

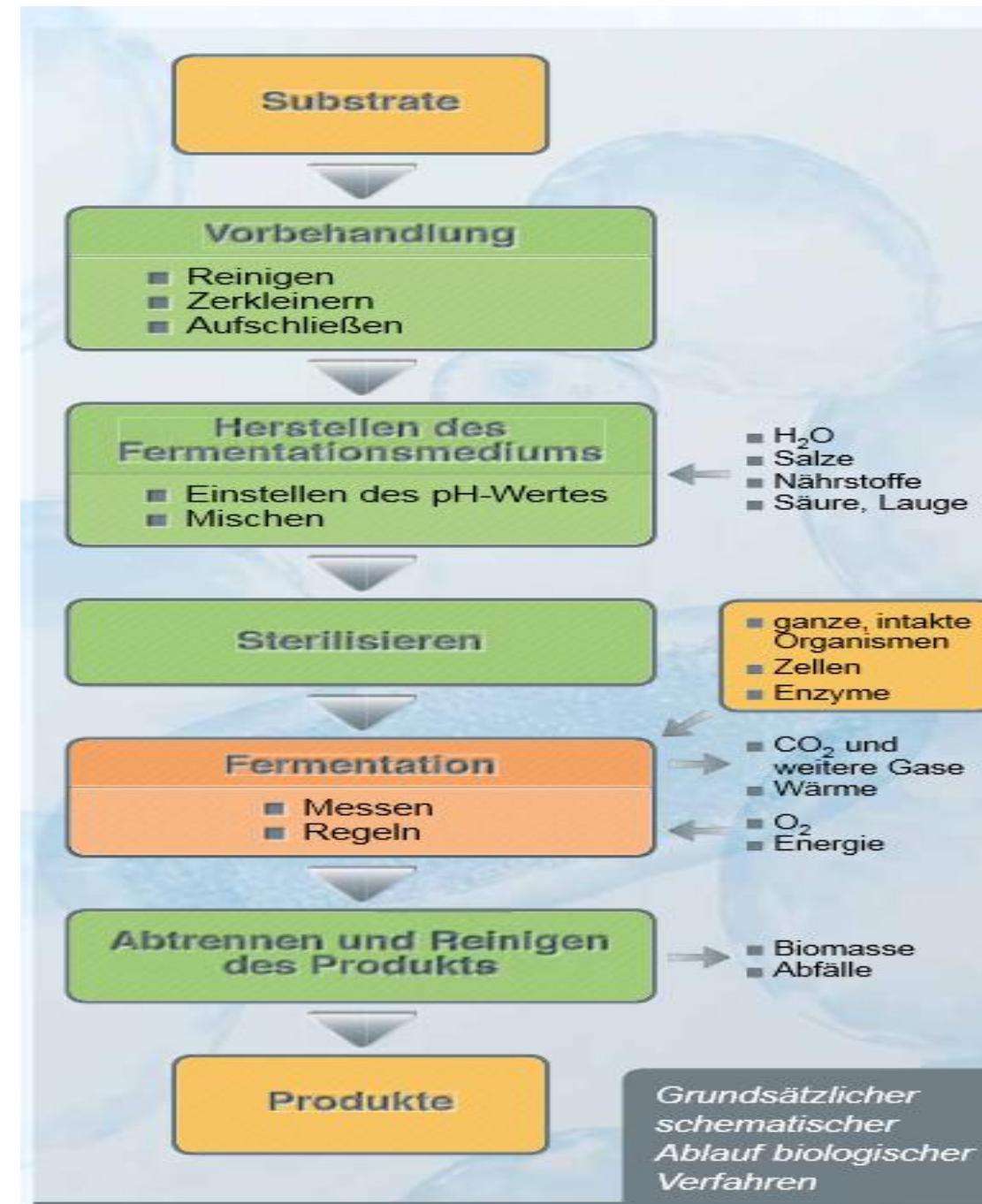
Einführung in die Bioverfahrenstechnik

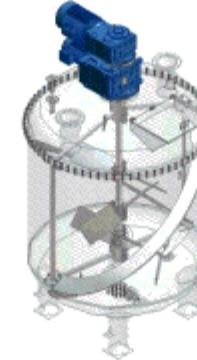
Fachbereich 2, Informatik und Ingenieurwissenschaften

