellets nach dem Abzentrifugieren der geernteten Zellen. Die Pelletbeschaffenheit variierte von sehr festen nur sehr schlecht zu resuspendierenden Zellkuchen bis hin zu kaum sedimentierten Zellsuspensionen. Bei dieser Bandbreite lässt sich eine automatisierte Abnahme des Medienüberstands nicht bewerkstelligen. Zusätzlich ergeben sich aus unterschiedlichen Zellkonzentrationen dann differierende Volumina an Medienüberständen welche sich

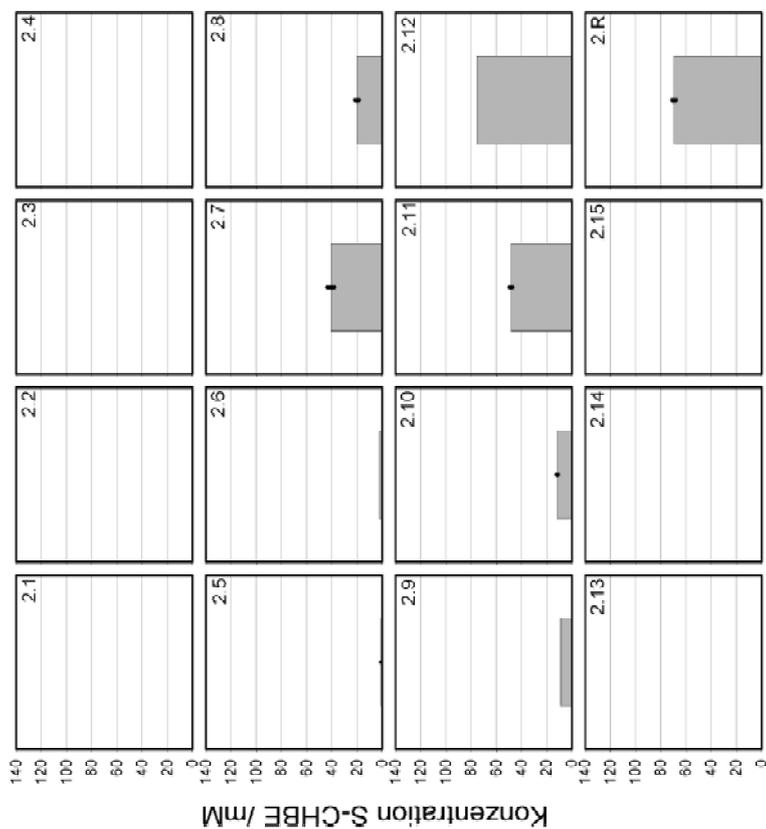
ebenfalls nicht automatisiert aufnehmen lassen. Aus diesen Gründen wurden die Überstände nach dem in Abschnitt 4.7 gezeigten standardisierten Verfahren manuell abgenommen. Ebenso scheiterte das automatisierte Resuspendieren der Zellpellets im Umsetzungsmedium. Dabei versucht der Pipettierroboter durch wiederholtes Aufnehmen und Abgeben der Flüssigkeit in der „Deep-Well“-Platte das Pellet aufzulösen und die Zellen zu resuspendieren was bei sehr kompakten Pellets nicht gelang. Daher musste auch dieser Schritt manuell nach Abschnitt 4.7 durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der Biotransformation wurden mittels chiraler Gaschromatographie ermittelt. Für alle Reaktoren wurden die Enantiomerenüberschüsse  $ee_{S-CHBE}$  berechnet und die Werte der Produktkonzentration  $c_{S-CHBE}$  und des  $ee_{S-CHBE}$  für die Reaktoren eines Dreifachansatzes gemittelt sowie die Standardabweichung errechnet. Einzelergebnisse, die mehr als die dreifache Standardabweichung vom Mittel abwichen, wurden als Ausreißer entfernt.

Die folgende Abbildung 6.6 zeigt die erzielten Produktkonzentrationen  $c_{S-CHBE}$  der 15 Ansätze der zweiten Generation zuzüglich der Referenz. In der Abbildung 6.5 ist der Enantiomerenüberschuss  $ee_{S-CHBE}$  der genannten Ansätze zu sehen. Bei den Balken sind, soweit das möglich war, die Standardabweichungen über alle drei Reaktoren eines Ansatzes eingezeichnet.



**Abbildung 6.5: Erzielter Enantiomerenüberschuss des S-CHBE nach der Biotransformation der 2. Generation**  
 Neben Ansätzen, die einen deutlich positiven  $ee_{S-CHBE}$  aufweisen, gibt es eine Anzahl Ansätze, die einen  $ee_{S-CHBE}$  von -100% haben. In diesen Fällen wurde lediglich R-CHBE, aber kein S-CHBE gebildet. Insbesondere der Ansatz 2.12 ist bemerkenswert, da er trotz gebildetem S-CHBE (siehe Abbildung 6.6) einen negativen  $ee_{S-CHBE}$  zeigt. Die Ursache liegt in einem leichten Überschuss an ebenfalls gebildetem R-CHBE.



**Abbildung 6.6: Erzielte Produktkonzentrationen an S-CHBE der 2. Generation nach der Biotransformation**  
 Die unterschiedlichen Ansätze haben zu verschiedenen erzielten Produktkonzentrationen an S-CHBE geführt. Ansätze ohne messbares S-CHBE haben entweder nur das R-Enantiomer gebildet oder aber keinerlei Umsatz erzeugt.

Nur wenige Ansätze haben zu einer nennenswerten Bildung von S-CHBE geführt. Die gebildeten Mengen liegen im Bereich dessen, was auch in der Referenz erzeugt werden kann. Einige Ansätze erreichen einen Enantiomerenüberschuss über 50% (Ansätze 2.7 – 2.10). Insbesondere die Ansätze 2.5 und 2.12 fallen auf, da sie trotz gebildetem S-CHBE einen negativen Enantiomerenüberschuss  $ee_{S-CHBE}$  haben.

In Abbildung 6.8 sind die erzielten Produktkonzentrationen  $c_{S-CHBE}$  aller Ansätze der siebten Generation zu sehen. In Abbildung 6.7 werden die dazugehörigen Enantiomerenüberschüsse  $ee_{S-CHBE}$  der 7. Generation gezeigt.

Die Anzahl der Ansätze, in denen 4Cl-ACE zu S-CHBE umgesetzt wurde beträgt 73%. Auffällig ist die Zunahme der Ansätze, in denen mehr S-CHBE produziert wurde als im Referenzansatz. Immerhin fünf der 15 Ansätze erreichen eine Produktkonzentration über 80 mM. Ebenso nimmt die Anzahl der Ansätze mit einem  $ee_{S-CHBE}$  über 50% um zwei auf sieben zu.

### 6.3 Ergebnis der Optimierung

Als Ausgangspunkt der Optimierung dienten die im Schüttelkolben mit CSL-Medium im Satzverfahren erzielten Ergebnisse von Engelking (2004). Diese Ergebnisse konnten im Schüttelkolben vollständig reproduziert werden (Daten hier nicht gezeigt). Der nächste Schritt bestand in einem Übergang vom Schüttelkolben in den gerührten Parallelbioreaktor. Zur Steigerung der erzielbaren Biotrockenmassekonzentrationen wurde die Glucosekonzentration wie bereits beschrieben von  $20 \text{ g l}^{-1}$  auf  $30 \text{ g l}^{-1}$  erhöht. Außerdem wurde statt des CSL-Mediums das nahezu identische CSP-Medium verwendet. Zunächst wurde der Prozess ohne pH-Regelung durchgeführt um einen Einfluss des Milliliter-Rührkesselbioreaktors zu identifizieren, danach wurde eine pH-Regelung auf pH 6,5 verwendet.

Der Übergang vom geschüttelten zum gerührten System führte auf Grund der erhöhten Glucosekonzentration zu einer erhöhten BTM und in der Folge auch zu einer erhöhten Produktkonzentration. Beide steigen durch die Einführung einer pH-Regelung bei sinkendem  $ee$  weiter an. Die Ergebnisse dieser Kultivierungen dienten nun als Ausgangsbasis der Optimierung.

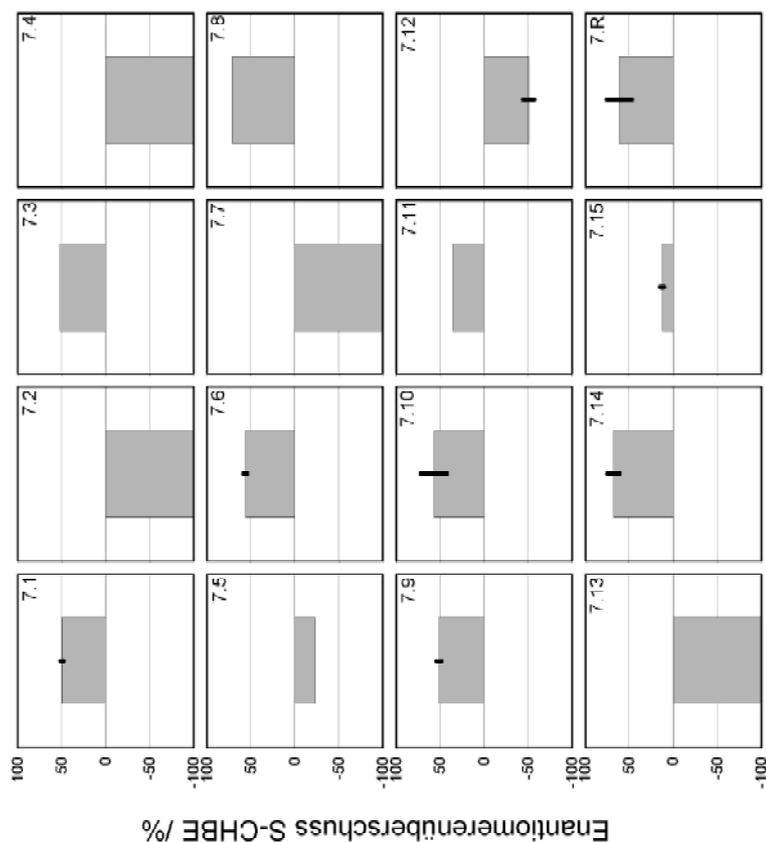


Abbildung 6.7: Erzielter Enantiomerenüberschuss des S-CHBE nach der Biotransformation der 7. Generation  
 Die Anzahl der Ansätze mit positivem  $ee_{S-CHBE}$  hat durch die Optimierung zugenommen. Dennoch gibt es Ansätze, die nur R-CHBE bilden und daher auch einen  $ee_{S-CHBE}$  von -100% aufweisen. In Ansatz 7.12 zeigt sich wie in Abbildung 6.5 zufällig wiederum das Verhalten, dass R-CHBE mit einem leichten Überschuss gebildet wird, wodurch sich ebenfalls ein negativer  $ee_{S-CHBE}$  ergibt.

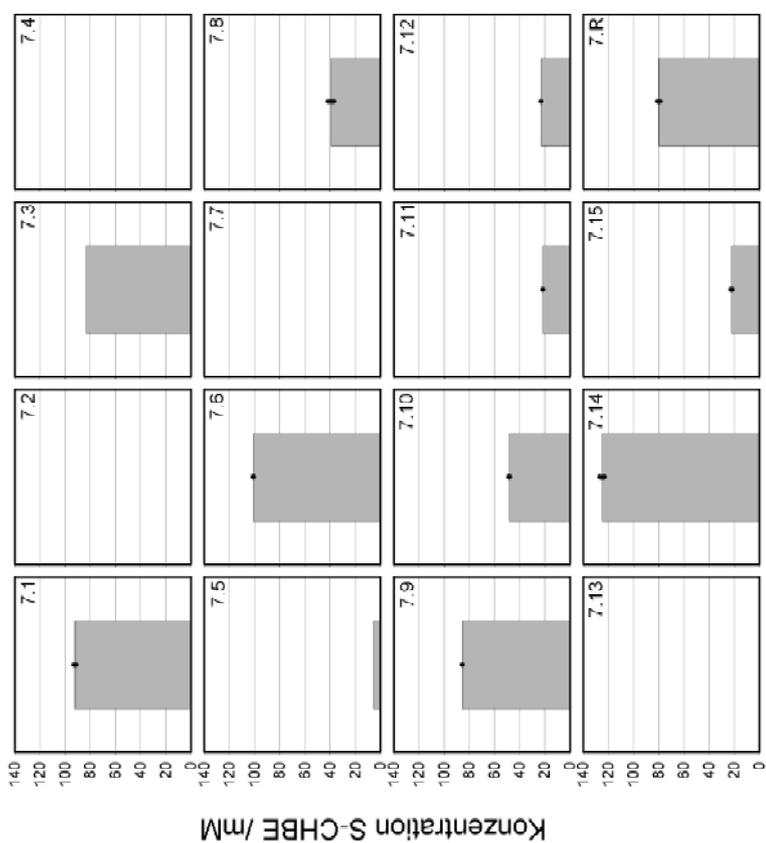


Abbildung 6.8: Erzielte Produktkonzentrationen an S-CHBE der 7. Generation nach der Biotransformation  
 Im Vergleich zur 2. Generation ist eine deutliche Steigerung an S-CHBE zu beobachten. Dennoch treten immer noch einzelne Ansätze auf, die in der Biotransformation kein S-CHBE gebildet haben.

**Tabelle 6.1: Vergleich der verschiedenen Kultivierungen als Ausgangslage der Optimierung**

**Die hier als Ausgangslage dienenden Kultivierungen im Satzverfahren wurden mit 48 identischen Ansätzen im Parallelbioreaktor durchgeführt.**

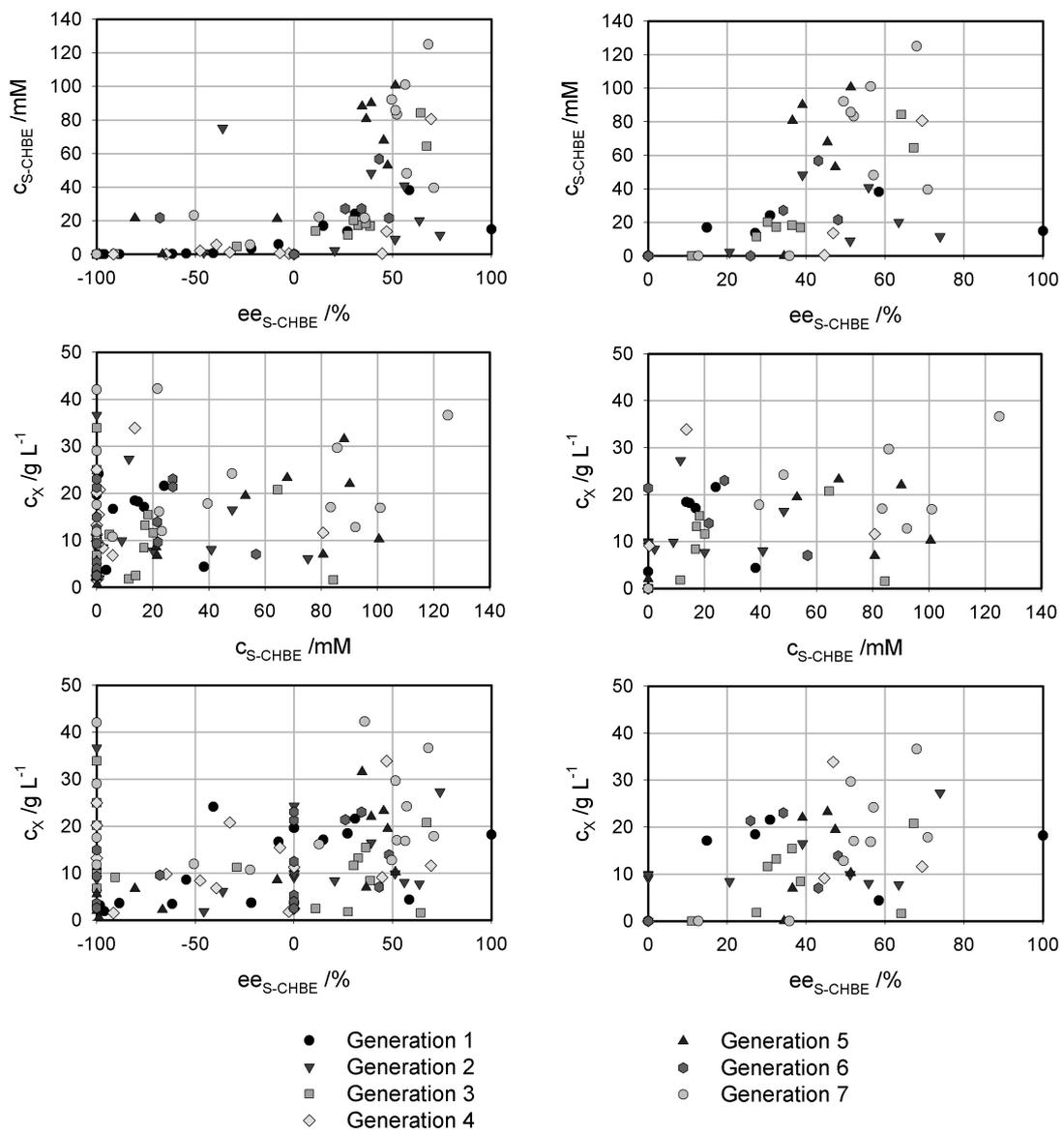
	Schüttelkolben (Engelking, 2004)	Satzverfahren ohne pH-Regelung	Satzverfahren mit pH-Regelung
maximale Biotrockenmasse- konzentration	14,4 g l <sup>-1</sup>	17,8 g l <sup>-1</sup>	20,6 g l <sup>-1</sup>
Enantiomerenüberschuss	82 – 84%	84,9%	67,8%
Produktkonzentration	24,5 mM	46,8 mM	90,5 mM

Die Prozessoptimierung mittels genetischem Algorithmus wurde über sieben Generationen durchgeführt. Die Biomassekonzentration  $c_X$ , die Produktkonzentration  $c_{S-CHBE}$  und der Enantiomerenüberschuss  $ee_{S-CHBE}$  stellten dabei die Zielgrößen dar und sollten maximiert werden.

