

RAMOS

(Respiration Activity Monitoring System)

Online-Messung der Atmungsaktivitäten biologischer Kulturen in geschüttelten Bioreaktoren

In messtechnisch hochauferüsteten gerührten Bioreaktoren (Volumen > 1L) gehört die Erfassung der Atmungsaktivität biologischer Kulturen, repräsentiert durch die Sauerstofftransferate (OTR), die Kohlendioxidtransferate (CTR) und den Respirationsquotient (RQ), schon lange zum Stand der Technik. In geschüttelten Bioreaktoren ermöglicht erstmals die neu entwickelte Messanlage „RAMOS“ (siehe Abb. 1), wie in Bioforum 4/99 berichtet, die Online-Ermittlung der Sauerstofftransferate (OTR). Die Weiterentwicklung von RAMOS in Kooperation mit der Firma HiTec Zang GmbH (Herzogenrath) erlaubt nun zusätzlich die Bestimmung der Kohlendioxidtransferate (CTR) respektive des Respirationsquotienten (RQ). Damit stellt RAMOS dem Anwender charakteristische Größen seines Bioprozesses online zur Verfügung, die es ihm ermöglicht Rückschlüsse auf den Metabolismus des mikrobiologischen Systems und die Kulturbedingungen zu ziehen.

Einführung

In der Ausgabe Bioforum 4/99 (S. 182–186) haben wir bereits auf die Bedeutung der Sauerstofftransferate (OTR) für die Prozessbeobachtung hingewiesen und eine Messanlage zur Online-Bestimmung dieser Sauerstofftransferate (OTR) unter sterilen Bedingungen in geschüttelten Bioreaktoren vorgestellt.

Die Musterverläufe in Abbildung 2 zeigen eine kleine Auswahl der Auswirkungen biologischer Phänomene auf die Sauerstofftransferate. Bild 1 stellt den typischen Verlauf der Sauerstofftransferate bei unlimitiertem Wachstum einer Kultur auf Minimalmedium mit nur einer



Abb. 1: RAMOS (Respiration Activity Monitoring System), mit acht Messkolben und sechs normale Schüttelkolben für die Probenahme auf einem Standardschütteltablett, in der Mitte des Tablett befinden sich die Ein- und Auslassventile und die Steuerungselektronik

Kohlenstoffquelle dar. Die Sauerstofftransferate nimmt exponentiell analog zur Biomassebildung zu. Danach fällt die Sauerstofftransferate steil ab. Dieses rapide Absinken der Sauerstofftransferate ist ein charakteristisches Merkmal für die Erschöpfung der Kohlenstoffquelle, bzw. der daraufhin eingestellten Atmung der Mikroorganismen. Durch Limitierungen (Bild 2, 3), Inhibitionen (Bild 4) und diauxisches Wachstum (Bild 5) entstehen jeweils charakteristische abweichende Verläufe der Sauerstofftransferate (OTR), aus denen man auf die Ursachen der Verläufe schließen kann.

In den folgenden Abschnitten wird eine Weiterentwicklung der Anlage vorgestellt: Die Online-Messung der Kohlendioxidtransferate (CTR), respektive des Respirationsquotienten (RQ).

Messanlage und -methode

Anhand Abbildung 3 soll die Messanlage und die Meßmethode näher erläutert

werden. Während eines Kulturversuches in den Schüttelkolben wird kontinuierlich ein sich wiederholender Messzyklus durchlaufen, der in eine Mess- und eine Spülphase unterteilt ist. In der Spülphase sind das Ein- und Auslassventil geöffnet und der Messkolben wird mit Gas durchströmt, das von einer Gasmischbatterie aufbereitet wird. Filter im Einlass und Auslass des Messkolbens sorgen für sterile Bedingungen im Kolben. Zu Beginn der Messphase werden das Ein- und Auslassventil des Messkolbens geschlossen. Die anhaltende Atmungsaktivität der Mikroorganismen führt zur Veränderungen des Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruckes im Gasraum des Messkolbens. Aus den Partialdruckänderungen, die mit Hilfe eines Sauerstoff- und Kohlendioxidsensors erfasst werden, bestimmt der angeschlossene Rechner die Sauerstoff- (OTR) und Kohlendioxidtransferate (CTR) und den Respirationsquotienten (RQ) im Messkolben. Anschließend werden die Ventile

Keywords

Sauerstofftransferate, Kohlendioxidtransferate, Respirationsquotient, Schüttelkolben, Atmungsaktivität, Messtechnik, Online-Analytik

wieder geöffnet und der nächste Messzyklus beginnt.

