



Lasse Jannis Frey (Autor)
Entwicklung und Charakterisierung von Tropfen-Bioreaktoren



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8528>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1. Einleitung und Zielsetzung

In der biotechnologischen und biopharmazeutischen Forschung besteht zunehmend ein erheblicher Bedarf an leistungsfähigen Kultivierungssystemen – so genannter Bioreaktoren – die einen automatisierten, hochparallelisierten Betrieb bei unabhängiger Variation einzelner Prozessparameter zulassen (Zanzotto et al., 2004). Damit einher geht die Notwendigkeit für immer größere Mengen an experimentellen Daten und die steigende Nachfrage nach Experimenten im Hochdurchsatz-Verfahren. Diese Anforderungen zu decken zielen miniaturisierte Kultivierungssysteme mit einem hohen Maß an integrierter Sensorik und Kontrollmöglichkeit ab.

Miniaturisierte Kultivierungssysteme (Mikrobioreaktoren, MBR) ermöglichen einen parallelisierten Betrieb von Prozessen, wodurch, verglichen mit Bioreaktoren im Labormaßstab, eine deutlich höhere Anzahl an Versuchen gleichzeitig durchgeführt werden kann. Dabei können verschiedene Parameter und Einflussgrößen – biologischer und prozesstechnischer Natur – simultan untersucht werden. Besonders Einschränkungen in der manuellen Bedienung und dem experimentellen Betrieb im herkömmlichen Prozess werden so umgangen. Weiterhin verringert das reduzierte Reaktionsvolumen den notwendigen Platzbedarf sowie die Mengen und Volumina an eingesetzten Proben, Substraten und Chemikalien. Zusätzlich bietet das größere Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis Vorteile im Wärme- und Stofftransport. Daraus ergibt sich neben einer gesteigerten Kosteneffizienz eine signifikante Beschleunigung der Forschung und Prozessentwicklung. Dabei kommen Vorteile von Mikroreaktoren umso besser zur Geltung, je kleiner der Versuchsraum ist.

Eine Herausforderung der Miniaturisierung stellt allerdings die Kontrolle und Aufrechterhaltung konstanter Umgebungsbedingungen im Reaktionsraum dar. Durch geeignete konstruktive Maßnahmen müssen Stoff- und Temperaturgradienten vermieden sowie homogene Strömungsverhältnisse über die gesamte Versuchsdauer hinweg gewährleistet werden. Diese besonderen Herausforderungen für die Homogenisierung ergeben sich vorwiegend aus dem zunehmenden Einfluss von Kapillar- und Zähigkeitskräften gegenüber der Gravitations- und Trägheitskraft im Mikromaßstab (Dietzel, 2016; Shilton et al., 2011). Zusätzlich ist die Implementierung von Sensorik und die einhergehende Analyse biologischer Prozesse anspruchsvoll.

MBR kommen zumeist in der Frühphasenentwicklung zum Einsatz, wenn eine große Anzahl an Einflussfaktoren und deren Zusammenspiel zu untersuchen sind. Ein Hauptanwendungsgebiet ist die Bioprozessentwicklung, wo sie die Bedingungen größerer Kultivierungssysteme abbilden sollen (vom Labor-, über den Pilot- bis hin zum Produktionsmaßstab). Das Ziel besteht darin, die gewonnenen Erkenntnisse aus dem kleinen in den nächstgrößeren Maßstab zu transferieren und so eine

Maßstabsvergrößerung (Scale-up) durchzuführen. Neben der Prozessentwicklung und dem damit verbundenen Scale-up kommen die Vorteile von MBR bei Screening-Anwendungen zu analytischen Zwecken zum Einsatz. In diesem Zusammenhang werden MBR weniger als Abbild von Produktionsbioreaktoren genutzt, sondern vielmehr um spezifisch zelluläre Abläufe zu beleuchten. Hierbei sind sie ein analytisches Werkzeug zur Durchführung zellulärer Versuche in einer automatisierten und parallelisierten Betriebsweise, um so einen großen Umfang an experimentellen Daten zu erzeugen. Für diese Screening-Anwendungen ist es wichtiger, die Zellpopulation unter klar definierten Bedingungen zu kultivieren und fortwährend Messungen durchzuführen, statt präzise ein Abbild von Prozessbedingungen eines größeren Maßstabes abzubilden.

