

K. Schügerl

**Bioreaktionstechnik:
Bioprozesse mit Mikroorganismen
und Zellen**

Prozeßüberwachung

Birkhäuser Verlag
Basel • Boston • Berlin

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	XI
1 Einleitung	1
2 Allgemeine Grundlagen und Methoden	5
2.1 Überwachungstechniken von Bioprozessen	5
2.1.1 <i>In-situ</i> -Messung der Kontrollvariablen	5
2.1.1.1 Temperatur	6
2.1.1.2 Druck	6
2.1.1.3 Flüssigkeitsniveau und -gewicht	6
2.1.1.4 Flüssigkeits- und Gasdurchsatz	7
2.1.1.5 Rührerdrehzahl und Leistungseintrag	8
2.1.1.6 pH-Wert des Mediums	9
2.1.2 <i>In-situ</i> -Messung der Zustandsvariablen	11
2.1.2.1 Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium	12
2.1.2.2 Gelöstkohlenstoffdioxidkonzentration im Kultivierungsmedium	15
2.1.2.3 Redoxpotential in Kultivierungsmedien	15
2.1.2.4 Bestimmung der Ionenkonzentrationen in Kultivierungsmedien	17
2.1.2.5 Bestimmung der Abgaszusammensetzung	18
2.1.2.6 Bestimmung der Konzentration und des biologischen Zustandes der Zellen	19
2.1.3 Sterile On-line-Probenahme und Probenvorbereitung	29
2.1.3.1 Zellfreie Mediumentnahme mit einem Querstrom-Filtrationsmembran-Modul, integriert in eine Mediumrückführschleife	31
2.1.3.2 <i>In-situ</i> -Membranfilter für die Probeentnahme zellfreier Medien	35
2.1.3.3 <i>In-situ</i> -Probeentnahme von zellhaltigem Medium	39
2.1.3.4 Probeentnahme gelöster Gase und flüchtiger Mediumkomponenten	40
2.1.3.5 Probenvorbereitung	42
2.1.4 On-line-Analysentechniken	43
2.1.4.1 Die kontinuierliche Fließanalyse (Continuous flow analysis, CFA)	44
2.1.4.2 Fließinjektionsanalyse FIA	46
2.1.4.3 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	53
2.1.4.4 Schnelle-Protein-Flüssigkeits-Chromatographie (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC)	57

2.1.4.5	Die Ionen-Chromatographie (IC)	58
2.1.4.6	Membran-Chromatographie (MC)	59
2.1.4.7	Kapillar-Elektrophorese (CE)	60
2.1.4.8	Gaschromatographie (GC)	62
2.1.4.9	Überkritische Fluid-Chromatographie (Supercritical-Fluid- Chromatography, SFC)	64
2.1.4.10	Massenspektrometrie (MS)	64
2.1.5	Die Off-line-Analyse von Schlüsselparametern	68
2.1.5.1	Vermeidung von Infektionen (Sterilitätstest)	68
2.1.5.2	Meßmethoden zur Bestimmung von Zellgröße, Lebendzellzahl, Zellmorphologie	69
2.1.5.3	Rheologie des Kultivierungsmediums	75
2.1.5.4	Intrazelluläre Zellkomponenten	77
2.1.5.5	Plasmidzahl und Plasmidstabilität	83
2.1.5.6	Spezielle analytische Methoden	84
3	Anwendung der allgemeinen Techniken für individuelle Bioprozesse	89
3.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
3.1.1	Die Überwachung des Prozesses	95
3.1.1.1	Die Festlegung der Mediumzusammensetzung	95
3.1.1.2	Die Bestimmung der Gaszusammensetzung	98
3.1.1.3	Bestimmung der Zellkonzentration und Feststellung ihres Zustandes	99
3.1.1.4	Fluiddynamisches Verhalten des Mehrphasensystems im Bioreaktor	99
3.1.2	Beispiele für die Prozeßüberwachung	100
3.1.2.1	Satzkultivierung	103
3.1.2.2	Kontinuierliche Kultivierung	107
3.1.2.3	Zellzyklus und Synchronwachstum	112
3.1.3	Prozeßsimulierung im Laboratorium. Scale-down Messungen	123
3.1.4	Maßstabvergrößerung (scale-up) des Reaktors	127
3.1.5	Ökonomische-, ökologische- und Sicherheitsaspekte	135
3.2	Die Produktion von Fusionsprotein mit rekombinanten <i>Escherichia coli</i> Bakterien	141
3.2.1	Die Prozeßüberwachung	143
3.2.1.1	Die Überwachung der Mediumzusammensetzung	144
3.2.1.2	Die Bestimmung der Zellkonzentration und die Charakterisierung der Zellen	152
3.2.2	Kultivierung von rekombinanten <i>E. coli</i> und Produktion von EcoRI und Fusionsprotein EcoRI::SPA	155
3.2.2.1	Satzkultivierung von <i>E. coli</i> JM103 (System C)	155

