

Vom Mikroliter zum Kubikmeter

In der Industrie werden nicht mehr nur chemische Reaktionen, sondern vermehrt Mikroorganismen oder höhere Zellen zur Produktsynthese eingesetzt. Ein Grund liegt im Wandel der Ausgangsstoffe: Hier ersetzen in Zukunft nachwachsende Rohstoffe mehr und mehr das fossile Erdöl. Ein zweiter Grund sind die Produkte: Die enormen Fortschritte gentechnischer und molekularbiologischer Forschung machen die Herstellung komplexer Moleküle möglich, die für Pharma- und chemische Industrie völlig neue Möglichkeiten eröffnen. Einige der ältes-

ten Anwendungen bio(techno)logischer Synthesen sind zum Beispiel die Umwandlung von Zucker in Alkohol und von Alkohol in Essig, die Menschen schon seit tausenden von Jahren bekannt sind. Heute erstreckt sich das Spektrum biologisch herstellbarer Stoffe von Massenchemikalien wie Zitronensäure über Enzyme für Waschmittel bis hin zu Pharmazeutika wie Impfstoffen oder Antibiotika.

Auch wenn die Produktion in Größenordnungen von einigen dutzend Kubikmetern ablaufen kann, findet doch ein wesentlicher Teil der Forschung

und Entwicklung in kleinen und kleinsten Maßstäben statt. Ziel des so genannten Screenings ist es, den geeignetsten Organismus und die besten Bedingungen für die Produktion zu identifizieren und diese dann in den größeren Maßstab zu übertragen. Zwei Anforderungen werden hier gestellt: Einerseits sollten die besten Organismen und Bedingungen gewählt werden. Fehler in dieser frühen Phase der Prozessentwicklung kosten eine Menge Geld und können den Erfolg des gesamten Prozesses gefährden. Zum anderen muss gewährleistet sein, dass die Bedingungen zwischen Screening und Produktion vergleichbar sind. Ansonsten kann diese Maßstabsübertragung, auch Scale-Up genannt, zu einer großen Hürde werden, über die

nicht wenige Unternehmen stolpern.

Probleme bei Maßstabsübertragungen sind nichts Neues in der Geschichte. Einer Anekdote zufolge nutzten dies die Einwohner der Insel Rhodos aus, als sie mit dem Koloss von Rhodos eines der Sieben Weltwunder errichteten. Dazu ließen sie den Architekten, einen gewissen Chares von Lindos, zuerst ein kleineres Standbild errichten. Für das doppelt so große Original veranschlagte der antike Baumeister dann schlicht den doppelten Preis, dabei betrug die Kosten natürlich das Achtfache, da sich das Volumen für die benötigte Bronze nun einmal als dritte Potenz der Größe ergibt. Sollte diese Geschichte wahr sein, hatte Chares von Lindos offen-

Bild 1: In der Aachener Verfahrenstechnik wird die Größenverteilung einer mikrobiellen Kultur vermessen, um so früh-

zeitig geeignete Bedingungen für den späteren Prozess identifizieren zu können. Foto: Peter Winandy



Der Aachener Weg zum intelligenten Screening in der Bioprozessentwicklung

bar ein Scale-Up-Problem! Die Geschichte ging für den antiken Baumeister nicht gut aus, auf einem Großteil der Kosten sitzen geblieben, nahm er sich das Leben. Über das „Doppelte-Größe-achtfacher-Preis“-Problem können Verfahrenstechniker heute nur müde lächeln: Moderne Bioprozesse überbrücken in ihrer Entwicklung Volumina von Mikroliter zum Kubikmetermaßstab, also von neun Zehnerpotenzen!

Das Ziel einer Bioprozessentwicklung, im Regelfall ein großer Rührkesselreaktor, ist vergleichsweise gut erforscht

und beschrieben. Mess- und Regeltechnik erlauben dort, die gewünschten Bedingungen von Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffversorgung optimal einzustellen und zu kontrollieren. Die Vorversuche und das Screening allerdings werden aus Kostengründen meist in geschüttelten Erlenmeyerkolben mit Volumina von 100 Milliliter bis 1 Liter durchgeführt. Wie leicht zu erkennen ist, besitzt ein Erlenmeyerkolben nicht die beste Geometrie, komplizierte Mess- und Regeltechnik zu befestigen. Daher überlassen viele Firmen die Kulturen dort sich selbst und ziehen allenfalls gelegentlich eine Probe. Was tatsächlich dort passiert? Ob in den Kolben letztlich doch etwas anderes als im Bioreaktor abläuft? Häufig bleiben diese

wichtigen Fragen unbeantwortet.