Studiengang Bioverfahrenstechnik

Prof. Dr. Ilona Brändlin
ilona.braendlin@fra-uas.de







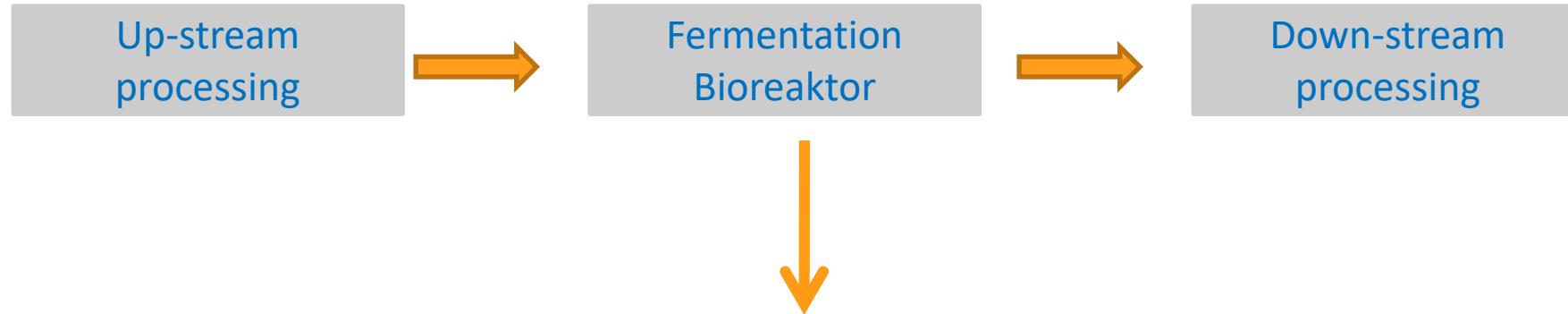
Prozessführung idealer Bioreaktoren



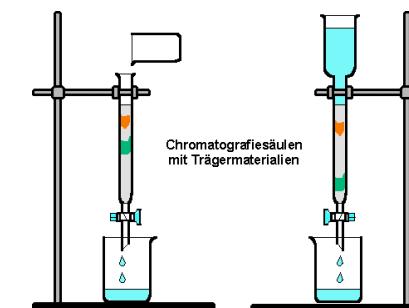
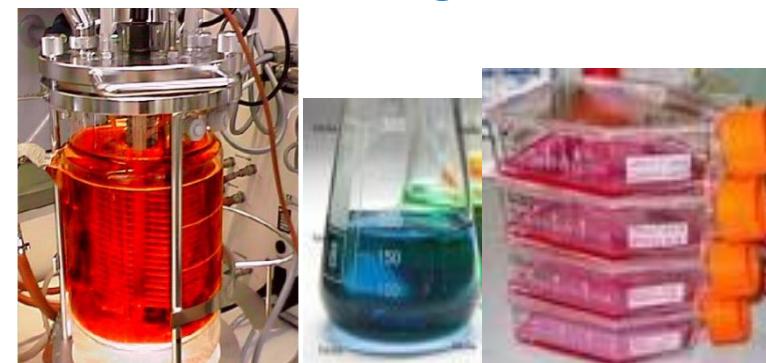
Übersicht-Einleitung

