

Einführung in die Bioverfahrenstechnik

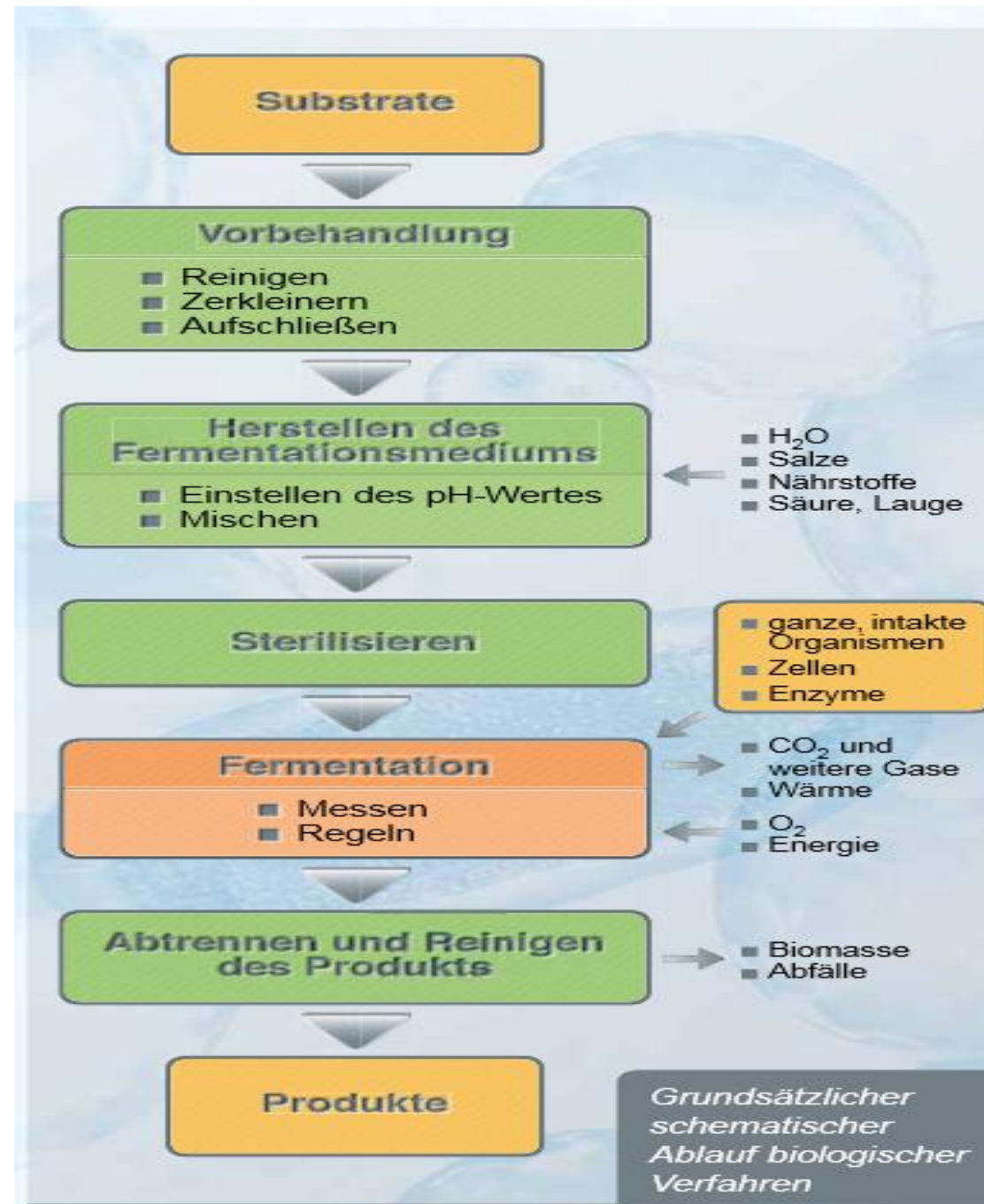
Fachbereich 2, Informatik und Ingenieurwissenschaften

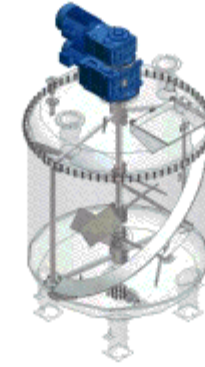
Studiengang Bioverfahrenstechnik

Prof. Dr. Ilona Brändlin

ilona.braendlin@fb2.fra-uas.de







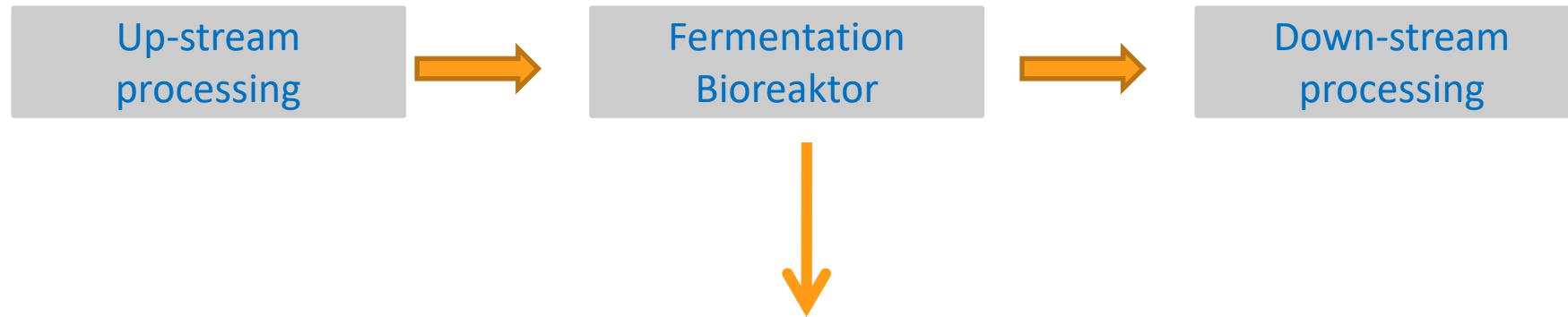
Prozessführung idealer Bioreaktoren



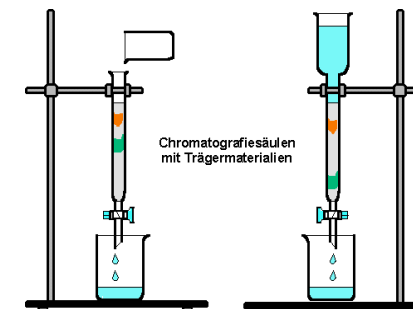
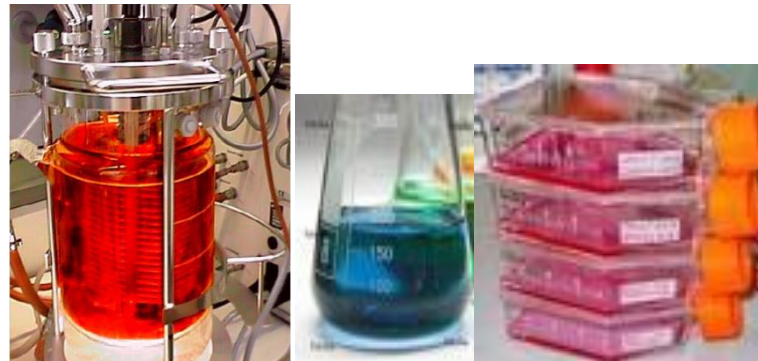
Übersicht-Einleitung

1. Parameter, welche die Prozess-Strategien beeinflussen
2. Parameter: Produkt
 - Prozess-Strategien
3. Charakterisierung der
 - Prozess-Strategien
 - 3.1 - batch
 - 3.2 - fed-batch
 - 3.3 - kontinuierliche Kultivierungen
4. Zusammenfassung: Vergleich
 - Prozess-Strategien