Beide Anwendungsgebiete von MBR – als Scale-up-Instrument oder als analytisches Werkzeug – sind sowohl für die industrielle als auch für die akademische Forschung von großem Nutzen. Dies wird auch verdeutlicht durch die enorme Anzahl an entwickelten MBR-Systemen und ihre rasche Integration in die moderne biotechnologische Forschung. Bei den beschriebenen MBR-Systemen sind zwei unterschiedliche Richtungen in Konstruktion und Bauweise zu erkennen: Auf der einen Seite existieren Systeme mit definiertem Reaktorbehälter, die grundlegende Ähnlichkeit in der Bauweise mit Laborbioreaktoren aufweisen – allerdings mit deutlich geringerem Reaktionsvolumen. Charakteristische Merkmale sind dabei die Möglichkeit einer aktiven Durchmischung der Flüssigphase, eine umfangreiche online-Sensorik sowie die Möglichkeit, durch Zugabe oder Entnahme von Flüssigkeiten den Kultivierungsprozess zu steuern. Zentrales Ziel dieser Systeme ist das Abbilden von Prozessbedingungen eines größeren Kultivierungssystems. Demgegenüber stehen MBR-Systeme, die ganz gezielt einen hohen experimentellen Durchsatz ermöglichen und daher in der Regel ein möglichst geringes Reaktionsvolumen beinhalten. Zu diesem Zweck werden häufig Flüssigkeitstropfen als abgeschlossenes und definiertes Reaktionselement genutzt, in denen separate Versuche durchgeführt werden. Ein dedizierter Reaktorbehälter („Kessel“) ist in der Regel nicht vorhanden. Die Integration einer aktiven Durchmischung zur Steigerung des Stofftransports und Vermeidung von Konzentrationsgradienten ist allerdings ebenso anspruchsvoll, wie die Einbringung einer geeigneten online-Sensorik in jeden Tropfen. Folglich ist eine ganzheitliche Überwachung der ablaufenden zellulären Prozesse in Tropfen-Bioreaktoren bislang nur eingeschränkt möglich. Allerdings ist eine nahezu unbegrenzte Parallelisierung der Reaktionselemente machbar, wodurch eine deutliche Flexibilität in der Versuchsdurchführung gewährt wird.

Die Verbindung beider Bauweisen – Tropfen-Bioreaktoren auf der einen und MBR mit definierter Reaktorgeometrie auf der anderen Seite – kann neue Anwendungsmöglichkeiten aber auch eine neue Qualität von Kultivierungsversuchen im Kleinstmaßstab eröffnen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand nunmehr darin, ein MBR-System zu entwickeln, das die Vorteile sowohl von Tropfen-Bioreaktoren als auch von Systemen mit definiertem Reaktorbehälter vereinigt und effektiv nutzt. Dies ist in **Abb. 1.1** verdeutlicht.



Abbildung 1.1: Zielstellung der Dissertation: Kombination der Vorteile der Konstruktion von Kultivierungssystemen, die Tropfen-basiert und mit definiertem Reaktorbehälter arbeiten.

Zu diesem Zweck wurde ein mikroskaliges Reaktorsystem mit automatisierten analytischen Sensoren für zellbasierte Anwendungen in der biopharmazeutischen Forschung entwickelt. Im Zuge der Miniaturisierung standen als besondere Herausforderung die Sensorintegration und die Implementierung einer aktiven Mischtechnik im Zentrum der Forschungs- und Entwicklungstätigkeiten, für die in der nachfolgenden Arbeit Lösungen gefunden wurden. Weiterhin wurden mögliche Grenzen hinsichtlich des Reaktionsvolumens ausgelotet. Letztlich war es das Ziel, eine möglichst große Schnittmenge der Vorteile von Tropfen-basierten Kultivierungssystemen und der Bauweise mit definiertem Reaktorbehälter zu definieren.