Mit innovativen Messtechniken ist es heute möglich, die Aktivität und das Wachstum von mikrobiellen Kulturen auch im Erlenmeyerkolben zu verfolgen. Zur Online-Überwachung ist in der Aachener Verfahrenstechnik dazu die RAMOS-Anlage entwickelt worden, RAMOS steht für Respiration Activity Monitoring System. Es ist in der Lage, bei einer mikrobiellen Kultur die Atmungsaktivität zu messen. Am Sauerstoffverbrauch und der CO₂-Produktion kann man den aktuellen Zustand der Kultur ablesen. Neben der ausreichenden Sauerstoffversorgung wirkt sich insbesondere die Prozessführung entscheidend auf die Vergleichbarkeit zum späteren Produktionsreaktor aus. So

werden Industrieprozesse häufig im Fed-Batch gefahren, dem Organismus wird also sein Substrat – zum Beispiel Zucker – im Laufe der Zeit erst nach und nach zugefüttert. So soll verhindert werden, dass sich die Organismen aus dem Überangebot an Zucker zu Beginn der Kultivierung „überfressen“, unerwünschte Nebenprodukte herstellen und sich so selbst schädigen. Um dies im kleinen Maßstab abzubilden, ist diese Fed-Batch-Betriebsweise auch für den Schüttelkolben realisiert worden. Dazu werden ins Medium so genannte Feed-Beads gegeben. In ihnen ist der Zucker in eine Silikonmatrix eingebettet, die ihn nach und nach ins Medium freisetzt. Eine ähnliche Technik kann auch genutzt werden, um den pH-Wert

Bild 2: Mikroliterplatte als Miniaturreaktor für das Screening.

