Modellgestützte Analyse und Optimierung eines komplexen, nichtlinearen bioverfahrenstechnischen Prozesses zur Produktion von Biotensiden

Christian Kühnert, Thomas Bernard, Fraunhofer IOSB, Karlsruhe; Marius Henkel, Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik KIT, Karlsruhe Rudolf Hausmann, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim Anke Schmidberger, Thomas Schwartz, Institut für Funktionelle Grenzflächen KIT, Karlsruhe

## Kurzfassung

Die biotechnologische Produktion von Tensiden gewinnt aus ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten immer mehr an Bedeutung. Eine kommerzielle Nutzung ist allerdings erst dann möglich, wenn die Effizienz der verwendeten Bioprozesse wesentlich verbessert wird. Für die Produktion der Tenside wird im vorliegenden Prozess das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* verwendet. Zur Erhöhung der Tensidausbeute während der Produktion spielt das detaillierte Verständnis der interzellulären Bakterienkommunikation (Quorum Sensing) eine wesentliche Rolle. Im vorliegenden Beitrag wird daher ein dynamisches, nichtlineares Modell entwickelt, welches sowohl alle wesentlichen Reaktionen als auch Quorum Sensing berücksichtigt. Es wurden mittels einer numerischen Sensitivitätsanalyse die wichtigsten Parameter des Modells identifiziert. Basierend auf dem Modell wurden erste optimierte Fedbatch Prozessführungsstrategien abgeleitet, um eine Steigerung der Produktionsrate der Biotenside zu erreichen.

## 1. Einleitung

Die Produktion von Bulk- und Feinchemikalien auf Basis nachwachsender Rohstoffe erlangte in den letzten Jahren als »weiße Biotechnologie« immer mehr an Bedeutung. Tenside, welche zurzeit überwiegend aus petrochemischen Ausgangsstoffen industriell hergestellt werden, lassen sich auch mittels biotechnologischer Verfahren produzieren Ein bekanntes Beispiel für mikrobielle Tenside sind Rhamnolipide [1] aus dem Bakterium Pseudomonas aeruginosa [2]. Rhamnolipide sind oberflächenaktive Glycolipide und können auf Basis nachwachsender Rohstoffe, wie z.B. Pflanzenöle oder Zucker, hergestellt werden. Sie zeichnen sich durch ihre Umweltverträglichkeit biologische gute und Abbaubarkeit sowie sehr gute Tensideigenschaften aus. Ein wesentlicher Grund dafür, dass sich biotechnologisch hergestellte Rhamnolipide bisher auf dem Markt gegenüber synthetischen Tensiden noch nicht durchsetzen konnten, sind relativ geringe Produktausbeuten [3]. Bisherige Ansätze zur Optimierung der Produktion von Biotensiden beruhen weitestgehend auf heuristischen Vorgehensweisen [4], insbesondere bei dem Rhamnolipid-Bildner *Pseudomonas aeruginosa*. Ziel des vorliegenden Beitrages ist es daher, durch die interdisziplinäre Verknüpfung von gehobenen regelungstechnischen Methoden (Advanced Process Control, APC), bioverfahrenstechnischen Methoden sowie molekularbiologischen Methoden optimierte Prozessführungsstrategien zu erzielen um somit eine ökonomische und nachhaltige Produktion von Tensiden aus erneuerbaren Rohstoffen zu ermöglichen.

#### 2. Nichtlineares, dynamisches Prozessmodell

Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Modellierung des Prozesses besteht darin, dass der Prozess durch starke Nichtlinearitäten und Rückkopplungen gekennzeichnet ist, was eine analytische Sensitivitätsanalyse sowie die Parameter-Adaption deutlich erschwert [5]. Zudem spielt in dem Prozess das zeitliche Verhalten des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* eine wesentliche Rolle. Im Folgenden werden zunächst die chemischen Reaktionen und in Abschnitt 2.2 kurz die Vorgehensweise bei der Entwicklung des dynamischen Modells beschrieben.