Dafür wurde zunächst eine Mischtechnik für geringe Flüssigkeitsvolumina entwickelt, die über vertikale Oszillation die Flüssigkeit in Bewegung versetzt und so für den Energieeintrag in die Flüssigphase sorgt. Dies wurde an einem so genannten *micro sphere reactor* (MSR) als Modellreaktor demonstriert, was in **Kap. 4.1** vorgestellt und diskutiert ist. Eine aktive Durchmischung stellt für jeden Bioreaktor eine Grundvoraussetzung für einen ordnungsgemäßen Betrieb dar und ist somit auch essentieller Bestandteil eines miniaturisierten Kultivierungssystems. Die vertikale Oszillation wurde anschließend erfolgreich auf ein MBR-System im Tropfen-Bioreaktorformat, dem so genannten *capillary wave microbioreactor* (cwMBR), übertragen und dessen Anwendbarkeit bewiesen (**Kap. 4.2**). Das so entwickelte cwMBR-Kultivierungssystem wurde hinsichtlich des Stofftransports charakterisiert. Anschließend wurde ein *proof-of-concept* des Systems durchgeführt. Zuletzt werden in **Kap. 4.3** zwei Anwendungsgebiete des cwMBR-Systems dargestellt: die Kultivierung a) von *Escherichia coli* und b) von tierischen Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellkulturen.

2. Theoretische Grundlagen

Miniaturisierte Systeme zur definierten Kultivierung von Zellen haben sich als leistungsfähige und unabdingbare Werkzeuge in der Entwicklung moderner Bioprozesse erwiesen. Sie werden vorwiegend in der Frühphasen-Forschung und –Prozessentwicklung eingesetzt und tragen entschieden zur Steigerung der Effektivität biotechnologischer Produktentwicklung bei und eröffnen damit eigene neue Forschungsfelder. Ihr verkleinertes Reaktionsvolumen geht einher mit zahlreichen inhärenten Vorteilen – besonders die Möglichkeit zu parallelisierten Durchführung von Screening-Versuchen, wodurch Kultivierungen im Hochdurchsatzverfahren bei geringem Probeneinsatz ermöglicht werden. Infolgedessen kann eine Vielzahl von Parametern und Einflussfaktoren in kurzer Zeit und mit verringerten Aufwendungen untersucht werden.

Miniaturisierte Kultivierungssysteme oder Mikroreaktoren (MBR) reichen von Systemen mit einfachem verkleinertem Reaktorkessel und geringer Möglichkeit zur Prozesskontrolle, bis hin zu hochkomplexen und automatisierten, kleinmaßstäbigen Screening-Geräten mit integrierter Sensorik und Kontrollmöglichkeit. Fortschreitende Entwicklung und Fortschritt in Herstellungs- und Automatisierungstechniken ermöglichen eine immer bessere Nutzung der Vorteile von MBR. Nachfolgend soll ein Überblick über den Einsatz und den Nutzen miniaturisierter Kultivierungssysteme gegeben werden (**Kap. 2.1**). Daran anschließend werden verschiedene Möglichkeiten erörtert, eine aktive Durchmischung in einen MBR zu integrieren (**Kap. 2.2**). Besonders für Tropfen-basierte Kultivierungssysteme, die vorwiegend für Analyse- und Screening-Anwendungen in zunehmendem Fokus von Forschungs- und Entwicklungsarbeiten stehen, ergeben sich bei der Homogenisierung des Reaktionsraumes Herausforderungen. Im Speziellen soll eine Methodik der aktiven Durchmischung von Flüssigkeitstropfen über die vertikale Oszillation und die sich dadurch ausbildenden Schwingungen näher erörtert werden (**Kap. 2.3**). Neben der aktiven Durchmischung stellt die umfassende Integration einer geeigneten Sensorik in den Reaktionsraum zur Überwachung des Versuchsfortschritts eine Kernaufgabe der Bioreaktorentwicklung dar, was in **Kap. 2.4** beschrieben wird. Als weitere Basis für die nachfolgenden Arbeiten werden darüber hinaus die Grundlagen des mikrobiellen Wachstums dargelegt (**Kap. 2.5**) sowie die Organismen *Escherichia coli* (**Kap. 2.6**) und Chinese Hamster Ovary-Zellen charakterisiert (**Kap. 2.7**).

