

Bioreaktoren simulieren Stoffwechselfunktionen

Modell eines wachsenden Bioreaktors / Von Manfred Sernetz

Der Entwicklung von Bioreaktoren mit immobilisierten Enzymen kommt heute in der Biotechnologie große Bedeutung zu für die Nutzung biospezifischer enzymatischer Reaktionen für analytische und chemisch-technische Prozesse. Umgekehrt können die an Bioreaktoren zu beobachtenden Phänomene der Wechselwirkung von Reaktion und Transport aber auch zu einem besseren Verständnis strukturgebundener biochemischer Umsetzungen im Organismus verhelfen. Hierzu gehören das Studium des Fließgleichgewichts und des Wachstums in einem offenen System, die Untersuchung periodischer Vorgänge im Stoffwechsel und die Analyse von Chaos und Ordnung in der Struktur des Organismus (JLU-FORUM 4, 1985). Solche Fragen lassen sich mit Modellreaktionen in Bioreaktoren simulieren und mit stoffwechselphysiologischen Befunden bei Mensch und Tieren vergleichen.

Der Bioreaktor

Für die Untersuchung des reaktionskinetischen Verhaltens eines solchen, kontinuierlich arbeitenden Bioreaktors unter experimentell vorgebbaren „Wachstumsbedingungen“ dient ein in der Arbeitsgruppe Angewandte Biochemie entwickelter Modellbioreaktor. Der spezielle Typ dieses Reaktors wird CSTR (Continuous stirred tank reactor) genannt, da in ihm eine enzymatische Reaktion bei ständigem Durchfluß des Substrats und unter intensivem Mischen kontinuierlich aufrechterhalten wird.

Die Analyse von Umsetzungen in Bioreaktoren erfordert zum Teil die Entwicklung neuer Meßtechniken und Steuerungen, um die in ihm ablaufende heterogene Katalyse, d.h. Umsetzung in einem Mehrphasensystem, unter Variation der Betriebszustände erfassen und beschreiben zu können. Dies wird an diesem Reaktor mit zwei Verfahren gezeigt, nämlich mit der simultanen Messung des Gesamtumsatzes mittels Durchflußfluorometrie und mit der Messung der Umsatzverteilung über alle Einzelpartikel der Trägergel-Suspension mittels Durchfluß-Impulsfluorometrie als dispersivem Meßverfahren.

Im Bioreaktor (Bild 1 und 4) wird in einer enzymatischen Reaktion ein gelöstes Substrat durch ein Enzym als Biokatalysator umgesetzt, das auf einem Trägergel immobilisiert ist. Der Biokatalysator liegt nicht in freier Lösung vor, sondern ist kovalent an eine feste Phase gebunden. Die Reaktion zwischen Substrat und Enzym erfolgt also in der stationären Phase, nämlich an der äußeren und inneren Oberfläche des als Trägermatrix in Perlförmigkeit dienenden porösen Gels (Bild 2). Bei einem gegebenen Gehalt des Reaktors an diesen Enzymgelpartikeln, bei gleichmäßiger Zuführung der Substratlösung und bei turbulenter Mischung durch Rührung wird kontinuierlich das gewünschte Produkt gebildet, dessen Bildungsgeschwindigkeit im Auslauf des Reaktors als Funktion der Versuchsvariablen gemessen werden kann.

In unserem Fall wurde das Enzym β -Galactosidase an ein oxiranaktiviertes, makroporöses, perlförmiges Polymethacrylamidgel