## 2.1 Reaktionsgleichungen

In Bild 1 sind die Reaktionen und Wechselwirkungen für die Bildung von *Pseudomonas aeruginosa* (Biomasse) zu den Produkten Mono-Rhamnolipid und Di-Rhamnolipid dargestellt. Die entsprechenden Reaktionsgleichungen (1) – (6) werden im Folgenden diskutiert. Die Biomasse wird zu großen Teilen durch Glycerin und Fettsäure gebildet (1). Zudem wird zur Bildung Stickstoff in Form von  $NO_3$  benötigt, sowie die Spurenelemente Phosphor, Schwefel und Eisen. Wie in Bild 1 dargestellt, wird das zugeführte Sonnenblumenöl unter Verwendung von Lipase als Katalysator in Glycerin und Fettsäure gespalten (2). Lipase wiederum wird unter Verwendung von Glycerin und Fettsäure sowie unter katalytischer Wirkung der Biomasse gebildet (3). Mono-Rhamnolipid wird ebenfalls aus Glycerin und Fettsäure unter katalytischer Wirkung der Biomasse gebildet (4). Ein Teil des Mono-Rhamnolipids reagiert mit Glycerin und Fettsäure zu Di-Rhamnolipid (5). Als Nebenprodukt wird Polysaccharid aus Glycerin und Fettsäure gebildet (6). Bei den Reaktionen fällt CO<sub>2</sub> und Wasser als Nebenprodukt an.



#### Bild 1: Reaktionen und Wechselwirkungen bei der Bildung von Rhamnolipiden.

 $\underbrace{C_{3}H_{8}O_{3}}_{Glycerin} + \underbrace{C_{17.9}H_{32.8}O_{2}}_{Fettsäure} + NO_{3} + O_{2} + H_{2}O + PO_{4} + SO_{4} + Fe$ 

$$\rightarrow \underbrace{H_{1.677}O_{0.314}N_{0.241}P_{0.018}S_{0.001}Fe_{0.0001}C}_{\text{Biomasse}} + CO_2 + H_2O$$
(1)

$$\underbrace{\mathcal{C}_{56.8}H_{100.3}O_6}_{\text{Sonnenblumenöl}} + H_2O \rightarrow \underbrace{\mathcal{C}_3H_8O_3}_{\text{Glycerin}} + \underbrace{\mathcal{C}_{17.9}H_{32.8}O_2}_{\text{Fettsäure}} + CO_2$$
(2)

$$\underbrace{C_{3}H_{8}O_{3}}_{\text{Glycerin}} + \underbrace{C_{17.9}H_{32.8}O_{2}}_{\text{Fettsäure}} + NO_{3} + O_{2} + H_{2}O + PO_{4} + SO_{4} \rightarrow \underbrace{C_{1436}H_{2263}O_{441}N_{395}S_{7}}_{\text{Lipase}} + CO_{2} + H_{2}O \quad (3)$$

$$\underbrace{\mathcal{C}_{3}H_{8}O_{3}}_{\text{Glycerin}} + \underbrace{\mathcal{C}_{17.9}H_{32.8}O_{2}}_{\text{Fettsäure}} + O_{2} + H_{2}O \rightarrow \underbrace{\mathcal{C}_{26}H_{48}O_{9}}_{\text{Mono-Rhamnolipid}} + CO_{2} + H_{2}O$$
(4)

$$\underbrace{\mathcal{C}_{26}H_{48}O_9}_{\text{Mono-Rhamnolipid}} + \underbrace{\mathcal{C}_3H_8O_3}_{\text{Glycerin}} + \underbrace{\mathcal{C}_{17.9}H_{32.8}O_2}_{\text{Fettsäure}} \rightarrow \underbrace{\mathcal{C}_{32}H_{58}O_{13}}_{\text{Di-Rhamnolipid}} + \mathcal{C}O_2 + H_2O$$
(5)

$$\underbrace{C_{3}H_{8}O_{3}}_{\text{Glycerin}} + \underbrace{C_{17.9}H_{32.8}O_{2}}_{\text{Fettsäure}} + O_{2} + H_{2}O \rightarrow \underbrace{C_{5.5}H_{9}O_{4.5}}_{\text{Polysaccharid}} + CO_{2} + H_{2}O$$
(6)

#### 2.2 Dynamisches Modell

Zustandsgrößen des Modells sind zum einen die Konzentration von Biomasse, Sonnenblumenöl, Lipase, Glycerin, Fettsäure, Mono-Rhamnolipid, Di-Rhamnolipid, Polysaccharid, Nitrat und Kohlendioxid. Eine weitere Zustandsgrößen ist die Konzentration von C<sub>4</sub>-HSL (HSL = Homoserine Lakton), welche ein Maß für Quorum Sensing ist. Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* setzt Quorum Sensing dazu ein, die Sekretion der Rhamnolipide zu steuern [6].