2.1 Nutzen von miniaturisierten Kultivierungssystemen

Um eine biologisch aktive Umgebung zu schaffen und kontrollieren zu können muss jeder Bioreaktor – ungeachtet seines Maßstabes – einige elementare Grundaufgaben erfüllen. Im Wesentlichen muss ein steriler oder monoseptischer Raum erzeugt werden, in dem unter definierten Bedingungen biologische Reaktionen durchgeführt werden können (McNaught et al., 2014). Diese Grundvoraussetzungen – Abgrenzung eines sterilen Raumes und Kontrolle der Umgebungsbedingungen – werden in gleicher Weise auch an einen Mikrobioreaktor (MBR) gestellt, wobei das Reaktionsvolumen im Vergleich zu einem Reaktor in Labor- oder Pilotmaßstab um mehrere Größenordnungen kleiner ist. Meist wird ein Bioreaktor mit einem Volumen von weniger als 1 mL als MBR bezeichnet (Marques, Szita, 2017). Andere Definitionen beschreiben einen MBR als ein Kultivierungssystem mit mindestens einem mikrofluidischen Element. Allgemein kann ein MBR als eine miniaturisierte Kultivierungsplattform gesehen werden, die biologische Prozesse und Abläufe unterstützt (Gernaey et al., 2012) und die Versuchsdurchführung mit hohem Durchsatz und umfangreicher Sensorik und Kontrolle ermöglicht (Hemmerich et al., 2018).

Ein Laborbioreaktor im Litermaßstab begrenzt die Anzahl gleichzeitig durchführbarer Versuche durch die Bedienbarkeit, den Ressourceneinsatz sowie durch seinen Platzbedarf. Durch die Verkleinerung des Versuchsraumes kann parallel eine Vielzahl von MBR betrieben werden, was in gleichem Umfang in größerem Maßstab nur begrenzt möglich ist. So können viele, unabhängige Variablen – sowohl biologischer als auch prozesstechnischer Natur – gleichzeitig untersucht werden. Durch diese Parallelisierung sind Versuche mit hohem Durchsatz (High Throughput, HTP), also einer großen Anzahl an Versuchsansätzen größtenteils mit Hilfe einer Design of Experiments (DoE)-Versuchsplanung, möglich, was die biotechnologische Forschung und Prozessentwicklung beschleunigt. Weiterhin verringert das geringere Reaktionsvolumen den Verbrauch von Chemikalien, Substraten, Proben und Verbrauchsmaterialien, die pro Versuchsansatz eingesetzt werden müssen. Dies senkt die laufenden Kosten und steigert die Kosteneffizienz. Zusätzlich bieten das größere Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis und die kleineren Distanzen Vorteile im Wärme- und Stofftransport (Doig et al., 2006; Hegab et al., 2013). Dies kann sowohl bei der Homogenisierung und Kontrolle von MBR-Systemen, als auch bei der Optimierung sensitiver Analytik von Nutzen sein. So können durch geringe Volumina und kurze Diffusionswege Messungen auch auf molekularer Ebene erfolgen (Garcia-Cordero, Fan, 2017). Zuletzt ist der Platzbedarf von MBR zumeist gering, was die Anwendung und Verbreitung in Forschungseinrichtungen erleichtert.

2.1.1 Einsatz von Mikrobioreaktoren in der Prozessentwicklung

Die Vorteile von MBR-Systemen sind sowohl für die akademische als auch für die industrielle Forschung von großem Wert. Ihre große Bedeutung wird auch durch die enorme Vielfalt an entwickelten MBR sowie die verbreitete Anwendung in der modernen Forschung untermauert. Je nach Einsatzgebiet unterscheiden sich die MBR-Systeme deutlich in der Umsetzung und dem Reaktoraufbau.

Besonders für die Bioprozessentwicklung besteht ein erheblicher Bedarf an leistungsfähigen MBR-Systemen, die einen möglichst automatisierten, hochparallelisierten Betrieb bei unabhängiger Variation einzelner Prozessparameter zulassen (Krull et al., 2016). Dabei soll im MBR ein möglichst ideales Abbild eines Bioreaktors im Labor- oder Pilotmaßstabes und identische Umgebungsbedingungen für die eingesetzten Zellen wie in großem Maßstab geschaffen werden (Bareither, Pollard, 2011; Hemmerich et al., 2018; Kostov et al., 2001; Marques et al., 2010; Schäpper et al., 2009). Nur wenn die Kultivierung unter vergleichbaren Bedingungen im MBR durchgeführt wird, können die gewonnen Erkenntnisse auf den nächstgrößeren Maßstab übertragen und so ein Scale-up durchgeführt werden. Diese Maßstabsvergrößerung ist für eine ökonomische Produktion mit ausreichender Produktausbeute notwendig. MBR werden als finale Produktionsplattform nur selten eingesetzt.