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

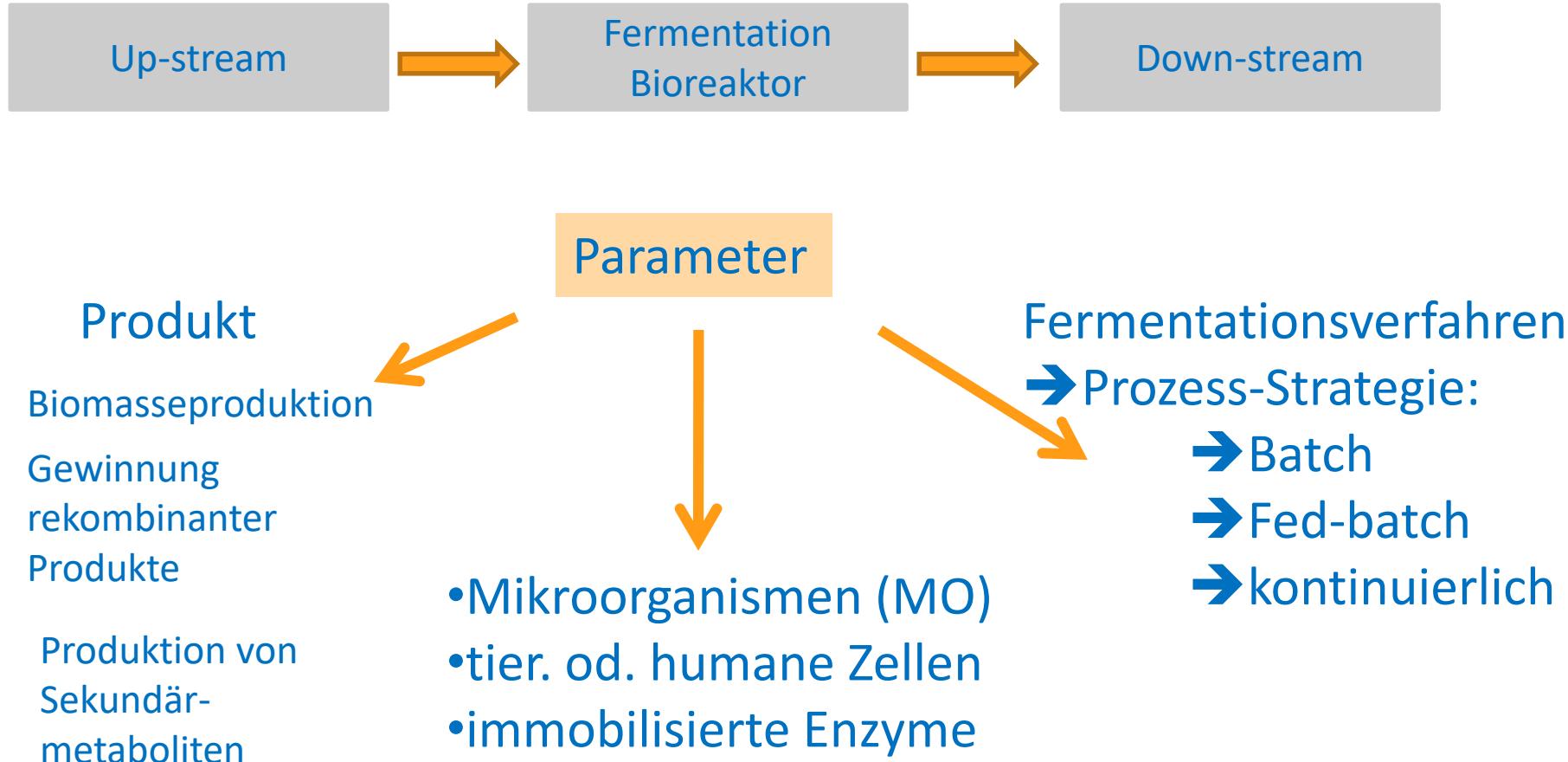
Betriebsweisen für Bioreaktoren



Fermentationsverfahren
→ Prozess-Strategie

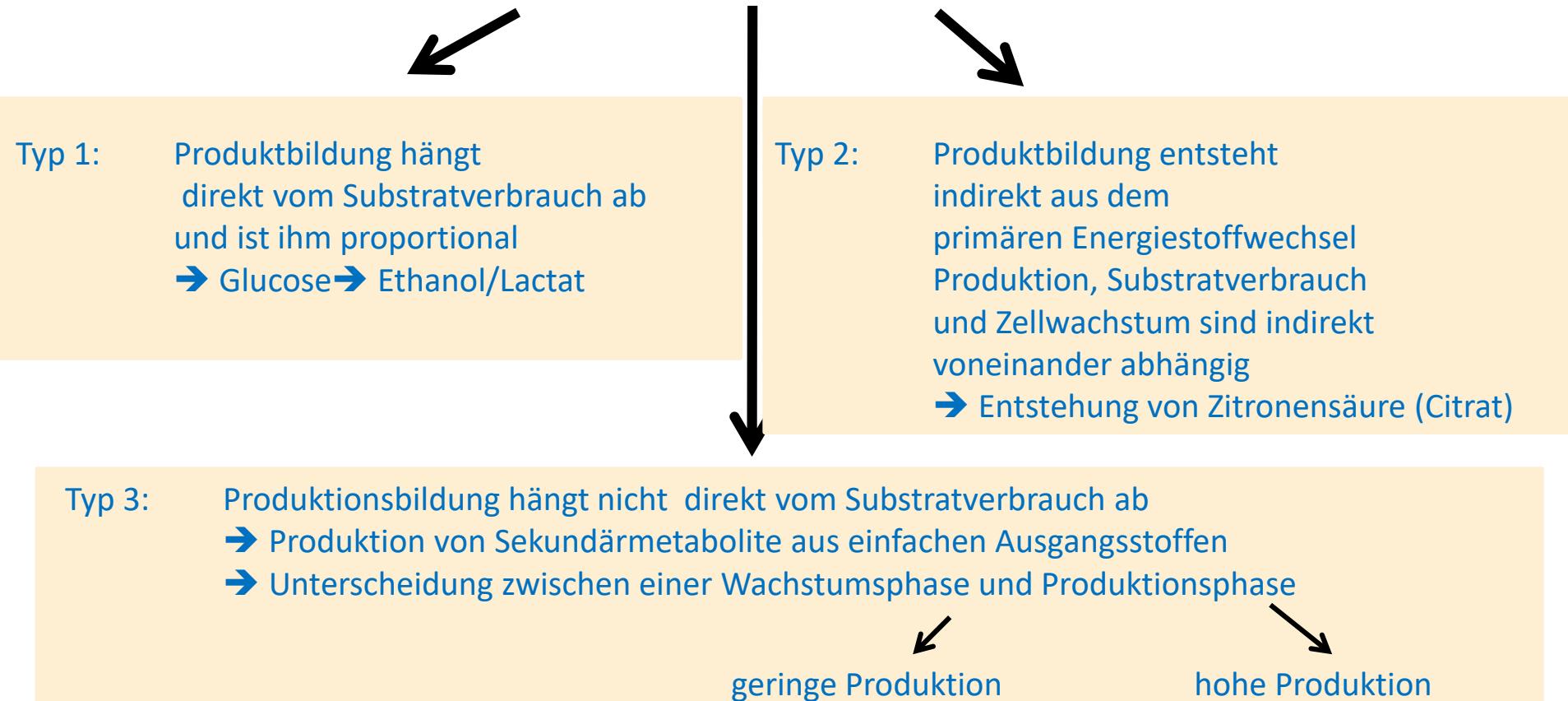


Wahl des Kultivierungsmodus Prozess – Strategie i. d. Fermentation

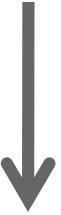


Produktbildung nach Gaden

Fermentationsprodukte aufgeteilt in 3 Klassen (Gaden)



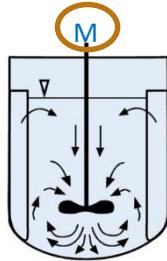
Parameter - Produkt



Produktbildungstypen nach *Gaden* (1959) mit Beispielen

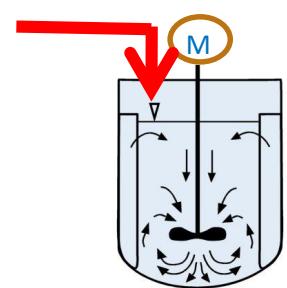
- direkte Abhängigkeit v. Substratverbrauch Typ I
→ Primärmetabolite, Biomasse
- indirekten Stoffwechselprodukten Typ II
→ Gewinnung rekombinannten Proteinen (z.B. Biokatalysatoren)
- Sekundärmetaboliten; keine Abhängigkeit vom Substratverbrauch Typ III