Es wurden gekoppelte, stark nichtlineare Differentialgleichungen aufgestellt, die sowohl die die Dynamik der Zustandsgrößen als auch die aus den Reaktionen folgende Massenbilanz beschreiben. Die Differentialgleichungen lassen sich in die drei Klassen autokatalytisches Wachstum (Biomasse), Wachstumsrate proportional zur Biomasse (Rhamnolipid-mono, Rhamnolipid-di, Polysacharid, Lipase) sowie Bilanzierung über Änderungsraten (Glycerin, Fettsäure, Nitrat, Kohlendioxid, Sauerstoff) einteilen. Hierbei sind viele Verstärkungsfaktoren stark nichtlinear von Zustandsgrößen abhängig. In Bild 2 ist der Zeitverlauf des Batch-Prozesses der simulierten Variablen und der Messdaten dargestellt. Es ist erkennbar, dass die simulierten Daten gut mit den Messdaten übereinstimmen.



Bild 2: Zeitverlauf des simulierten Prozesses und der Messdaten

## 3 Sensitivitätsanalyse und Parameteroptimierung

Da das Modell 36 Parameter enthält, von denen nur wenige Werte aus der Literatur übernommen werden können, müssen die anderen Parameter anhand der Messdaten identifiziert werden. Um zunächst die wichtigsten Parameter identifizieren zu können, wurde eine numerische Sensitivitätsanalyse durchgeführt. Dazu wurden wesentliche Merkmale und Güteindices definiert und die Sensitivität der Güteindices bezüglich der ca. 30 Parameter ausgewertet. Folgende vier Güteindices wurden definiert (siehe auch Bild 2): 1. Stationärwert Biomasse, 2. Stationärwert Mono-Rhamnolipid, 3. Stationärwert Di-Rhamnolipid, 4. Maximalwert C4-HSL.

Mittels der in Bild 3 dargestellten *Hinton Matrix* wurde der Einfluss von Änderungen der 36 Modellparameter (in den Zeilen aufgelistet) auf die vier definierten Güteindices (Spalten) übersichtlich visualisiert. Die Modellparameter wurden um {-50, -20, -10, +10, +20, +50, +100,

+200} % gegenüber den Nominalwerten variiert. Durch diese Methode wurden aus den 36 Modellparametern fünf Parameter identifiziert, deren Variation den größten Einfluss auf die definierten Güteindices haben.

Die numerisch ermittelte Sensitivität

$$S = \frac{\Delta y/y}{\Delta p/p}$$

der Güteindices *y* bezüglich der fünf relevantesten Parameter *p* ist in Bild 4 gezeigt. Es ist ersichtlich, dass die Sensitivität überwiegend in nichtlinearer Form von der Parametervariation  $\Delta p/p$  abhängt.

Die Optimierung der ausgewählten Parameter erfolgt schließlich in Form eines Algorithmus, der die Abweichung der simulierten Verläufe von den Messdaten minimiert. Das Ergebnis ist in Bild 2 gezeigt (durchgezogene Linie: simulierten Prozessvariablen, gepunktet: Messdaten (sowiet verfügbar)). Es ist erkennbar, dass die simulierten Daten überwiegend gut mit den Messdaten übereinstimmen.

Basierend auf dem Modell werden in laufenden Forschungsarbeiten optimierte Prozessführungsstrategien untersucht, um die Rhamnolipid-Produktionsrate signifikant zu steigern.



Bild 3: Hinton Matrix zur Visualisierung des Einflusses von Änderungen der 36 Modellparameter (in den Zeilen aufgelistet) auf 4 definierte Güteindices (Spalten). Die Parameter wurden um {-50, -20, -10, +10, +20, +50, +100, +200}% gegenüber den Nominalwerten variiert.



Bild 4: Sensitivität der vier definierten Güteindices (abgekürzt als maxBDM, maxRL1, maxRL3, maxC4HSL) bezüglich der fünf relevantesten Parameter

# Danksagung

Die Arbeiten werden finanziert durch die Baden-Württemberg Stiftung im Programm "Umwelttechnologieforschung".

## Literatur

- [1] Henkel M. et al.: Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production In: Process Biochemistry, 2012
- [2] Jarvis, F.G. and Johnson M.J.: A Glyco-Lipide produced by Pseudomonas-Aeruginosa, Journal of American Chemical Society, 1949
- [3] Cha, M. et al.: Heterologous production of Pseudomonas aeruginosa EMS1 biosurfactant in Pseudomonas putida, Bioresource technology, 2008
- [4] Müller M., Hausmann R.: Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. In: Applied Mircrobiological Biotechnology, 2012
- [5] Medina-Moreno, S.A. et al.: Modeling rhamnolipids production by Pseudomonas aeruginosa from immiscible carbon source in a batch system, 2011
- [6] Waters, C.M., Bassler, B.L.: Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. In: Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005