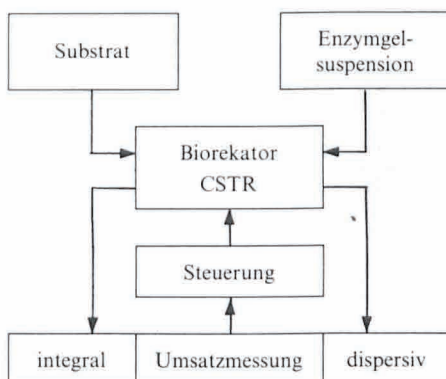
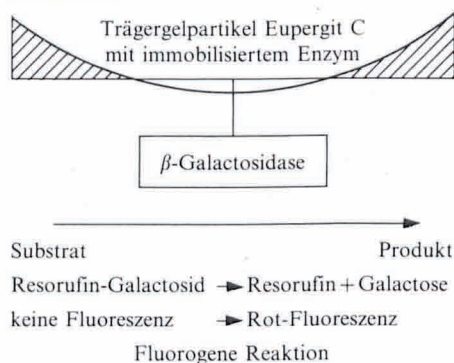


Bild 1: Schema der Prozeßsteuerung des Bioreaktors mit integraler und dispersiver Umsatzmessung.

(Eupergit C) gebunden (Bild 3). Natürliches Substrat der β -Galactosidase ist der Milchzucker, der in Glucose und Galactose gespalten wird. Im Reaktor bieten wir der β -Galactosidase jedoch ein sogenanntes fluorogenes, künstliches Substrat an, das eine besonders empfindliche fluorometrische Meßtechnik ermöglicht. Fluorogene Substrate sind Verbindungen, hier Galactoside, die selbst farblos sind, aber bei der enzymatischen Spaltung fluoreszenzfähige Produkte liefern. Als fluorogenes Substrat dient hier das von uns synthetisierte Resorufingalactosid, das nach Spaltung durch die immobilisierte β -Galactosidase das rotfluoreszierende Resorufin als Produkt liefert.

Bild 3: Schema der fluorogenen Meßreaktion der Umsetzung durch das an der Trägergelpartikel kovalent gebundene Enzym β -Galactosidase.



Integrale und dispersive Messung

Der Gesamtumsatz des Reaktors wird kontinuierlich und in konventioneller Weise, also integral aus der Konzentration des Produkts und dem Volumenstrom im Auslauf des Reaktors bestimmt, der durch die Durchflußküvette eines Spektralfluorometers geleitet wird (Bild 4). Dieser Umsatz stellt die Summe aus den individuellen Beiträgen aller im Reaktor dispergierten Enzymgelpartikeln dar. Da sich diese Partikel jedoch in ihrer Größe und Enzymbelastung und damit im individuellen Umsatz sehr unterscheiden können, ist es wünschenswert, auch die Verteilung der die Partikeln charakterisierenden Größen zu kennen. Die konventionelle Umsatzmessung kann darüber jedoch keine Information liefern. Die Untersuchung von Partikelsuspensionen hinsichtlich etwa Anzahl, Dichte, Größenverteilung, Enzymbelastung oder Umsatz erfordert neue, dispersive Meßverfahren, welche gestatten, Meßdaten der individuellen Partikeln und ihre Verteilung zu erfassen. Hierfür wurde erstmals das bisher vorwiegend in der Medizin und Biologie zur automatischen und schnellen Diagnostik von Zellen in Suspension entwickelte Verfahren der Durchfluß-Impulsfluorometrie auf die Analyse der Partikelsuspension eines Bioreaktors übertragen. Bei diesem dispersiven Verfahren (Bild 4 und 5) wird die zu untersuchende und fluoreszenzmarkierte Partikelsuspension in einer Kapillare mit einem Mantelstrom umhüllt und hydrodynamisch fokussiert, sodaß die Partikeln in einem sehr feinen Flüssigkeitsfaden einzeln hintereinander und in schneller Folge (≈ 1000 s) durch den Anregungsstrahl eines Lasers geführt werden. Hier erzeugen sie Lichtblitze, die zum einen als Streulichtimpulse dem Partikelvolumen und zum anderen als Fluoreszenzimpulse der Menge des Fluorochroms pro Partikel proportional sind.