Betriebsweisen eines Bioreaktors



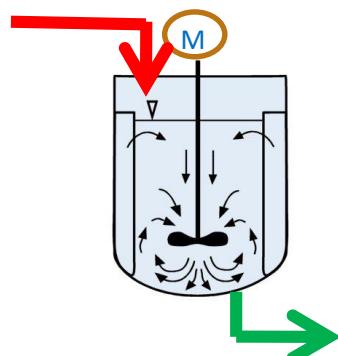
1. Teiloffene Systeme = Diskontinuierlich

- Batch/ Satzbetrieb
- Fed-Batch/ Zulaufsbetrieb



2. Offene Systeme = Kontinuierlich

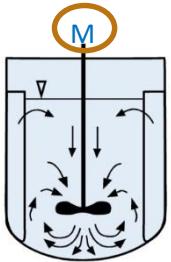
- **Vollständige Rückvermischung**
 - CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor)/ Durchflussreaktor
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion
- **Keine Rückvermischung**
 - Plug flow reactor (PFR)/ Strömungsrohrreaktor
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion



Betriebsweisen eines Bioreaktors

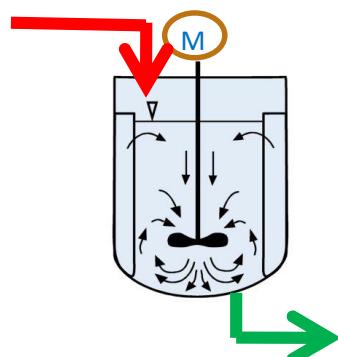
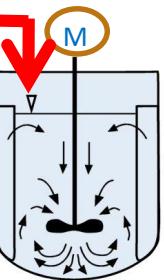
1. Teiloffene Systeme = Diskontinuierlich

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

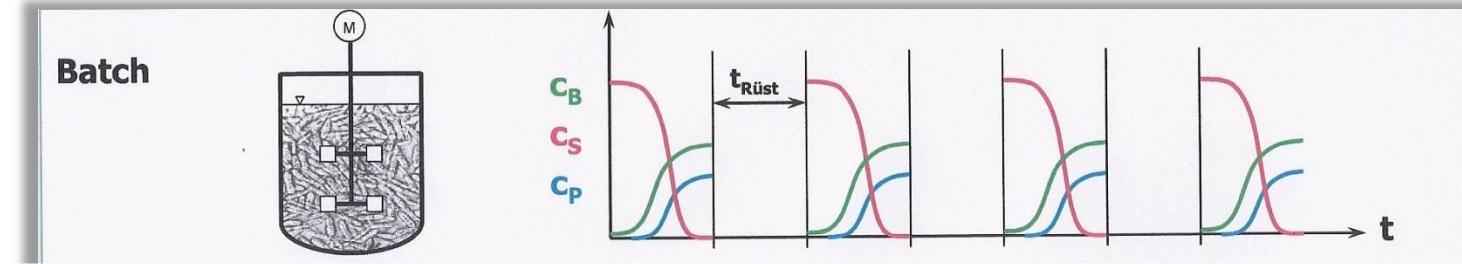


2. Offene Systeme = Kontinuierlich

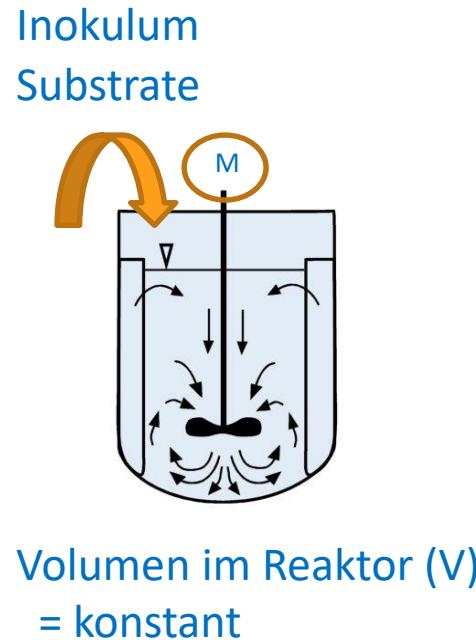
- **Vollständige Rückvermischung**
 - CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor)/ Durchflussreaktor
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion
- **Keine Rückvermischung**
 - Plug flow reactor (PFR)/ Strömungsrohrreaktor
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion



Betriebsweisen eines Bioreaktors



batch – Fermentation



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

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

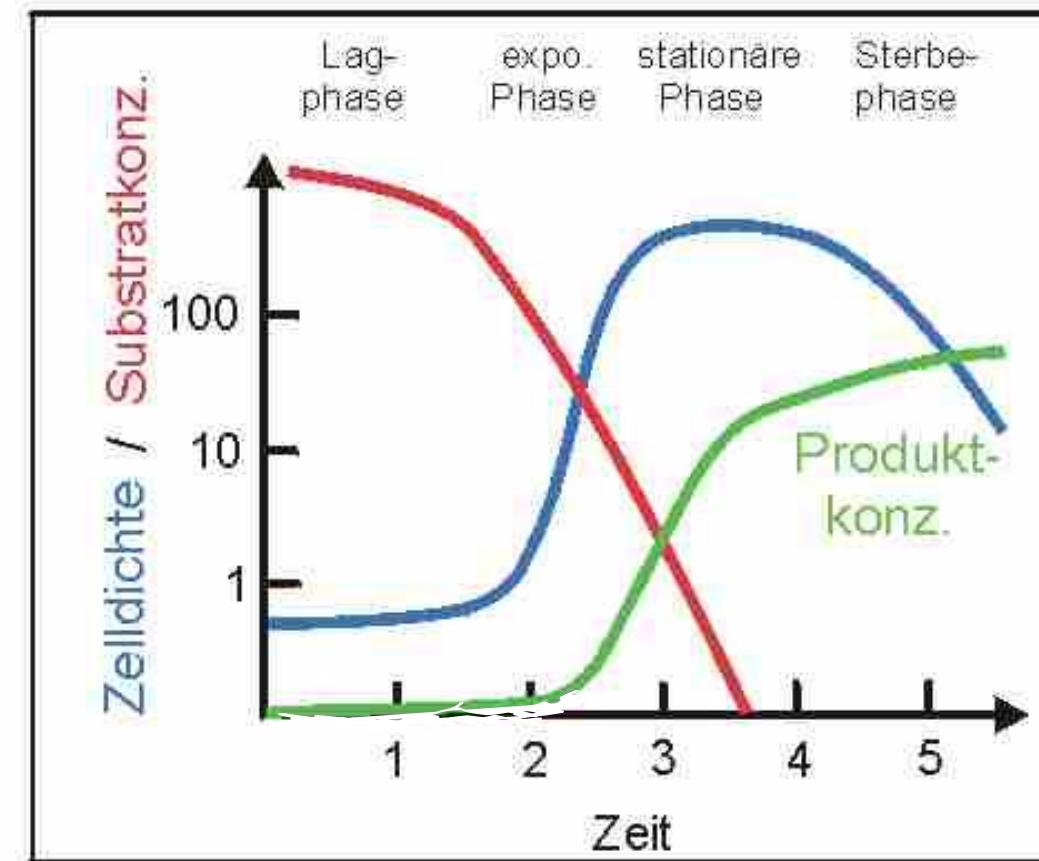
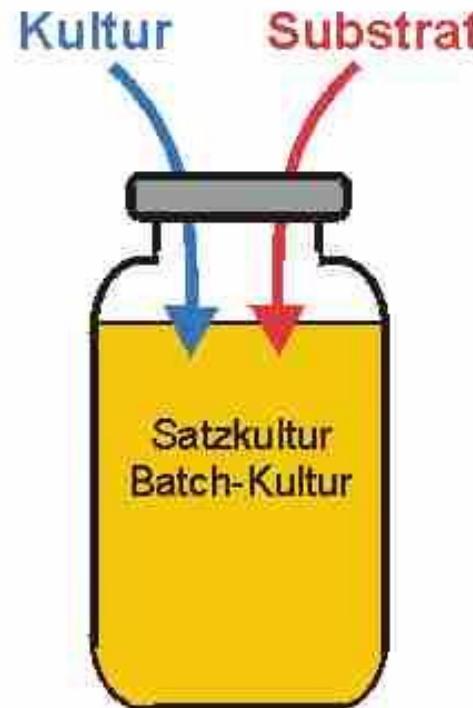
Ende des Prozesses

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

Zugabe von

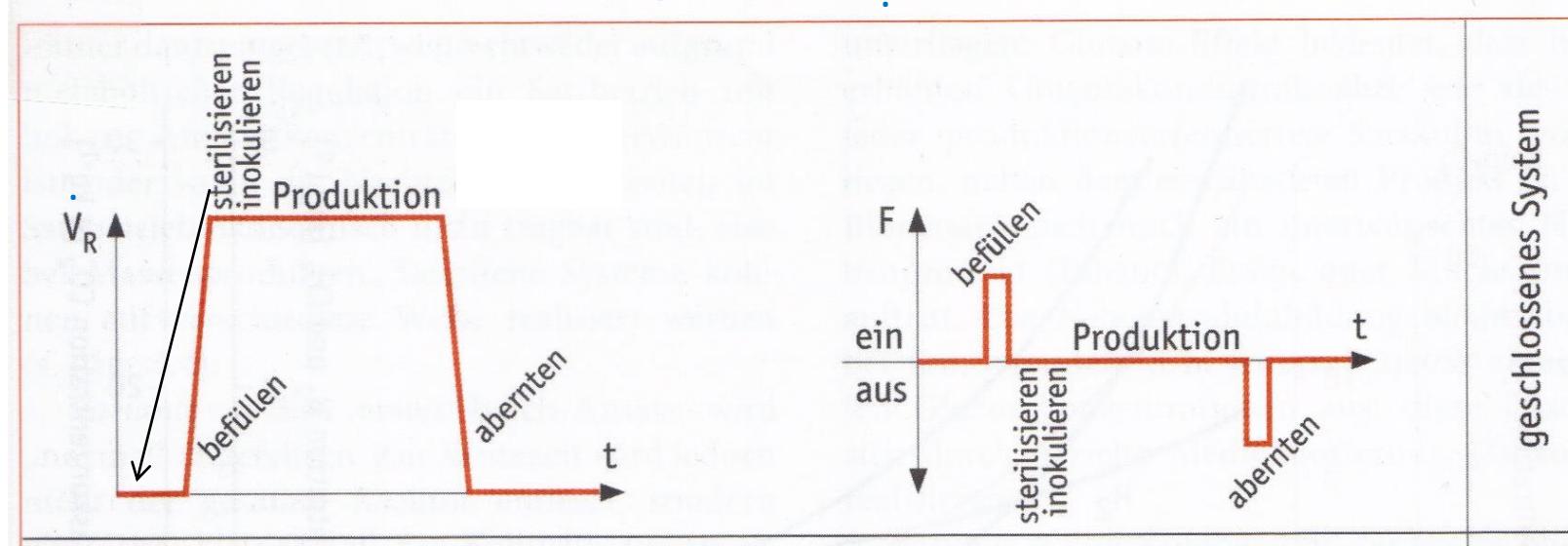
- Luft/O₂/CO₂
- Säuren/Laugen
- Antischaummittel