Betriebsweisen für Bioreaktoren

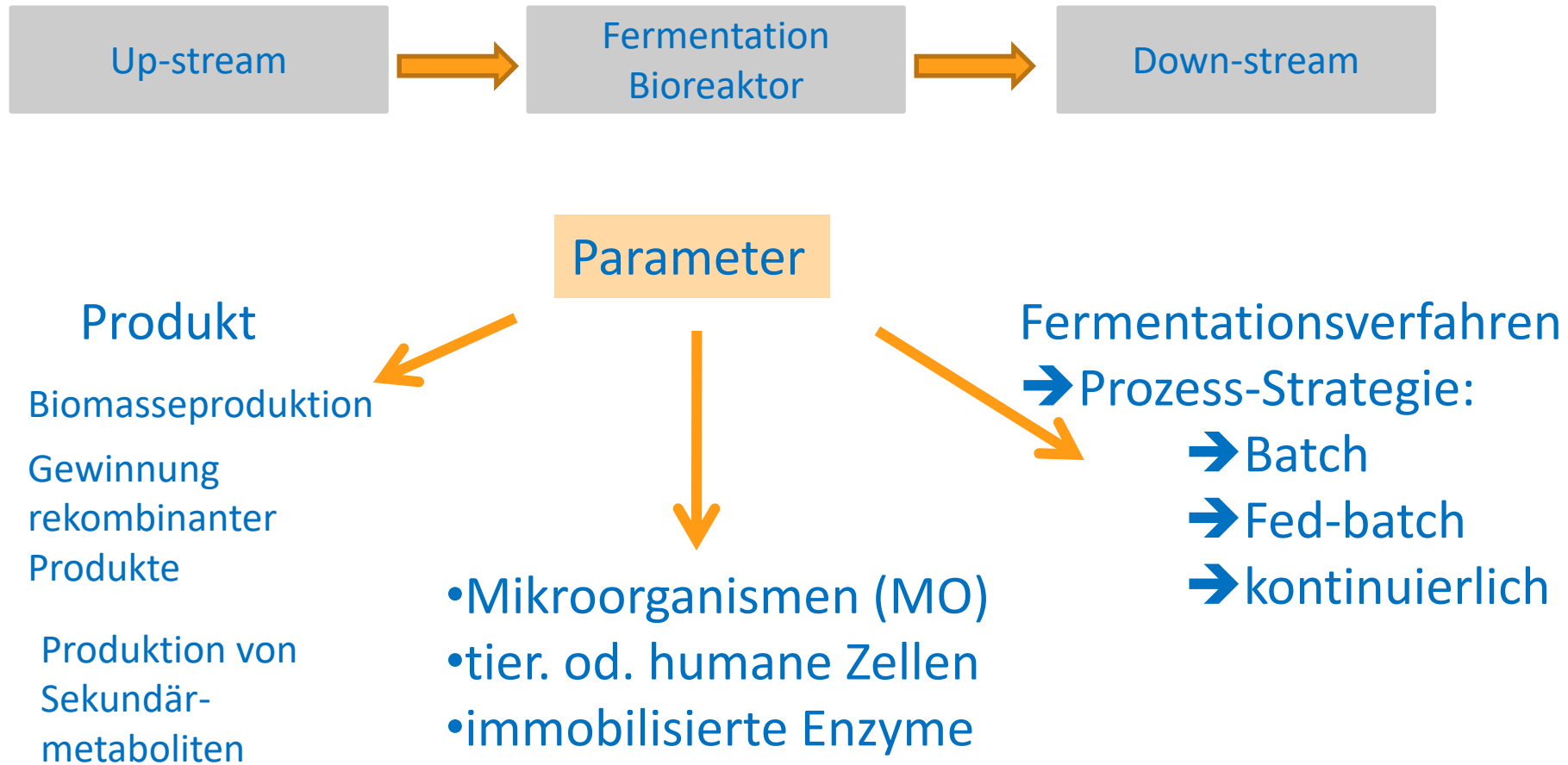


Fermentationsverfahren → Prozess-Strategie



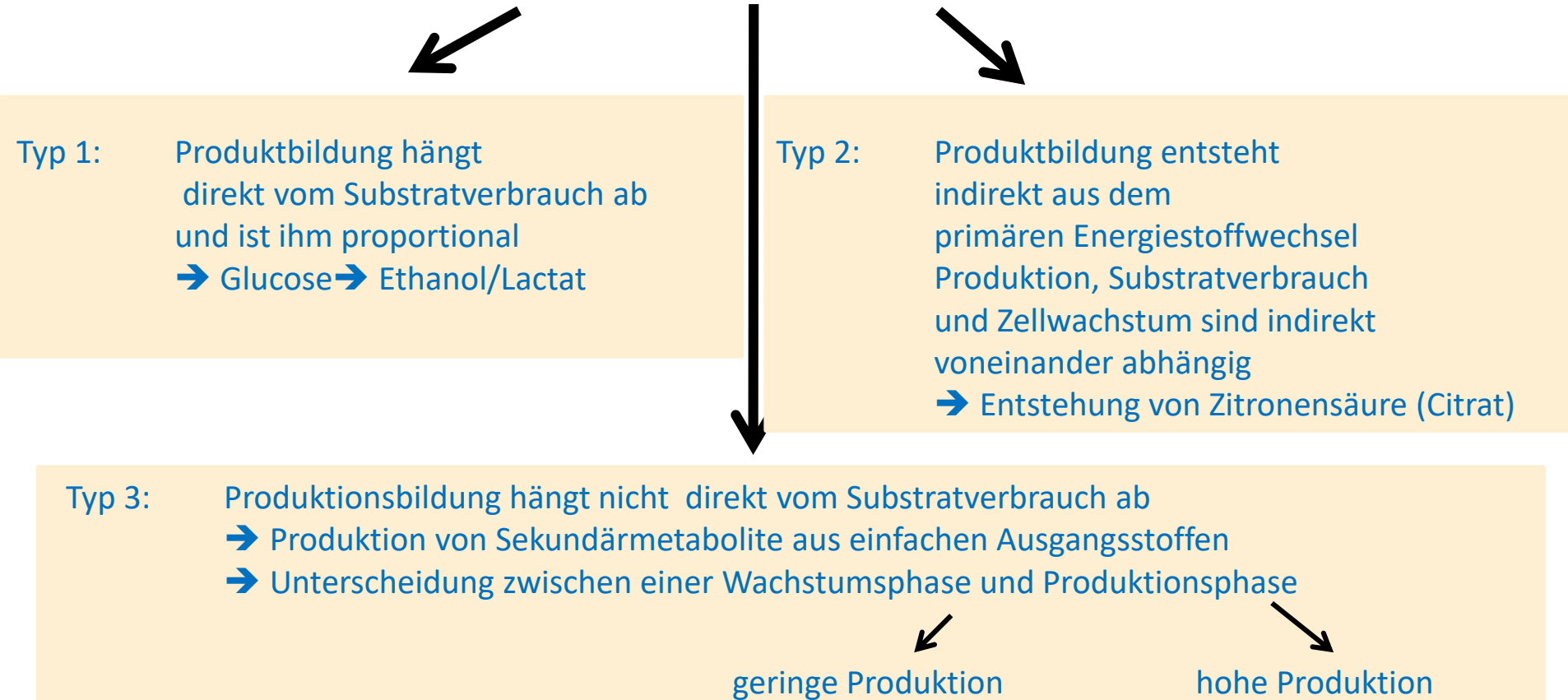
Wahl des Kultivierungsmodus

Prozess – Strategie i. d. Fermentation



Produktbildung nach Gaden

Fermentationsprodukte aufgeteilt in 3 Klassen (Gaden)



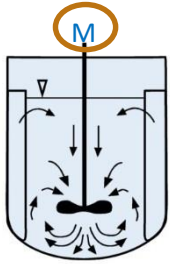
Parameter - Produkt



Produktbildungstypen nach *Gaden* (1959) mit Beispielen

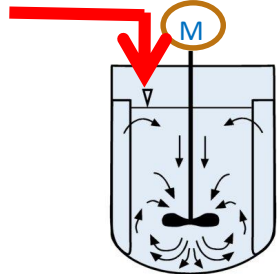
- direkte Abhängigkeit v. Substratverbrauch Typ I
 - ➔ Primärmetabolite, Biomasse
- indirekten Stoffwechselprodukten Typ II
 - ➔ Gewinnung rekombinanten Proteinen (z.B. Biokatalysatoren)
- Sekundärmetaboliten; keine Abhängigkeit vom Substratverbrauch Typ III

Betriebsweisen eines Bioreaktors



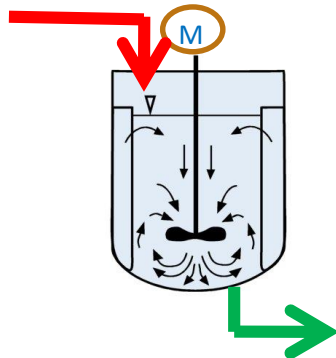
1. Teiloffene Systeme = Diskontinuierlich

- Batch/ Satzbetrieb
- Fed-Batch/ Zulaufsbetrieb

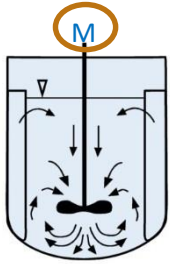


2. Offene Systeme = Kontinuierlich

- Vollständige Rückvermischung
 - CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor/ Durchflussreaktor)
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion
- Keine Rückvermischung
 - Plug flow reactor (PFR)/ Strömungsrohrreaktor
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion

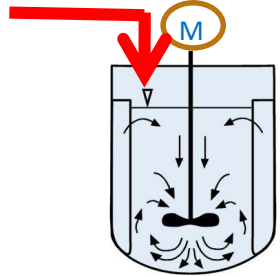


Betriebsweisen eines Bioreaktors



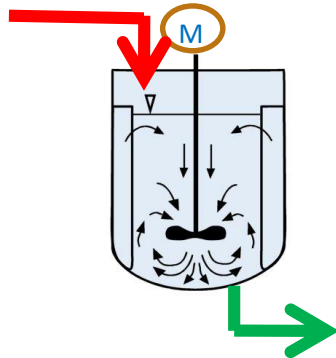
1. Teiloffene Systeme = Diskontinuierlich

- **Batch/ Satzbetrieb**
- Fed-Batch/ Zulaufsbetrieb

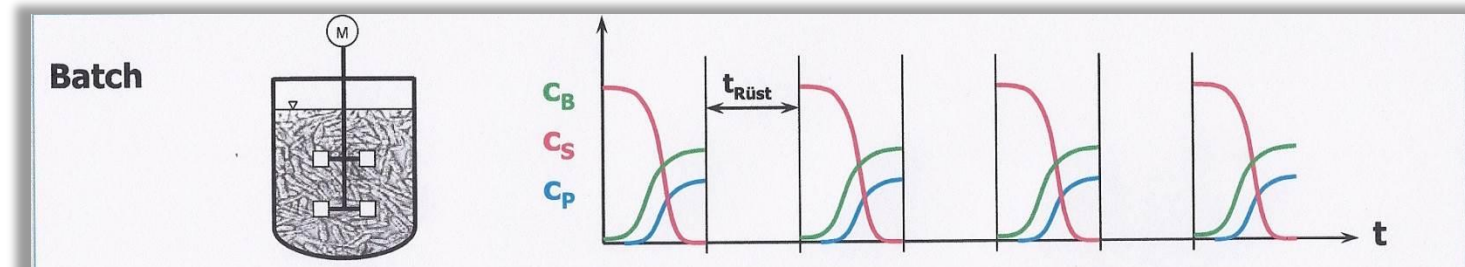


2. Offene Systeme = Kontinuierlich

- **Vollständige Rückvermischung**
 - CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor/ Durchflussreaktor)
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion
- **Keine Rückvermischung**
 - Plug flow reactor (PFR)/ Strömungsrohrreaktor
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion



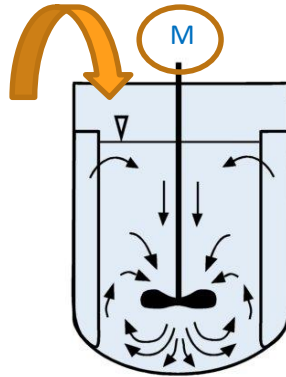
Betriebsweisen eines Bioreaktors



batch – Fermentation

- Einmalige Zugabe des Substrates
- Einmalige Zugabe des Inokulums
- Prozess wird gestartet