Die Abbildung 6.9 zeigt alle Ergebnisse aller Generationen sowie die selektierten Ergebnisse zur Erzeugung neuer Generationen.

Die große Anzahl dargestellter Datenpunkte mit einem  $ee_{S-CHBE} \sim 100\%$  ist auf die Vielzahl von Biotransformationen zurückzuführen, bei denen ausschließlich R-CHBE bzw. eine sehr große Menge R-CHBE und nur sehr geringe Mengen an S-CHBE gebildet wurden.

Das Ergebnis zeigt, dass im Rahmen der Optimierung keine Medienzusammensetzung und Prozessbedingungen gefunden werden konnten, die alle drei Ziele gleichermaßen bevorzugt. So gab es einen Ansatz in Generation 1 (Ansatz 1.1) mit dem sehr hohen  $ee_{S-CHBE}$  von 100%. Dieser bringt jedoch eine niedrige Produkt- und Biomassekonzentration mit sich. Zudem konnte bei der Kultivierung in zwei der drei Reaktoren kein Wachstum beobachtet werden. Das Ergebnis bezieht sich also auf einen einzigen Milliliter-Bioreaktor. Auf der anderen Seite stehen Ansätze in Generation 7 (Ansätze 7.2 und 7.11), die über 42 g l<sup>-1</sup> Biotrockenmasse erreichen, jedoch kein (7.2) oder mit 21,6 mM nur sehr wenig S-CHBE produzieren (7.11). Die beiden letztgenannten wurden auf Grund ihrer sehr niedrigen Enantiomerenüberschüsse außerdem aussortiert. Der Ansatz 7.14 erzielte eine maximale Biomassekonzentration von 36,6 g l<sup>-1</sup> und die höchste Produktkonzentration von 125,1 mM S-CHBE, der Enantiomerenüberschuss betrug dabei jedoch lediglich 68,0%.



**Abbildung 6.9: Ergebnis aller im Rahmen der Optimierung durchgeführten experimentellen Untersuchungen**

In den linken drei Diagrammen sind alle Ergebnisse der Biokatalysatorherstellung und Biotransformation eingetragen. Sie enthalten damit auch beispielsweise negative  $ee_{S-CHBE}$ . In den rechten drei Diagrammen sind die Daten wiedergegeben, die als Eingangsgrößen für den genetischen Algorithmus zur Generierung der nächsten Generation dienen. Es ist schön zu sehen, wie mit dem Fortschreiten der Optimierung die Werte der Zielgrößen zunehmen.

**Tabelle 6.2: Zusammenfassung der Ergebnisse mit den höchsten Werten Biotrockenmassekonzentration  $C_{X,max}$ , Produktkonzentration  $C_{S-CHBE,max}$  und Enantiomerenüberschuss  $ee_{S-CHBE,max}$  im Vergleich zur Ausgangslage**

	Ausgangslage	Ansatz 1.1	Ansatz 7.11	Ansatz 7.14
		$ee_{S-CHBE,max}$	$C_{X,max}$	$C_{S-CHBE,max}$
Biotrockenmassekonzentration	20,6 g l <sup>-1</sup>	18,2 g l <sup>-1</sup>	42,2 g l <sup>-1</sup>	36,6 g l <sup>-1</sup>
Enantiomerenüberschuss	67,8%	100,0%	35,8%	68,0%
Produktkonzentration	90,5 mM	14,8 mM	21,7 mM	125,1 mM

Im Vergleich zur Ausgangsbasis konnte die Biotrockenmassekonzentration um 104,9%, der Enantiomerenüberschuss um 47,9% und die Produktkonzentration um 38,2% gesteigert werden.

Die Medienzusammensetzungen und pH, die zu  $C_{X,max}$ ,  $C_{S-CHBE,max}$  und  $ee_{S-CHBE,max}$  geführt haben sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

**Tabelle 6.3: Vergleich der Medienzusammensetzungen der Ansätze mit den maximalen Werten der Zielgrößen**

	Ansatz 1.1	Ansatz 7.11	Ansatz 7.14
	$ee_{S-CHBE,max}$	$C_{X,max}$	$C_{S-CHBE,max}$
Pepton /g l <sup>-1</sup>	9,7	21,0	21,0
Hefeextrakt /g l <sup>-1</sup>	14,5	37,1	37,1
CS-Pulver /g l <sup>-1</sup>	9,7	4,8	1,6
Phosphat /g l <sup>-1</sup>	3,9	3,9	3,9
Magnesium /g l <sup>-1</sup>	1,9	0,3	2,0
Kalium /g l <sup>-1</sup>	0,1	0,8	0,8
pH Kultivierung	6,6	6,0	6,0
pH Biotransformation	6,0	5,7	5,7

Alle drei Medien weisen einen Phosphatgehalt von 3,9 g l<sup>-1</sup> auf, der Kaliumgehalt liegt unter 1 g l<sup>-1</sup>. Ebenso ist allen drei Ansätzen eine Absenkung des pH nach der Biokatalysatorherstellung gemein. Bei beiden Ansätzen mit hoher Biotrockenmassekonzentration ist die Konzentration an Hefeextrakt und Pepton sehr hoch, die Konzentration an CS-Pulver dagegen vergleichsweise niedrig.

## 6.4 Maßstabsübertragung

Zur Validierung der Ergebnisse wurden der Ansatz 1.1 der ersten Generation mit einem  $ee_{S-CHBE,max}$  von 100% und der Ansatz 7.14 der siebten Generation mit einer

$C_{S-CHBE,max}$  von 125,1 mM direkt aus dem ml- in den Liter-Rührkesselbioreaktor übertragen.

Das Ergebnis der Maßstabsvergrößerung des Ansatzes 1.1 ist in Tabelle 6.4 im Vergleich der Daten des Milliliter-Ansatzes angegeben.

**Tabelle 6.4: Ergebnis der Maßstabsvergrößerung des Ansatzes 1.1**

	Parallelbioreaktor	Liter-Rührkesselbioreaktor
maximale Biotrockenmasse- konzentration	18,2 g l <sup>-1</sup>	21,2 g l <sup>-1</sup>
Produktkonzentration	14,8 mM	14,2 mM
Enantiomerenüberschuss	100,0%	63,8%

Das Ergebnis der Kultivierung im Milliliter-Rührkesselbioreaktor konnte im Liter-Rührkesselbioreaktor nicht reproduziert werden. Die erreichte Biotrockenmassekonzentration liegt etwas über der im Milliliter-Bioreaktor, die Produktkonzentration ist nahezu gleich. Der Enantiomerenüberschuss ist zwar im Vergleich zu anderen Ansätzen relativ hoch, erreicht jedoch bei weitem nicht 100%. Auch eine erneute Überprüfung im Parallelbioreaktor erbrachte kein besseres Ergebnis (Daten hier nicht gezeigt).

In Tabelle 6.5 ist das Ergebnis der Maßstabsübertragung des Ansatzes 7.14 im Vergleich zu den Daten des Milliliteransatzes aufgeführt.

**Tabelle 6.5: Ergebnis der Maßstabsvergrößerung des Ansatzes 7.14**

	Parallelbioreaktor	Liter-Rührkesselbioreaktor
maximale Biotrockenmasse- konzentration	36,6 g l <sup>-1</sup>	36,5 g l <sup>-1</sup>
Produktkonzentration	125,1 mM	150,6 mM
Enantiomerenüberschuss	68,0%	65,2 %

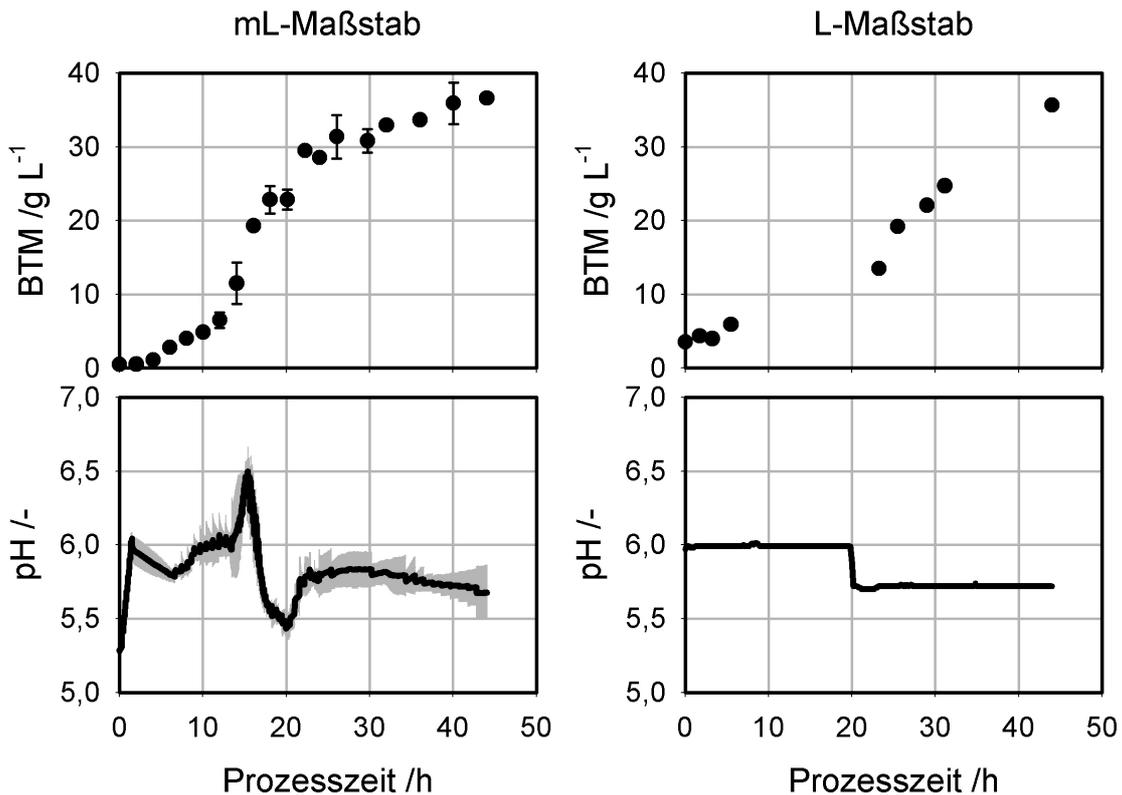
Das Ergebnis des Ansatzes 7.14 konnte im Litermaßstab reproduziert werden. Die erreichten Biotrockenmassekonzentrationen waren nahezu identisch. Die Produktkonzentration betrug 20,3% mehr, der Enantiomerenüberschuss dagegen 4,1% weniger.

Die Maßstabsübertragung des Ansatzes 7.14 soll im Folgenden detailliert betrachtet werden.

Zur Kultivierung im Liter-Rührkesselbioreaktor wurden die Konzentrationen der Medienbestandteile und die pH sowie die Prozesszeiten beibehalten und der pO<sub>2</sub> im

Reaktor über 30% Luftsättigung geregelt. Als Titrationsmittel kamen ebenfalls 5 M NaOH und 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zum Einsatz. Das Verhältnis Inokulum zu Arbeitsvolumen wurde ebenfalls bei konstanten 10,4% beibehalten wobei das anfängliche Arbeitsvolumen 23 L betrug.

Die Abbildung 6.10 zeigt den zeitlichen Verlauf der Biotrockenmasse-konzentration und des geregelten pH.



**Abbildung 6.10: Vergleich der Kultivierungen im Milliliter- und Liter-Rührkesselbioreaktor**  
 Beide Kultivierungen erreichen nach 44 – 45 Stunden eine maximale Biotrockenmasse-konzentration von 36 g l<sup>-1</sup>. In beiden Fällen wird der pH in den vorgegebenen Grenzen eingehalten.

In beiden Kultivierungen wird eine Biotrockenmassekonzentration von über 36 g l<sup>-1</sup> erreicht. Der pH wurde auf die vorgegebenen Sollwerte geregelt.

Die Biotransformation des Literprozesses wurde ebenfalls 1:1 im Maßstab vergrößert. Dabei kam ein Rührkesselreaktor im 400-Milliliter-Maßstab zum Einsatz. Im diesem vergrößerten Maßstab wurde ein Enantiomerenüberschuss von 65,2% bei einer Produktkonzentration von 150,6 mM erreicht.

## 6.5 Diskussion

Das Ziel der durchgeführten Arbeiten war eine Optimierung der Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 als Ganzzell-Biokatalysator zur enantioselektiven Reduktion von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethyl-ester (S-CHBE). Die Zielgrößen der mittels genetischem Algorithmus durchgeführten Optimierung waren die maximierte Biotrockenmassekonzentration  $c_X$  während der Biokatalysatorherstellung sowie die Produktkonzentration  $c_{S-CHBE}$  und der Enantiomerenüberschuss während der Biotransformation. Die dazu notwendigen experimentellen Untersuchungen wurden im Parallelansatz im Parallel-bioreaktor und in „Deep-Well“-Platten durchgeführt.

Nur das Produkt S-CHBE der Biotransformation kann als Intermediat zur Statin-Herstellung genutzt werden. Daher ist es für eine ökonomische industrielle Anwendung notwendig, das Produkt in möglichst reiner Form zu erhalten. Eine aufwändige Aufreinigung und Abtrennung des unerwünschten R-Enantiomers verursacht hierbei hohe Kosten. Das Hauptziel der Optimierung war es nun, einen maximalen Enantiomerenüberschuss an S-CHBE zu erreichen, im Idealfall also 100%. Daneben sind auch eine hohe Biotrockenmasse-konzentration bei der Anzucht des Biokatalysators und eine hohe Produktkonzentration bei der Biotransformation relevant, da beide die Kosten für das Endprodukt senken.

Das Idealziel der 100% Enantiomerenüberschuss an S-CHBE konnte nicht erreicht werden. Zwar gab es einen Ansatz in einem einzelnen Milliliter-Bioreaktor, der einen  $ee_{S-CHBE}$  von 100% erreichte, dieser lies sich jedoch nicht reproduzieren und muss daher als Einzelereignis angesehen werden. Die Ursachen, die zu einem Enantiomerenüberschuss von 100% führten konnten nicht ermittelt werden. Die mehrfach erreichbaren hohen Enantiomerenüberschüsse lagen im Bereich ab 60%, das Maximum lag bei 73,9%.