Bioprozesse werden von zahlreichen Faktoren beeinflusst, deren Zusammenspiel für die erfolgreiche Umsetzung von Substrat zu Produkt verantwortlich ist. Dieser Einflussfaktoren und deren Zusammenspiel untereinander bedarf es einer umfangreichen Kenntnis, um einen effizienten Bioprozess mit optimalen Versuchsbedingungen zu entwickeln. Besonders entscheidend sind hierbei unter anderem physikochemische Parameter, wie der pH-Wert, die Temperatur, Nährstoffkonzentration und allgemein die Medienzusammensetzung. Zusätzlich haben die im Reaktor vorherrschenden physikalischen Umgebungsbedingungen direkten Einfluss auf den gesamten Prozess. So wirken sich der Leistungseintrag und die damit verbundene Durchmischung direkt auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen, ebenso aber auf den auftretenden Scherstress, der am Biokatalysator angreift, aus (Büchs et al., 2000a, 2000b; Lübbert, Bay Jørgensen, 2001). Um die Gesamtheit dieser Faktoren untersuchen zu können, sind umfangreiche Versuchsreihen notwendig. Durch den Einsatz von MBR kann hier die Versuchsdurchführung sowohl kosteneffizient gestaltet, als auch über die Möglichkeit der Parallelisierung erheblich Zeit eingespart werden. Letztendlich führt dies zu einer Beschleunigung der Prozessentwicklung (Bareither, Pollard, 2011; Hegab et al., 2013; Lattermann, Büchs, 2015). In typischen Bioreaktoren im Labormaßstab mit Reaktionsvolumina zwischen 1 und 30 L sind das Wachstumsverhalten, die Produktbildung sowie die -qualität repräsentativ zu Reaktoren im Produktionsmaßstab. Der mögliche Durchsatz hingegen ist deutlich eingeschränkt und die experimentelle Umsetzung und Durchführung aufwändig. Gerade in frühen Phasen der

Prozessentwicklung übersteigt die Anzahl an zu untersuchenden Faktoren schnell die Kapazitäten von Kultivierungssystemen im Labor-Maßstab. Typischerweise bedarf es oft mehr als 50 Experimente, um eine Kultivierung hinreichend genau zu charakterisieren, was schnell einige Monate in Anspruch nimmt (Bareither, Pollard, 2011; Rathore, Winkle, 2009). Hier können demnach die Vorteile der MBR-Systeme gewinnbringend eingesetzt werden.

Die Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses ist in der Regel eine Abfolge konsekutiver Schritte. Beginnend mit Versuchen in kleinem Maßstab werden viele Prozessvariablen untersucht, wobei der Informationsgehalt und die Aussagekraft anfänglich eingeschränkt ist. Im Zuge der Maßstabsvergrößerung wird dann die Zahl der betrachteten Faktoren reduziert. Gleichzeitig steigt auch der Umfang an gewonnenen Daten pro Experiment mit zunehmendem Kultivierungsvolumen (Hemmerich et al., 2018). Zur Verbesserung des Entwicklungsprozesses setzen die in der Literatur diskutierten MBR-Systeme dabei an unterschiedlichen Punkten an, abhängig von ihrem Umfang an die Sensorik und die Parallelisierbarkeit. Die Systeme haben jedoch alle gemein, die Möglichkeiten zur Überwachung und Kontrolle von Bioprozessen zu verbessern und dabei den experimentellen Durchsatz zu erhöhen.