3.2.2.2	Zulauf-Satzkultivierung von <i>E. coli</i> JM 103	158
3.2.3	Ökonomische-, ökologische- und Sicherheitsaspekte	161
3.3	Alkalische Proteaseproduktion mit <i>Bacillus licheniformis</i>	166
3.3.1	Die Prozeßüberwachung	166
3.3.2	Satz- und Zulauf-Satzkultivierungen	179
3.3.3	Ökonomische-, ökologische- und Sicherheitsaspekte	184
3.4	Die Produktion von Antibiotika mit Pilzen und Streptomyceten	186
3.4.1	Analytische Prozeßüberwachung	186
3.4.1.1	Produktion von Penicillin mit <i>Penicillium chrysogenum</i>	186
3.4.1.2	Produktion von Cephalosporin C mit <i>Acremonium chrysogenum</i> (<i>Cephalosporium acremonium</i>)	204
3.4.1.3	Produktion von Tetracyclin mit <i>Streptomyces aureofaciens</i>	214
3.4.1.4	Vergleich der Produktion der drei Antibiotika in Rührkessel- und Mammut-Säulen-Schlaufen (ATL)-Reaktoren	220
3.4.1.5	Bilanzierung der Tetracyclinproduktion	224
3.4.2	Ökonomische-, ökologische- und Sicherheitsaspekte	230
3.5	Kontinuierliche Produktion von Primärmetaboliten mit suspendierten und immobilisierten Mikroorganismen	236
3.5.1	Prozeßüberwachung	237
3.5.2	Charakterisierung der immobilisierten Zellsysteme	238
3.5.2.1	Kontinuierliche Kultivierung von <i>Zymomonas mobilis</i> und Produktion von Ethanol mit suspendierten bzw. immobilisierten Zellen	239
3.5.2.2	Kontinuierliche Kultivierung von <i>Clostridium acetobutylicum</i> und Produktion von Aceton und Butanol mit suspendierten sowie immobilisierten Zellen	252
3.5.2.3	Kontinuierliche Kultivierung von Lactobazillen: Produktion von Milchsäure mit suspendierten und immobilisierten Zellen	261
3.5.3	Ökonomische-, ökologische- und Sicherheitsaspekte	270
3.6	Kultivierung tierischer Zellen und Produktion von Proteinen	274
3.6.1	Prozeßüberwachung	274
3.6.1.1	Probeentnahme	275
3.6.1.2	Perfusionssysteme	277
3.6.1.3	Überwachung der Konzentration und Eigenschaften der Zellen	280
3.6.1.4	Überwachung der Zusammensetzung des Nährmediums und der Konzentrationen der Metaboliten	283
3.6.1.5	Überwachung der Enzymaktivität	284
3.6.1.6	Überwachung der Produktkonzentration	285
3.6.1.6.1	FIA-Immunoassays	285
3.6.1.6.2	Chromatographische Methoden	286

3.6.1.6.3	Massenspektrometrische Methoden	287
3.6.1.6.4	Optische spektroskopische Methoden	289
3.6.1.6.5	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	290
3.6.1.7	Kultivierung von BHK- und CHO-Zellen und Produktion von β-Galactosidase und Antithrombin III	290
3.6.1.8	Kultivierung von Hybridomzellen und die Produktion monoklonaler Antikörper	297
3.6.1.9	Kultivierung von <i>Spodoptera frugiperda</i> Zellen und Produktion von β-Galactosidase	300
3.6.2	Ökonomische-, ökologische- und Sicherheitsaspekte	312
3.7	Anaerobe Abwasserbehandlung	315
3.7.1	Prozeßüberwachung	318
3.7.1.1	Bestimmung der Zellkonzentration und -aktivität	318
3.7.1.2	Analyse der flüssigen Phase	320
3.7.1.3	Analyse der Gasphase	323
3.7.2	Biogasproduktion aus Molke und Kohlenstoffbilanzierung	323
3.7.3	Modellierung	328
3.4.7	Biogasproduktion aus Rindergülle	331
3.7.5	Ökonomische-, Ökologische- und Sicherheitsaspekte	335
4	Neue Entwicklungen	339
4.1	Prozeßüberwachung	339
4.1.1	Schnelle Probeentnahme für die Analyse intrazellulärer Metabolite	339
4.1.2	<i>In-situ</i> -Scanning-Fluorometrie für die Überwachung von Kultivierungsprozessen	340
4.2	Bildanalyse von Zellen und Zellaggregaten	342
4.2.1	<i>In-situ</i> -Mikroskopie der Zellen und Zellaggregate	342
4.2.2	<i>Ex-situ</i> -Mikroskopie und Bildanalyse der Zellen und Zellaggregate	344
4.2.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	349
4.2.4	Elektronmikroskopische Untersuchungen	353
4.3	Ermittlung experimenteller Daten für die Berechnung der Stoffwechselflüsse in Mikroorganismen und tierischen Zellen	358
4.4	Signalauswertung, Automatisierung und Expertensysteme für die Prozeßüberwachung	361
5	Literaturverzeichnis	367
5.1	Literaturverzeichnis zu Kapitel 2	367
5.2	Literaturverzeichnis zu Kapitel 3.1	384
5.3	Literaturverzeichnis zu Kapitel 3.2	387

5.4	Literaturverzeichnis zu Kapitel 3.3	389
5.5	Literaturverzeichnis zu Kapitel 3.4	391
5.6	Literaturverzeichnis zu Kapitel 3.5	395
5.7	Literaturverzeichnis zu Kapitel 3.6	400
5.8	Literaturverzeichnis zu Kapitel 3.7	405
5.9	Literaturverzeichnis zu Kapitel 4	408
Anhang	413
Abkürzungsverzeichnis	413
Griechische Buchstaben	417
Schlagwortverzeichnis	419