Eine Maximierung der Produktkonzentration konnte erlangt werden. Die maximale Produktkonzentration  $c_{S-CHBE}$  im Milliliter-Maßstab lag bei 125,1 mM. Bei einer eingesetzten Menge von 170 mM 4Cl-ACE bedeutet das eine Ausbeute von 73,6%. Im Litermaßstab konnte diese mit einer  $c_{S-CHBE}$  von 150,6 mM auf 88,6% gesteigert werden. Eine Ursache für die im Milliliter-Maßstab geringere Produktkonzentration könnte in der verwendeten Technik liegen. Die Biotransformationen fanden in verschlossenen „Deep-Well“-Platten statt. Diese bestehen aus hydrophobem Polypropylen beziehungsweise Polyethylen. Über die Interaktionen des schwer wasserlöslichen Edukts 4Cl-ACE und Produkts R/S-CHBE mit diesen Materialien ist

nichts bekannt. Eine Beeinflussung auf Grund des hydrophoben Charakters beider Stoffe ist nicht auszuschließen.

Der verwendete rek. *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 Stamm scheint generell nur bedingt für diese Art der Biotransformation geeignet zu sein. Seine ebenfalls vorhandenen zelleigenen Carbonylreduktasen (siehe 3.4.1) wirken sich negativ auf das Ergebnis der Biokatalyse aus. Allein fünf der acht bekannten Carbonylreduktasen bilden bevorzugt das R-Enantiomer. Wird nun die Fettsäuresynthase FasB nicht entsprechend massiv überexprimiert und die R-Enantiomer bildenden Carbonylreduktasen liegen in verhältnismäßig hohen Konzentrationen vor, wird eine nicht unerhebliche Menge R-CHBE gebildet. Die FasB scheint dann nicht in der Lage zu sein entsprechend mehr S-Enantiomer zu bilden um trotz des gebildeten R-Enantiomers einen hohen Enantiomerenüberschuss  $ee_{S-CHBE}$  zu erreichen.

Die Maximierung der Biotrockenmassekonzentration  $c_X$  gelang ebenfalls. Sie konnte von anfänglichen  $20,6 \text{ g l}^{-1}$  auf  $42,2 \text{ g l}^{-1}$  verdoppelt werden. Der Gehalt der komplexen organischen Mediumestandteile Pepton, Hefeextrakt und „Corn-Steep-Powder“ wurde dazu lediglich von insgesamt  $40 \text{ g l}^{-1}$  auf  $62,9 \text{ g l}^{-1}$  erhöht. Die vorgelegte Glucosekonzentration wurde mit  $30 \text{ g l}^{-1}$  beibehalten. Die Steigerung könnte daher ihre Ursache in der Prozessführung und Medienzusammensetzung haben. Allerdings muss beachtet werden, dass allein die Konzentration an Hefeextrakt, der eine nahezu optimale Wachstumsgrundlage für Hefen bildet, von  $10 \text{ g l}^{-1}$  auf  $37,1 \text{ g l}^{-1}$  erhöht wurde.

Die direkte Maßstabsübertragung von Prozessen im Milliliter-Bioreaktor in den Liter-Bioreaktor ist möglich. Der vollständige Prozess der Biokatalysatorherstellung und Biotransformation wurde in den Liter-Maßstab skaliert. Bei genauer Betrachtung ergibt der Vergleich der Prozessverläufe Unterschiede zwischen der Kultivierung im Milliliter-Maßstab und im Liter-Maßstab. So erfolgt das Wachstum der Zellen im Liter-Bioreaktor zeitlich um etwa acht Stunden verzögert zum Milliliter-Parallelreaktor. Am Ende liegt in beiden Fällen jedoch eine maximale Biotrockenmassekonzentration von gut  $36 \text{ g l}^{-1}$  vor. Eine Ursache dafür konnte nicht gefunden werden. In beiden Fällen wird der pH auf die beiden Sollwerte geregelt. Im Fall des Milliliter-Prozesses erfolgt dies mit einem Toleranzband von  $\pm 0,2 \text{ pH}$ , beim Literprozess mit  $\pm 0,01$  Einheiten. Im Parallelbioreaktor kommt es beim Wechsel des Sollwerts zu einer Übertitration mit Säure die sofort durch Basenzugabe korrigiert wird (siehe Abbildung 6.10).

Die Biotransformation im 400-Milliliterreaktor mit Biokatalysatoren aus dem Liter-Bioreaktor reproduzierte das Ergebnis der parallelen Biotransformation im Mikroliter-Maßstab ebenfalls. Der Enantiomerenüberschuss liegt etwas unter dem Wert des

Milliliter-Prozesses, dafür konnte die Produktkonzentration und damit auch die Produktbildungskapazität gesteigert werden. Die Abweichungen rühren am wahrscheinlichsten von systematischen Fehlern bei der Versuchsdurchführung her. So ist die Handhabung der verschiedenen Volumina der verwendeten Flüssigkeiten beim 400-Milliliterreaktor einfacher und genauer im Vergleich zum Mikroliter-Ansatz in der „Deep-Well“-Platte. Zusätzlich ändert sich das Verhältnis der freien Oberfläche in den jeweiligen Reaktoren zum Volumen der Biotransformationsansätze bei zunehmender Größe der Ansätze, gleichzeitig nimmt das Kopfraumvolumen ab. In der „Deep-Well“-Platte mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 1950  $\mu\text{l}$  befinden sich 500  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit, wobei gerade einmal 50  $\mu\text{l}$  organisches Lösungsmittel sind. Der Kopfraum hat in diesem Fall ein Volumen von 1450  $\mu\text{l}$ . Dadurch ist es denkbar, dass der Verdunstungsverlust an Lösungsmittel der organischen Phase so groß wird, dass es zu einer Beeinflussung der eigentlich zweiphasigen Biotransformation kommt.

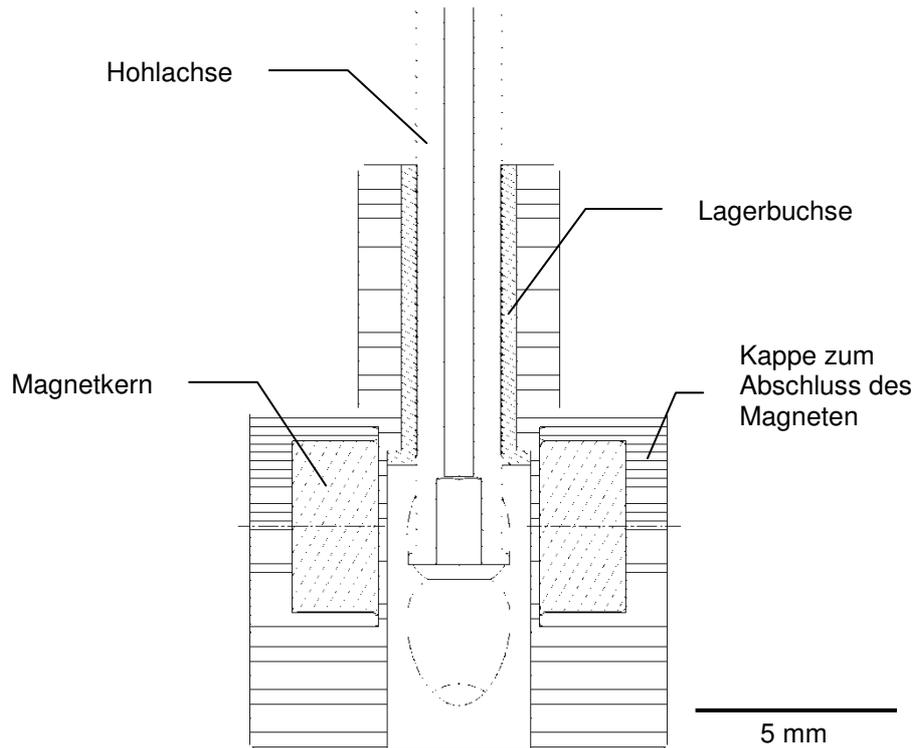
Alles in allem ist die mit Hilfe des parallelen Bioreaktorblocks durchgeführte Prozessoptimierung aus der Sicht der Technologie ein voller Erfolg. Die sieben Generationen wurden inklusive aller Arbeiten und Analytik von nur einem Experimentator in insgesamt 14 Wochen durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 105 verschiedene Medienkompositionen und Prozessbedingungen untersucht. Mit einem herkömmlichen kommerziell erhältlichen parallelen Laborbioreaktor hätten diese Arbeiten bei vergleichbarem personellem Aufwand mindestens 42 Wochen gedauert. Damit konnte gezeigt werden, dass der automatisierte Bioreaktorblock mit 48 parallelen Milliliter-Rührkesselbioreaktoren effizient für die Prozessentwicklung und Optimierung eingesetzt werden kann.



## 7 Zusammenfassung

Eine effiziente Bioprozessentwicklung und -optimierung benötigt geeignete Werkzeuge. Ein neues Werkzeug war ein Prototyp eines Bioreaktorblocks mit 48 magnetisch-induktiv angetriebenen Rührkesselbioreaktoren im Milliliter-Maßstab zur Kultivierung von Mikroorganismen unter technischen Prozessbedingungen (Puskeiler, 2004). Dieser Prototyp war jedoch für Bioprozessentwicklungen nur bedingt nutzbar (Ausfall der Rührorgane, Korrosion, keine *online* Messung und Kontrolle von pH und  $pO_2$  in 48 Parallelreaktoren sowie extreme Aerosolbildung). Zielsetzung dieser Arbeit war daher die reaktionstechnische Optimierung dieser Parallelreaktoren um zuverlässig kontrollierte Bioprozesse unter technischen Bedingungen durchführen zu können.

Als Ursache für den häufigen Rührerausfall wurden zum einen die nicht genügend temperaturstabilen und korrosionsbeständigen Dauermagnete in den Rührorganen identifiziert. Zum anderen führte der Verschleiß der Rührerlagerung auf der Hohlachse zu einem unzuverlässigen Gleitlauf des Rührers. Die bisherigen Magnetkerne verloren bei jedem zur Sterilisation notwendigen Autoklaviervorgang einen Teil ihrer Magnetisierung und wurden zunächst durch neue Dauermagnete aus Samarium-Kobalt  $Sm_5Co_{17}$  ersetzt. Dieses Magnetmaterial hat eine zulässige Dauereinsatztemperatur von 350 °C und ist daher unproblematisch. Die Korrosion der bisher offen liegenden Magnete wurde mit passgenauen Kappen verhindert. Diese wurden zusammen mit den Magneten in entsprechende Bohrungen des Rührorgans eingepresst und versiegeln die Magnete hermetisch (siehe Abbildung 7.1).



**Abbildung 7.1: modifizierter gasinduzierender Rührer mit Gleitlagerbuchse und gekapselten Magnetkernen**

Die Bohrung des Rührers zur Lagerung auf der Hohlachse unterlag durch die hohe Drehzahl von bis zu  $3000 \text{ U min}^{-1}$  und die lange Betriebsdauer einem starken Verschleiß. Durch die nur einseitige Lagerung und die Kraftübertragung vom magnetisch-induktiven Antrieb auf die Rührer unterhalb der Lagerung traten zusätzliche Beanspruchungen auf. Es wurde daher eine eigens konstruierte Lagerbuchse eingesetzt (siehe Abbildung 7.1). Diese wurde aus einem speziell für Gleitlager entwickelten Werkstoff (ZEDEX<sup>®</sup> ZX-530, PTFE mit eingelagerten Keramikpartikeln) gefertigt und in den Rührer eingepresst. Mit der neuen Lagerung konnte ein über mehr als 1000 Stunden ein zuverlässiger Lauf sichergestellt werden.

Alternativ dazu wurde ein neues Rührorgan entwickelt. Dieses verfügt über zwei Gleitlager und unterliegt somit nicht der zusätzlichen Beanspruchung. Außerdem wurde im Vergleich zum bisherigen Rührer die Geometrie des Gasauslasses verändert. Dadurch konnte die Sauerstoffeintragsleistung des Rührers um bis zu 100% verbessert werden. Beispielsweise sind volumetrische Stoffübergangskoeffizienten  $k_L a$  von bis zu  $0,48 \text{ s}^{-1}$  bei einer Drehzahl von  $3800 \text{ U min}^{-1}$  (nicht koaleszierendes newtonsches  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Medium) möglich.

Als Ursachen für die Korrosion der Sterilgasabdeckung wurden sowohl die mangelnde Korrosionsbeständigkeit von Aluminium gegenüber basischen Lösungen

als auch die Materialpaarung Aluminium und der darin eingeschraubten Hohlachsen aus Edelstahl identifiziert. Durch den Ersatz der bisherigen Verdrängungskörper aus Aluminium durch Einsätze aus Polyetheretherketon wurde zum einen das Problem der generellen Korrosion der medienberührten Teile umgangen und zum anderen die ungünstige Materialpaarung Aluminium-Edelstahl vermieden.

Zur Vermeidung der Aerosolfreisetzung wurde ein zusätzlicher Absaugdeckel entwickelt. Dieser ermöglicht auf einfache Weise die Absaugung der an jeder Reaktorauslassbohrung entweichenden Abluft. Zusätzlich wurde die Absaugvorrichtung aus Edelstahl gefertigt. Da diese auf der Sterilgasabdeckung aufgelegt wird, ist die korrosionsanfällige Oberseite der Sterilgasabdeckung geschützt.

Mit einer neuen parallelen optischen Sensorik konnten erfolgreich *online* Messungen des  $pO_2$  und des pH in allen 48 Reaktoren des Bioreaktorblocks realisiert werden. Die maximale Standardabweichung der Sauerstoffmessung während einer parallelen Kultivierung mit *Escherichia coli* in 48 Reaktoren unter identischen Prozessbedingungen betrug beispielsweise  $\pm 5,3\%$ . Die pH-Messung wies in diesem Fall eine maximale Standardabweichung von  $\pm 0,044$  pH im Bereich von pH 5,5 bis 8,5 auf.

Mit Hilfe dieser *online* pH-Messung wurde eine funktionierende pH-Regelung mehrerer Reaktoren beispielsweise bei parallelen Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae* ermöglicht. Hierzu wurde ein herkömmlicher PI-Regler mit zusätzlicher Stellgrößenbeschränkung, Toleranzband und „Anti-Windup“-Technologie verwendet. Diese pH-Regelung war in der Lage in parallelen Kultivierungen den pH entsprechend den individuellen Sollwerten der Ansätze exakt innerhalb des Toleranzbandes von  $\pm 0,2$  pH zu regeln.

Mit den neuen und verbesserten Komponenten des Bioreaktorblocks und der funktionierenden *online* pH- und *online*  $pO_2$ -Messung sowie der realisierten individuellen pH-Regelung wurde beispielhaft eine mehrstufige Prozessoptimierung durchgeführt. Der zu optimierende Prozess umfasste die Herstellung von rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6 als Biokatalysator für die in einem zweiten Schritt durchgeführte Biotransformation von 4-Chlor-Acetessigsäureethylester (4Cl-ACE) zu (S)-4-Chlor-3-Hydroxybuttersäureethyl-ester (S-CHBE). Die Ziele der Optimierung bestanden in der Maximierung der erreichbaren Biotrockenmassekonzentration  $c_X$  während der Biokatalysatorherstellung, sowie in einer Maximierung der erzielbaren Produktkonzentration  $c_{S-CHBE}$  und des Enantiomerenüberschusses  $ee_{S-CHBE}$  in der nachfolgenden Biotransformation. Die Optimierung wurde mit Hilfe eines genetischen Algorithmus zur experimentellen

Versuchsplanung in mehreren iterativen Stufen durchgeführt. 15 verschiedene Prozessbedingungen (Konzentration an Hefeextrakt, Pepton, „Corn-Steep-Powder“, Phosphat, Magnesium und Kalium im Medium sowie ein pH während der Biokatalysatoranzucht und ein pH zur Konditionierung vor der Biotransformation) wurden in jedem Parallelansatz variiert (dreifache Ansätze). Insgesamt konnten so in einem Zeitraum von nur 14 Wochen 105 verschiedene Medienkompositionen und Prozessbedingungen experimentell und teilautomatisiert untersucht werden.

Es zeigte sich, dass hohe Enantiomerenüberschüsse nur bei vergleichsweise niedrigen Biotrockenmasse- und Produktkonzentrationen erzielt werden konnten. Auf der anderen Seite wurden relativ hohe Konzentrationen an Biomasse und Produkt nur bei niedrigerem Enantiomerenüberschuss erreicht. Die Ergebnisse der Optimierung sind im Vergleich zur Ausgangslage in Tabelle 7.1 zusammengefasst. Die Übertragung der Reaktionsbedingungen zur Erzielung hoher Produktkonzentrationen vom 10 Millilitermaßstab in den 23 l Rührkesselreaktor gelang unmittelbar ( $c_X = 35,5 \text{ g l}^{-1}$ ,  $ee_{S\text{-CHBE}} = 65,2\%$ ). Die gewonnenen Biokatalysatoren setzen 4Cl-ACE zu einer Produktkonzentration von 150,6 mM S-CHBE um und übertrafen damit sogar den Milliliter-Maßstab.