MBR-Systeme im Mikrotiterplatten (MTP)-Format ermöglichen die Durchführung von bis zu 96 parallelen Kultivierungsansätzen und wurden für die Prozessentwicklung und Scale-up-Studien eingesetzt (Isett et al., 2007; Kensy et al., 2009b, 2005; Lamping et al., 2003; Micheletti et al., 2006). In Reaktionsvolumina zwischen 400 und 1200 μL wurden Kultivierungen durchgeführt und dabei die Biomasse- und Gelöstsauerstoffkonzentration sowie der pH-Wert online aufgezeichnet (Kensy et al., 2009a). Die Kultivierungsbrühe wurde durch orbitales Schütteln homogenisiert, wobei der Stoffaustausch zwischen Flüssig- und Gasphase über den Kopfraum der einzelnen Kavitäten erfolgte. Durch eine Abdeckung der Kavitäten mit einer Folie bzw. Membran wurde ein steriler Raum abgetrennt, die Verdunstung minimiert und dennoch ein Gasaustausch gewährleistet (Sieben et al., 2016). Durch MTPs mit Schikanen konnte der Sauerstoffeintrag erhöht und die Mischzeiten verringert werden (Buchenauer et al., 2009; Funke et al., 2010a, 2009; Lattermann et al., 2014). So konnte in 48-Well-Platten ein äquivalentes Wachstums- und Produktbildungsverhalten wie in Schüttelkolben ($V_L = 25 \text{ mL}$) erzeugt werden, wobei die Sauerstofftransfer rate (oxygen transfer rate, OTR) über die Maßstäbe konstant erzeugt wurde (Wewetzer et al., 2015). Dadurch wurde ein erfolgreicher Scale-up mit *Escherichia coli*, *Gluconobacter oxidans* und *Kluyveromyces lactis* vom μL - in den mL-Maßstab durchgeführt.

MTP-basierte Systeme wurden zusätzlich zur Verbesserung von Wachstumsbedingungen (Käß et al., 2014), Medienoptimierung (Back et al., 2016) und Klonauswahl (Böhm et al., 2004; Hemmerich et al., 2014; Huber et al., 2009; Jensen et al., 2016; Mühlmann et al., 2017) eingesetzt. Neben mikrobiellen

Kultivierungen wurden diese Systeme auch für tierische Zellkulturen verwendet (Betts et al., 2014; Lamping et al., 2003; Micheletti et al., 2006; Wiegmann et al., 2020). Kommerzielle MBR-Systeme auf MTP-Basis werden unter anderem von m2p-Systems (BioLector, Baesweiler), Applikon (micro-Matrix, Delft, Niederlande), Pall (μ 24, New York, USA) oder Oy Growth Curves Ab (Bioscreen C, Helsinki, Finnland) angeboten.

Mittels MTP-Systeme können parallelisiert mehrere Prozessparameter gleichzeitig untersucht werden. Während der Versuchsansatz in jeder Kavität individuell variiert (u.a. mit Zell- und Nährstoffkonzentration) werden kann, können bestimmte Parameter wie Temperatur oder Schüttelfrequenz allerdings nur global für die gesamte Schüttlerplatte angepasst werden (Isett et al., 2007; Mühlmann et al., 2017). Vorteilhaft erweist sich bei diesen orbital geschüttelten MBR-Systemen dagegen der Verzicht auf bewegliche Mischelemente im Reaktionsraum, die herausfordernd in der Produktion und ihrer Handhabung sind. Weiterhin ist die Fluidbewegung in MTPs mit der in Schüttelkolben gut vergleichbar, was die Maßstabsvergrößerung erleichtert.

Neben orbital geschüttelten MTP-Systemen gibt es auch eine Reihe gerührter Systeme, die besonders gut die vorherrschenden Kultivierungsbedingungen in größeren Reaktoren in Labor- oder Pilotmaßstab abbilden. Weit verbreitet, besonders für die Anwendung in der Zellkulturtechnik sowie der Wachstums- und Medienoptimierung, ist das exzentrisch gerührte ambr[®] System (Sartorius, Göttingen, Deutschland) (Hsu et al., 2012; Kreye et al., 2019; Moses et al., 2012; Nienow et al., 2013a; Rameez et al., 2014; Ratcliffe et al., 2012; Velez-Suberbie et al., 2018). Ein weiteres gerührtes System speziell für die Kultivierung myzelbildender Organismen wurde von Hortsch et al. (2009a, 2009b) entwickelt und beschrieben. Durch einen rotierenden Blattrührer soll dabei das Wandwachstum in einem Reaktionsraum von 10 mL vermieden werden. In einem modifizierten Versuchsaufbau wurde dieses System in einer Reaktorkaskade eingesetzt und die mikrobielle Expression rekombinanter Proteine optimiert (Schmideder et al., 2015; Schmideder, Weuster-Botz, 2017).