Die Streulicht- und Fluoreszenzimpulse werden elektronisch gezählt, über Vielkanalanalysatoren simultan nach Größe sortiert und liefern so die Partikeldichte und die mehrparametrischen Impulsgrößenverteilungen der Suspension. Damit kann z. B.

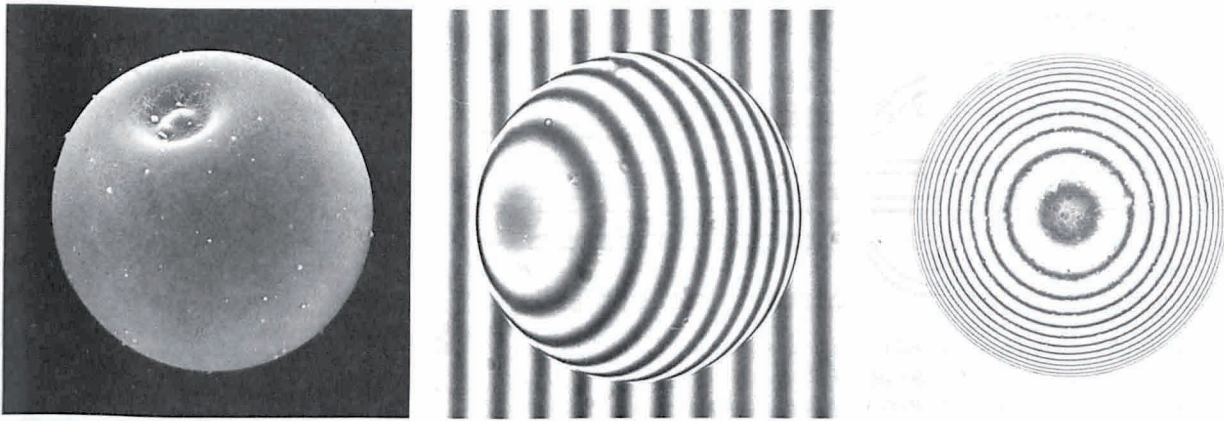


Bild 2: Mikroaufnahmen der Trägergelkugeln Eupergit C (Röhm), a) Rasterelektronenmikroskopie zur Darstellung der Oberflächenstruktur des trockenen Gels (Durchmesser ca. 0,1 mm), b und c) Interferenzmikroskopie zur Messung der Homogenität und der Porenradialverteilung des gequollenen Gels.

durch Fluoreszenzmarkierung der β -Galactosidase mit Fluoresceinisothiocyanat die Verteilung der Enzymbeladung im Trägergel fluorometrisch bestimmt werden.

Bei der Messung von Fluoreszenzimpulsen der Enzymträgerpartikeln muß man unterscheiden zwischen statischen, konstanten Fluoreszenzfärbungen, die man an entnommenen Proben zu beliebiger Zeit messen könnte, und dynamischen, zeitabhängigen Fluoreszenzfärbungen, die unterschiedlich analysiert werden müssen. Bei der Hydrolyse des fluorogenen Substrats Resorufingalactosid durch die immobilisierte β -Galactosidase entsteht das fluoreszierende Produkt Resorufin in dem porösen Trägergel, aus dem es wieder herausdiffundiert. Der momentane Produktgehalt einer Partikel stellt das Fließgleichgewicht aus dem Eindiffundieren des Substrats und dem Ausdiffundieren des Produkts dar. Diese Art von Fluoreszenzfärbung ist also zeitabhängig und die Messung des Umsatzes in Partikeln, und seine Verteilung muß daher unmittelbar am Reaktor erfolgen.

Dafür war es notwendig, eine neue Meßsonde für die kontinuierliche Durchfluß-Impulsfluorometrie zu entwickeln (Bild 5). Diese Meßsonde ist durch eine besondere optische Anordnung und ein neues Verfahren der Mantelstromtechnik gekennzeichnet. Der Meßkopf ist vom Impulsfluorometer getrennt. Die optische Kopplung mit dem Meßgerät erfolgt über Lichtleiter sowohl für die Anregung durch den Laser als auch für die Meßimpulsleitung. Ein Ellipsoidspiegel ermöglicht eine empfindliche Impulsaufnahme mit hoher Apertur zwischen dem Anregungsfokus des Lasers und dem Eingangsfokus des Meßlichtleiters. Der Partikel- und Mantelstrom im Meßkopf werden durch eine spezielle Anordnung von Präzisionspumpen erzeugt, deren Volumenströme in Differenz geschaltet sind.