Inokulum
Substrate



Volumen im Reaktor (V)
= konstant

- Umwandlung des Substrats während der Kultivierung in
 - Biomasse
 - Produkt

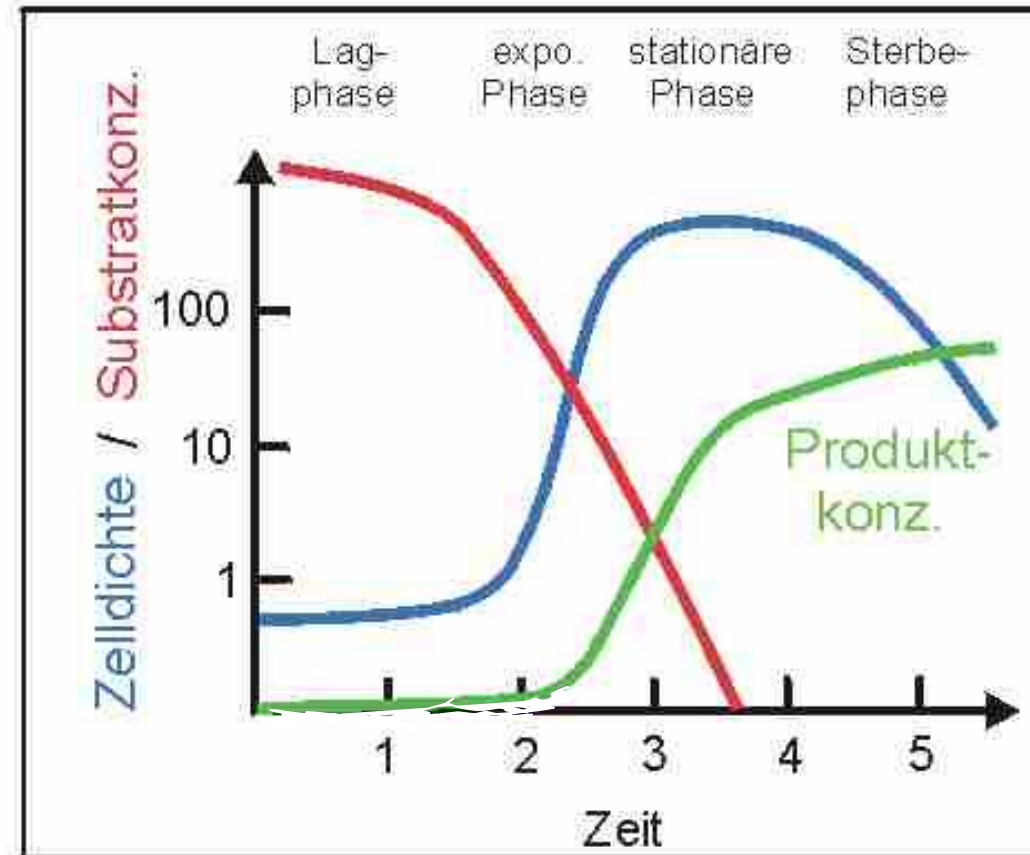
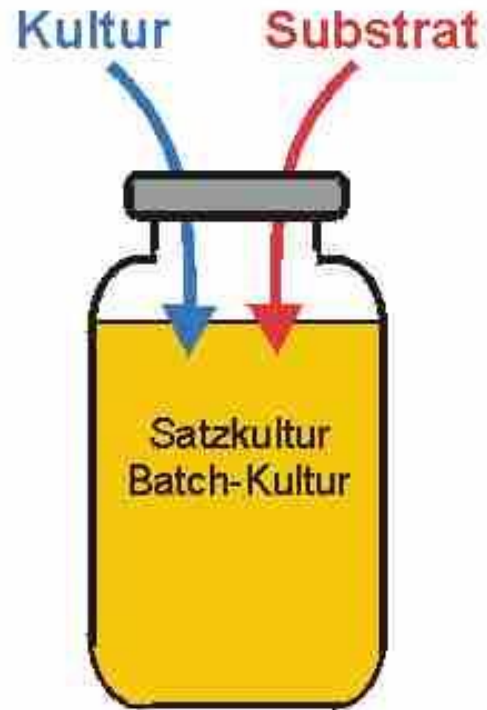
Ende des Prozesses

- vollständigem Verbrauch der Substrate
- Inhibitionen
- max. erreichbare Produktkonzentration

Zugabe von

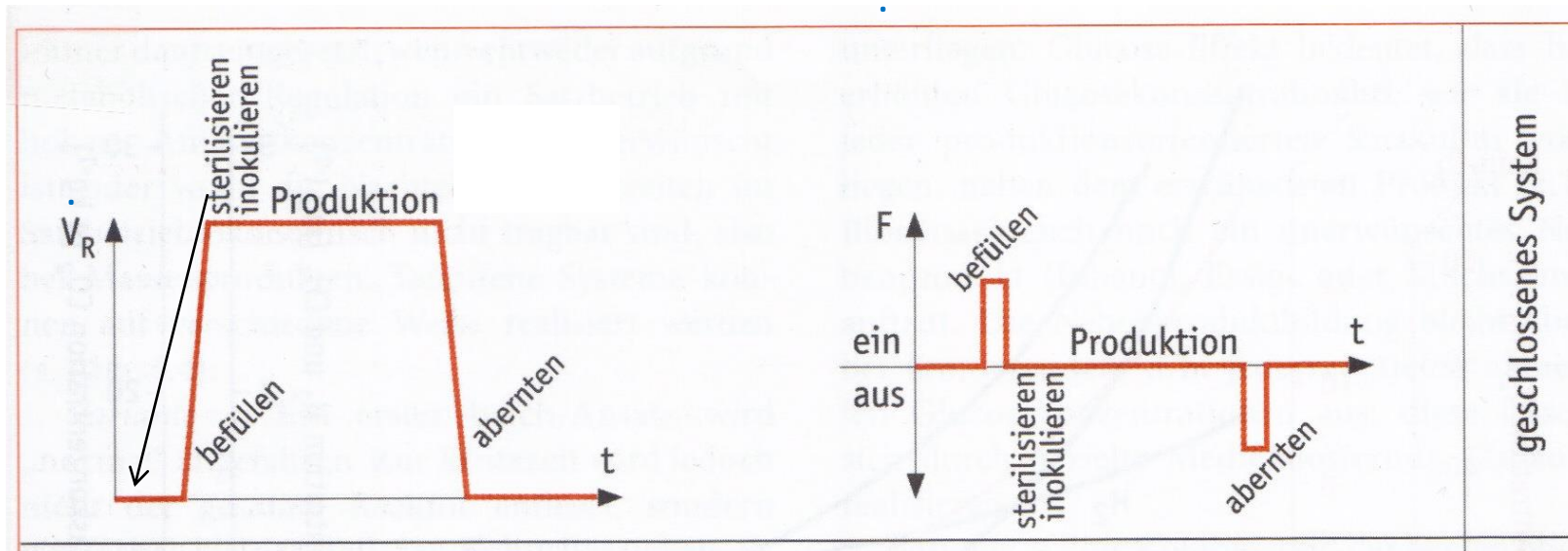
- Luft/O₂/CO₂
- Säuren/Laugen
- Antischaummittel

Substratkonzentration/ Zelldichte: batch



Produktbildung: batch

Systembeschreibung



$\dot{V}_R$ = zeitliches Reaktionsvolumen
 t = Zeit

$\dot{V}F$ = Volumenstrom

$\dot{F}$ in das System hinein:
 F aus dem System heraus:

positiv
negativ

Batch-Betrieb Zusammenfassung

Einfach

Zuverlässig

In der industriellen Praxis weit verbreitet

Volumenspezifische Produktbildungsrate

- Kurzer Zeitraum
 - Zum Ende der Fermentation, bei hohen Zelldichten
 - Lange Anwuchsphase

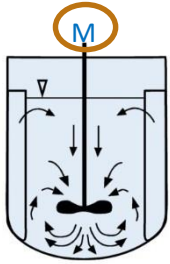
Produktivität wird beeinflusst durch

- Anfangskonzentration der Substrate
 - Substratüberschussinhibierung
 - Erhöhte Produktion an inhibierenden Metaboliten



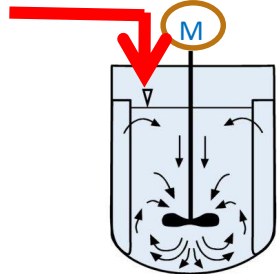
Verbesserte Effizienz durch : Repeated Batch

Betriebsweisen eines Bioreaktors



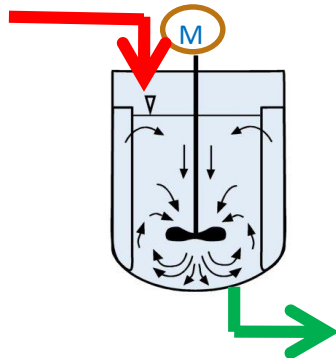
1. Teiloffene Systeme = Diskontinuierlich

- Batch/ Satzbetrieb
- **Fed-Batch/ Zulaufbetrieb**



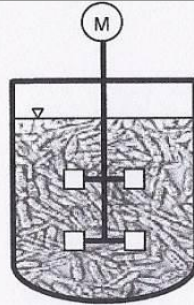
2. Offene Systeme = Kontinuierlich

- **Vollständige Rückvermischung**
 - CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor/ Durchflussreaktor)
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion
- **Keine Rückvermischung**
 - Plug flow reactor (PFR)/ Strömungsrohrreaktor
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion

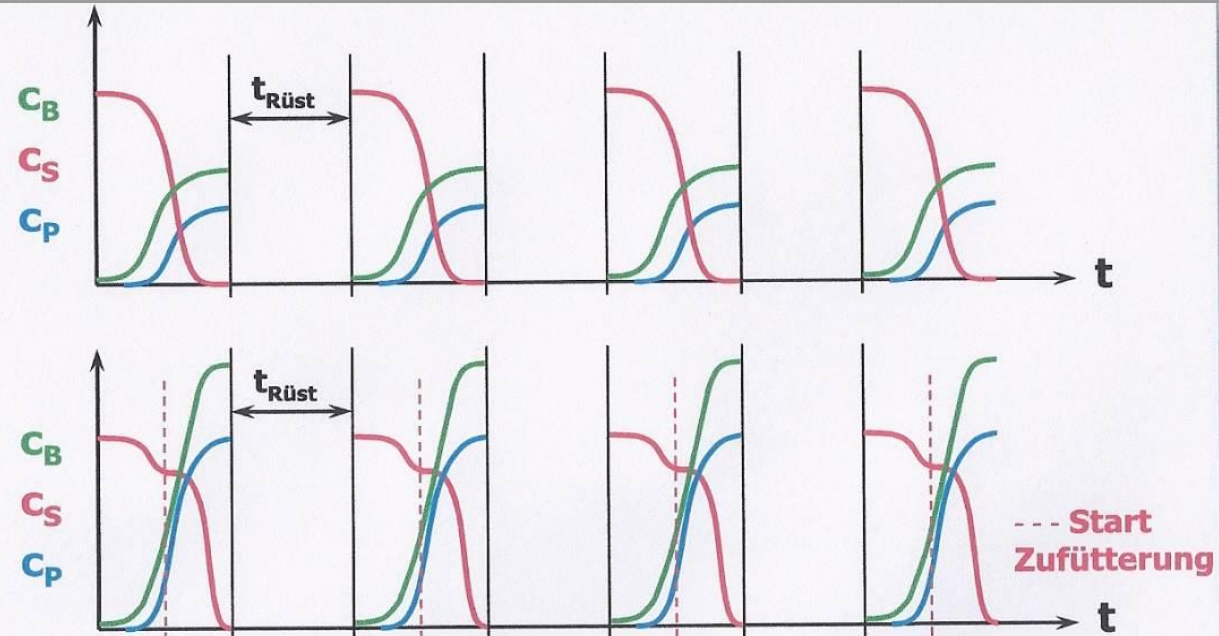
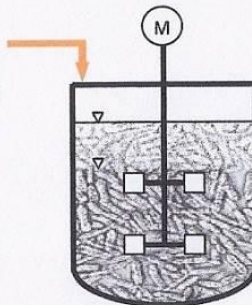


Betriebsweisen eines Bioreaktors

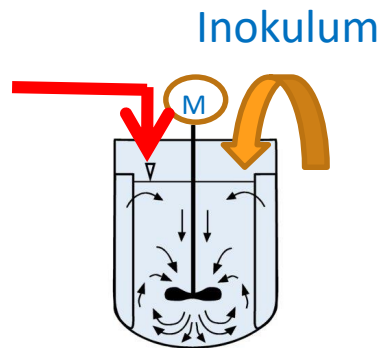
Batch



Fed-Batch



2. Teiloffene Systeme (Zulaufverfahren, „fed-batch“)

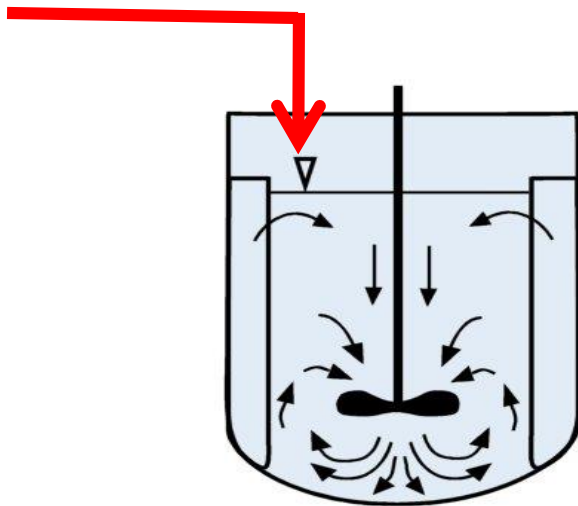


= Diskontinuierliches System

- Einmalige Zugabe des Inokulums
- Substrat kann kontinuierlich oder schrittweise zugeführt werden
- Produktbildung im System
- Volumen im Reaktor (V)= nicht konstant