Substratkonzentration/ Zelldichte: batch



Produktbildung: batch

Systembeschreibung



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

$\dot{V}F$ = Volumenstrom
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 Anwachsphase

Produktivität wird beeinflusst durch

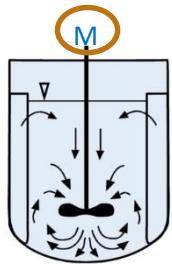
- Anfangskonzentration der Substrate
 - Substratüberschussinhibierung
 - Erhöhte Produktion an inhibierenden Metaboliten



Verbesserte Effizienz durch : Repeated Batch

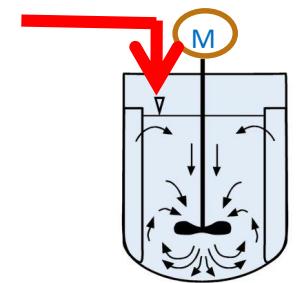
Betriebsweisen eines Bioreaktors

1. Teiloffene Systeme = Diskontinuierlich



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

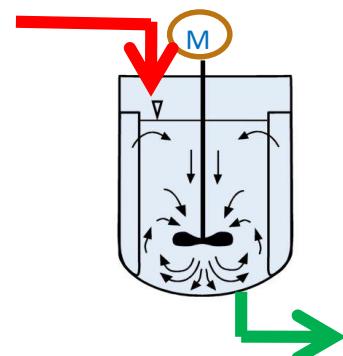
2. Offene Systeme = Kontinuierlich



- **Vollständige Rückvermischung**
 - CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor)/ Durchflussreaktor