Die Analysenmöglichkeiten an diesem Modellreaktor sind somit durch die Kombination zweier kontinuierlicher on-line Techniken gekennzeichnet, nämlich durch die integrale Messung des Gesamtumsatzes mittels Durchflußfluorometrie und durch die disperse Umsatzmessung mittels Durchfluß-Impulsfluorometrie.

Eine *Nutzanwendung* dieser Technik unabhängig von der hier geschilderten Aufgabe ist die disperse Analyse von Zell- und Partikelsuspension. Dies ermöglicht z. B. toxiologische Experimente auf Zellebene, wie etwa die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der Phagozytose von Mikropartikeln mit gebundenen Wirkstoffen durch Zellen (Bild 6).

Wachstum von Reaktoren und Organen

Der Umsatz eines Bioreaktors als Mehrphasensystem mit heterogener Katalyse ist nicht nur – wie bei homogener Katalyse in

Lösung – abhängig von den Konzentrationen der beteiligten Enzyme und Substrate und ihrer Wechselwirkung im molekularen Bereich. Vielmehr ist er auch abhängig von makroskopischen Eigenschaften des offenen Systems, wie der Partikelgröße, der Partikeldichte und ihrer Änderung, der Vermischung der Phasen durch turbulente Rührung und der Geometrie, Größe und Volumenänderung des Reaktors. Insbesondere die Vorstellung eines kontinuierlich betriebenen Reaktors mit lebenden und sich vermehrenden Zellen (Fermenter) erlaubt zwei extreme Fälle zu unterscheiden, nämlich den üblichen technischen Fall eines Reaktors mit konstantem Volumen und wachsender Zellmasse (Biomasse) und damit Zelldichte und den eher hypothetischen Fall eines bei konstanter Zelldichte mit der Zellvermehrung wachsenden Reaktorvolumens.

Man kann diese Terminologie der heterogenen Katalyse aber auch auf die Stoffwech-

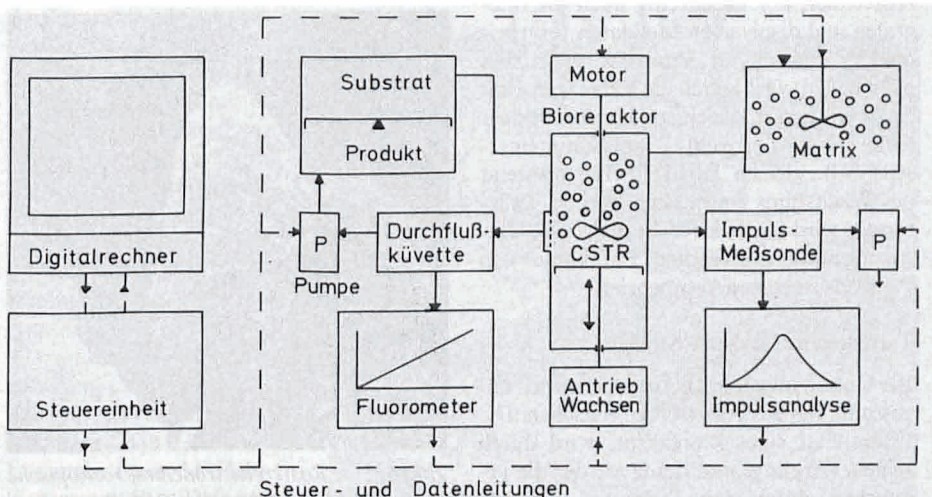


Bild 4: Funktionsdiagramm der Steuerung des Wachstums des Bioreaktors, der Versorgung mit fluorogenem Substrat und mit der Enzymgelmatrix, der integralen fluorometrischen Umsatzmessung in der Durchflußküvette und der dispersiven Partikelanalyse mit der Impulsmeßsonde.