Fed-Batch – Fermentation

Anwendung

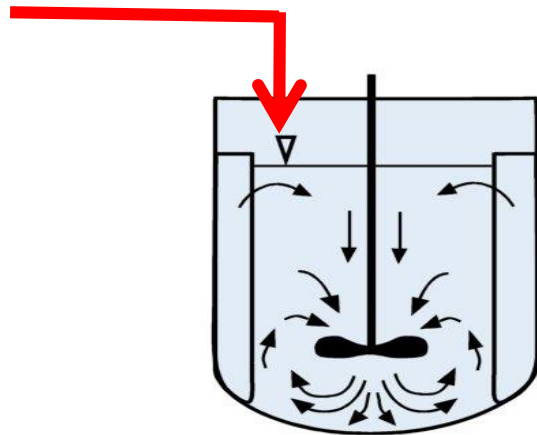


- wenn hohe Anfangskonzentrationen an Substraten auf Grund metabolischer Regulationen unerwünscht sind (Crabtree-Effekt)
- bei Massenproduktionen
 - Überwindung der Wachstumslimitierung durch Substratlimitierung

Fed-Batch – Fermentation

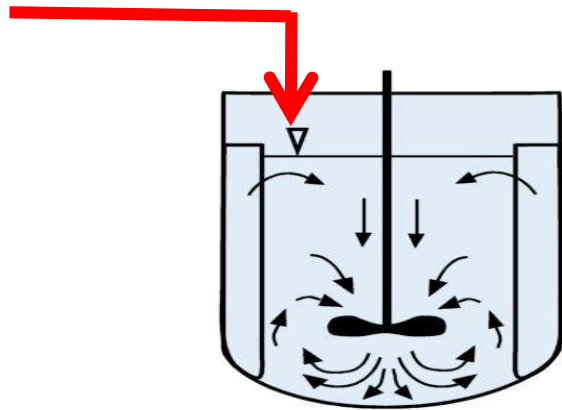
2. Teiloffene Systeme (Zulaufverfahren „fed-batch“)

- ➔ Start mit einem Teil des Reaktorvolumens (batch)
danach Zufütterung bis zum max. Volumen
- sehr konzentrierte Medienbestandteilen möglich



- ➔ Niedrighalten der Konzentration von Substratkomponenten, wenn diese einen Einfluss auf Wachstum oder Produktion haben
(Inhibierung/Crabtree-Effekt)

Fed-Batch – Fermentation

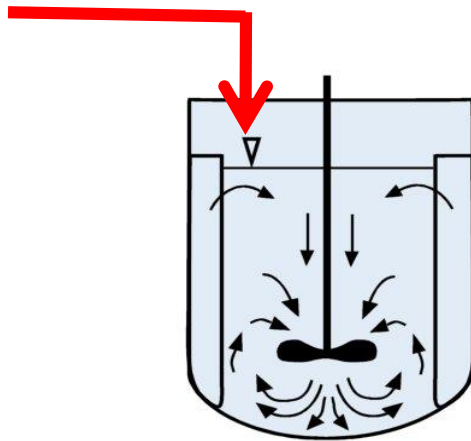


→ 1. normaler „batch“- Ansatz wird angefahren,
zur Ernte der Produkte wird jedoch nicht der
ganze Reaktor geleert – kleiner Teil bleibt als Inokulum
im Reaktor. Die Kulturflüssigkeit wird entzogen
und durch neue Medien ersetzt werden
= repetitives System

→ kurzzeitig , regelmäßig wird das System geöffnet,
jedoch so, dass der Flüssigkeitsstand im Reaktor immer
gleich bleibt (pH-Elektrode!!!)

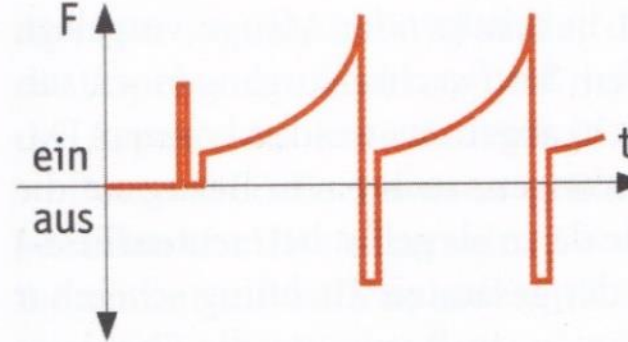
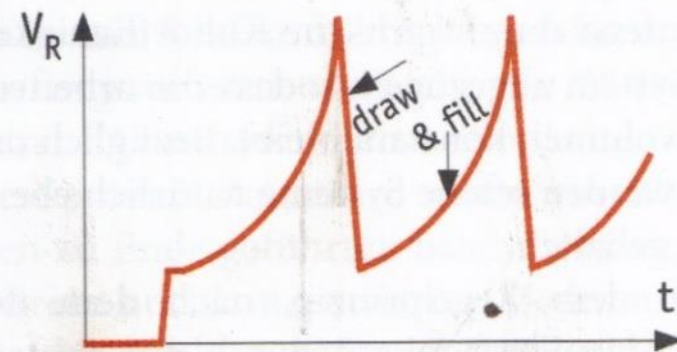
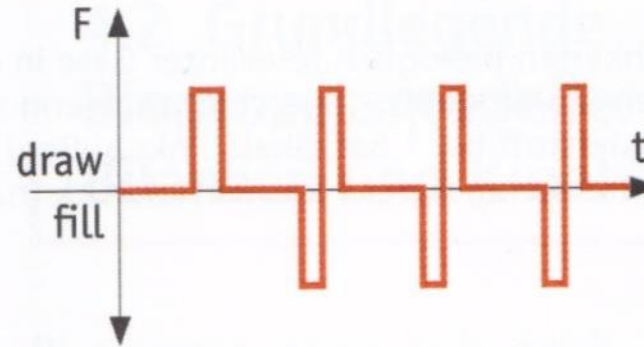
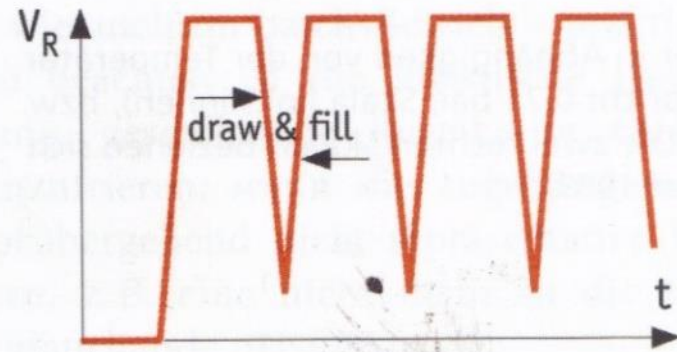
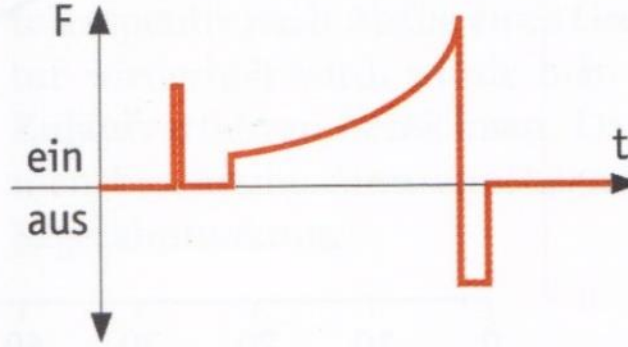
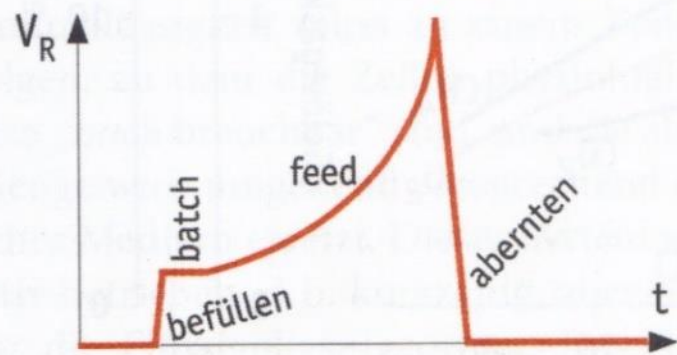
Fed-Batch – Fermentation

2. Teiloffene Systeme (Zulaufverfahren „fed-batch“)



→ 2. Start mit 20% des Reaktorvolumens
bis kurz vor dem Ende der Produktion-
danach Zuführung
sehr konzentrierten Medienbestandteilen möglich

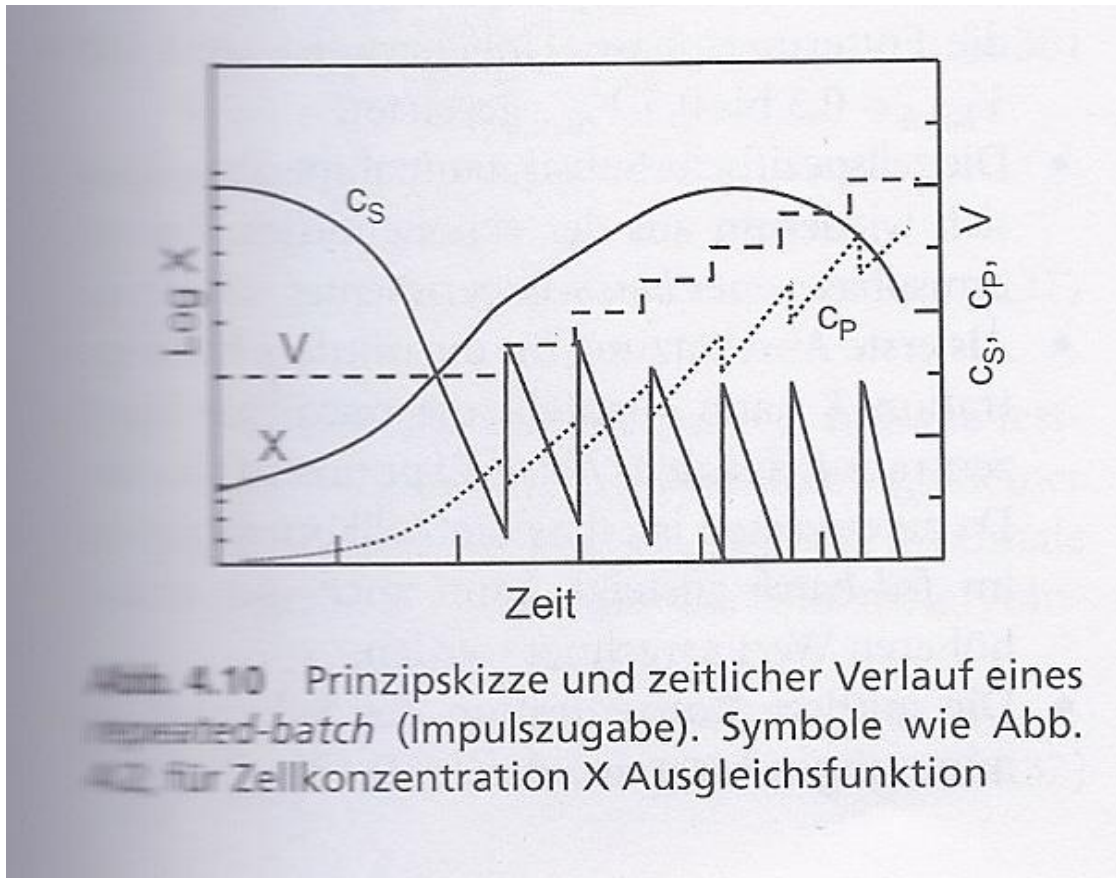
→ Niedrighaltend der Konzentration von
Substraten, wenn diese einen Einfluss
auf Wachstum oder Produktion haben
(*Glucose-Effekt*)