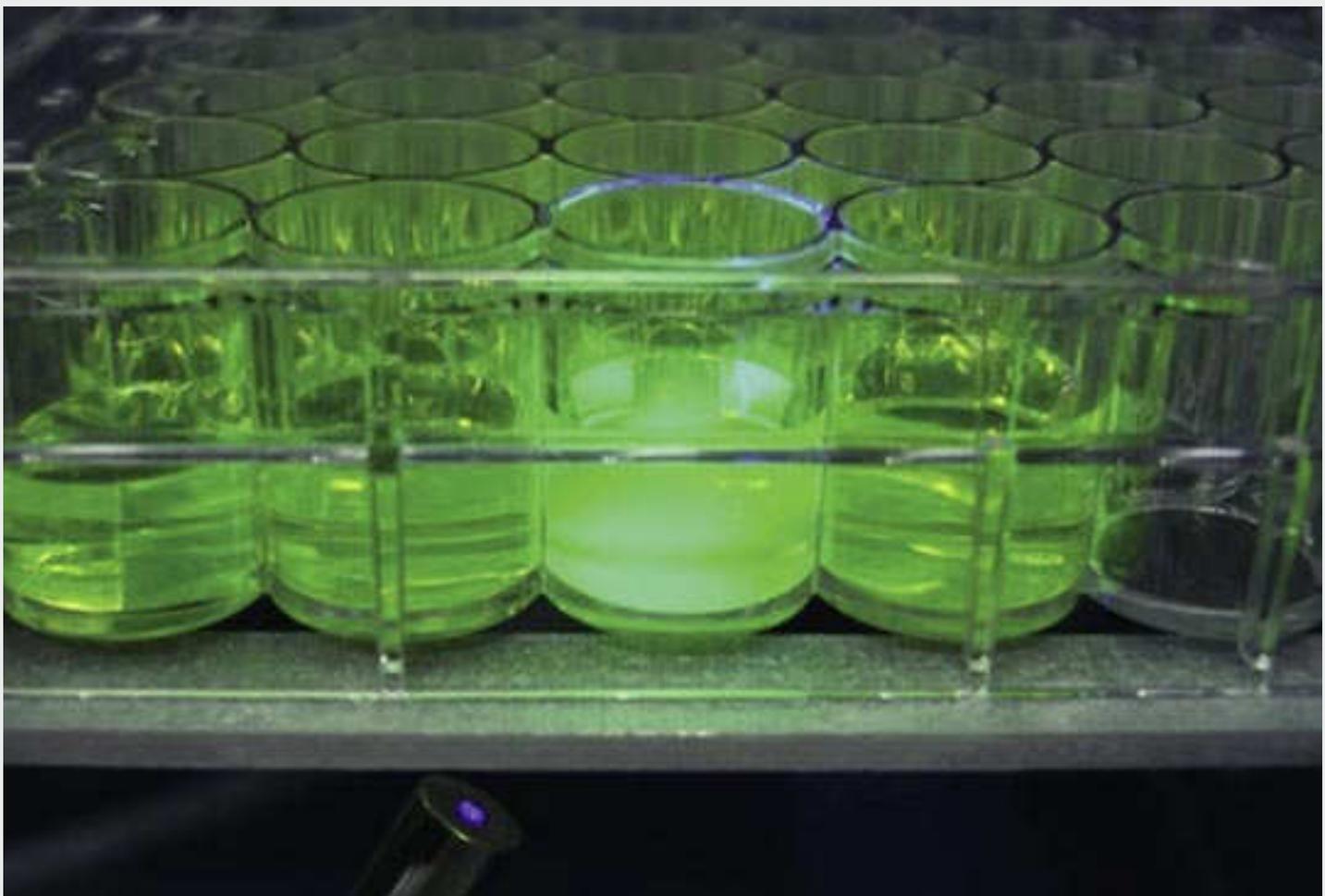


Bild 3: 50 Liter-Druckreaktor der Aachener Verfahrenstechnik für den Labormaßstab, der im wesentlichen dem späteren großtechnischen Produktionsreaktor entspricht.

in den Kolben konstant zu halten, hier wird statt des Zuckers Natriumcarbonat (Soda) in die Matrix eingebracht.

Eine Randbemerkung: Während der Koloss von Rhodos schon nach 66 Jahren durch ein Erdbeben umstürzte, wird der Erlenmeyerkolben schon seit mehr als 100 Jahren im Labor eingesetzt. Aber durch den Trend zur Automatisierung und Miniaturisierung findet auch hier ein Wandel statt. Nutzte man früher noch einen ganzen Schrank mit dutzenden oder hunderten von Schüttelkolben, ist heute die Mikrotiterplatte das Mittel der Wahl. Auf der rechteckigen Grundfläche ist dabei eine Vielzahl von Vertiefungen – auch Kavitäten genannt – untergebracht, die als Kultivierungsgefäße dienen. Mikrotiterplatten mit 48 oder 96 Vertiefungen und entsprechenden Arbeitsvolumina von etwa 100 bis 600 Mikrolitern werden zur Kultivierung von Organismen eingesetzt. Vereinfacht gesagt: Man bringt einen Schrank voll miniaturisierter Schüttelkolben auf einer Fläche eines DIN A6 – Blattes unter.

Ein Orakel soll den Bewohnern von Rhodos von der Restaurierung des gestürzten Kolosses abgeraten haben: „Was gut liegt, soll man nicht von der Stelle bewegen.“ Für die Kultivierung von Mikroorganismen sollte man diesem Orakelspruch allerdings nicht vertrauen. Hier gilt: Bewegung ist zwingend notwendig! Genau wie Erlenmeyerkolben müssen auch Mikrotiterplatten ständig geschüttelt werden. Hauptgrund ist die erforderliche Durchmischung und die kontinuierliche Versorgung der Organismen mit Sauerstoff. Um diese Anforderungen zu erfüllen, war eine genaue Charakterisierung der Flüssigkeitsbewegung der erste Schritt. Hierdurch wurde es möglich, Probleme und Hürden bei der späteren Übertragung der Kultivierung in den Maßstab eines Rührkessels zu erkennen und auch zu beheben. Ergebnis dieser Verbesserung ist die „Flowerplate“ mit einem völlig neuartigen, rationalen Design



für die Kavitäten einer Mikrotiterplatte. Die neue Form, deren Querschnittsfläche an eine Blume erinnert, sieht allerdings nicht nur gut aus, sie bietet den entscheidenden Vorteil, dass die Blütenblätter als Stromstörer wirken und durch die erhöhte Turbulenz der Sauerstofftransfer zu den Mikroorganismen deutlich verbessert wird.

