

Einführung in die USP - Kritische Biotech-Parameter

Ihre Ziele:

Am Ende dieser Lektion sollten Sie in der Lage sein, kritische biotechnologische Parameter zu identifizieren.

Die Funktionen eines Bioreaktors

Der Bioreaktor ist mit einer oder allen der folgenden Funktionen ausgestattet:

- eine (oft kontrollierte) Umgebung, die sich von jeder äusseren Umgebung unterscheidet
- (z.B.: Temperatur, Druck, Redoxpotential*, Ionenstärke, etc.)
- sterile Bedingungen (falls erforderlich)
- Unterstützung (falls erforderlich)
- Eingrenzung
- Rühren/Vermischen (homogene Bedingungen)
- Belüftung (falls erforderlich)
- anærobische Bedingungen (falls erforderlich)

Vorkehrungen für eine kontrollierte Wachstumsumgebung

Eine kontrollierte Wachstumsumgebung beinhaltet die Kontrolle der folgenden Punkte:

- Suspensions- oder adhærente Zellkultur, d. h. flüssig (STR) oder fest (Festbett)
- Bereitstellung von Sauerstoff, wenn ærob, oder, wenn anærob, ærobischer Ausschluss von Sauerstoff
- (*Redoxpotential (Eh) ist ein Mass für den Grad der Sauerstoffanreicherung eines Mediums)
- Temperatur
- Druck
- Ionenstärke
- pH-Wert

Belüftung (Sauerstoffzufuhr)

Die vier Arten von Bioprozessen sind wie folgt: (Mnemonik: "A.F.M.A.")

1. Ærobisch
2. Fakultativ anærobisch
3. Mikroærophil
4. Anærobisch

Ærobische Zellen

Die meisten Zelltypen, z. B. alle tierischen Zellen, die meisten Hefen und viele Bakterien sind ærob.

Ærobisch bedeutet, dass die Zellen Sauerstoff benötigen, um zu wachsen und zu metabolisieren. Obligate ærobes müssen Sauerstoff haben, sonst verlieren sie ihre Lebensfähigkeit und sterben (z. B. tierische Zellen).

Einige Zellen benötigen Sauerstoff und wachsen Ærobisch. Wenn aber aus irgendeinem Grund kein Sauerstoff verfügbar ist, können sie anaerob wachsen. Diese werden fakultativ anærob genannt.

Bestimmte Zellen (tierische Zellen) wachsen ærob, aber wenn sie mit zu viel Zucker (Glukose) versorgt werden, beginnen sie zu gären. Dies wird als **Crabtree-Effekt, Überfluss-Stoffwechsel** oder **Katabolitenunterdrückung** bezeichnet.

Fakultativ anaerobische Zellen

Viele Bakterienzellen (E. coli) und Hefen (z. B. ** Saccharomyces cerevisiae) können entweder ærob oder anærob wachsen - auch fakultativ anærob genannt.

Wenn diese Zellen ohne Sauerstoff wachsen (Gärung) und dann plötzlich Sauerstoff zugeführt wird, schalten sie automatisch auf Wachstum mit dem Sauerstoff (Atmung) um - das nennt man den **Pasteur-Effekt**.

Das Wachstum in Gegenwart von Sauerstoff ist häufiger und effizienter als in seiner Abwesenheit. Sowohl die Wachstumsrate als auch der Biomasseertrag sind höher, wenn sie ærob wachsen.

Mikroærophile Zellen

Einige mikrobielle Zellen (z. B. Laktobazillen) und Hefen (z. B. S. cerevisiae) können in völliger Abwesenheit von Sauerstoff nicht wachsen.

Laktobazillen benötigen keinen Sauerstoff zum Wachstum, können aber in dessen Gegenwart besser wachsen (höhere Wachstumsrate und Ausbeute).

S. cerevisiae kann nicht vollständig anaerob wachsen; es braucht Spuren von Sauerstoff, damit es die Fettsäuren produzieren kann, die es zum Wachstum braucht.

S. cerevisiae kann anærob wachsen, wenn ihr im Medium bestimmte Fettsäuren (z. B. Ölsäure) zusammen mit Ergosterol zugeführt werden, für deren Herstellung der Sauerstoff ursprünglich benötigt wurde (Brauen)!

Anaerobische Zellen

Im Allgemeinen handelt es sich bei anaerobischen Organismen ausschliesslich um Bakterien, am bekanntesten sind die Clostridien-Arten. - z.B. Clostridium tetani (Cl. tetani); Clostridium difficile (Cl. difficile); Clostridium botulinum (Cl. botulinum) - andere umfassen Bacillus anthracis; Methanobakterien, etc.

Kulturen dieser Organismen benötigen Medien, denen jeglicher Sauerstoff entzogen wurde. Oftmals werden dem Medium Reduktionsmittel zugesetzt, um sicherzustellen, dass jedes Sauerstoffmolekül entfernt wird. Sauerstoff ist für solche Zellen giftig (toxisch), und die Zellen würden sofort absterben. Reduktionsmittel sind besonders wichtig bei der Herstellung von Biogas und für bestimmte kosmetische Produkte.

Belüftung (Oxygenierung)

Wie wird einer Kultur Sauerstoff zugeführt?

- Durch den **Kopfraum** über dem Kulturmedium
- Durch **Durchspülen** des Mediums im Bioreaktor mit Luft oder sauerstoffangereicherter Luft, Ether

pH-Werte

- Tierische Zellen wachsen bei pH 7,2 - 7,4
- Hefezellen im Allgemeinen bei pH 4 - 6
- Bakterien bei pH 2 - 8

Temperaturen

- Psychophile (-5°C - 20°C)
- Mesophile (15°C - 42°C)
- Thermophile (38°C - 65°C)
- Extremophile (<5°C oder >65°C)

Das Zellwachstum basiert auf mehreren chemischen Reaktionen; daher hat die Temperatur einen Einfluss auf die chemischen Reaktionen. Die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt sich nämlich ungefähr mit einem Anstieg von 10 Grad Celsius.

Druckstufen

Es gibt zwei Arten von Druck in einem Bioreaktor:

- **Atmosphärischer Druck**
 - Acidophile, Neutrophile und Basophile
- **Osmotischer* Druck**
 - 330-360 mOsmol, Osmophile

Säugetierzellen sind neutrophil und benötigen strenge osmotische Druckgrenzen.

* Osmose: die Tendenz eines Lösungsmittels, durch eine halbdurchlässige Membran, wie die Wand einer lebenden Zelle, in eine Lösung höherer Konzentration überzugehen, so dass sich die Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran angleichen. Der osmotische Druck verhindert somit das Auftreten von Osmose.

Sterile Umgebung

Das Erreichen der Sterilität eines Bioreaktors erfordert:

- Thermische Sterilisation
- Chemische Sterilisation
 - Flüssigkeiten (z. B. 0,1-1N NaOH)
 - Gase (z. B. Ethylenoxid)
- Bestrahlung
- Elektronenstrahl-Bestrahlung (E-Strahl)

NB1: Wenn die Buchstaben "ae" in einem Wort als **Monothong** (Einzellaut) ausgesprochen werden, schreibt man sie zusammen als "æ"- (z. B. aerosol, aeroplane, anaerobic). Wenn ein Wort jedoch als Diphthong (zwei getrennte Laute) ausgesprochen wird, wird 'ae' getrennt geschrieben - (z. B. aeration, cerevisiae).

NB2: "i.e." spricht ein spezifisches Beispiel oder eine Illustration an, während "e.g." dazu dient, nur eines von mehreren möglichen Beispielen zu nennen.