teiloffene Systeme

Fed-Batch – Fermentation

Systembeschreibung → repetitives Zulaufverfahren



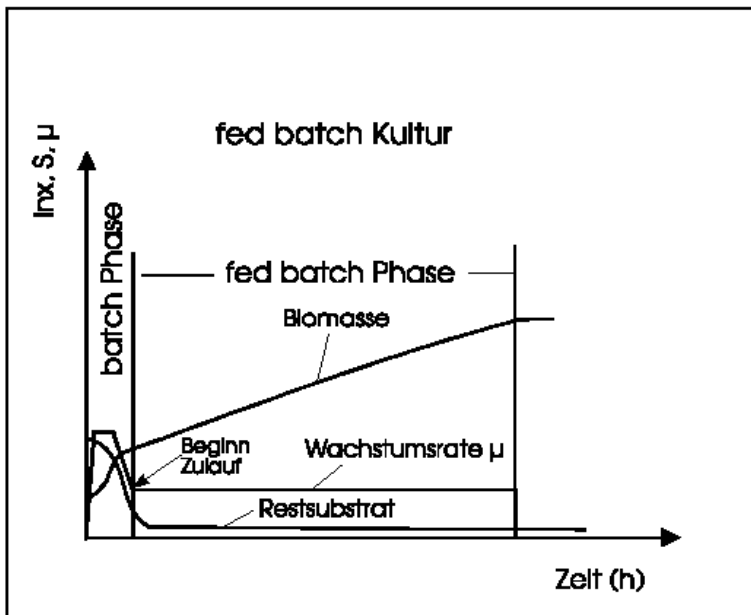
X = Biomassenkonzentration
 C_S = Substratkonzentration
 C_P = Produkt-Metabolitenkonzentration
 V = Volumen

Fed-Batch – Fermentation

Varianten der *fed-batch* Steuerung nach Krahe (2003)

Zur Einstellung einer konstanten Wachstumsrate
muss die vorgegebene Menge an Substrat exponentiell ansteigen

Verlauf einer fed batch Kultur



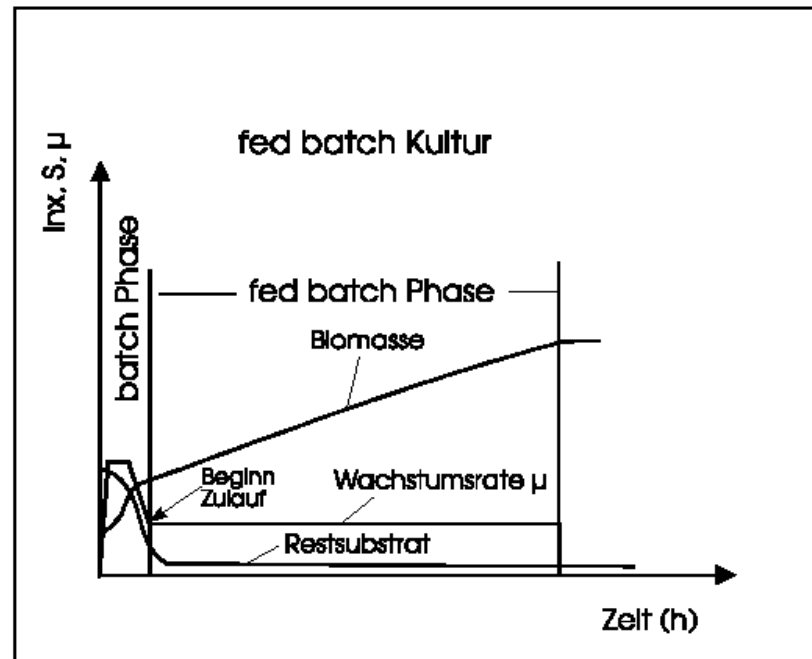
Prozess muss oft unter Substratlimitierung gefahren werden

➔ Unterdrückung limitierender Metaboliten, d.h. zu gefütterte Menge an Substrat sollte unterhalb der max. umsetzbaren Menge bleiben

Fed-Batch – Fermentation

Varianten der *fed-batch* Steuerung nach Krahe (2003)

Verlauf einer fed batch Kultur



Sauerstoffkonzentration als Indikator für Substratlimitierung

- ➔ Hoher schneller Anstieg der O_2 -Konz.
= Substratlimitierung
- ➔ Verzögerter Anstieg der O_2 -Konz.
= es war noch Substrat vorhanden

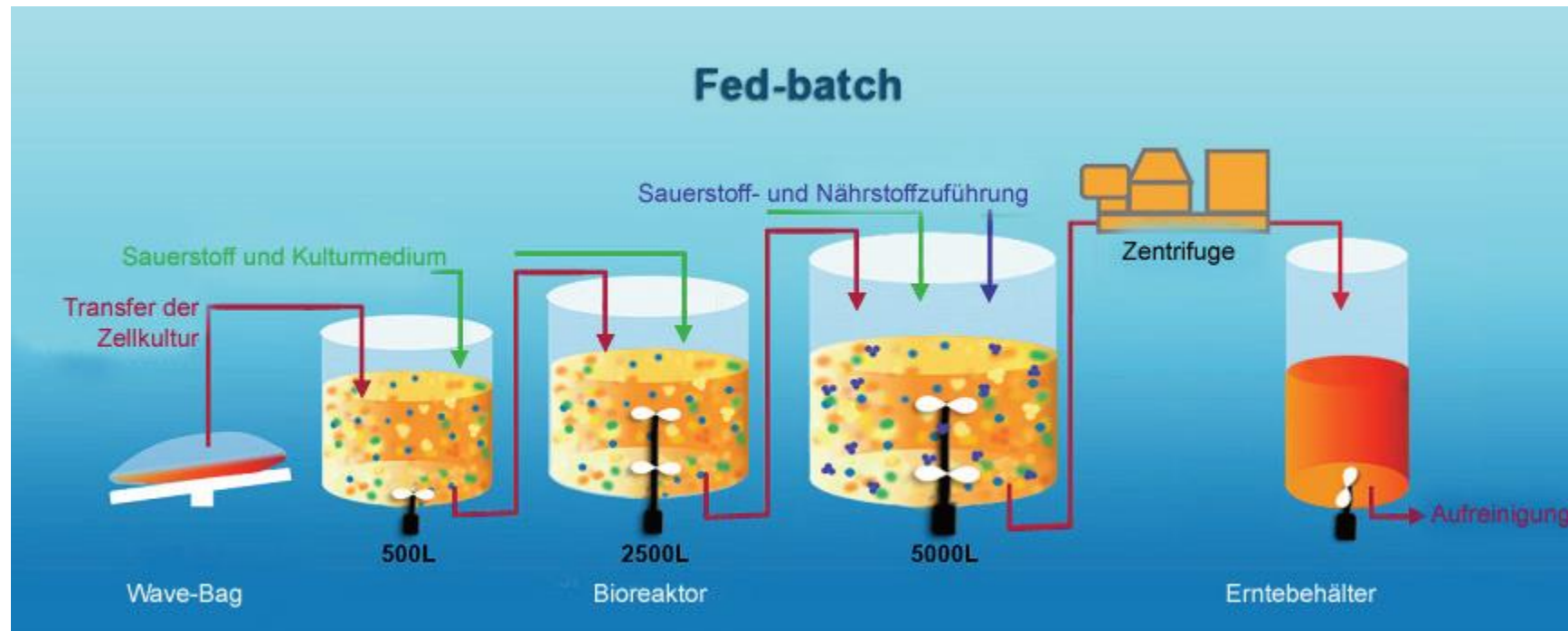
Vermutung: MOs benötigen Sauerstoff, ist der Sauerstoff schnell angestiegen, weniger MOs, da weniger Wachstum durch nicht vorhandenes Substrat

Anwendungsbeispiel: rekombinante Proteinproduktion

*Der Bioreaktor ist eine optimale Umgebung für die Produktion von Protein
aus Zellkulturen*

krankheitsmodifizierendes Medikament zur Behandlung von schubförmig verlaufenden
Formen der Multiplen Sklerose → Rebif® - Interferon-beta-1a-Protein

Merck Serono Biotech Center (MSBC)



Fed-Batch – Fermentation

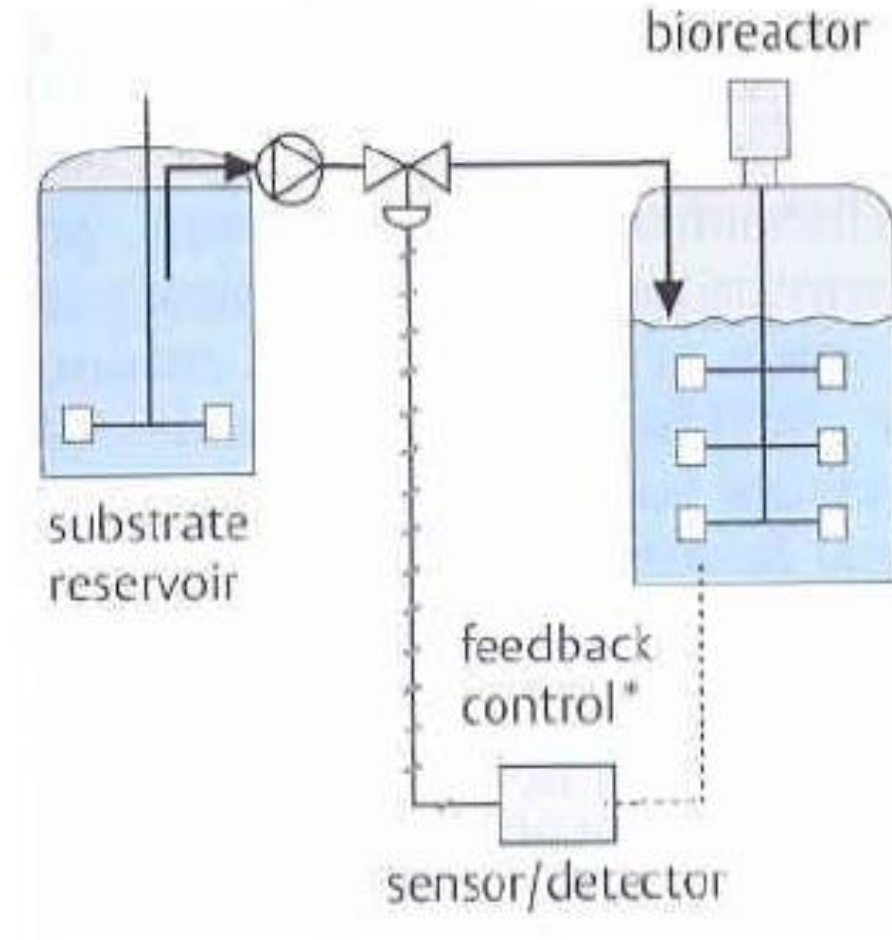
Probleme der *fed-batch* Steuerung

- In der exponentiellen Wachstumsphase steigt nicht nur der Bedarf an Substraten, sondern auch von Sauerstoff
- Gefahr der **Sauerstofflimitierung**-
- Auftreten von Veränderungen im Metabolismus während der oder zwischen aufeinanderfolgenden Kultivierung/en
- Bildung und Anreicherung inhibierender Metaboliten durch Fütterung mit konzentrierten Substratlösungen
- Anreicherung von
 - ➔ Ethanol: bei Hefen
 - ➔ Acetat: bei MOs
 - ➔ Lactat und Ammonium: tierische/humane Zellen
- Limitierte online-Messgrößen stehen zur Verfügung
 - ➔ Erschwerung der Konzeption der Mess-und Regeltechnik
 - ➔ Gefahr der Apoptose durch Substratlimitierung oder Metabol-Inhibierung