Der Ehrgeiz der Aachener Verfahrenstechniker war es nun, auch für den Maßstab der Mikrotiterplatte Online-Messtechniken zu entwickeln. Die Herausforderung waren hierbei die hohe Parallelität der Kultivierungen und das Flüssigkeitsvolumen von wenigen 100 Mikrolitern. Zudem war eine wiederwertbare und nicht invasive Messtechnik nötig. Die Lösung heißt heute „BioLector“ und steht seit 2006 durch ein Spin-Off-Unternehmen Kunden in aller Welt zur Verfügung, siehe auch www.m2p-labs.com.

Das Medium zur einfachen und störungsfreien Messung im BioLector heißt Licht. Im einfachsten Fall wird Licht an Teilchen gestreut. Die Intensität des zurückgestreuten Lichtes dient dabei als Maß für die An-

zahl der Organismen in der Kultur. Zusätzlich kann die Messung der Fluoreszenzeigenschaften einer Kultur Auskunft geben über die Produktion von Eiweißen oder den physiologischen Zustand der Mikroben. Durch die Zugabe spezieller Fluorophore ist außerdem die Erfassung des pH-Wertes oder des gelösten Sauerstoffgehaltes der Kulturflüssigkeit möglich.

Der technische Clou des BioLector-Systems liegt in zwei wesentlichen Neuerungen: Eine Verfahrenheit bewegt den mit einem Spektrometer verbundenen Lichtleiter unterhalb der Mikrotiterplatte nacheinander zu jeder einzelnen Kavität. So ist die automatisierte Analyse aller Kulturen möglich. Die zweite Neuerung ist die Messung während des laufenden Schüttelvorganges. Eine Unterbrechung der Bewegung und damit der Sauerstoffversorgung werden vermieden und eine Beeinflussung der Mikroorganismen ist so praktisch nicht vorhanden. Jede einzelne Kavität einer handelsüblichen Mikrotiterplatte – oder besser noch der neue Flowerplate – kann mit diesem System eine

große Menge Online-Informationen liefern.

Was noch fehlt, um in der Mikrotiterplatte einen industriellen Bioprozess nachzubilden, ist eine Prozessregulierung. Im Rührkessel kommen routinemäßig pH-Regulation und Zufütterung von Nährstoffen zum Einsatz. Um dies auch in Mikrotiterplatten umzusetzen, arbeiten die RWTH-Verfahrenstechniker neben der gezielten Freisetzung von pH-Stellmitteln und Nährstoffen aus Polymeren – analog dem beschriebenen System für Schüttelkolben – aktuell an mikrofluidischen Bauteilen für Mikrotiterplatten. Diese werden am Boden der Mikrotiterplatte angebracht und sorgen mit ihren Kanälen von nur 100 bis 200 Mikrometern Breite für eine Verbindung zwischen den Kavitäten. Durch Ventile und einfache Pumpen wird die Dosierung von wenigen Nanolitern von einer Kavität zur anderen möglich.

Die Rhodier vertrauten damals dem Orakel – was natürlich auch eine Menge Kosten und einen neuen Baumeister ersparte – und stellten die Trümmer des gestürzten Kolo-

Bild 4: Die Aachener Bioverfahrenstechniker haben es sich zur Aufgabe gemacht, den Schüttelkolben detailliert zu charakterisieren. Hierdurch werden Schüttelkolben-Experimente im Milliliter-Maßstab auf den späteren

Produktionsprozess im Kubikmeter-Maßstab übertragbar. Auf diese Weise können die Entwicklungskosten für biotechnologische Prozesse deutlich reduziert werden. Foto: Peter Winandy



ses neun Jahrhunderte aus, bevor die Araber sie als Altmetall abtransportierten. So lange möchte heute natürlich niemand mehr warten. Die neuen Mess- und Regeltechniken für Kleinkultursysteme versetzen Verfahrenstechniker daher in die Lage, schon von Beginn an ein intelligentes Screeningkonzept zu verfolgen, dessen Ergebnisse sich auf den Produktionsmaßstab übertragen lassen. Der Vergleich von Daten aus RAMOS und BioLector mit Rührkesselfermentern zeigt, dass in Screening und Scale-Up beträchtliche Verbesserungen erzielt worden sind und dass dafür nur ein wenig Köpfchen und kein achtetes Weltwunder nötig ist.

Autoren:
Univ.-Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs leitet den Lehrstuhl AVT-Bioverfahrenstechnik.
Dipl.-Biotechnol. Matthias Funke und M.Sc. Tobias Klement sind Wissenschaftliche Mitarbeiter am Lehrstuhl AVT-Bioverfahrenstechnik.