Durch die Verkleinerung des Reaktionsraumes werden die Möglichkeiten zur Überwachung und Kontrolle des Kultivierungsprozesses für gewöhnlich eingeschränkt. Um den Informationsgehalt und die Aussagekraft der Kultivierungen dennoch möglichst groß zu halten und gleichzeitig eine parallele Reaktionsführung zu ermöglichen, weisen MBR-Systeme für die Prozessentwicklung zumeist Reaktionsvolumina im oberen Mikroliter oder sogar Milliliter-Bereich auf (Betts, Baganz, 2006; Funke et al., 2010a; Long et al., 2014).

Mit den beschriebenen MBR-Systemen soll ein möglichst ideales Abbild eines biologischen Prozesses im großen Maßstab erzeugt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit suboptimale Kultivierungsbedingungen, die u. U. im großen Maßstab auftreten durch einen Scale-down im MBR

nachzubilden, anschließend Optimierungsversuche zur Überwindung der Unzulänglichkeiten durchzuführen und dann wiederum durch einen Scale-up das ursprüngliche Problem beseitigt zu haben. Um über mehrere Maßstäbe hinweg gleiche Umgebungsbedingungen zu schaffen, kann mittels diverser maßstabsunabhängiger Skalierungsparameter oder geeigneter dimensionsloser Kennzahlen eine Übertragung erfolgen (Tescione et al., 2015). Werden diese konstant gehalten, kann von vergleichbaren Bedingungen sowohl im kleinen als auch im großen Maßstab ausgegangen werden. Relevante Parameter können der volumen- oder massenbezogene Leistungseintrag P/V bzw. P/m (auch als spezifische Leistungsaufnahme bezeichnet) sein (Büchs et al., 2000b, 2000a; Peter et al., 2006). Da der Sauerstofftransport in die Flüssigphase als einer der zentralen Transportprozesse für aerobe Kultivierungen angesehen wird (Kirk, Szita, 2013; Lübbert, Bay Jørgensen, 2001), ist eine gebräuchliche Kennzahl als Scale-up-Kriterium der volumenbezogene flüssigkeitsseitige Sauerstoffübergangskoeffizient $k_L a$ (Garcia-Ochoa et al., 2010; Gill et al., 2008; Islam et al., 2008; Nienow, 2015). Da Sauerstoff nur sehr schlecht in wässrigen Medien löslich ist und der Sauerstoffbedarf mit zunehmender Kultivierungsdauer exponentiell ansteigt, kann die Verfügbarkeit von Sauerstoff ein limitierender Faktor für das Zellwachstum sein. Der $k_L a$ -Wert beschreibt die Fähigkeit eines Systems Sauerstoff von der Gas- in die Flüssigphase einzutragen, was bei einem Scale-up konstant gehalten werden muss, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Wird die Triebkraft für den Sauerstofftransport, der Konzentrationsgradient zwischen Gas- und Flüssigphase, mit einbezogen, kann die Sauerstofftransferrate OTR ebenfalls als Scaling-Parameter genutzt werden (Garcia-Ochoa et al., 2010). Diese ist in **Gl. 2.1** beschrieben.

$$\text{OTR} = k_L a \cdot (c_{\text{O}_2}^* - c_{\text{O}_2}) \quad (2.1)$$

Hierbei stellt $c_{\text{O}_2}^*$ die Sättigungskonzentration und c_{O_2} die aktuelle Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase dar (Kirk, Szita, 2013). Wenn der Sauerstoffgradient über die verschiedenen Skalen nicht gleich ist, was durch den hydrostatischen Druck oder unterschiedliche Sättigungskonzentrationen bedingt sein kann, wird ein Scale-down in den Mikromaßstab in abweichenden OTRs resultieren (Tajssoleiman et al., 2019). Hierdurch wird die Verfügbarkeit von Sauerstoff und letztlich die Versorgung der Zellen beeinträchtigt, was wiederum das Zellwachstum und die zugehörige Reaktionskinetik beeinflusst.