Impuls-Meßsonde

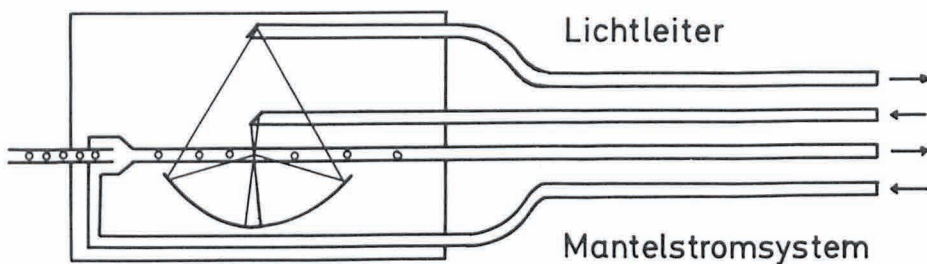


Bild 5: Schema des Aufbaus der neuen Impulsmeßsonde mit der zentralen Mantelstromkapillare für die Partikeln, der Anregung mittels Laser über Lichtleiterkabel, der Impulsfokussierung mittels Ellipsoidspiegel zum Impulslichtleiter, sowie den Schlauchverbindungen zu den Pumpen des Mantelstromsystems.

selprozesse im Organismus übertragen, die in Analogie zum CSTR bei kontinuierlicher Aufnahme des Substrats und Umsetzung in den Zellen ablaufen. Die Zellen entsprechen dabei als „Enzymträgerpartikel“ der stationären Phase. Dann ist der Organismus in kinetischer und struktureller Hinsicht als ein solcher Bioreaktor im Fließgleichgewicht zu beschreiben, der im Verlauf seines Lebens bei konstanter Partikeldichte das Reaktorvolumen nach einer Wachstumsfunktion vergrößert und gleichzeitig eine spezifische innere Struktur entwickelt.

Der hier vorgestellte Modellreaktor ist gerade daraufhin konzipiert worden, solche Wachstumsprozesse zu simulieren. Sein kinetisches Verhalten läßt sich mit dem von wachsenden Organismen vergleichen, bei denen analoge Stoffwechselfunktionen wie Clearance und Umsatzraten als Funktion der Körpergröße seit jeher untersucht werden. Die zeitliche Änderung des Volumens des Bioreaktors kann nach frei vorgebbaren Wachstumsfunktionen variiert werden. Die Steuerung des Wachstums und der Vermischung im Reaktor erfolgt durch einen Prozeßrechner, der gleichzeitig auch die integralen und dispersiven Meßdaten verarbeitet. Der Zuwachs an „Biomasse“ (Partikeln oder Zellen) wird durch die Versorgung mit Enzymträgergel aus einem Matrixreservoir (Bild 1 und 4) erreicht. Damit kann einerseits z. B. gleiche Partikeldichte während des Wachstums eingehalten werden, andererseits wird auch die für die dispersive Umsatzmessung notwendige Entnahme von Partikelsuspension kompensiert.

Turbulenz und fraktale Struktur

Bei Umsetzungen in Bioreaktoren wird angestrebt, hohe Effektivität zu erreichen. Die Effektivität eines Bioreaktors wird durch seinen Wirkungsgrad definiert, der die gemessene, durch den Transport limitierte Leistung zu der bei vorgegebener Enzymausstattung maximal möglichen in Beziehung setzt. Ein hoher Wirkungsgrad wird beim Bioreaktor durch möglichst gute Mi-

schung der reagierenden Komponenten, z. B. durch turbulentes Rühren erreicht (Bild 4), um die Transport- und Diffusionswege möglichst klein zu halten. Beim Wachstum ist daher auch der Aufwand für die Vermischung zu variieren, etwa durch entsprechende Regelung der Rührerdrehzahl.