**Tabelle 7.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der parallelen Optimierung im Vergleich zur Ausgangslage; die jeweils maximalen Ergebnisse sind unterlegt**

	Ausgangslage	Reaktionsbedingungen zur Erzeugung von		
		$ee_{S\text{-CHBE,max}}$	$c_{X,max}$	$c_{S\text{-CHBE,max}}$
Biotrockenmassekonzentration	20,6 g l <sup>-1</sup>	18,2 g l <sup>-1</sup>	<b>42,2 g l<sup>-1</sup></b>	36,6 g l <sup>-1</sup>
Enantiomerenüberschuss	67,8%	<b>100,0%</b>	35,8%	68,0%
Produktkonzentration	90,5 mM	14,8 mM	21,7 mM	<b>125,1 mM</b>

## 8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Prototyp des parallelen Milliliter-Bioreaktorblocks weiter entwickelt und beispielhaft für die Prozessentwicklung und -optimierung eingesetzt. Dabei haben sich jedoch noch weitere Möglichkeiten zur Optimierung gezeigt.

Generell wäre es wünschenswert auf Aluminium beim Bau des Bioreaktorblocks zu verzichten. Die starke Korrosionsneigung dieses Metalls stellt immer wieder ein Problem dar. Der Verzicht geht jedoch sicherlich mit weit reichenden konstruktiven Veränderungen einher.

Die diskontinuierliche Dosierung von pH-Korrekturmitteln und auch Nährlösung mittels eines Pipettierroboters kann nachteilig sein. Mittels einer zu entwickelnden Mikrodosiertechnik, die beispielsweise in die Sterilgasabdeckung integriert werden könnte, könnte es möglich sein, quasi-kontinuierlich zu dosieren. Damit würde auch die pH-Regelung erleichtert und ein Standard-PID-Regler würde für eine zufriedenstellende Regelung ausreichen. Zusätzlich würde eine eigene Mikrodosiertechnik den Pipettierroboter entlasten und somit Kapazität freigeben für die automatisierte Durchführung aufwändiger *atline*-Analytik. Andererseits könnte der Bioreaktorblock zusammen mit einer Mikrodosiertechnik alleine ohne einen Pipettierroboter betrieben werden. Das reduziert den finanziellen Aufwand bei der Anschaffung und würde einer Vermarktung der Technologie eventuell zusätzliche Absatzmöglichkeiten bieten. In diesem Fall müsste allerdings eine Methode für die einfache und sterile Probenahme entwickelt werden. Die gängige Methode mittels einer Handpipette ist bei 48 parallelen Reaktoren nur bedingt möglich.

Auch das Rührsystem des parallelen Bioreaktorblocks bietet die Möglichkeit für weitere Arbeiten. Das momentan verwendete Rührorgan ist auf die aerobe Kultivierung von Mikroorganismen mit hohem Sauerstoffbedarf ausgelegt. Daher leistet es auch einen vergleichsweise hohen Energieeintrag. Dadurch ist aber die Kultivierung von beispielsweise myzel- und pelletbildenden Organismen nur schwer

möglich, da diese bei zu hohem Leistungseintrag zerstört werden. Es müsste ein Rührorgan entwickelt werden, das die besonderen Bedürfnisse scherempfindlicher Mikroorganismen berücksichtigt.

Neben dem bereits genannten maßstabsverkleinerten Industrieprozess zur Riboflavinproduktion wurde erstmals eine Prozessoptimierung mit Hilfe des parallelen Bioreaktorblocks durchgeführt. Zur Demonstration der Möglichkeiten des Parallelbioreaktors sind jedoch dringend weitere Prozessentwicklungen und -optimierungen nötig. Nur durch den vielseitigen und intensiven Gebrauch können neue Informationen gewonnen und die Technik weiter verbessert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Möglichkeiten des parallelen Milliliter-Bioreaktorblocks schöpfen das Potential der Technologie sicherlich bei weitem noch nicht aus. Daher werden sich in der Zukunft noch vielfältige andere Einsatzmöglichkeiten finden lassen. Die Entwicklung gestaltet sich also weiterhin spannend.

## 9 Literaturverzeichnis

Alford, J. S. (2006): *Bioprocess control: Advances and challenges*. Computers & Chemical Engineering **30** (10-12): 1464–1475.

Araina, S., John, G. T., Krause, C., Gerlach, J., Wolfbeis, O.S., Klimant, I. (2006): *Characterization of microtiterplates with integrated optical sensors for oxygen and pH, and their applications to enzyme activity screening, respirometry, and toxicological assays*; Sensors and Actuators B: Chemical **113** (2): 639-648.

Bertau M. (2002): *How cell physiology affects enantioselectivity of the biotransformation of ethyl 4-chloro-acetoacetate with Saccharomyces cerevisiae*; Biocatalysis and Biotransformation **20** (5): 363-367.

Bertau M., Bürli M., Hungerbühler E. (1999): *Enantioselektive Synthesen im industriellen Maßstab*. Bio World **1/99**: 7-10.

Bertau, M. (2001): *Novel unusual microbial dehalogenation during enantioselective reduction of ethyl 4,4,4-trifluoro acetoacetate with baker's yeast*. Tetrahedron Letters **42**: 1267-1268.

Bertau, M., Scheller, D. (2003): *Equilibrium-dependent hydration of ethyl 4,4,4-trifluoro-acetoacetate in aqueous solutions and consequences for the whole-cell biotransformation with Saccharomyces cerevisiae*; Enzyme and Microbial Technology **32**: 491-497.

Betts, J. I., Baganz, F. (2006): *Miniature bioreactors: current practices and future opportunities*. Microbial Cell Factories **5** (1): 21–35.

Bruce, L. J., Daugulis, A. J. (1991): *Solvent Selection Strategies for Extractive Biocatalysis*; *Biotechnology Progress* **7**: 116-124.

Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C., Moreno-Sanchez, R. (2001): *Interactions of chromium with microorganisms and plants*. *FEMS Microbiology Reviews* **25** (3): 335–347.

Chênevert, R., Fortier, G., Rhalid, R. B. (1992): *Asymmetric Synthesis of Both Enantiomers of Fluoxetine via Microbial Reduction of Ethyl Benzoylacetate*; *Tetrahedron* **48**: 6769-6776.

Csuk, R., Glaenger, B. I. (1991): *Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry*. *Chemical Reviews* **91** (1): 49–97.

Davoli, P., Forni, A., Moretti, I., Prati, F., Torre, G. (1999): *I-(+) and (S)-(-) ethyl 4,4,4-trifluoro-3-hydroxy butanoate by enantioselective Baker's yeast reduction*; *Enzyme and Microbial Technology* **25**: 149-152.

DE102005049226A1 (2007): Probenahmesystem für fluide Proben.

DE19829657A1 (1999): *Verfahren und Vorrichtung zur Referenzierung von Fluoreszenzintensitätssignalen*.

DiMasi, J. A., Hansen, R. W., Grabowski, H. G. (2003): *The price of innovation: new estimates of drug development costs*. *Journal of Health Economics* **22** (2): 151-85.

*DIN 19226 1994-02: Leittechnik; Regelungstechnik und Steuerungstechnik*. Deutsches Institut für Normung e. V.

*DIN EN 10088 2005-09: Nichtrostende Stähle*. Deutsches Institut für Normung e. V.

*DIN EN ISO 8044 1999-11: Korrosion von Metallen und Legierungen – Grundbegriffe und Definitionen*. Deutsches Institut für Normung e. V.

Doig, S. D., Diep, A., Baganz, F. (2005): *Characterisation of a novel miniaturised bubble column bioreactor for high throughput cell cultivation*. *Biochemical Engineering Journal* **23**: 97–105.

Doig, S. D., Ortiz-Ochoa, K., Ward, J. M., Baganz, F. (2005): *Characterization of Oxygen Transfer in Miniature and Lab-Scale Bubble Column Bioreactors and Comparison of Microbial Growth Performance Based on Constant  $k_{La}$* . Biotechnology Progress **21**: 1175-1182.

Duetz, W. A., Witholt, B. (2004): *Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions*. Biochemical Engineering Journal **17** (3): 181–185.

Engelking, H. (2004): *Reaktionstechnische Untersuchungen zur asymmetrischen Reduktion von  $\beta$ -Ketoestern mit rekombinanten Hefen*. Dissertation. Technische Universität München.

European Hygienic Engineering & Design Group (2007): *Materials of construction for equipment in contact with food*. Trends in Food Science & Technology **18** (Supplement 1): 40-S50.

Giller, K. E., Witter, E., McGrath, S. P. (1998): *Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review*. Soil Biology and Biochemistry **30** (10-11): 1389–1414.

Gupta, P., Lee, K. H. (2007): *Genomics and proteomics in process development: opportunities and challenges*. Trends in Biotechnology **25** (7): 324-330.

Harms, P., Kostov, Y., French, A., Soliman, M., Anjanappa, M., Ram, A., Rao, G. (2005): *Design and Performance of a 24-Station High Throughput Microbioreactor*. Biotechnology and Bioengineering **93** (1): 6-13.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A. (1998): *Resistance of environmental bacteria to heavy metals*. Bioresource Technology **64** (1): 7–15.

Havelka, P., Moucha, T., Sinkule, J., Linek, V. (1998): *Chemical dynamic method for measuring  $k_{La}$  in gas-liquid dispersions*. Chemical Engineering Communications **168**: 97-110.

Heinzle, E., Biber, A., Eissen, M., Kholiq, M. A. (2006): *Bewertung biotechnologischer Prozesse in frühen Phasen der Entwicklung hinsichtlich Risiken bezüglich Ökologie, Sicherheit und Gesundheit*. Chemie Ingenieur Technik **78** (3): 301-305.

- Heinzle, E., Weirich, D., Brogli, F., Hoffmann, V. H., Koller, G., Verduyn, M., Hungerbühler, K. (1998): *Ecological and Economic Objective Functions for Screening in Integrated Development of Fine Chemical Processes. 1. Flexible and Expandable Framework Using Indices*. Industrial & Engineering Chemistry Research **37**: 3395-3407.
- Hermann, R., Lehmann, M., Buechs, J. (2003): *Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates*. Biotechnology and Bioengineering **81** (2): 178–186.
- Horn, M., Dourdoumas, N. (2004): *Regelungstechnik*. Pearson Studium. München.
- Huber, C., Klimant, I., Krause, C., Wolfbeis, O. S. (2001): *Dual lifetime referencing as applied to a chloride optical sensor*. Analytical Chemistry **73** (9): 2097–2103.
- Illmer, P., Erlebach, C. (2003): *Influence of Al on growth, cell size and content of intracellular water of Arthrobacter sp. PI/1-95*. Antonie van Leeuwenhoek **84** (3): 239–246.
- Informationsstelle Edelstahl Rostfrei (2005): *Edelstahl Rostfrei in Kontakt mit anderen Werkstoffen*. Merkblatt 829. 4. Überarbeitete und erweiterte Auflage.
- John, G. T., Klimant, I., Wittmann, Ch., Heinzle, E. (2003): *Integrated Optical Sensing of Dissolved Oxygen in Microtiter Plates: A Novel Tool for Microbial Cultivation*. Biotechnology and Bioengineering **81** (7): 829-836.
- Katsuki, T., Sharpless, K. B. (1980): *The first practical method for asymmetric epoxidation*. Journal of the American Chemical Society **102** (18): 5974-5976.
- Katz, M., Hahn-Hagerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. F. (2003): *Screening of two complementary collections of Saccharomyces cerevisiae to identify enzymes involved in stereo-selective reductions of specific carbonyl compounds: an alternative to protein purification*. Enzyme and Microbial Technology **33** (2-3): 163–172.
- Kawamoto, T.; Kanda, T.; Tanaka, A. (2001): *Preparation of an organic solvent-tolerant strain from baker's yeast*; Applied Microbiology Biotechnology **55**: 476-479.

Kensy, F., John, G. T., Hofmann, B., Büchs, J. (2005): *Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **75**: 75-81.

Kensy, F., Zimmermann, H. F., Knabben, I., Anderlei, T., Trauthwein, H., Dingerdissen, U., Buechs, J. (2005): *Oxygen transfer phenomena in 48-well microtiter plates: Determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth*. *Biotechnology and Bioengineering* **89** (6): 698–708.

Kholiq, M. A., Heinzle, E. (2006): *Prozessmodellierung und Nachhaltigkeitsbewertung einer Ganzzellbiotransformation im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Wasser*. *Chemie Ingenieur Technik* **78** (3): 307-316

Knorr B., Schlieker H., Hohmann H-P., Weuster-Botz D. (2007): *Scale-down and parallel operation 139ft he riboflavin production process with Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal* **33**: 263-274.

Knorr, B. (2005): *Scale-down and parallel operation of a riboflavin production process with Bacillus subtilis*. Dissertation. Technische Universität München.

Knowles, W. S., Sabacky, M. J. (1968): *Catalytic asymmetric hydrogenation employing a soluble, optically active, rhodium complex*. *Chemical Communications* **22**: 1445.

Komanduri, R., Hou, Z. (2001): *A review of the experimental techniques for the measurement of heat and temperatures generated in some manufacturing processes and tribology*. *Tribology International* **34** (10): 653–682.

Kostov, Y., Harms, P., Randers-Eichhorn, L., Rao, G. (2001): *Low-Cost Microbioreactor for High-Throughput Bioprocessing*. *Biotechnology and Bioengineering* **72** (3): 346-352.

Kumar, S., Wittmann, C., Heinzle, E. (2004): *Review: Minibioreactors*. *Biotechnology Letters* **26** (1): 1–10.

Leon, R., Fernandes, P., Pinheiro, H., Cabral, J. (1998): *Whole-cell biocatalysis in organic media*. *Enzyme and Microbial Technology* **23** (7-8): 483–500.

Liebsch, G., Klimant, I., Krause, C., Wolfbeis, O. S. (2001): *Fluorescent imaging of pH with optical sensors using time domain dual lifetime referencing*. Analytical Chemistry **73** (17): 4354–4363.

Liese, A., Filho, M. V. (1999): *Production of fine chemicals using biocatalysis*. Current Opinion in Biotechnology **10** (6): 595-603.

Linek, V., Vacek, V., Benes, P. (1987): *A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen-transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte-solutions and viscous liquids*. The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal **34** (1): 11-34.

Link, H., Weuster-Botz, D. (2006): *Genetic algorithm for multi-objective experimental optimization*. Bioprocess and Biosystems Engineering **29** (5): 385-390.

Lord, P. G., Wheals, A. E. (1981): *Variability in individual cell cycles of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Cell Science **50**: 361–376.

Lunze, J. (2006): *Regelungstechnik 1*. 5. neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

Lynen, F. (1969): *[3] Yeast fatty acid synthase*. In: John M. Lowenstein. Methods in Enzymology : Lipids. 17–33. Academic Press.

Maharbiz, M. M., Holtz, W. J., Howe, R. T., Keasling, J. D. (2004): *Microbioreactor Arrays With Parametric Control for High-Throughput Experimentation*. Biotechnology and Bioengineering **85** (4): 376-381.

Mayr, T., Klimant, I., Wolfbeis, O. S., Werner, T. (2002): *Dual lifetime referenced optical sensor membrane for the determination of copper(II) ions*. Analytica Chimica Acta **462** (1): 1–10.

Micheletti, M., Lye, G. J. (2006): *Microscale bioprocess optimisation*. Current Opinion in Biotechnology **17**: 611–618.

Miyashita, A., Yasuda, A., Takaya, H., Toriumi, K., Ito, T., Souchi, T., Noyori, R. (1980): *Synthesis of 2,2'-bis(diphenylphosphino)<sup>-1</sup>,1'-binaphthyl (BINAP), an atropisomeric chiral bis(triaryl)phosphine, and its use in the rhodium(I)-catalyzed asymmetric hydrogenation of .alpha.-(acylamino)acrylic acids.* Journal of the American Chemical Society **102** (27): 7932-7934.