Anwendung

In der neuen Messanlage wurden bereits mehrere biologische Systeme (Bakterien, Pilze, tierische und pflanzliche Zellen, ...) kultiviert. Exemplarisch soll hier am Beispiel der Hefe *Pichia stipitis* der Nutzen der Anlage für den Anwender erläutert werden. Abbildung 4 zeigt den zeitlichen Verlauf der Sauerstofftransferate (OTR) einer Fermentation der Hefe *Pichia stipitis* in einem 250 mL Messschüttelkolben. Nach einer kurzen Lag-Phase steigt die Sauerstofftransferate mit der Biomassebildung steil an. Aus dem Anstieg der Sauerstofftransferate in dieser Phase lässt sich die maximale Wachstumsrate μ_{max} mit 0,54 1/h bestimmen. Nach etwa 6 Std. stagniert die Sauerstofftransferate und bildet ein Plateau bei einem Wert von 0,018 mol/L/h. Dieser Verlauf

der Sauerstofftransferate entspricht dem Musterverlauf in Abbildung 2.3 und weist auf eine Sauerstofflimitierung der Kultur hin. Das Plateau kennzeichnet die maximale Sauerstofftransferkapazität des Schüttelreaktors bei den gewählten Kulturbedingungen. Das relativ niedrige Niveau der Sauerstofftransferkapazität ist auf die geringe Schüttelfrequenz von 100 Upm zurückzuführen. Der steile Abfall der Kurve nach ca. 21 Std. weist auf die Erschöpfung der Kohlenstoffquelle zu diesem Zeitpunkt hin und markiert dadurch das Ende der Fermentation. Alleine aus dem zeitlichen Verlauf der Sauerstofftransferate (OTR) lassen sich wichtige Informationen (Wachstumsrate, Sauerstofflimitierung, Kulturdauer usw.) ableiten. RAMOS bietet dem Anwender aber seit neustem auch die Kohlendioxidtransferate (CTR) und den Respirationsquotienten (RQ) als Informationsquelle online an, wie in Abbildung 4 zu sehen ist.



Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs, Dipl.-Ing. Tibor Anderlei; Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, RWTH Aachen

Die zusätzlichen Daten (CTR, RQ) erlauben eine ganz neue Sichtweise der Kultivierung von *Pichia stipitis*. Die Fermentation der Hefe lässt sich nun in drei Phasen unterteilen, deren Bruttoreaktionsstöchiometrien in Abbildung 5 aufgeführt sind:

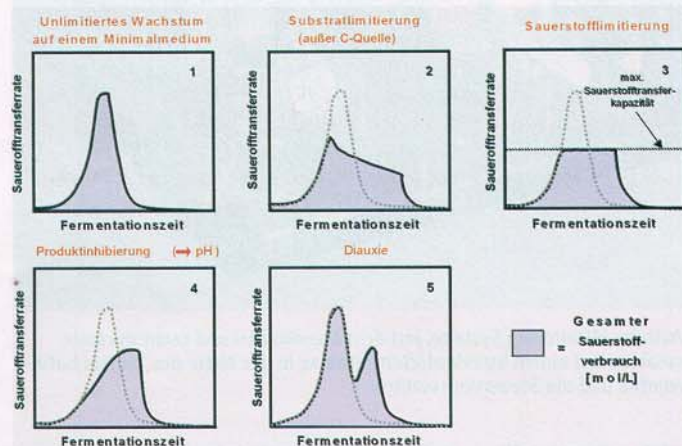


Abb. 2: Auswirkungen von biologischen Phänomenen auf den Verlauf der Sauerstofftransferate (OTR)

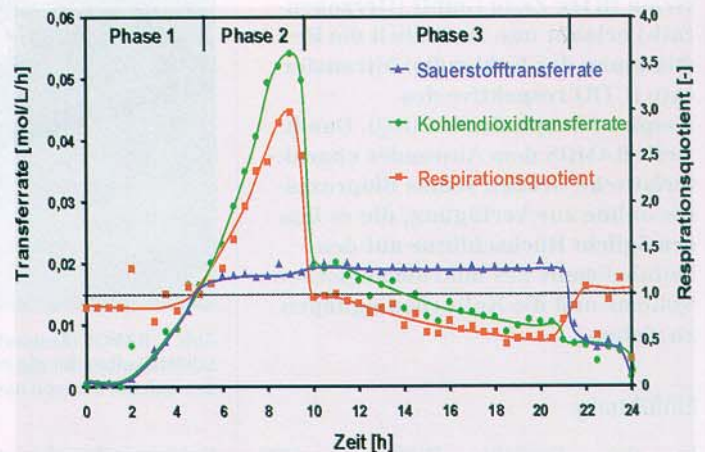


Abb. 4: Zeitliche Verlauf der Sauerstofftransferate (OTR), Kohlendioxidtransferate (CTR) und des Respirationsquotienten (RQ) während einer Kultur von *Pichia stipitis*, Füllvolumen 10 mL, Schüttelfrequenz 100 Upm, Schütteldurchmesser 50 mm, Temperatur 30°C, Medium: Complexmedium mit 20 g/L Pepton, 10 g/L Hefeextrakt und 20 g/L Glukose.