Neben den Kennzahlen für die Sauerstoffversorgung kann die Mischzeit t_m , als Skalierungsparameter verwendet werden. Die Mischzeit ist als die Zeit definiert, die es benötigt, bis im Zuge eines Durchmischungsvorganges ein gewisser Grad an Homogenität in einer Lösung erreicht ist (Kraume, 2012; Merchuk et al., 1998). Werden die Strömungsbedingungen für die Skalierung herangezogen, kann die Reynolds-Zahl (Re) als Parameter herangezogen werden. Diese beschreibt das Verhältnis von

Trägheits- zu Zähigkeitskräften. Neben dem $k_L a$ -Wert, OTR, t_M oder Re kann für gerührte Systeme auch die Rührer-Umfangsgeschwindigkeit (Margaritis, Zajic, 1978; Schmidt, 2005) oder für begaste Systeme die Gasleerrohrgeschwindigkeit genutzt werden (Xu et al., 2017).

Trotz des Einsatzes fortschrittlicher und potenter MBR Systeme kann ein Bioprozess im Großmaßstab mittels miniaturisierter Kultivierungssysteme immer nur angenähert werden, wobei nicht alle Prozessbedingungen ideal abgebildet werden. So haben kleine Reaktionsvolumina stets ein größeres Oberflächen-zu-Volumen Verhältnis, wodurch der Einfluss von Kapillar- und Oberflächenkräften im Mikromaßstab zunimmt, Trägheits- und Zähigkeitskräfte dagegen verhältnismäßig abnehmen (Friend et al., 2008; Squires, Quake, 2005; Yeo et al., 2011). Dies wirkt sich auf den Stofftransport aus und erfordert besondere Berücksichtigung bei der Auslegung der Homogenisierung. Zusätzlich führt die Verdunstung in Mikrosystemen im Verhältnis zum Reaktionsvolumen zu einem größeren Flüssigkeitsverlust, wodurch sich Stoffkonzentrationen erhöhen (Bareither, Pollard, 2011; Silk et al., 2010; Wiegmann et al., 2018). In Bioreaktoren im Pilot- oder Produktionsmaßstab herrscht dagegen ein deutlich größerer hydrostatischer Druck, der so in Mikrosystemen nur bedingt abgebildet werden kann (Tajsoleiman et al., 2019). Turbulente Strömungsbedingungen eines Bioreaktors im Großmaßstab sind in Mikrosystemen ebenfalls nur eingeschränkt nachzubilden (Dietzel, 2016). Weiterhin sind die Mischzeiten im Labor- oder Produktionsmaßstab deutlich höher als in miniaturisierten Systemen. Durch die sich im großen Maßstab ausbildenden Stoff- und Temperaturgradienten können den Mikroorganismen alternierende oder sogar oszillierende Umgebungsbedingungen widerfahren. Dies wirkt sich sowohl auf das Zellwachstum als auch auf die Produktbildung und -qualität aus (Nienow et al., 2013b; Ying Lin, Neubauer, 2000). Wird nun eine einzelne Kennzahl für eine Maßstabsvergrößerung herangezogen, können sich die Bedingungen durch die Nichtbeachtung anderer Prozesse, die mit anderen Kennzahlen beschrieben werden, tiefgreifend ändern und den Prozess nachhaltig beeinflussen. Daher ist eine komplexe Charakterisierung des Prozesses und die Berücksichtigung mehrerer Skalierungsparameter für ein gezieltes Scale-up notwendig (Tajsoleiman et al., 2019).

Für einen tiefergehenden Einblick in den Bereich miniaturisierter Kultivierungssysteme für die Prozessentwicklung sei an dieser Stelle auf die Übersichtsartikel von Hemmerich et al. (2018), Junne und Neubauer (2018), Krull et al. (2016), Lattermann und Büchs (2015), Hegab et al. (2013), Schäpper et al. (2009), El-Ali (2006) und Breslauer et al. (2006) verwiesen.

2.1.2 Einsatz von Mikrobioreaktoren als analytisches Messinstrument

MBR haben sich für die Prozessentwicklung und die Maßstabsvergrößerung als effektive Werkzeuge in sowohl industrieller als auch akademischer Forschung etabliert, was auch die große Zahl kommerzieller