Mori, K. (1989): *Synthesis of optically active pheromones;* Tetrahedron **45**: 3233-3298.

Nakamura, K., Kawai, Y., Nakajima, N. Ohno, A. (1991): *Stereochemical Control of Microbial Reduction. 17. A Method for Controlling the Enantioselectivity of Reductions with Bakers' Yeast;* Journal of Organic Chemistry **56**: 4778-4783.

Oguni, N., Ohkawa, Y. (1988): *Complete stereoselective synthesis of chiral intermediates for thienamycin and related antibiotics;* Journal of the Chemical Society, Chemical Communications **20**: 1376-1377.

Olfert, K. (2001): *Kostenrechnung. 12. Aktualisierte und durchges. Auflage.* Kiehl. Ludwigshafen.

Pavlou, A. K., Reichert, J. M. (2004): *Recombinant protein therapeutics – success rates, market trends and values to 2010.* Nature Biotechnology, **22**: 1513-1519.

Pavlou, A. K., Reichert, J. M. (2004): *Recombinant protein therapeutics – success rates, market trends and values to 2010;* Nature Biotechnology **22**: 1513-1519.

Pavlov, V. A., Starodubtseva, E. V., Vinogradov, M. G., Ferapontov, V. A., Malyshev, O. R., Heise, G. L. (2000): *Enantioselective hydrogenation of  $\beta$ -keto esters catalyzed by chiral binaphthylbisphosphine ruthenium complexes;* Russian Chemical Bulletin **49** (4): 728-731.

Pereira, R. S. (1998): *The Use of Baker's Yeast in the Generation of Asymmetric Centers to Produce Chiral Drugs and Other Compounds.* Critical Reviews in Biotechnology **18**: 25-64.

Pfaller, M. (2004): persönliche Mitteilung.

- Pfründer, H. (2005): *Ganzzell-Biokatalyse in Gegenwart ionischer Flüssigkeiten*. Dissertation. Technische Universität München.
- Phue, J.-N., Shiloach, J. (2005): *Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of E. coli BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions*. *Metabolic Engineering* **7** (5): 353–363.
- Pignatti, F., Aronsson, B., Gate, N., Vamvakas, S., Wade, G., Moulon, I., Le Courtois, P. (2002): *The review of drug applications submitted to the European Medicines Evaluation Agency: frequently raised objections, and outcome*. *European Journal of Clinical Pharmacology* **58**: 573–580.
- Piña, R. G., Cervantes, C. (1996): *Microbial interactions with aluminium*. *BioMetals* **9** (3): 311–316.
- Puskeiler, R. (2004): *Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung*. Dissertation. Technische Universität München.
- Puskeiler, R., Kaufmann, K., Weuster-Botz, D. (2005a): *Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD)*. *Biotechnology and Bioengineering* **89** (5): 512–523.
- Puskeiler, R., Kusterer, A., John, G. T., Weuster-Botz, D. (2005b): *Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **42** (3): 227–235.
- Reichert, J. M. (2006): *Trends in US approvals: new biopharmaceuticals and vaccines*. *Trends in Biotechnology* **24** (7): 293-298.
- Reuter, M., Zacher, S. (2004): *Regelungstechnik für Ingenieure*. 11. Korrigierte Auflage. Vieweg & Sohn Verlag. Wiesbaden.
- Riedel, E. (1994): *Anorganische Chemie*. 3. Verbesserte Auflage. De Gruyter. Berlin.

Rissom S., Beliczey J., Giffels G., Kragl U., Wandrey C. (1999): *Asymmetric reduction of acetophenone in membrane reactors: comparison of oxazaborolidine and alcohol dehydrogenase catalyzed process*; Tetrahedron: Asymmetry **10**: 923-928.

Rozell, J. D. (1999): *Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities*. Bioorganic & Medicinal Chemistry **7** (10): 2253 – 2261.

Rupes, I. (2002): *Checking cell size in yeast*. Trends in Genetics **18** (9): 479–485.

Salter, G. J.; Kell, D. B. (1995): *Solvent Selection for Whole Cell Biotransformations in Organic Media*; Critical Reviews in Biotechnology **15**: 139-177.

Schmidt, M. (2006): *Der Einsatz von Sankey-Diagrammen im Stoffstrommanagement*. Beiträge der Hochschule Pforzheim Nr. 124.

Seebach D., Bachmann B. M. (1998): *Synthesis and structure of linear and cyclic oligomers of 3-hydroxybutanoic acid with specific sequences of (R)- and (S)-configurations*; Helvetica Chimica Acta **81**: 2430-2445.

Shieh, W.-R., Gopalan, A. S., Sih, C. J. (1985): *Stereochemical Control of Yeast Reductions. 5. Characterization of the Oxidoreductases Involved in the Reduction of  $\beta$ -Keto Esters*; Journal of the American Chemical Society **107**: 2993-2994.

Shimizu, K. (1993): *An Overview on the Control System Design of Bioreactors*. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Vol. 50: Measurement and Control. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

Shimizu, S., Kataoka, M., Kato, M., Morikawa, T., Miyoshi, T., Yamada, H. (1990): *Stereoselective Reduction of Ethyl 4-Chloro-3-Oxobutanoate by a Microbial Aldehyde Reductase in an Organic Solvent-Water Biphasic System*. Applied and Environmental Microbiology **56** (8): 2374–2377.

Spähn, H., Fäßler, K. (1966): *Kontaktkorrosion. Grundlagen – Auswirkung – Verhütung*. Materials and Corrosion/Werkstoffe und Korrosion **17** (4): 321–331.

- Sybesma, W. F. H., Straathof, A. J. J., Jongejan, J. A. (1998): *Reductions of 3-oxo esters by Baker's Yeast: Current Status*; Biocatalysis and Biotransformation **1**: 95-134.
- Szita, N., Boccazzi, P., Zhang, Z., Boyle, P., Sinskey, A. J., Jensen, K. F. (2005): *Development of a multiplexed microbioreactor system for high-throughput Bioprocessing*. Lab on a Chip **5**: 819–826.
- Tang, Y. J., Laidlaw, D., Gani, K., Keasling, J. D. (2006): *Evaluation of the Effects of Various Culture Conditions on Cr(VI) Reduction by Shewanella oneidensis MR-1 in a Novel High-Throughput Mini-Bioreactor*. Biotechnology and Bioengineering **95** (1): 176-184.
- Umweltbundesamt (2000): *Handreichung Bewertung in Ökobilanzen*. Hintergrundpapier. Umweltbundesamt. Berlin.
- van Walle, M. de , Shiloach, J. (1998): *Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant Escherichia coli strains during high density fermentation*. Biotechnology and Bioengineering **57** (1): 71–78.
- Weng, Z., de Lisi, C. (2002): *Protein therapeutics: promises and challenges for the 21st century*. Trends in Biotechnology **20** (1): 29-35.
- Weuster-Botz, D. (2000): *Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search?* Journal of Bioscience and Bioengineering **90** (5): 473-483.
- Weuster-Botz, D., Puskeiler, R., Kusterer, A., Kaufmann, K., John, G. T., Arnold, M. (2005): *Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design*. Bioprocess and Biosystems Engineering **28** (2): 109–119.
- Wheals, A. E. (1982): *Size control models of Saccharomyces cerevisiae cell proliferation*. Molecular and Cellular Biology **2** (4): 361–368.
- Zhang, Z., Boccazzi, P., Choi, H.-G., Perozziello, G., Sinskey, A. J., Jensen, K. F. (2006): *Microchemostat—microbial continuous culture in a polymer-based, instrumented microbioreactor*. Lab on a Chip **6**: 906–913.

Zhou, B., Gopalan, A. S., VanMidlesworth, F., Shieh, W.-R., Sih, C. J. (1983): *Stereochemical Control of Yeast Reductions. 1. Asymmetric Synthesis of L-Carnitin*; Journal of the American Chemical Society **105**: 5925-5926.

Zitzler, E., Thiele, L. (1999): *Multiobjective evolutionary algorithms: a comparative case study and the strength Pareto approach*. IEEE Transactions on Evolutionary Computation **3**: 257–271.



## 10 Anhang A – Bilanzierung und Bewertung biotechnologischer Prozesse

Neue Prozesse stehen immer in Konkurrenz zu bereits etablierten. Sie müssen sich daher an den bereits bestehenden Prozessen messen lassen. Besonders relevant sind dabei die Wirtschaftlichkeit und die ökologischen Auswirkungen neuer Prozesse. Für den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Prozess zur biokatalytischen Reduktion von 4CI-ACE zu S-CHBE wurde eine vergleichende ökonomische Bilanzierung und ökologische Bewertung mit insgesamt drei konkurrierenden Prozessen durchgeführt. Für die Ganzzell-Biotransformationen wurden dabei *Saccharomyces cerevisiae* FasB His6, *Lactobacillus kefir* (Wildtyp) und ein rekombinanter *Escherichia coli* verwendet.

Die ökonomische und ökologische Bilanzierung wurde mit der Software Sabento<sup>®</sup> (ifu Hamburg, Hamburg) durchgeführt. Die ursprünglich zur Verfügung stehende Version der Software konnte nur einfache einstufige Prozesse im Satzverfahren und ohne Aufarbeitung modellieren. Daher wurde durch die ifu Hamburg eine speziell an die Anforderungen des hier betrachteten Prozesses angepasste Version zur Verfügung gestellt. In ihr ist ein eigenes Modul „Aufarbeitung“ enthalten. Dieses umfasst neben einer einfachen Aufarbeitung die gesamte Biotransformation inklusive der notwendigen Vorbereitung nach der Biokatalysatorherstellung.

Die zugrunde liegende Datenbasis zur Modellierung und Bewertung der drei Prozesse mit rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus kefir* und rekombinanten *Escherichia coli* ist in 10.3 aufgelistet.

### 10.1 Theorie der ökonomischen und ökologischen Bilanzierung

Im allgemeinen Sprachgebrauch ist eine Bilanz die finanztechnische Gegenüberstellung von Kapital und Vermögen eines Unternehmens. Bilanzen spielen aber auch in vielen Bereichen von Wissenschaft und Forschung eine wichtige

Rolle. Es ist beispielsweise oft die Rede von Stoff- und Energiebilanzen in der Verfahrenstechnik, Kraftwerkstechnik und auch in der Mikrobiologie. Eine Bilanz gibt für ein fest umrissenes, klar definiertes System Aufschluss über die Quelle und den Verbleib betrachteter Ströme. Im Fall einer ökonomischen Bilanz handelt es sich hierbei um Geld. Die ökologische Bilanzierung und damit auch die Bewertung gestaltet sich hingegen schwieriger und soll im Folgenden näher erläutert werden. Da die im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Bilanzierungen mit Hilfe der Software Sabento<sup>®</sup> (ifu Hamburg, Hamburg) erstellt wurden, orientiert sich die theoretische Beschreibung auf die dabei verwendeten Bestandteile.

### 10.1.1 Ökonomische Bilanzierung

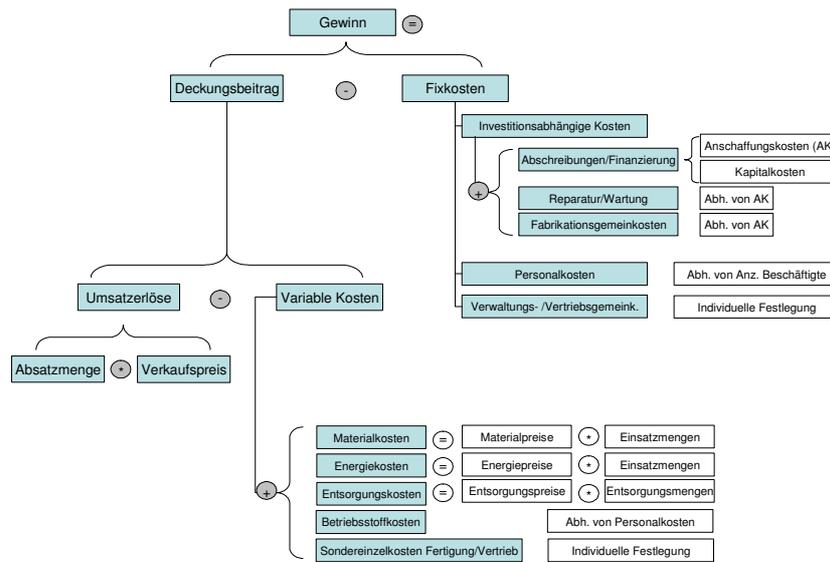
Die hier behandelte ökonomische Bilanzierung hat zum Ziel einen biotechnologischen Prozess von kaufmännischer Seite bewertbar zu machen. Dazu bedient sie sich verschiedener Ergebnis- und Renditekennziffern:

**Tabelle 10.1: Aufstellung der in Sabento<sup>®</sup> verwendeten Kennziffern  
(Definitionen nach Olfert (2001))**

Kennziffer	Definition
Deckungsbeitrag	um die variablen Kosten reduzierter Umsatz zur Deckung der Fixkosten
Gewinn	auf einen Zeitraum bezogener Überschuss Erfolg = Erträge – Aufwendungen
fixe Kosten	zeitabhängige und beschäftigungsunabhängige Kosten
variable Kosten	beschäftigungsabhängige Kosten
Kapitalrendite	$\frac{\text{Gewinn}}{\text{Kabitalbasis}} \cdot 100\%$
Amortisationszeit	$\frac{\text{Anschaffungskosten}}{\text{period. Kosten d. Ansch.} + \text{durchschn. Gewinn}}$
Umsatzrendite	$\frac{\text{Gewinn}}{\text{Umsatz}} \cdot 100\%$

Der finanzielle Gewinn eines biotechnologischen Prozesses wird nach dem in Abbildung 10.1 gezeigten Schema berechnet.

Wie aus Abbildung 10.1 ersichtlich ist, fließen in die Bilanzierung neben den variablen Kosten, die direkt durch die Herstellung des Produkts entstehen, auch die Fixkosten mit ein. Die variablen Kosten schließen neben den reinen Kosten für die Edukte und die aufzuwendende Energie auch Kosten für die Entsorgung mit ein. Die fixen Kosten erstrecken sich hauptsächlich auf investitionsabhängige Kosten für Apparate und Anlagen sowie Personalkosten.



**Abbildung 10.1: Berechnungsschema des Gewinns eines bilanzierten Prozesses**

Das Kostenrechnungssystem ist einem Bericht zur ökonomischen Bilanzierung der Software Sabento<sup>®</sup> entnommen und gibt das Ablaufschema zur Ermittlung des Gewinns wieder.

Da Details über viele dieser Kosten für den Einzelnen nicht oder nur sehr schwer zu beschaffen sind, wurden diese in Sabento<sup>®</sup> sinnvoll vorbelegt. So wird beispielsweise der Bedarf an Dampf für den Betrieb eines Bioreaktors, und damit die Kosten, in Abhängigkeit der Reaktorgröße automatisch berechnet.

### 10.1.2 Ökologische Bilanzierung

Die ökologische Bilanzierung stellt sich als schwierigeres und weitreichenderes Problem dar als die ökonomische Bilanzierung. Es gibt keine klaren Systemgrenzen, an denen ein- und ausgehende Ströme betrachtet werden können. Stattdessen müssen die Interaktionen eines Prozesses und seiner Stoffe mit ihrer Umwelt für die Bewertung herangezogen werden (Heinzle *et al.*, 2006; Kholiq und Heinzle, 2006). Dazu werden sogenannte Umweltkennzahlen bzw. Umweltbewertungszahlen errechnet. Diese stellen eine Normierung von Wirkungsindikatoren dar und lassen somit eine Rangbildung zu (Kholiq und Heinzle, 2006; Umweltbundesamt, 2000).

Die Umweltkennzahl UK eines Prozesses wird wie folgt berechnet:

$$UK = \frac{\sum_1^j \sum_1^i K_j \cdot WF_{i,j} \cdot MI_i}{\sum_1^j K_j} \quad (10-1)$$

Dabei bezieht sich der Index  $i$  immer auf einen bestimmten Stoff, der Index  $j$  beschreibt jeweils eine Wirkungskategorie der Stoffe. Die einzelnen Kategorien werden untereinander durch die Wichtungsfaktoren  $K_j$  der jeweiligen Kategorie gewichtet.