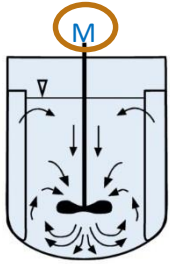
fed-batch – Fermentation

Zusammenfassung

- Kontinuierliche Nährstoffzufuhr ist gewährleistet
- Substratinhibierung ausgeschlossen
- Höhere Konzentrationen an Biomasse/Produkt
- Regulation der Wachstumsrate
- geringere Akkumulation von toxischen Metaboliten
- Reaktorvolumen begrenzt die Kultivierungsdauer
- Einfache Prozesssteuerung
- „Geringer“ technischer Aufwand

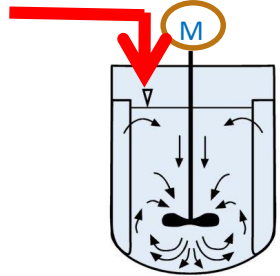


Betriebsweisen eines Bioreaktors



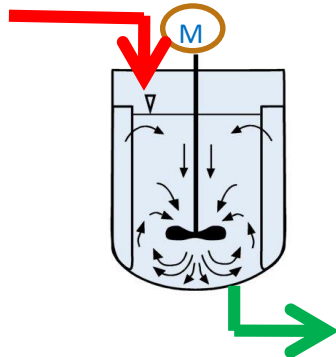
1. Teiloffene Systeme = Diskontinuierlich

- Batch/ Satzbetrieb
- Fed-Batch/ Zulaufbetrieb



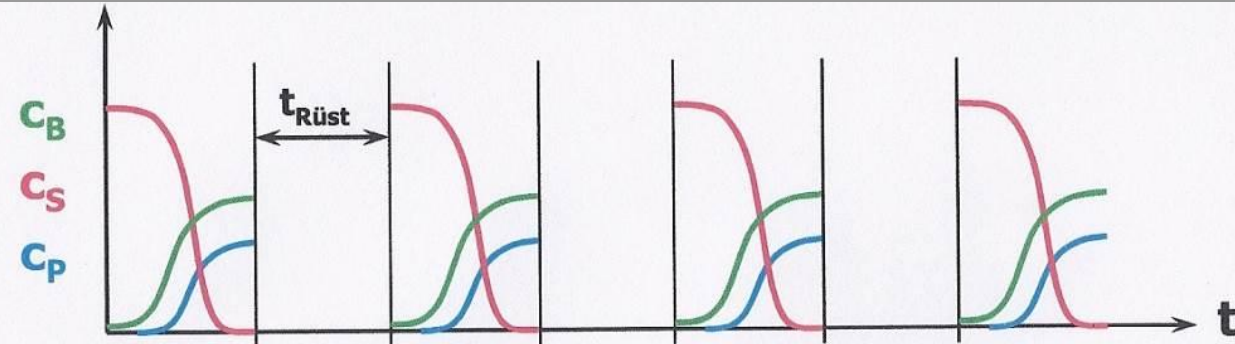
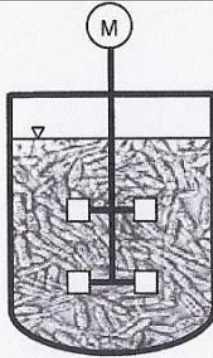
2. Offene Systeme = Kontinuierlich

- Vollständige Rückvermischung
 - CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor/ Durchflussreaktor)
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion

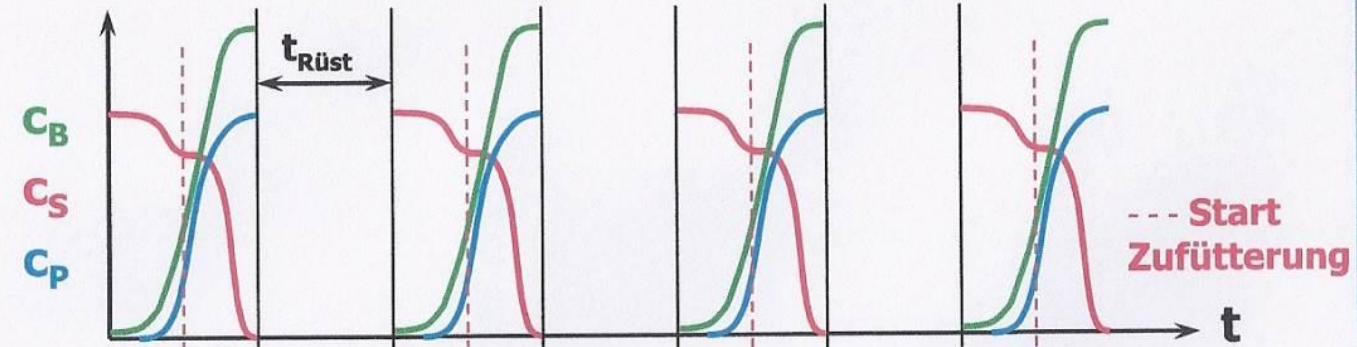
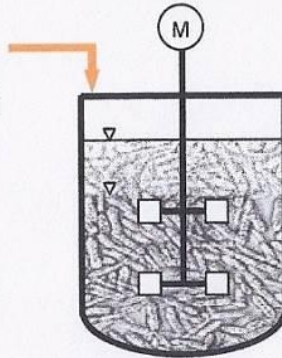


- Keine Rückvermischung
 - Plug flow reactor (PFR)/ Strömungsrohrreaktor
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion

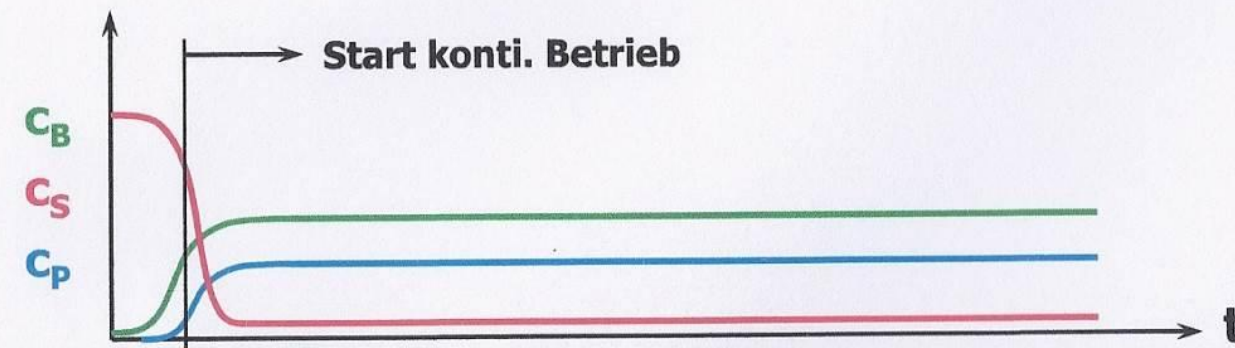
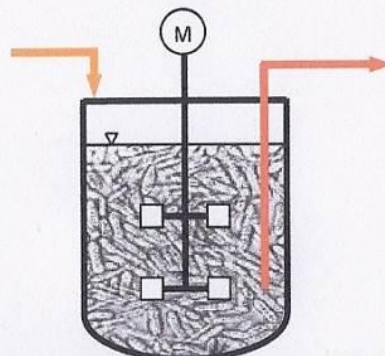
Batch



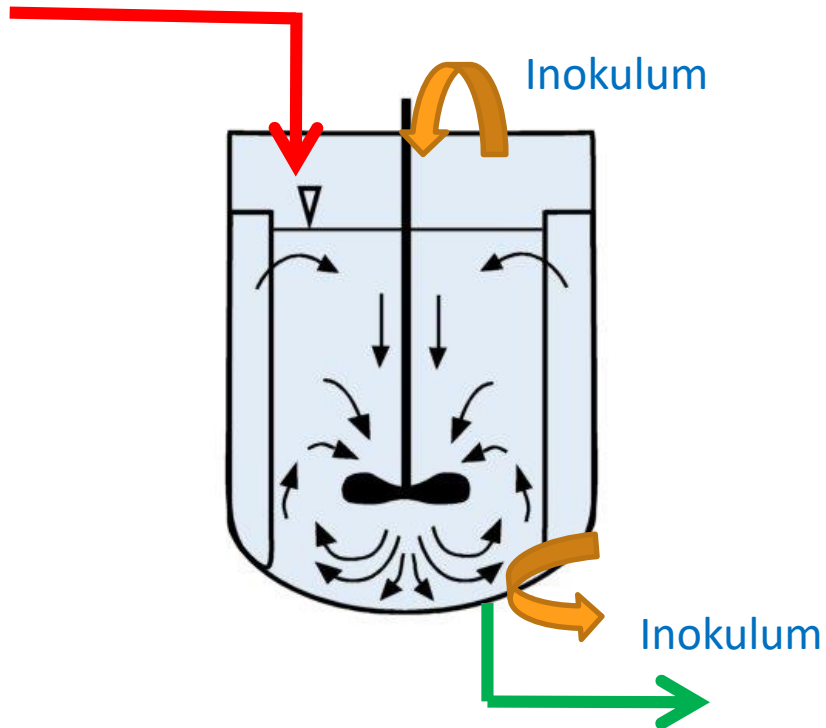
Fed-Batch



konti- nuierlich



3. Offene Systeme (kontinuierliche Systeme)



- System ist ständig offen
 - Substrat (und Inokulum) wird zugeführt
 - Produkt (und Inokulum) wird abgeführt
- der Volumenstand im Reaktor bleibt konstant
 $V = \text{const.}$,
- *steady-state Phase*, Fließgleichgewicht