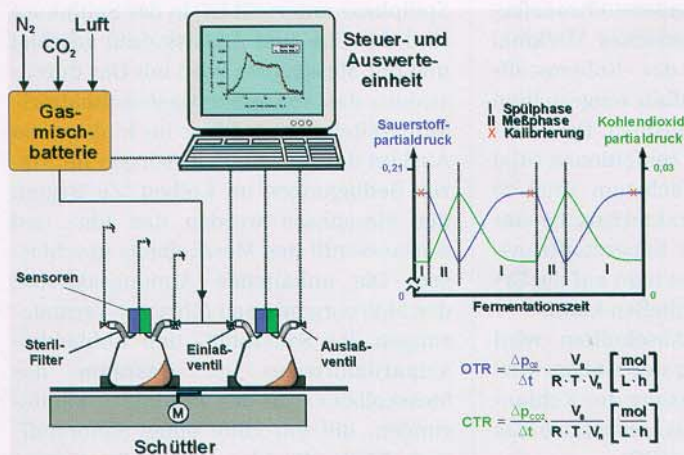


Abb. 3: Aufbau von RAMOS; Verlauf der Partialdrücke in der Mess- und Spülphase; vereinfachte Berechnungsformel von Sauerstofftransferate (OTR) und Kohlendioxidtransferate (CTR), V_g : Gasvolumen [mL], V_L : Flüssigkeitsvolumen [mL], R: Ideale Gaskonstante [bar·L/mol/K], T: Temperatur [K], $\Delta p_{O_2(CO_2)}$: Sauerstoff- (Kohlendioxid-) partialdruckdifferenz [bar], Δt : Messzeit [h]

Phase

- 1) $\text{Glukose} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{Biomasse} \quad (RQ \approx 1)$
- 2) $\text{Glukose} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{Ethanol} + \text{Biomasse} \quad (RQ \gg 1)$
- 3) $\text{Ethanol} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{Biomasse} \quad (RQ \approx 0,66)$

Abb. 5: Stöchiometrische Grundlagen der drei Phasen der Fermentation der Hefe *Pichia stipitis*

1. Phase:

In den ersten 5 Std. verläuft die Kohlendioxidtransferrate (CTR) annähernd parallel zur Sauerstofftransferrate. In dieser Phase wird die Kohlenstoffquelle Glukose vollständig zu Biomasse und Kohlendioxid oxidiert.

2. Phase:

Ab der 6. Std. stagniert die Sauerstofftransferrate aufgrund der Sauerstofflimitierung. Die Kohlendioxidtransferrate steigt währenddessen kontinuierlich bis zur 9. Std. an. In diesem Zeitraum wird dadurch mehr Kohlendioxid vom Mikroorganismus produziert als Sauerstoff aufgenommen. Dies führt zu einem Respirationsquotienten, der bis auf 2,7 ansteigt (siehe Abb. 4). In dieser Phase schaltet die Hefe aufgrund der Sauerstofflimitierung parallel zur vollständigen Oxidation der Glukose die Vergärung zu Kohlendioxid und dem Produkt Ethanol hinzu, was stöchiometrisch zu einem Respirationsquotienten von größer 1 führt.

3. Phase:

Nach ca. 10 Std. sinkt die Kohlendioxidtransferrate steil ab und zeigt damit an, dass die Kohlenstoffquelle Glukose verbraucht ist. Daraufhin fällt die Kohlendioxidtransferrate auf einen Wert von ca. 0,01 mol/L/h unterhalb der Sauerstofftransferrate ab. Dies führt zu einem Respirationsquotienten von ca. 0,6. Dies deutet stöchiometrisch auf die nun einsetzende vollständige Oxidation des vorher produzierten Ethanols zu Kohlendioxid und Biomasse hin. Nach 21 Std. knicken beide Kurven gleichzeitig ab und weisen auf die Erschöpfung der Kohlenstoffquelle Ethanol hin.

In Abbildung 6 sind die Analysenergebnisse (Konzentration von Glukose und Ethanol) der Proben, die aus parallel betriebenen Kolben entnommen wurden dargestellt. Die Verläufe der Glukose- und der Ethanolkonzentration verifizieren die oben beschriebenen Fermentationsphasen.