Die Umweltkennzahl eines einzelnen Stoffes berechnet sich folglich nach:

$$UK_i = \frac{\sum_1^j K_j \cdot WF_{i,j}}{\sum_1^j K_j} \cdot MI_i \quad (10-2)$$

Jeder einzelne Stoff  $i$  in der Stoffbilanz eines Prozesses führt zu einem Materialindex  $MI_i$  der den Anteil des jeweiligen Massenstroms  $m_i$  am Produktmassenstrom  $m_P$  wiedergibt:

$$MI_i = \frac{m_i}{m_P} \quad (10-3)$$

Die Summe aller Materialindices  $MI_i$  ergibt den Massenindex  $MI$  des Prozesses:

$$MI = 1 + \sum_1^i MI_i \quad (10-4)$$

Der letzte Parameter ist der Wichtungsfaktor  $WF_{i,j}$  der sich aus der ABC-Klassifizierung eines Stoffes in einer Wirkungskategorie  $j$  ergibt:

$$WF_{i,j} = B^a \quad (10-5)$$

Dabei ist die Basis  $B$  meist 10 (Standard) und der Exponent  $a$  wird entsprechend der Klassenzuordnung gewählt:

Klasse	a
A	2
B	1
C	0

Die ABC-Klassifizierung erfolgt nach einem Vorschlag von Heinzle *et al.* (1998). In einer jeweiligen Wirkungskategorie wie z.B. Treibhauseffekt oder

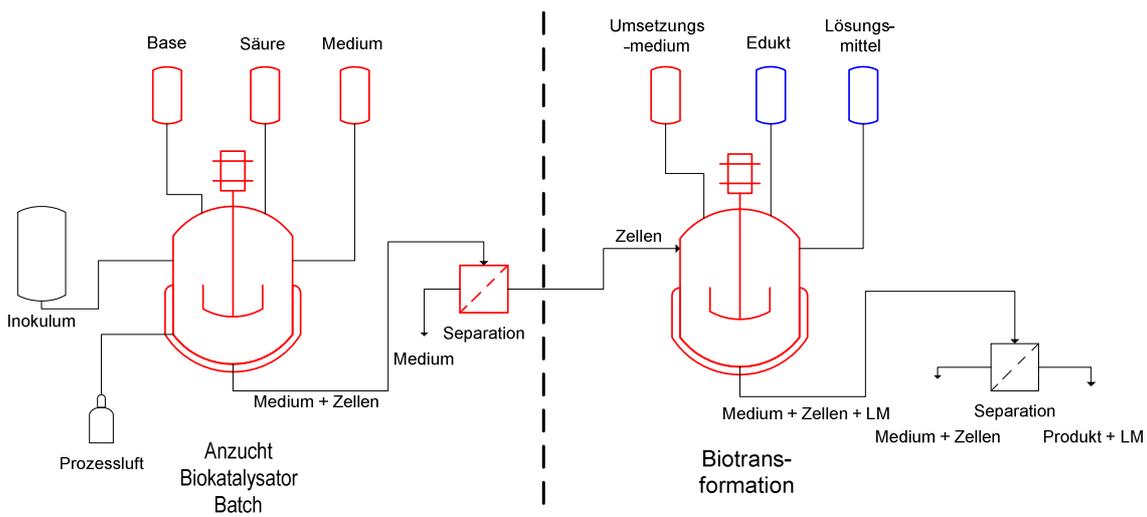
Wassereutrophierung wird ein Stoff in einer Klasse A, B oder C entsprechend einer hohen, mittleren oder niedrigen Relevanz zugeordnet.

Für alle an einem Prozess beteiligten Stoffe und den gesamten Prozess werden nun alle Indizes und Kennzahlen berechnet. Über diese Kennzahlen, hauptsächlich die Umweltkennzahl des Gesamtprozesses, ist nun ein Vergleich mit anderen konkurrierenden Prozessen möglich. Dabei ist eine möglichst kleine Kennzahl erstrebenswert, da eine niedrige Umweltkennzahl auf ein niedriges Umweltwirkunspotenzial schließen lässt.

## 10.2 Ökonomische und ökologische Bilanzierung

Das Produkt des vorliegenden zu optimierenden Prozesses ist S-CHBE. Es wird, als Ausgangsstoff bei der Herstellung von Cholesterinsenkern, in großem Maßstab auf klassischem kombinatorisch-chemischem Weg hergestellt. Dies erfolgt in der Regel bei hohen Drücken und Temperaturen unter Zuhilfenahme großer Mengen an Lösungsmitteln und Schwermetallkatalysatoren. Über diese Prozesse waren jedoch keine ökonomischen Daten oder Angaben über ökologische Auswirkungen und Risiken in Erfahrung zu bringen. Daher wurde der vorliegende Prozess mit *Saccharomyces cerevisiae* ökonomisch und ökologisch bilanziert und mit den beiden bereits genannten Prozessen mit *L. kefir* und *E. coli* verglichen. Über den *L. kefir*-Prozess liegen dabei detaillierte Daten vor, beim *E. coli*-Prozess mussten weitreichende Annahmen getroffen werden.

Zur Vereinfachung wurde ein Prozessschema entwickelt, das alle drei Prozesse vereinheitlicht und damit leichter bilanzierbar macht. Der wichtigste Schritt ist die Entkopplung der Biokatalysatorherstellung von der eigentlichen Biotransformation. Dadurch können beide Teile unabhängig voneinander gewertet werden. Die zweite Vereinfachung ist die getrennte Zugabe des Edukts und eines weiteren organischen Lösungsmittels bei der Biotransformation. Dieses dient je nach Prozess als weitere flüssige Phase bzw. beim *L. kefir*-Prozess als Opfersubstrat der Umsetzung. Das hat auf den praktischen Ablauf kaum einen Einfluss, ermöglicht jedoch eine einheitliche Bilanzierung der verschiedenen Prozesse. Da die zu Grunde liegenden Daten zu weiten Teilen spekulativ sind oder nur bedingt industriellen Maßstäben genügen, ist lediglich eine vergleichende Bilanzierung möglich. Keinesfalls kann die Bilanzierung absolute Werte liefern oder gar Basis der Auslegung eines neuen Prozesses sein.



**Abbildung 10.2: Vereinheitlichtes Prozessschema zur Bilanzierung**

Die Herstellung von S-CHBE gliedert sich in zwei entkoppelte Einzelprozesse. Zunächst wird der Biokatalysator mit einer mikrobiellen Kultivierung herangezogen und am Ende des Prozesses abgetrennt. Die anschließende Biotransformation nutzt die gewonnene Biomasse um das Edukt zu S-CHBE umzusetzen.

Die ökonomische und ökologische Bilanzierung war als Teilaspekt der vorliegenden Arbeit ohne externe Hilfestellung nicht zu bewerkstelligen. Der Umfang der notwendigen Arbeiten und des anfallenden Zeitbedarfs hätte den Rahmen des Möglichen gesprengt und würde den Schwerpunkt in eine nicht gewünschte Richtung verlagern. Aus diesem Grund wurde die Bilanzierung mit Hilfe des Werkzeugs Sabento<sup>®</sup> (ifu Hamburg) durchgeführt. Diese Software wurde geschaffen um biotechnologisch klar strukturierte Prozesse ökonomisch und ökologisch zu bilanzieren sowie ihre sozialen Auswirkungen zu untersuchen. Die Bilanzierung erfolgt nutzerfreundlich über die Abarbeitung von Assistenten. Dabei sind sehr viele der notwendigen Daten mit sinnvollen Werten vorbelegt, beispielsweise die anfallenden Kosten für die Kühlung eines Bioreaktors.

Die vollständigen, der ökonomischen und ökologischen Bilanzierung zugrunde liegenden prozessspezifischen Daten der Biokatalysatorherstellung und der anschließenden Biotransformation sind in 10.3 aufgeführt.

### 10.2.1 Vergleichende ökonomische Bilanzierung

Zur ökonomischen Bilanzierung mussten für die verwendeten Rohstoffe und das Produkt handelsübliche Preise der Industrie in Erfahrung gebracht werden. Für leicht zu beschaffende Medienbestandteile wie z.B. Hefeextrakt war das möglich, jedoch bereits für vergleichsweise günstige Stoffe wie z.B. Ethylacetatester werden von den betreffenden Firmen keine Preise für große Mengen genannt. Aus diesem Grund

wurden die Preise für alle verwendeten Stoffe und das Produkt den 2005/2006 Katalogen der Firmen VWR International GmbH, Darmstadt, und Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, entnommen. Dabei wurde, soweit möglich, der jeweils günstigste Preis berücksichtigt. Alle erhobenen Preise wurden anschließend mit dem Faktor 0,0688, der das Verhältnis aus bestem VWR-Preis für Hefeextrakt zum Großabnehmerpreis wiedergibt, gewichtet. Die sich ergebenden Preise spiegeln sicher nicht die tatsächlichen Preise wider, ermöglichen jedoch in gewissen Grenzen eine vergleichende Bilanzierung.

Da die Software Sabento<sup>®</sup> nur bedingt die sehr komplexen Zusammenhänge der biokatalysierten Herstellung von S-CHBE wiedergeben kann, mussten einige Vereinfachungen vorgenommen werden. Die Prozessparameter erreichter Enantiomerenüberschuss und Ausbeute der Biotransformation wurden zu einem einzelnen Parameter selektive Ausbeute zusammengefasst. Der Umsatz des Edukts betrug in jedem Fall 100%, die Menge an vorgelegtem Edukt und Biomasse wurde auf der Basis der Produktbildungskapazität berechnet und angepasst.

Die Bilanzierung wird für neu anzuschaffende Anlagen bei einer Nutzung und Abschreibung über 10 Jahre durchgeführt. Es wird jeweils nur ein Bioreaktor für die Biokatalysatorherstellung und die Biotransformation verwendet. Dadurch ist der Personalbedarf, unter der Annahme, dass Anlagen mit größerem Volumen nicht mehr Bedienpersonal benötigen, bei allen drei Prozessen gleich.

Basierend auf den ermittelten Preisen der Rohstoffe, der prozessspezifischen Daten und den in Sabento<sup>®</sup> hinterlegten Daten für den Betrieb der Anlagen ergibt sich für die Produktion von 50 t S-CHBE pro Jahr der in Tabelle 10.2 aufgelistete Reingewinn.

**Tabelle 10.2: Bilanzierter theoretischer Reingewinn der betrachteten Prozesse**

	Gewinn /kg S-CHBE
rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	152,50 €
<i>Lactobacillus kefir</i>	181,68 €
rek. <i>Escherichia coli</i>	202,45 €

Diese Gewinne ergeben sich aus dem erzielten Umsatz für das Produkt abzüglich der variablen und fixen Kosten der Herstellung. Diese umfassen neben den Material- und Energiekosten auch die Nebenkosten für Entsorgung und den Betrieb sowie Kosten für Personal und Investitionen in Anlagen.

**Tabelle 10.3: Vergleich der variablen und fixen Kosten der betrachteten Prozesse**

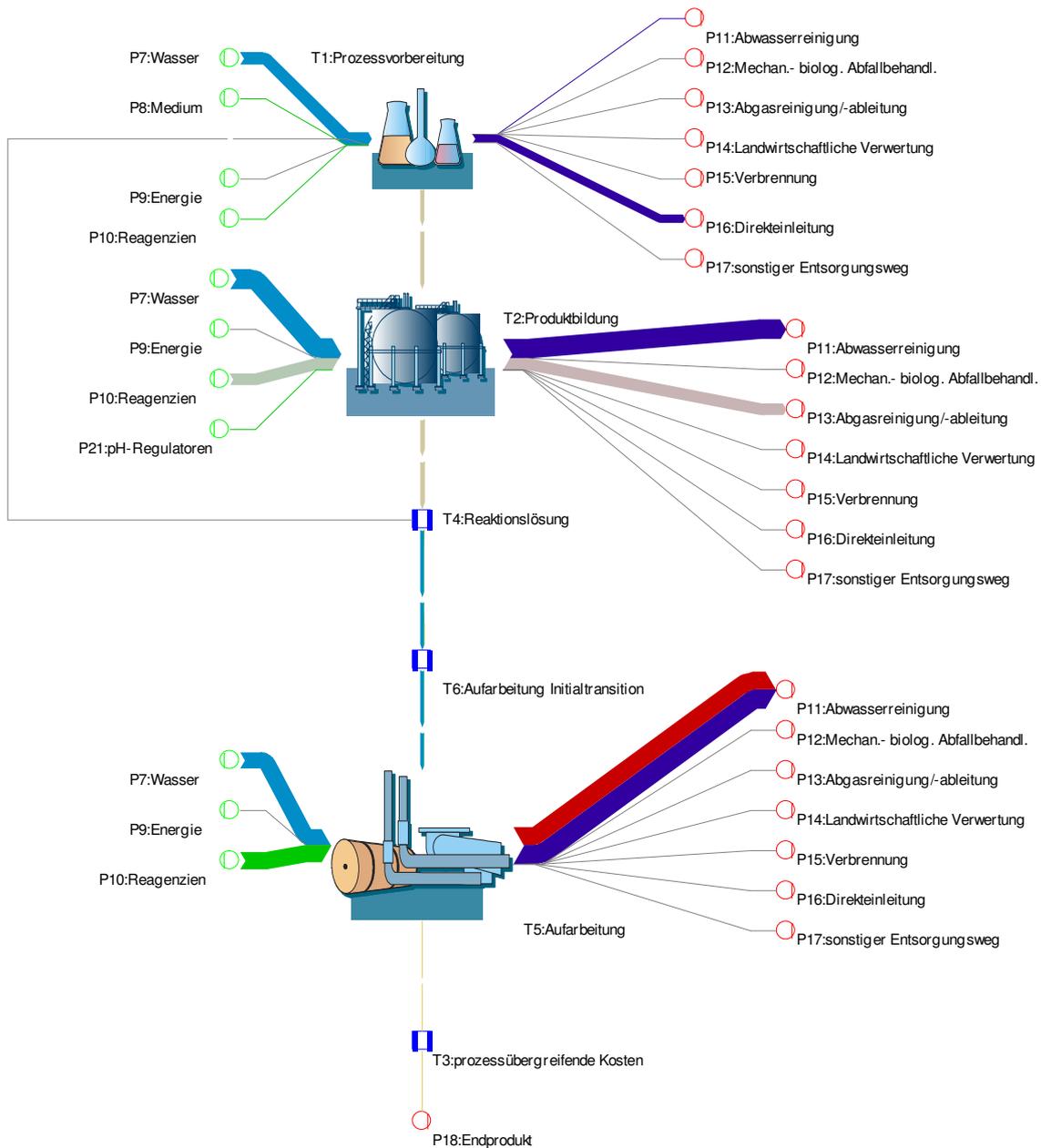
	rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	rek. <i>Escherichia coli</i>
variable Kosten /kg S-CHBE			
Materialkosten	56,77 €	21,63 €	8,53 €
Energiekosten	0,23 €	0,20 €	0,03 €
Entsorgungskosten	0,39 €	0,54 €	0,06 €
Betriebsstoffkosten	0,05 €	0,05 €	0,05 €
fixe Kosten /kg S-CHBE			
Personalkosten	0,75 €	0,75 €	0,75 €
investitionsabhängige Kosten	14,90 €	36,39 €	10,30 €

### 10.2.2 Vergleichende ökologische Bewertung

Neben der ökonomischen Bilanzierung eines Prozesses ist auch seine ökologische Bewertung ein wichtiger Punkt. In Zeiten beginnender Ressourcenknappheit und zunehmendem Umweltbewusstsein ist die nachhaltige Gestaltung biotechnologischer Prozesse unabdingbar.

Die ökologische Bewertung wurde für alle drei zu vergleichenden Prozesse durchgeführt und die wichtigsten Ergebnisse werden hier vorgestellt. Des Weiteren wird beispielhaft die Bewertung des Prozesses mit rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* im Detail bezüglich der verschiedenen Auswirkungen und Risiken beschrieben.

Grundlage der ökologischen Bewertung ist ein Stoff- und energief Fluss-Diagramm, ein sogenanntes Sankey-Diagramm (Schmidt, 2006). Für den *Saccharomyces*-Prozess ist dieses in Abbildung 10.3 dargestellt. Alle ein- und ausgehenden Stoff- und Energieströme sind darauf entsprechend ihres Umfangs eingetragen.