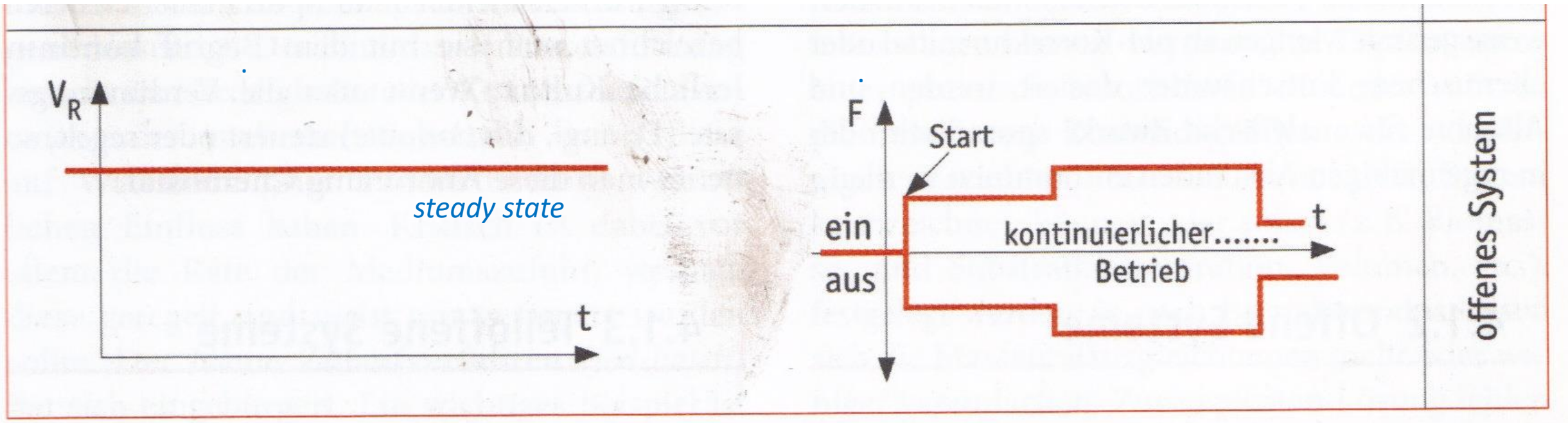
Produktbildung *kontinuierlich*

Systembeschreibung →

Offenes System

→ Chemostat

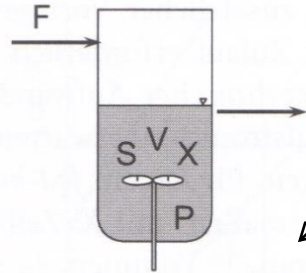
→ Perfusion



$\dot{V}_R$ = zeitliches Reaktionsvolumen
 t = Zeit

F in das System hinein: positiv
 F aus dem System heraus: negativ

kontinuierlich– Fermentation



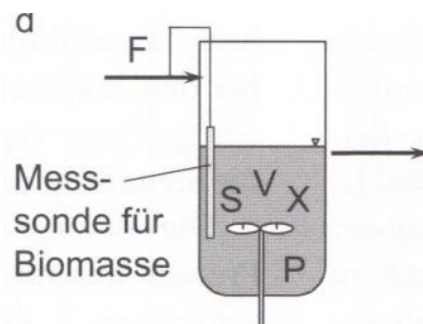
Chemostat

= kontinuierlicher Prozess
ohne Biomasserückhaltung

steady state

Rückkopplungs-Regulation

steady state

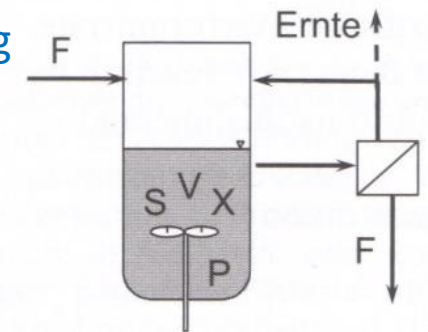


Turbidostat

=kontinuierlicher Prozess
ohne Biomasserückhaltung,
mit Regelung der Biomassenkonzentration
– konstante Trübung, konstante Zellmasse
– variabler Zufluss von Nährlösung

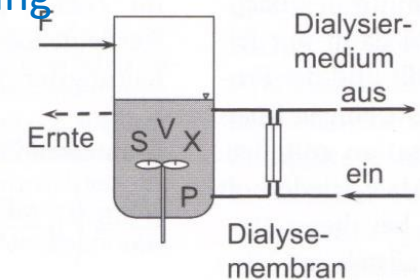
Perfusion

= kontinuierlicher Prozess
mit Biomasserückhaltung^e

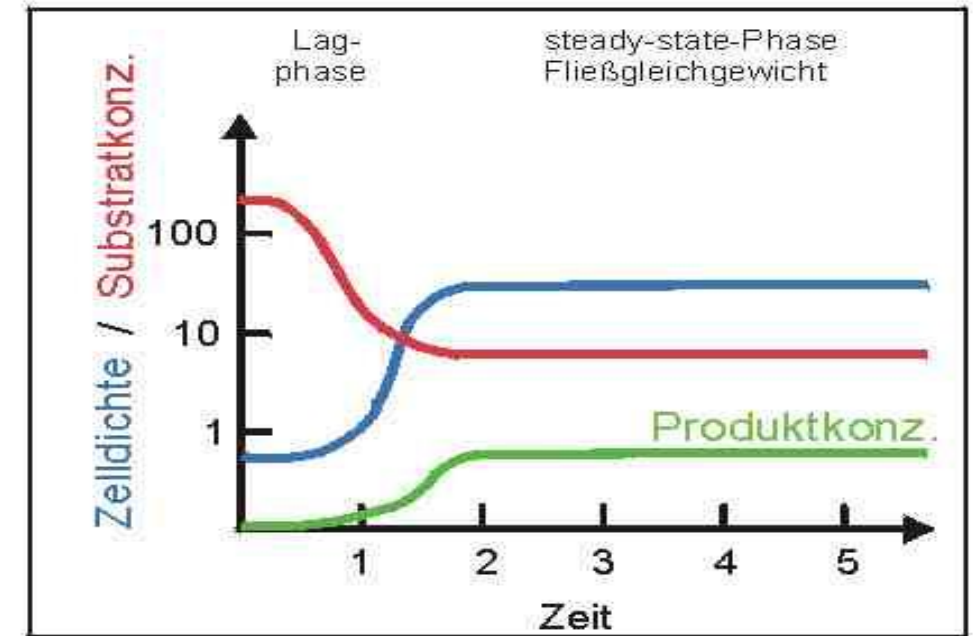
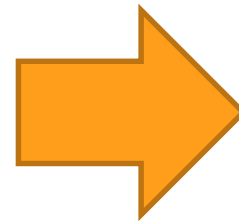
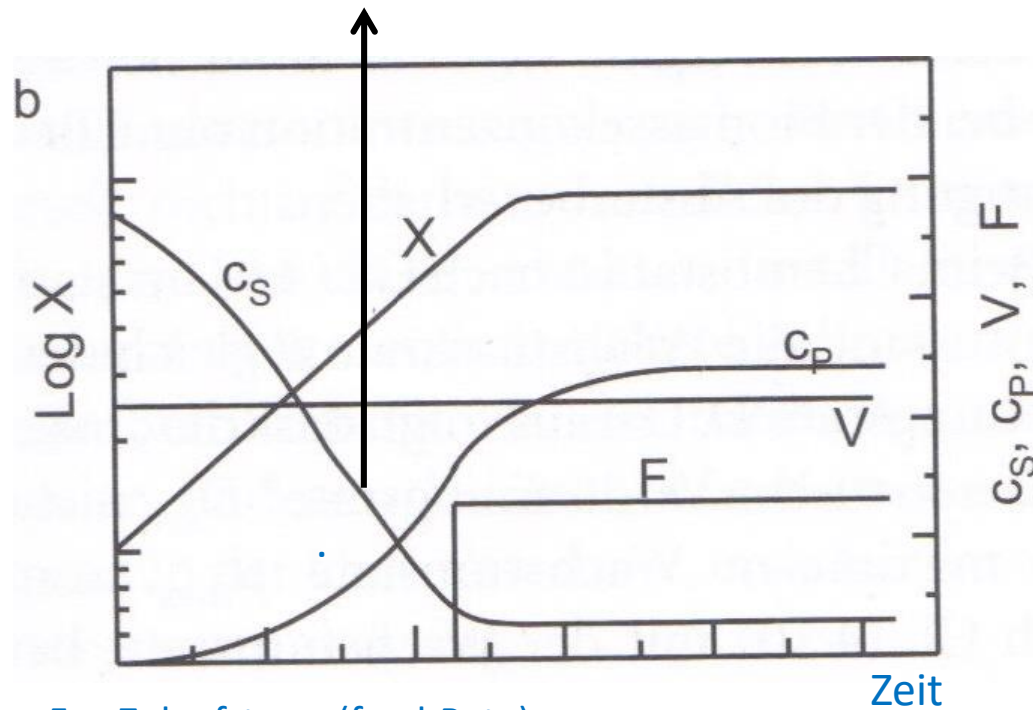


Dialyse

=kontinuierlicher Prozess
mit Zell- und Produktrückhaltung



Chemostat- kontinuierliche Fermentation = ohne Biomasserückhaltung, variable Entnahme von Zellmasse und Produkt



F = Zulaufstrom (feed-Rate)
X = Biomassenkonzentration
V = Reaktionsvolumen
 C_S = Substratkonzentration
 C_P = Produkt-Metabolitenkonzentration

Geregelte Zu- /Ablauftrate (F)
= Verdünnungsrate D

Chemostat – Verdünnungsrate D

$$\text{Verdünnungsrate } D = \frac{\dot{F} \text{ (feed-rate Zulauf)}}{V \text{ (Volumen im Reaktor)}}$$

D = Verdünnungsrate [h⁻¹]

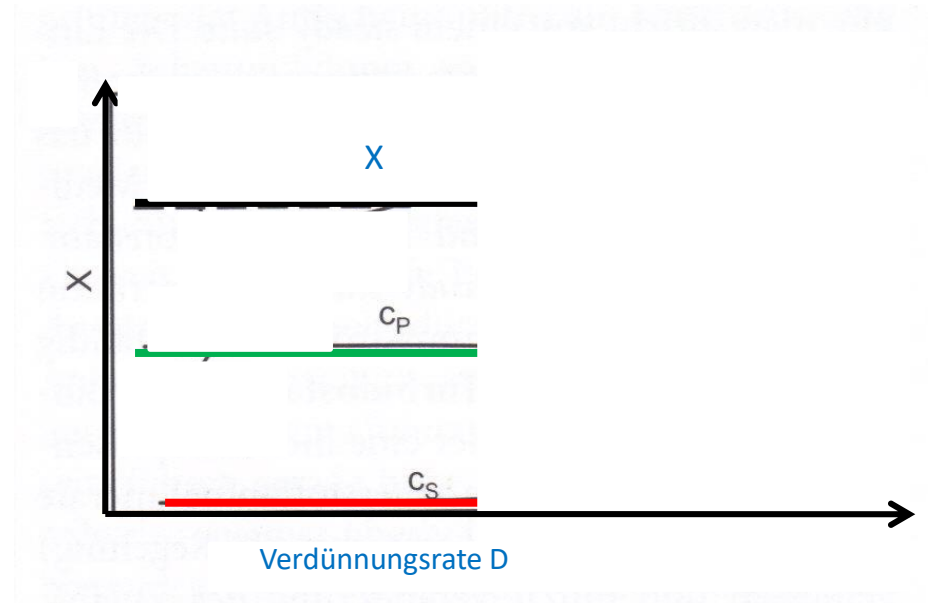
$\dot{F}$ = Zufluss [l/h]