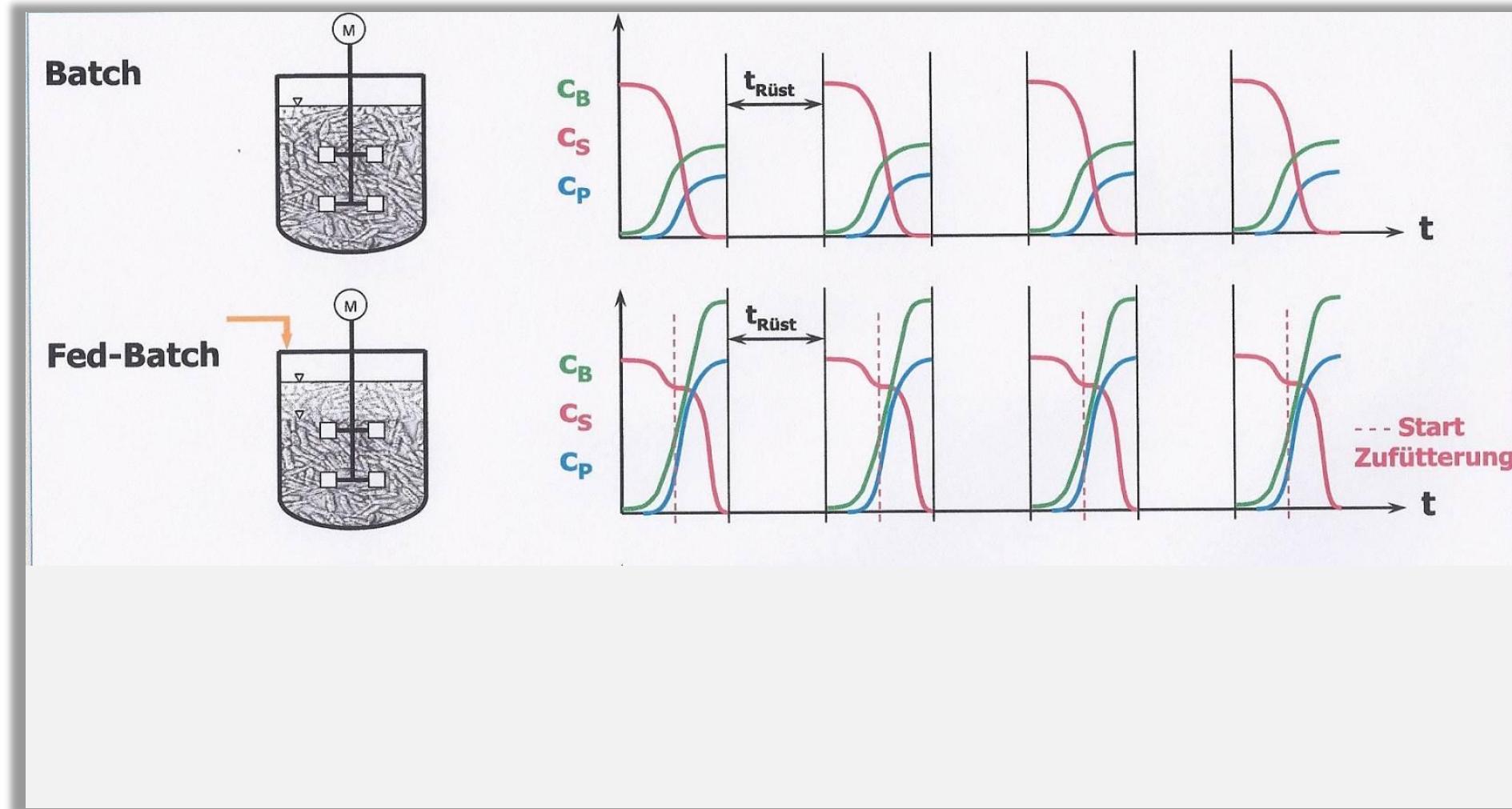
- Chemostat
- Turbidostat
- Perfusion

• **Keine Rückvermischung**

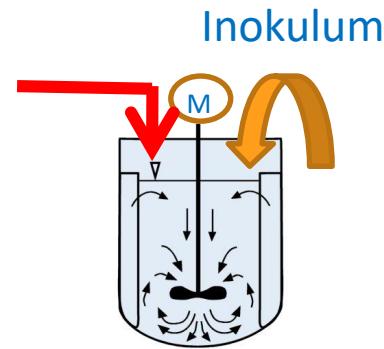


- **Plug flow reactor (PFR)/ Strömungsrohrreaktor**
 - Chemostat
 - Turbidostat
 - Perfusion

Betriebsweisen eines Bioreaktors



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

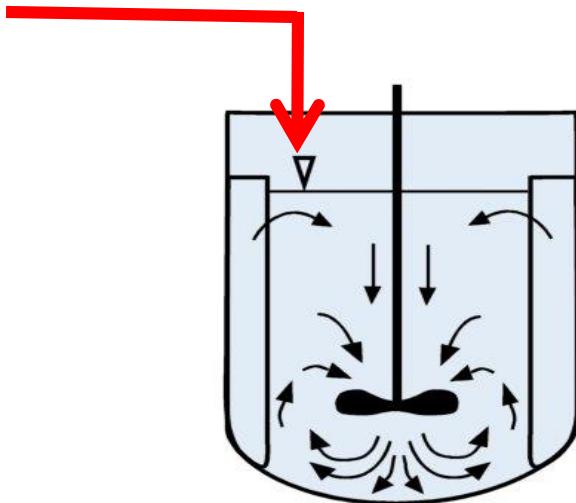


= Diskontinuierliches System

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

Fed-Batch – Fermentation

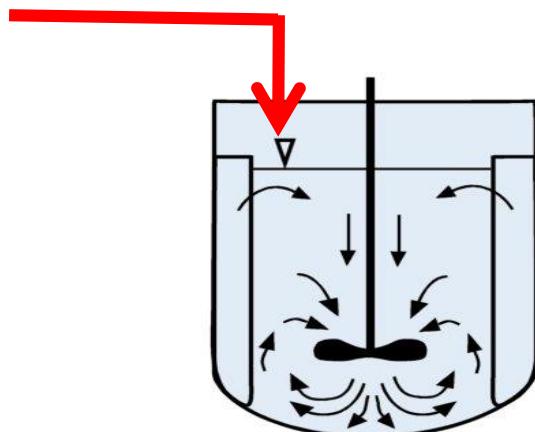
Anwendung



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

Fed-Batch – Fermentation

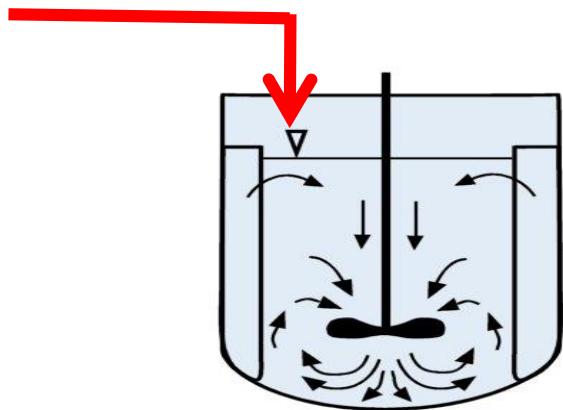
2. Teiloffene Systeme (Zulaufverfahren „fed-batch“)