**Abbildung 10.3: Sankey-Diagramm des rek. Saccharomyces-Prozesses**

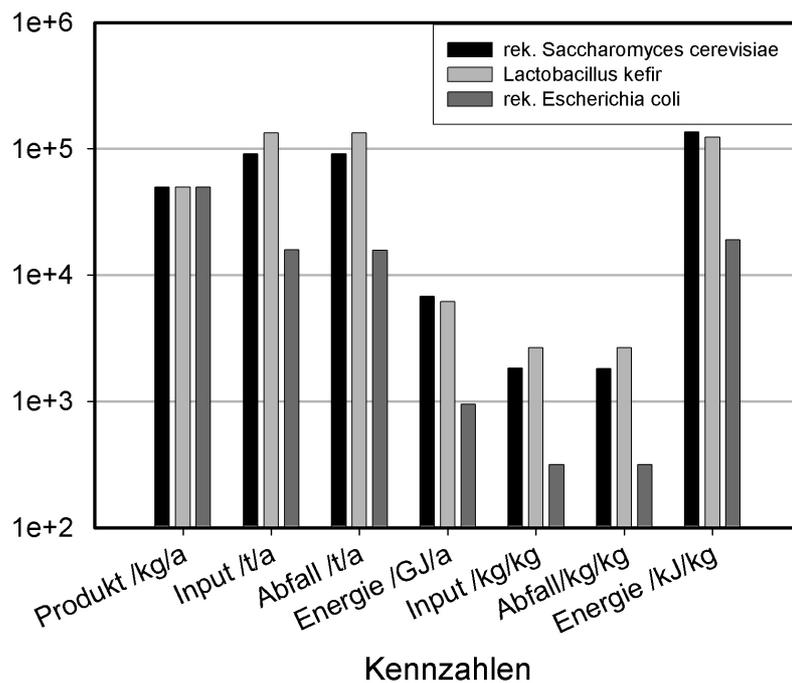
Der überwiegende Teil der eingehenden Stoffströme sind Wasser und die notwendigen Reagenzien des Mediums und der Biotransformation. Dies äußert sich auch in der Dominanz der Abwasserreinigung auf der Ausgangsseite.

Alle diese Ströme werden für alle drei Prozesse zu entsprechenden Kennzahlen zusammengefasst und sind in Tabelle 10.4 aufgelistet.

**Tabelle 10.4: Zusammenfassung der ökologischen Bilanzierung**

Kennzahl	rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	rek. <i>Escherichia coli</i>
Produktstrom /kg a <sup>-1</sup>	50000	50000	50000
Inputstrom /kg a <sup>-1</sup>	91298464	133245419	158171111
Abfallstrom /kg a <sup>-1</sup>	91161255	133255276	15755301
Energiestrom /kJ a <sup>-1</sup>	6776978533	6158328338	951161306
Inputindex /kg kg <sup>-1</sup>	1826	2665	316
Abfallindex /kg kg <sup>-1</sup>	1823	2665	315
Energieindex /kJ kg <sup>-1</sup>	135539	123167	19023

Zur besseren Veranschaulichung dient die Darstellung der Kennzahlen als Balkendiagramm in Abbildung 10.4:.



**Abbildung 10.4: Darstellung der Kennzahlen der ein- und ausgehenden Stoff- und Energieströme**

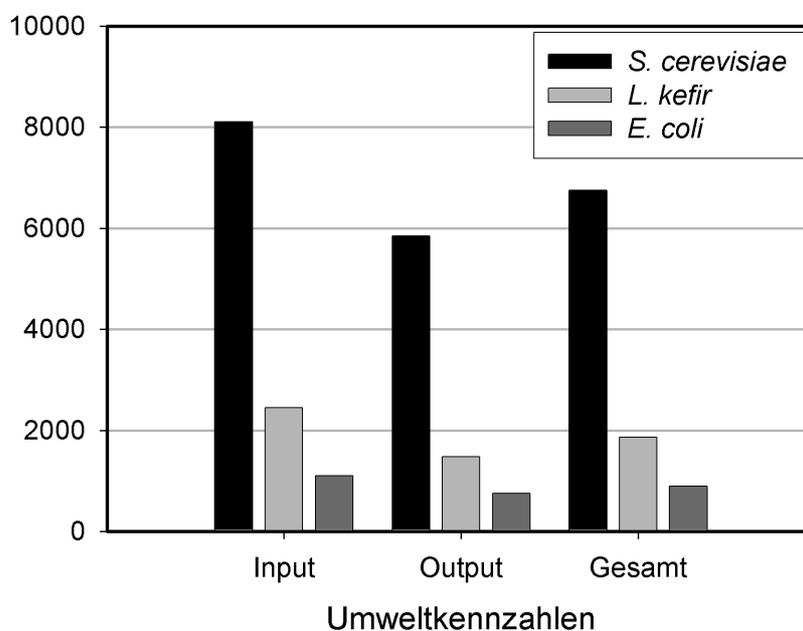
Die Skalierung der Ordinate wurde zur bessern Darstellung logarithmisch gewählt.

Daneben wurden ebenfalls für alle drei Prozesse nach den Gleichungen (10-1) bis (10-5) die Umweltkennzahlen berechnet:

**Tabelle 10.5: Zusammenfassung der Umweltkennzahlen der drei bewerteten Prozesse**

Umweltkennzahl	rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	rek. <i>Escherichia coli</i>
Input	8106	2446	1098
Output	5848	1480	755
Gesamt	6751	1866	892

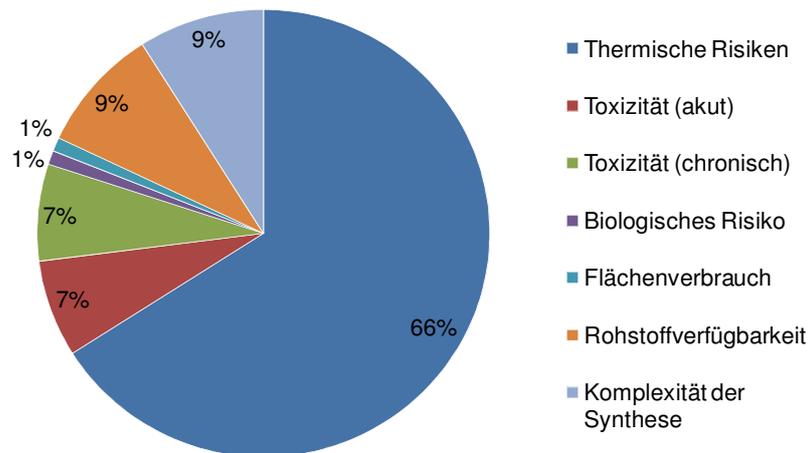
Zur besseren Visualisierung dient wieder die graphische Darstellung in Abbildung 10.5:



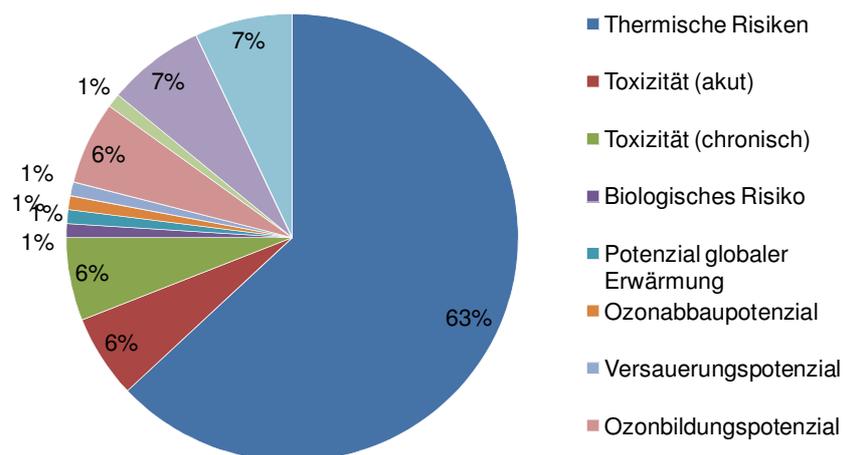
**Abbildung 10.5: Vergleich der Umweltkennzahlen der drei bewerteten Prozesse**

Die Umweltkennzahlen bewerten integral die Auswirkungen der ein- und ausgehenden Energie- und Stoffströme eines Prozesses. Dabei sind die Auswirkungen umso geringer, je niedriger die Kennzahl ist.

Die einzelnen Wirkungskategorien der Eingangs- und Ausgangsseite und ihr Anteil an der Gesamtwirkung werden in Abbildung 10.6 und Abbildung 10.7 exemplarisch für den *Saccharomyces cerevisiae*-Prozess gezeigt.



**Abbildung 10.6: Eingangsseitige Wirkungskategorien des rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* Prozesses**



**Abbildung 10.7: Ausgangsseitige Wirkungskategorien des rek. *Saccharomyces cerevisiae* Prozesses**

Bis zu 2/3 der Gesamtwirkung der Eingangs- und Ausgangsseite gehe auf das Konto der thermischen Risiken. Daneben spielen auch die akute und chronische Toxizität sowie die Atmosphäre beeinflussende Faktoren eine Rolle.

### 10.2.3 Diskussion

Alle simulierten Prozesse scheinen zunächst rentabel zu sein, wobei der *E. coli*-Prozess den höchsten und der *Saccharomyces*-Prozess den niedrigsten Gewinn aufweist. Die Differenz zwischen dem niedrigsten und höchsten Gewinn liegt bei knapp 50 € pro kg S-CHBE.

Aus Tabelle 3.6 ist ersichtlich, dass nahezu ausschließlich die Materialkosten und die investitionsabhängigen Kosten einen Einfluss haben. Es zeigt sich jedoch auch, dass der *Saccharomyces*-Prozess durch eine effizientere Biokatalysatorherstellung, durch einen gesenkten Materialbedarf also, ein besseres Ergebnis bringt. Zusätzlich senkt dies die Investitionskosten, da durch eine effizientere Zellanzucht kleinere Anlagen benötigt werden um die notwendige Biomasse zu erzeugen. Dieser Aspekt gilt insbesondere für den *L. kefir*-Prozess, da dieser in der Biokatalysatorherstellung nur vergleichsweise geringe Zelldichten erreicht und somit großvolumige Anlagen erfordert um die notwendige Biomasse herzustellen. Ebenso sinken in beiden Fällen die Energie- und Entsorgungskosten. Der *E. coli*-Prozess, bei dem sehr weit reichende Annahmen getroffen werden mussten, ist in der Realisierung sicherlich weit wirtschaftlicher als in der hier durchgeführten Simulation.

Die vergleichende ökologische Bewertung der ein- und ausgehenden Energie- und Stoffströme ergibt keine überaus großen Unterschiede zwischen den beiden Prozessen *Saccharomyces* und *Lactobacillus*. Da der *Saccharomyces*-Prozess eine niedrige Produktbildungskapazität hat und der *L. kefir*-Prozess niedrige Zellkonzentrationen erreicht, führt das im Endeffekt zu den hohen Kennzahlen der Bewertung. Lediglich der *E. coli*-Prozess weist niedrigere Werte der Kennzahlen auf. Dies kann jedoch, wie bereits in 6.5 angesprochen, auf die wesentlich höhere Produktbildungskapazität zurückgeführt werden.

Bei den drei Umweltkennzahlen liegt der *Saccharomyces*-Prozess abgeschlagen an dritter Stelle. Seine Kennzahlen sind teilweise fast achtfach höher als die des *E. coli*-Prozesses der die niedrigsten Werte hat. Die Umweltkennzahlen des *L. kefir*-Prozesses liegen dazwischen, jedoch weit näher am *E. coli*-Prozess. Auch dieses Ergebnis kann mit der Produktbildungskapazität begründet werden. Zwar ist die des *Escherichia*-Prozesses gut fünfmal größer als die des *L. kefir*-Prozesses, dafür verwendet dieser kein organisches Lösungsmittel als zweite Phase. Das zugegebene Isopropanol dient nur als Opfersubstrat und muss daher nach dem Prozess nicht verwertet werden. Das hat wesentlich niedrigere Umweltkennzahlen zur Folge. Die hohen Werte aller drei Umweltkennzahlen des *Saccharomyces*-Prozesses deuten auf ein vorhandenes großes Verbesserungspotenzial hin. Der größte Gewinn wäre hierbei durch eine Erhöhung der Produktbildungskapazität des Prozesses zu erzielen.

Die exemplarische Bewertung der einzelnen Wirkungskategorien der Gesamtwirkungspotenziale des rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae* Prozesses führt zu einem jeweiligen Anteil der thermischen Risiken von über 60%. Das kann jedoch leicht auf die großen Mengen der leicht brennbaren organischen

Lösungsmittel, die bei der Biotransformation Verwendung finden, zurück geführt werden. Für die akute und chronische Toxizität sind hauptsächlich Edukt und Produkt verantwortlich. Die Eutrophierung wird nahezu ausschließlich durch die komplexen Medienbestandteile und den Phosphatpuffer hervorgerufen.

## 10.3 Datenbasis der ökonomischen und ökologischen Bilanzierung

### 10.3.1 Biokatalysatorherstellung

- *Medien*

**Tabelle 10.6: Medium zur Biokatalysatorherstellung des *Saccharomyces cerevisiae*-Prozesses**

Komponente	Konzentration /g l <sup>-1</sup>	Kosten /€ kg <sup>-1</sup>
CSL	20,00	2,51
Pepton	20,00	11,08
Hefeextrakt	10,00	7,50
Glucose	30,00	1,37

**Tabelle 10.7: Medium zur Biokatalysatorherstellung des *L. kefir*-Prozesses**

Komponente	Konzentration /g l <sup>-1</sup>	Kosten /€ kg <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	58,28	7,50
Natriumacetat	3,38	2,46
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,97	2,44
di-Ammoniumhydrogencitrat	2,97	3,17
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,18	1,77
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,07	4,10
Glukose	142,88	1,37

**Tabelle 10.8: Medium zur Biokatalysatorherstellung des *E. coli*-Prozesses**

Komponente	Konzentration /g l <sup>-1</sup>	Kosten /€ kg <sup>-1</sup>
Pepton	20,00	11,08
Hefeextrakt	20,00	7,50
NaCl	5,00	1,18
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,00	2,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,00	2,18
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,00	1,39
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,00	1,77
NH <sub>4</sub> Cl	0,20	1,62
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,00	2,15
Spurenelementlsg.	8,00	0,08
Glucose	30,00	1,37
IPTG	0,02383	3894,50

- *Prozessbedingungen*

**Tabelle 10.9: Überblick über die Prozessbedingungen der Biokatalysatorherstellung der bilanzierten Prozesse**

	rek. Saccharomyces cerevisiae	<i>Lactobacillus</i> <i>kefir</i>	rek. <i>Escherichia</i> <i>coli</i>
Temperatur /°C	30	30	37
Laufzeit /h	44	71	11
Biotrockenmasse /g l <sup>-1</sup>	20	10,8	15

### 10.3.2 Biotransformation

- *Umsetzungsmedium*

**Tabelle 10.10: Umsetzungsmedium des *Lactobacillus kefir*-Prozesses**

Komponente	Konzentration /g l <sup>-1</sup>	Kosten /€ kg <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	34,83	2,44
Isopropanol	100,00	0,34
4Cl-ACE	204,10	11,90

**Tabelle 10.11: Umsetzungsmedium des rek. *Saccharomyces cerevisiae*-Prozesses**

Komponente	Konzentration /g l <sup>-1</sup>	Kosten /€ kg <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	34,83	2,44
Glucose	198,17	1,37
NaCl	5,84	0,62
NADP <sup>+</sup>	0,08	5979,36
n-Butylacetat	100,00	0,37
4Cl-ACE	32,90	11,90

**Tabelle 10.12: Umsetzungsmedium des rek. *Escherichia coli*-Prozesses**

Komponente	Konzentration /g l <sup>-1</sup>	Kosten /€ kg <sup>-1</sup>
Triton X-100	0,50	0,71
NADP <sup>+</sup>	0,06	5979,36
n-Butylacetat	500,00	0,37
Glucose	275,00	1,37
4Cl-ACE	250,00	11,90

- *Prozessbedingungen*

**Tabelle 10.13: Übersicht über die Prozessbedingungen der Biotransformation der der bilanzierten Prozesse**

	rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	rek. <i>Escherichia coli</i>
Laufzeit /h	8	16	34
Biotrockenmasse /g l <sup>-1</sup>	20	50	20
pH	7	6,5	6,5
Produktbildungskapazität /mM g <sup>-1</sup>	1,8	24	129
Ausbeute /%	94	97	85
Enantiomerenüberschuss /%	95	99,5	100