Für hohe Wirkungsgrade im Bioreaktor ist turbulente Mischung notwendig. Ihr entspricht im Organismus als strukturelles Äquivalent die besondere Form der fraktalen inneren Organisation. Fraktale Struktur bedeutet rekursive Wiederholung eines Konstruktionsmerkmals durch viele Maßstabsbereiche. Wir finden sie in der fortgesetzten Unterteilung der Verzweigungen des Gefäßsystems wie in der gleichfalls hierarchisch fortschreitenden Faltung der Gewebe vom makroskopischen bis zum submikroskopischen Bereich. Dieses allgemeine Bauprinzip des Organismus, schafft erst wie bei turbulenten Systemen, hier dem Bioreaktor, die für den Stofftransport und -austausch notwendigen großen inneren Oberflächen.

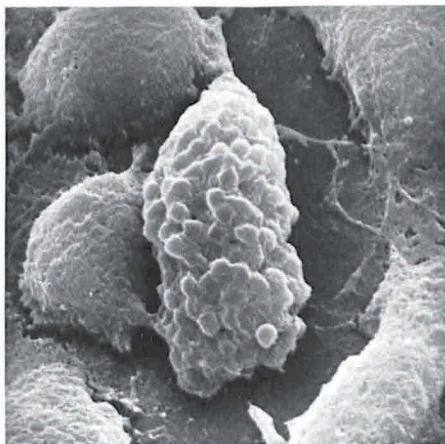


Bild 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen, die in Zellkultur monodisperse Mikropartikel (Eupergit C1Z, Röhm, Durchmesser ca. 1 µm) phagozytiert haben, auf denen eine definierte Menge eines Wirkstoffes gebunden wurde.

Bild 7: Rechnersimulation des fraktalen Wachstums eines Gefäßsystems, z. B. der Verzweigung von Arterien oder Venen in einer Niere, mittels rekursiver Computerprogramme.



In Verbindung mit dem experimentellen Vergleich von Umsetzungen in wachsenden Bioreaktoren und Organismen stehen daher auch Arbeiten der Forschungsgruppe, einerseits diesen fraktalen Aufbau von Geweben und Verzweigungssystemen zu analysieren und durch fraktale Dimensionen als Kenngrößen der Strukturiertheit zu charakterisieren, andererseits aber durch die Entwicklung rekursiver Computerprogramme die innere Struktur und ihr Wachstum zu simulieren. Dies wird am Beispiel eines rechnergenerierten fraktalen Gefäßstammbaums (Bild 7) demonstriert. Durch geeignete Wahl der Parameter können so gewebes- und organspezifische Baumuster simuliert werden. Das Studium der Eigenschaften turbulenter Prozesse in Bioreaktoren und fraktaler Strukturen kann somit zu einem neuen Verständnis der Organisation und Funktion von Organismen beitragen.

Die Arbeitsgruppe

Biotechnologie ist kein klassisches Fachgebiet, sondern Neuland und Schnittfeld vieler naturwissenschaftlicher Disziplinen. Hier fließen Aspekte der Enzymbiochemie, der Gel- und Partikelanalytik, fluorometrischer Meßtechniken, der Zellbiologie und der vergleichenden Stoffwechselphysiologie der Ingenieurtechnik, Prozeßsteuerung und Datenverarbeitung zusammen. Die hier vorgestellten Verfahren stammen aus der Zusammenarbeit einer Arbeitsgruppe, in der Chemiker, Physiker, Ingenieure, Biologen und Tierärzte mit ihrem eigenen Fachwissen zu einem fachübergreifenden Konzept beitragen. Die Arbeiten stellen Teilergebnisse zu grundlagen- und anwendungsorientierten Forschungsprojekten dar, die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert werden.