Mit den zusätzlich aufgenommenen Verläufen der Kohlendioxidtransferrate (CTR) und des Respirationsquotienten (RQ) wird die Information, die aus der Sauerstofftransferrate (OTR) gewonnen

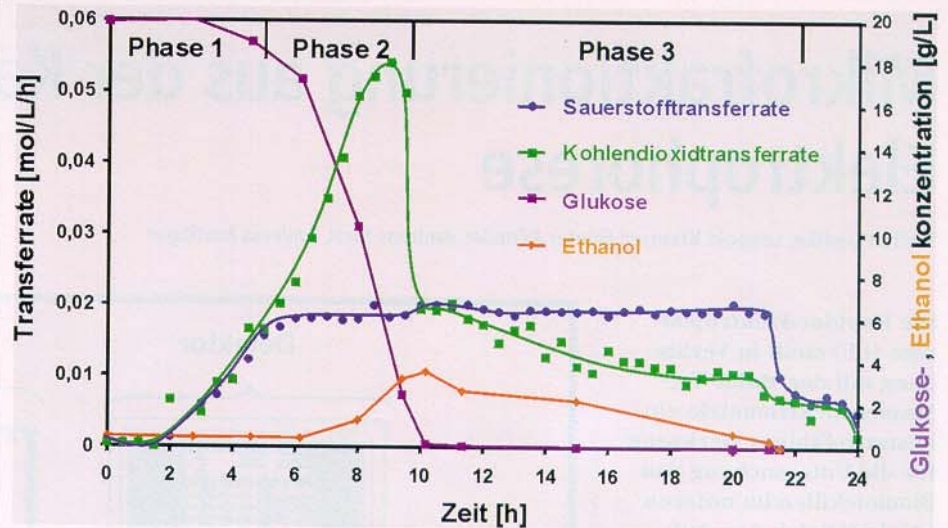


Abb. 6: Zeitliche Verlauf der Sauerstofftransferrate, Kohlendioxidtransferrate, Glukose- und Ethanolkonzentration während einer Fermentation von *Pichia stipitis*, Füllvolumen 10 mL, Schüttelfrequenz 100 Upm, Schütteldurchmesser 50 mm, Temperatur 30°C, Medium: Komplexmedium mit 20 g/L Pepton, 10 g/L Hefeextrakt und 20 g/L Glukose

wurde, ergänzt. Das diauxische Wachstum der Hefe auf Glukose und Ethanol und der Zeitpunkt der Erschöpfung der Glukose wurden erst mit Hilfe der Kohlendioxidtransferrate sichtbar.

Fazit

Mit RAMOS werden die Vorteile von geschüttelten Bioreaktoren (Parallelansätze, kostengünstig, einfache Handhabbarkeit, ...) mit denen von gerührten Bioreaktoren (online Messtechnik) verknüpft. Damit ist es nun möglich, in einer frühen Phase der Forschung und Bioprozessentwicklung aus den Messdaten extrem hilfreiche Rückschlüsse auf die Kultivierungsbedingungen und den physiologischen Zustand der Mikroorganismen zu ziehen:

- Ermittlung geeigneter Bedingungen für das konventionelle Massenscreening (Versuchsdauer, Betriebsbedingungen)
- Erkennung und Verhinderung von Limitierungen (z. B. Sauerstoff) und Inhibierungen
- Online-Verfolgung von mikrobiellen Kulturen in Schüttelreaktoren
- Ermittlung von Kenngrößen (OTR, CTR, RQ, μ_{max} , k_{La} ...) für ein sicheres Scale Up
- Bilanzieren von Fermentationen

Prof. Dr.-Ing. Jochen Büchs

1975-81 Studium der Verfahrenstechnik an der TU München; 1982-84 Mombusho/DAAD Stipendiat am Institute of Physical and Chemical Research (Riken) und an der Tokyo Universität in Japan; 1984-88 Doktorand, später wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biotechnologie II des FZ Jülich; 1988 Promotion, 1988-93 Sachbearbeiter, später Leiter des Teams Bioverfahrenstechnik der BASF AG in Ludwigshafen; 1993-96 Leitung des Biotechnikums der BASF AG in Ludwigshafen; seit 1996 Leiter des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik an der RWTH Aachen

Dipl.-Ing. Tibor Anderlei

1991-97 Maschinenbaustudium mit der Vertiefungsrichtung Bioverfahrenstechnik an der RWTH Aachen; seit 1997 Doktorand an dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der RWTH Aachen

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

RWTH Aachen
Worringerweg 1
52056 Aachen
buechs@biovt.rwth-aachen.de
anderlei@biovt.rwth-aachen.de

Easy Info

630

www.biosearch.de



Informationen zu Produkten und Dienstleistungen
von über 3050 Firmen