## 11 Anhang B – Tabellen und Verzeichnisse

### 11.1 Daten des Substrats und Produkts der Biotransformation

**Tabelle 11.1: Chemische und physikalische Eigenschaften des Substrats**

Substrat	4Cl-ACE
Summenformel	$C_6H_9ClO_3$
CAS-Nr.	638-07-3
Name	Ethyl-4-Chloracetoacetat; 4-Chlor-Acetessigsäureethylester; Ethyl- 4-Chloro-oxobutanoate;
Reinheit	> 98 % (VWR)
Molmasse	164,59 g mol <sup>-1</sup>
pH	2,9 (10 g l <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O)
Dampfdruck	10 Pa (20 °C)
Siedepunkt	220 °C (1013 hPa)

**Tabelle 11.2: Chemische und physikalische Eigenschaften des Produkts**

Produkt	R/S-CHBE
Summenformel	$C_6H_{10}ClO_3$
CAS-Nr.	86728-85-0 (S) 90866-33-4 ®
Name	(S)-4-Chlor-3- Hydroxybuttersäureethylester; (-)-Ethyl (S)-4-chloro-3- hydroxybutyrate; Ethyl 4-chloro-3-hydroxybutanoate
Reinheit	> 97 % (Sigma-Aldrich)
Molmasse	166,6 g mol <sup>-1</sup>
Dichte	1,187 g ml <sup>-1</sup>
Löslichkeit in Wasser	125 g l <sup>-1</sup>

## 11.2 Abkürzungen

### 11.2.1 Material- und Medienbezeichnungen

CSL	Corn Steep Liquor
CSP	Corn Steep Liquor
GFP	grün fluoreszierendes Protein green fluorescent protein
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polyethylen
PEEK	Polyetheretherketon
POM	Polyoxymethylen
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluoethen
VE-Waser	vollentsalztes Wasser

### 11.2.2 Mess- und Prozessgrößen

$\mu$	Wachstumsrate, $\mu \equiv \frac{1}{c_X \cdot V} \frac{dc_X \cdot V}{dt}$
$\mu_{\max}$	maximale Wachstumsrate
BTM	Biotrockenmasse, g l <sup>-1</sup>
$c_{S\text{-CHBE}}$	S-CHBE-Konzentration, Produktkonzentration, mM
$c_X$	Biotrockenmassekonzentration, g l <sup>-1</sup>
ee	Enantiomerenüberschuss, Enantiomeric Excess, %
$k_{La}$	volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient, s <sup>-1</sup>
L, l	Liter
logP	Hansch-Parameter
logP	Hansch-Parameter
ml	Milliliter
OD	optische Dichte

---

OTR	Sauerstoffeintragsrate, Oxygen-Transfer-Rate
P	n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
U min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
Y <sub>X,Glucose</sub>	Zellertragskoeffizient bei Wachstum auf Glucose

### 11.2.3 Sonstige Abkürzungen und Indizes

1S	Einstrahlphotometer betreffend
DLR	Dual Lifetime Referencing
DSM	dynamische Sulfit Methode
FDA	Food and Drug Administration, USA
GA	genetischer Algorithmus
MTP	Mikrotiterplatte
	MTP-Photometer betreffend
real	die tatsächlichen Verhältnisse betreffend
SIP	sterilization-in-place
SPEA	Strength Pareto Evolutionary Algorithm

### 11.2.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: 24-fache parallele Miniaturblasensäule	10
Abbildung 3.2: Arbeitsprinzip der 24-fache parallele Miniaturblasensäule	11
Abbildung 3.3: Schema des Mikroliter-Rührkesselbioreaktors	12
Abbildung 3.4: Parallelbioreaktor mit 24 Rührkesselbioreaktoren	13
Abbildung 3.5: Bioreaktorblock mit 48 parallelen ml-Bioreaktoren	14
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der erweiterten Grundstruktur eines Regelkreises	24
Abbildung 3.7: Anteile der Dissoziationsstufen der Phosphorsäure in Abhängigkeit des pH bei 25 °C	27
Abbildung 3.8: Schema einer Stellgrößenbeschränkung	28
Abbildung 3.9: Schema eines „Anti-Windup“-Mechanismus	29
Abbildung 3.10: Lumineszenzantwort des sensitiven Sensors auf die Anregung	31
Abbildung 3.11: Enantiomere des (R/S)-4Cl-3-Hydroxybuttersäure-ethylesters (R/S-CHBE)	32
Abbildung 3.12: Schema der Biotransformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
Abbildung 4.1: Experimenteller Aufbau des Parallelbioreaktors	40
Abbildung 4.2: Paralleler Bioreaktorblock	42
Abbildung 4.3: Schnitt durch den Bioreaktorblock (Teilansicht)	43
Abbildung 4.4: Spannungssignale des Rührerantriebs und der Hall-Effekt-Sensoren zur Rührerüberwachung	44
Abbildung 4.5: Rührer des Typs B4	45
Abbildung 4.6: Geometrie der Einweg-Bioreaktoren	46
Abbildung 4.7: Einweg-Bioreaktoren mit Sensorpunkten zur pH- und pO <sub>2</sub> -Messung	47
Abbildung 4.8: Schema des Prozessleitsystems	48
Abbildung 4.9: Individuelle Übersichtsanzeige eines einzelnen ml-Bioreaktors	49
Abbildung 4.10: Individuelle Einstellung des pH-Profiles	50
Abbildung 4.11: 42 Liter-Laborbioreaktor Techfors	51
Abbildung 4.12: „Deep-Well“-Platte mit MTP-Schüttler für parallele Biotransformationen	52
Abbildung 4.13: 400 ml-Reaktor für Biotransformationen	53
Abbildung 4.14: Korrelation zwischen der gemessenen OD und der realen OD des Einstrahlphotometers und des MTP Readers	59
Abbildung 4.15: Korrelation von BTM und OD <sub>650</sub>	60
Abbildung 4.16: Eingabemaske zur Auswahl eines „Workflow“ in der Software fedbatch XP (Ausschnitt)	66

Abbildung 4.17: Eingabemaske der Software fedbatch XP zur individuellen Anpassung der pO <sub>2</sub> -Messung aller 48 Reaktoren (Ausschnitt)	67
Abbildung 4.18: Abnahme des Medienüberstands in „Deep-Well“-Platten zur Gewinnung der Zellpellets für Biotransformationen	70
Abbildung 4.19: Zeitplan der Optimierung	71
Abbildung 5.1: Vergleich verschiedener Lösungen zur Kapselung der Magnete	78
Abbildung 5.2: Schnitt durch einen Rührer mit gekapselten Magneten	78
Abbildung 5.3: Verschleißbild eines Rührers nach 1000 Betriebsstunden	80
Abbildung 5.4: Schnitt durch einen Rührer mit Magneten und Achse	81
Abbildung 5.5: Lagerbuchsen aus ZEDEX-530 <sup>®</sup> zum Einpressen in Rührkörper und Schnitt durch einen Rührer mit Lagerbuchse	82
Abbildung 5.6: Schnitt und Darstellung des verbesserten neuen Rührertyps	83
Abbildung 5.7: volumetrischer Stoffübergangskoeffizient k <sub>La</sub> des neuen Rührertyps bei verschiedenen Drehzahlen und Volumina	84
Abbildung 5.8: Korrosionsbilder der Aluminium-Sterilgasabdeckung	86
Abbildung 5.9: Neu gestaltete Sterilgasabdeckung mit PEEK Einsätzen	87
Abbildung 5.10: Vorrichtung zur individuellen Absaugung der Reaktorabluft	88
Abbildung 5.11: Schnitt durch eine Absaugposition der Absaugvorrichtung mit den entsprechenden Volumenströmen	89
Abbildung 5.12: Kalibrierung der chemischen Sauerstoffsensoren im Milliliter-Bioreaktor	94
Abbildung 5.13: Vergleich des in CSL-Medium gemessenen pO <sub>2</sub> zum tatsächlichen pO <sub>2</sub> bei Verwendung der herstellerseitigen Kalibrierung	95
Abbildung 5.14: Zeitlicher Verlauf des pO <sub>2</sub> und der Biotrockenmasse-konzentration in 48 parallelen Reaktoren	96
Abbildung 5.15: Rührerüberwachung mit Wiederanlauf nach Ausfall eines Rührers (Detailansicht)	97
Abbildung 5.16: Charakterisierung der pH-Messung	100
Abbildung 5.17: Vergleich des in CSL-Medium gemessenen pH zum tatsächlichen pH bei Verwendung der herstellerseitigen Kalibrierung	101
Abbildung 5.18: Messfehler der optischen pH-Messung in Phosphatpuffer und CSL-Medium	102
Abbildung 5.19: Verlauf des pH einer Satzkultivierung mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit pH-Referenz	103
Abbildung 5.20: Zeitlicher Verlauf des pH in 48 parallelen Reaktoren bei der Kultivierung von <i>E. coli</i>	104

Abbildung 5.21: Sechs zufällig ausgewählte Ansätze einer Kultivierung im Parallelansatz mit verschiedenen individuell geregeltem pH	105
Abbildung 5.22: Gemittelter zeitlicher Verlauf des geregelten pH in drei Reaktoren mit identischen Prozessbedingungen	106
Abbildung 6.1: Anordnung der einzelnen Ansätze einer Generation im Bioreaktorblock	111
Abbildung 6.2: Zeitlicher Verlauf der BTM-Konzentration aller 15 Parallelansätze und des Referenzansatzes der 2. Generation	113
Abbildung 6.3: Zeitlicher Verlauf der BTM-Konzentration aller 15 Parallelansätze und des Referenzansatzes der 7. Generation	114
Abbildung 6.4: Zellsuspensionen nach der Zellernte und Zellpellets nach der Abnahme des Überstands	115
Abbildung 6.5: Erzielte Produktkonzentrationen an S-CHBE der 2. Generation nach der Biotransformation	117
Abbildung 6.6: Erzielter Enantiomerenüberschuss des S-CHBE nach der Biotransformation der 2. Generation	117
Abbildung 6.7: Erzielte Produktkonzentrationen an S-CHBE der 7. Generation nach der Biotransformation	119
Abbildung 6.8: Erzielter Enantiomerenüberschuss des S-CHBE nach der Biotransformation der 7. Generation	119
Abbildung 6.9: Ergebnis aller im Rahmen der Optimierung durchgeführten experimentellen Untersuchungen	121
Abbildung 6.10: Vergleich der Kultivierungen im Milliliter- und Liter-Rührkesselbioreaktor	124
Abbildung 7.1: modifizierter gasinduzierender Rührer mit Gleitlagerbuchse und gekapselten Magnetkernen	130
Abbildung 10.1: Berechnungsschema des Gewinns eines bilanzierten Prozesses	149
Abbildung 10.2: Vereinheitlichtes Prozessschema zur Bilanzierung	152
Abbildung 10.3: Sankey-Diagramm des rek. <i>Saccharomyces</i> -Prozesses	155
Abbildung 10.4: Darstellung der Kennzahlen der ein- und ausgehenden Stoff- und Energieströme	156
Abbildung 10.5: Vergleich der Umweltkennzahlen der drei bewerteten Prozesse	157
Abbildung 10.6: Eingangsseitige Wirkungskategorien des rekombinanten <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Prozesses	158
Abbildung 10.7: Ausgangsseitige Wirkungskategorien des rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Prozesses	158

## 11.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse verschiedener Arbeiten zum Sauerstoffeintrag in Mikrotiterplatten	8
Tabelle 3.2: Vergleich der Ergebnisse von Kultivierungen in geschüttelten Mikrotiterplatten	9
Tabelle 3.3: Vergleich paralleler Miniaturbioreaktoren	16
Tabelle 3.4: Liste der im bioverfahrenstechnischen Apparatebau zu verwendenden Stähle nach DIN EN 10088	18
Tabelle 3.5: Vergleich ausgewählter Materialeigenschaften von PEEK, Aluminium und Edelstahl	20
Tabelle 3.6: Auflistung verschiedener Korrosionsarten und deren Gegenmaßnahmen	21
Tabelle 3.7: Übersicht über Wirkungsweise von P-, I- und D-Reglern	25
Tabelle 3.8: Beispiele pharmazeutisch genutzter chiraler Intermediate mit deren Edukten und Endprodukten	33
Tabelle 3.9: In <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (wt) identifizierte $\beta$ -Ketoester-Reduktasen zur Reduktion von 4CI-ACE.	34
Tabelle 3.10: Biokompatibilität verschiedener organischer Lösungsmittel zur zweiphasigen Biotransformation mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
Tabelle 3.11: Vergleich der Verteilungskoeffizienten von 4CI-ACE und R/S-CHBE in verschiedenen org. Lösungsmitteln	38
Tabelle 4.1: CSL-Medium	54
Tabelle 4.2: CSP-Medium	54
Tabelle 4.3: Modifiziertes LB-Medium	55
Tabelle 4.4: Puffermedium für Biotransformation von 4CI-ACE zu S-CHBE	55
Tabelle 4.5: Übersicht über die verwendeten Antischaum-Mittel	56
Tabelle 4.6: Parameter der Korrelation der verschiedenen OD-Messungen mit der realen optischen Dichte	60
Tabelle 4.7: Parameter der Korrelation von BTM und realer optischer Dichte der Zell-suspensionen	61
Tabelle 4.8: Parameter der gaschromatographischen Bestimmung von S-CHBE	61
Tabelle 4.9: Parameter des PI-Reglers zur pH-Kontrolle in parallelen automatisierten Kultivierungen mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
Tabelle 4.10: Zusammenfassung der Optimierungsparameter	73
Tabelle 4.11: Parametereinstellungen GAME.opt	73
Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Kalibrierdaten zur pO <sub>2</sub> -Messung	94
Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Kalibrierdaten der pH Messung	100

Tabelle 6.1: Vergleich der verschiedenen Kultivierungen als Ausgangslage der Optimierung	120
Tabelle 6.2: Zusammenfassung der Ergebnisse mit den höchsten Werten Biotrockenmassekonzentration $c_{X,max}$ , Produktkonzentration $c_{S-CHBE,max}$ und Enantiomerenüberschuss $ee_{S-CHBE,max}$ im Vergleich zur Ausgangslage	122
Tabelle 6.3: Vergleich der Medienzusammensetzungen der Ansätze mit den maximalen Werten der Zielgrößen	122
Tabelle 6.4: Ergebnis der Maßstabsvergrößerung des Ansatzes 1.1	123
Tabelle 6.5: Ergebnis der Maßstabsvergrößerung des Ansatzes 7.14	123
Tabelle 7.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der parallelen Optimierung im Vergleich zur Ausgangslage; die jeweils maximalen Ergebnisse sind unterlegt	132
Tabelle 10.1: Aufstellung der in Sabento <sup>®</sup> verwendeten Kennziffern	148
Tabelle 10.2: Bilanzierter theoretischer Reingewinn der betrachteten Prozesse	153
Tabelle 10.3: Vergleich der variablen und fixen Kosten der betrachteten Prozesse	154
Tabelle 10.4: Zusammenfassung der ökologischen Bilanzierung	156
Tabelle 10.5: Zusammenfassung der Umweltkennzahlen der drei bewerteten Prozesse	157
Tabelle 10.6: Medium zur Biokatalysatorherstellung des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Prozesses	160
Tabelle 10.7: Medium zur Biokatalysatorherstellung des <i>L. kefir</i> -Prozesses	160
Tabelle 10.8: Medium zur Biokatalysatorherstellung des <i>E. coli</i> -Prozesses	161
Tabelle 10.9: Überblick über die Prozessbedingungen der Biokatalysatorherstellung der bilanzierten Prozesse	161
Tabelle 10.10: Umsetzungsmedium des <i>Lactobacillus kefir</i> -Prozesses	161
Tabelle 10.11: Umsetzungsmedium des rek. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Prozesses	162
Tabelle 10.12: Umsetzungsmedium des rek. <i>Escherichia coli</i> -Prozesses	162
Tabelle 10.13: Übersicht über die Prozessbedingungen der Biotransformation der bilanzierten Prozesse	162
Tabelle 11.1: Chemische und physikalische Eigenschaften des Substrats	163
Tabelle 11.2: Chemische und physikalische Eigenschaften des Produkts	163