V = Reaktionsvolumen

X = Biomassenkonzentration

C_s = Substratkonzentration

C_p = Produkt-Metabolitenkonzentration



-niedere Verdünnungsraten → konstante Biomassenkonzentration

-hohe Verdünnungsraten → Abnahme der Biomassenkonzentration im *steady-state*

-Auswaschrage: kritische Verdünnungsrate D_{krit}
tierische, humane Zellen= Absterbe Verhalten

Chemostat: Anwendung

Hager + Elsässer GmbH



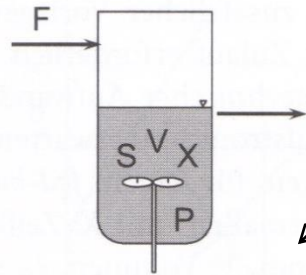
1. in der aeroben Abwasserreinigung

2. Biogasanlagen

Einschränkungen der Anwendung:

- max. zu erwartende Biomassenkonzentration (X) gering
- keine Produktion von Sekundärmetaboliten
- erhöhter Installationsaufwand
- erhöhter Aufwand an Steriltechniken

Kontinuierliche Prozesse

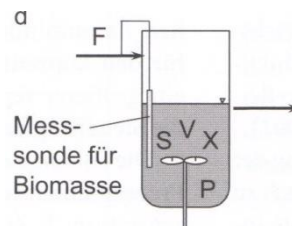


Chemostat
= kontinuierlicher Prozess
ohne Biomasserückhaltung

steady state

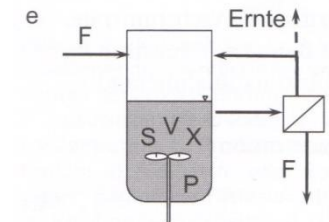
Rückkopplungs-Regulation

steady state

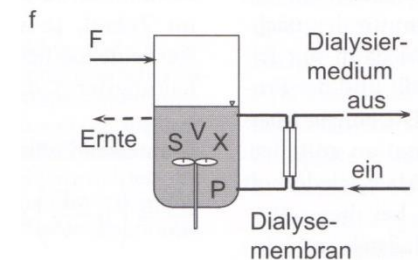


Turbidostat
=kontinuierlicher Prozess
ohne Biomassenrückhaltung,
mit Regelung der Biomassenkonzentration
– konstante Trübung, konstante Zellmasse
– variabler Zufluss von Nährlösung

Perfusion
= kontinuierlicher Prozess
mit Biomassenrückhaltung



Dialyse
=kontinuierlicher Prozess
mit Zell- und Produktrückhaltung



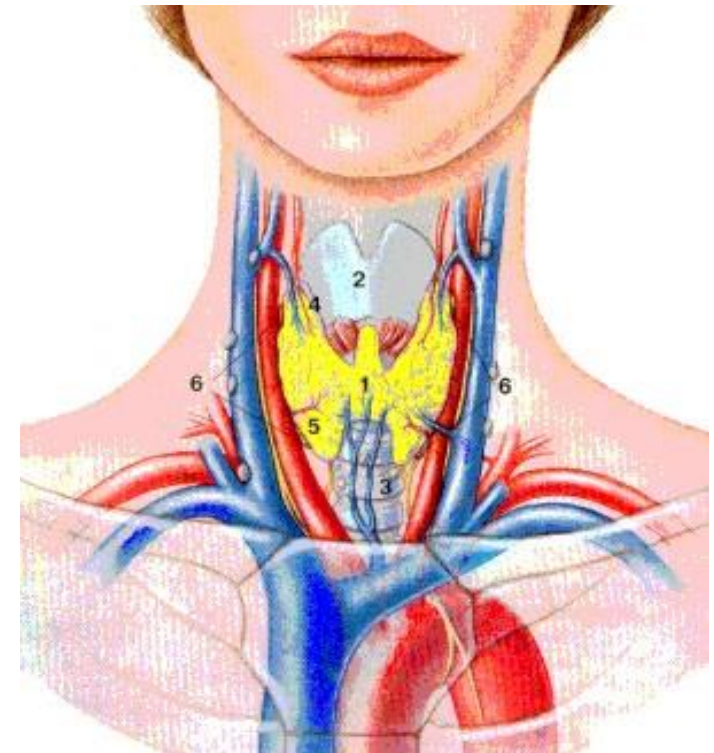
Perfusion

= kontinuierlicher Prozess mit Biomassenrückhaltung

- Vorteil:
- Größere Ausbeuten an Biomasse
 - Produktion und Gewinnung von Sekundärmetaboliten ist möglich

Anwendung in den industriellen Prozessen:

- Produktion von Wirkstoffen mit tierischen Zellen
 - Wachstumshormone
 - rekombinante Proteine
- regenerative Medizin, Tissue engineering



Anwendungsbeispiel: Regenerative Medizin

Vaskularisierte Matrix im Bioreaktor

Anschluss zur Perfusion der vaskulären Strukturen über einen seitlichen Kreislauf kann Medium zugeführt werden.



 **Fraunhofer**
IGB



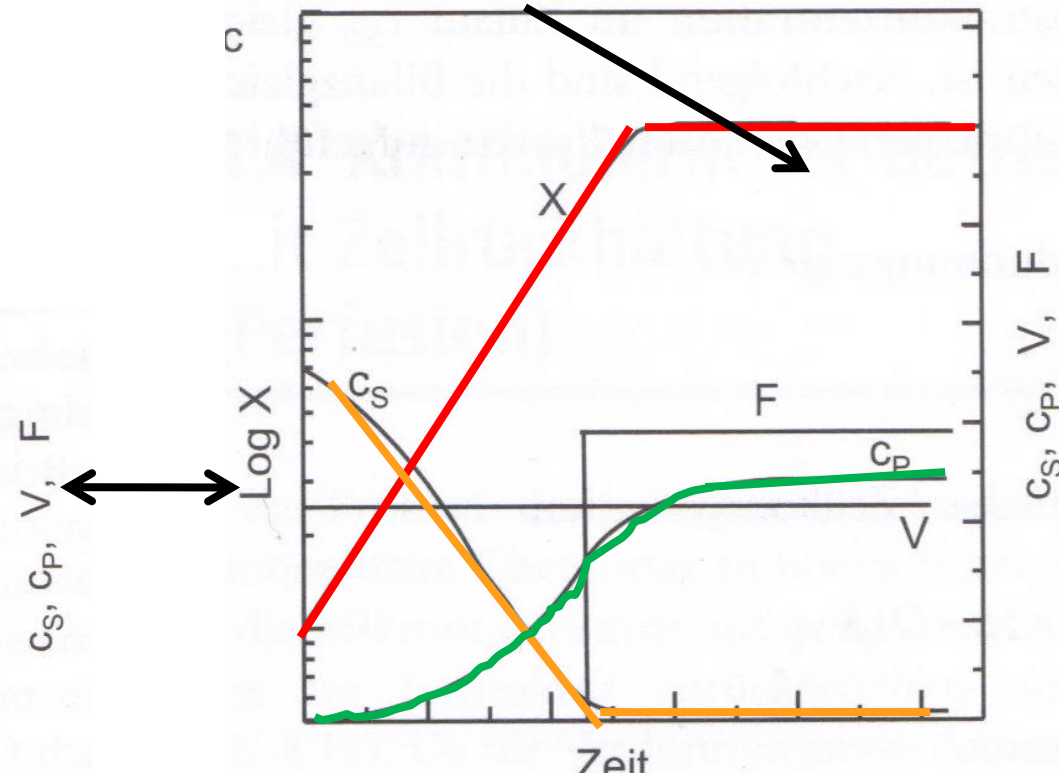
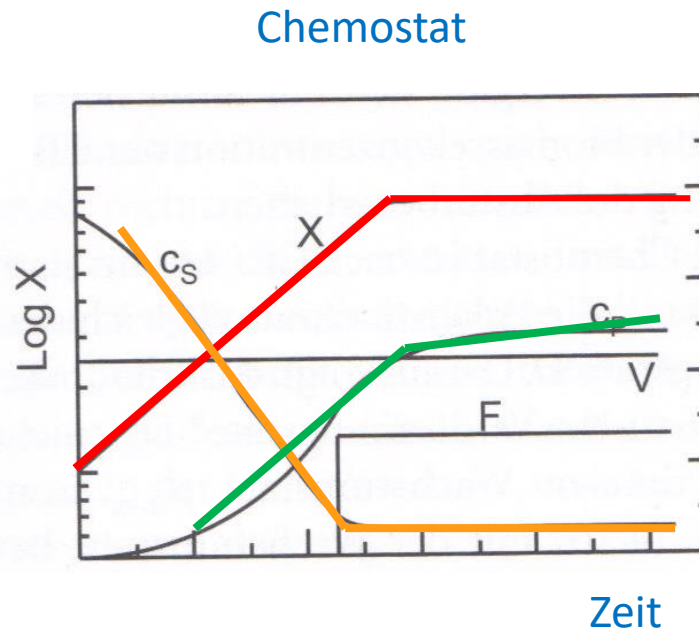
Ein durchgängiges , artifizielles Blutsystem verbessert

- die Zufuhr von Nährstoffen
- den Gasaustausch sowie
- den Abtransport von Stoffwechselprodukten

Perfusion

= kontinuierlicher Prozess mit Biomassenrückhaltung

F= Zulaufstrom (feed-Rate)
X= Zellkonzentration
V= Volumen
C_s= Substratkonzentration
C_p=produkt-Metabolitkonzentration



Produktkonzentration ähnelt dem Chemostat

Betriebsart	Vorteile	Nachteile
Batch (Satzbetrieb) → Anwendung: Labor	- hohe Flexibilität - niedere Investitionskosten, da geringer Regelaufwand	- diskontinuierlich - hohe Lohnkosten durch höheren Personalaufwand - zeitl. Schwankungen aller Größen - Hohe Substratkonzentrationen
Fed-batch (Zulaufbetrieb) → Anwendung: - Biomassenproduktion - rekombinante Proteine	- höchste Raum-Zeit Ausbeute - weitgehende Automatisierung - geringe Lohnkosten - gleichbleibende Produktqualität	- hohe Investitionskosten - hoher Regelaufwand - hohe Substratkonzentrationen
Kontinuierlich → Anwendung: - Umwelttechnik - Pharmaka (Insulin; Novo Nordisk) - Tissue - engineering	- einfachere Automatisierung - geringe Lohnkosten, kürzere Rüstzeiten - gleichbleibende Produktqualität bei wachstumsabhängiger Produktion	- Geringe Flexibilität - hohe Investitionskosten - hoher Regelaufwand - Sterilität - Mutationsgefahr – Plasmid Verlust - > als 500h - wirtschaftlich



Danke