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

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

Fed-Batch – Fermentation

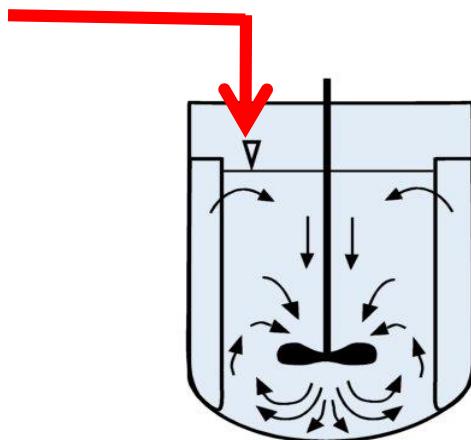


→ 1. normaler „batch“- Ansatz wird angefahren, zur Ernte der Produkte wird jedoch nicht der ganze Reaktor geleert – kleiner Teil bleibt als Inokulum im Reaktor. Die Kulturflüssigkeit wird entzogen und durch neue Medien ersetzt werden
= repetitives System

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

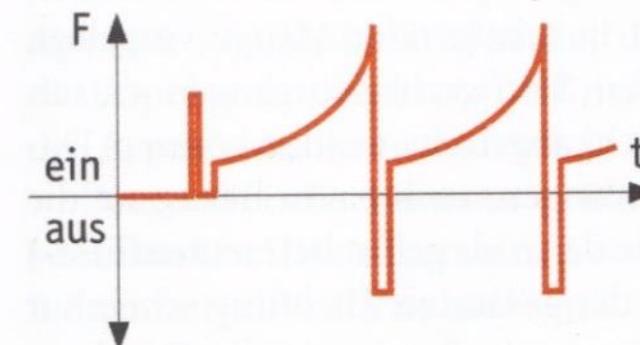
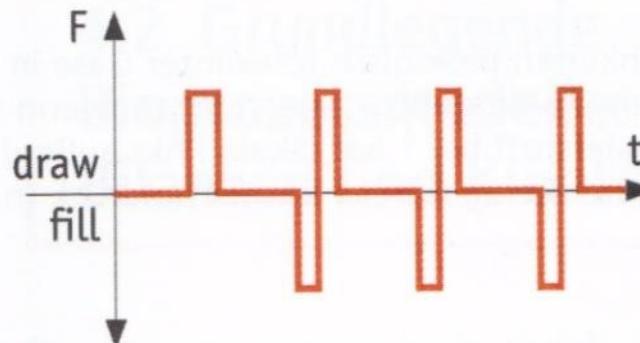
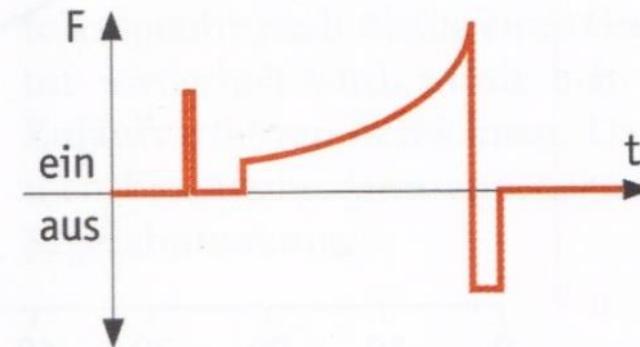
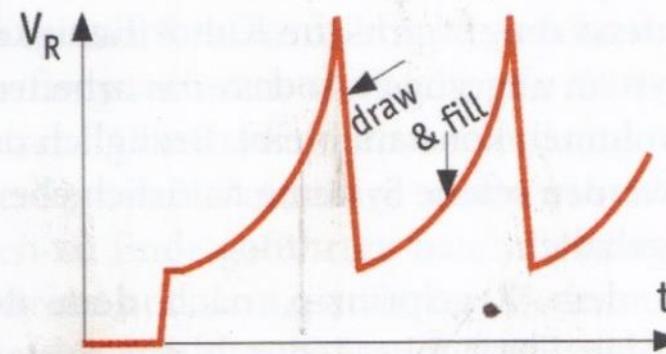
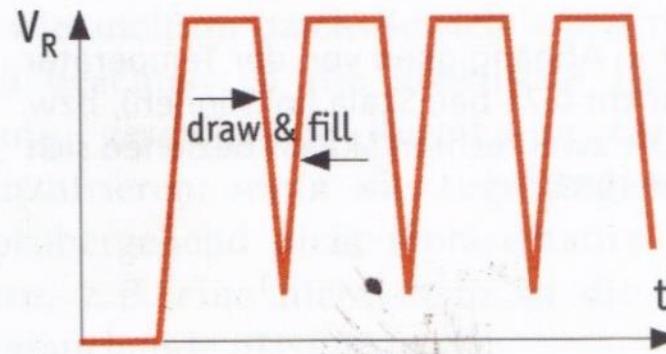
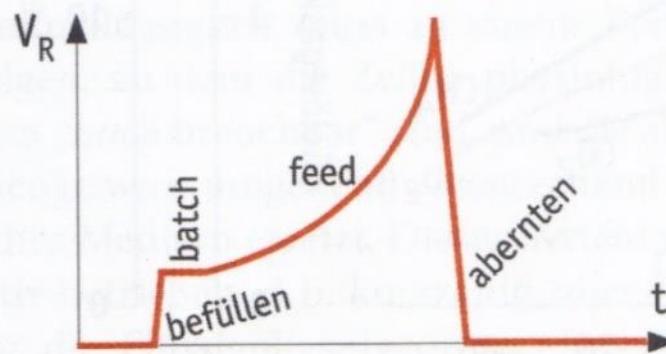
Fed-Batch – Fermentation

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

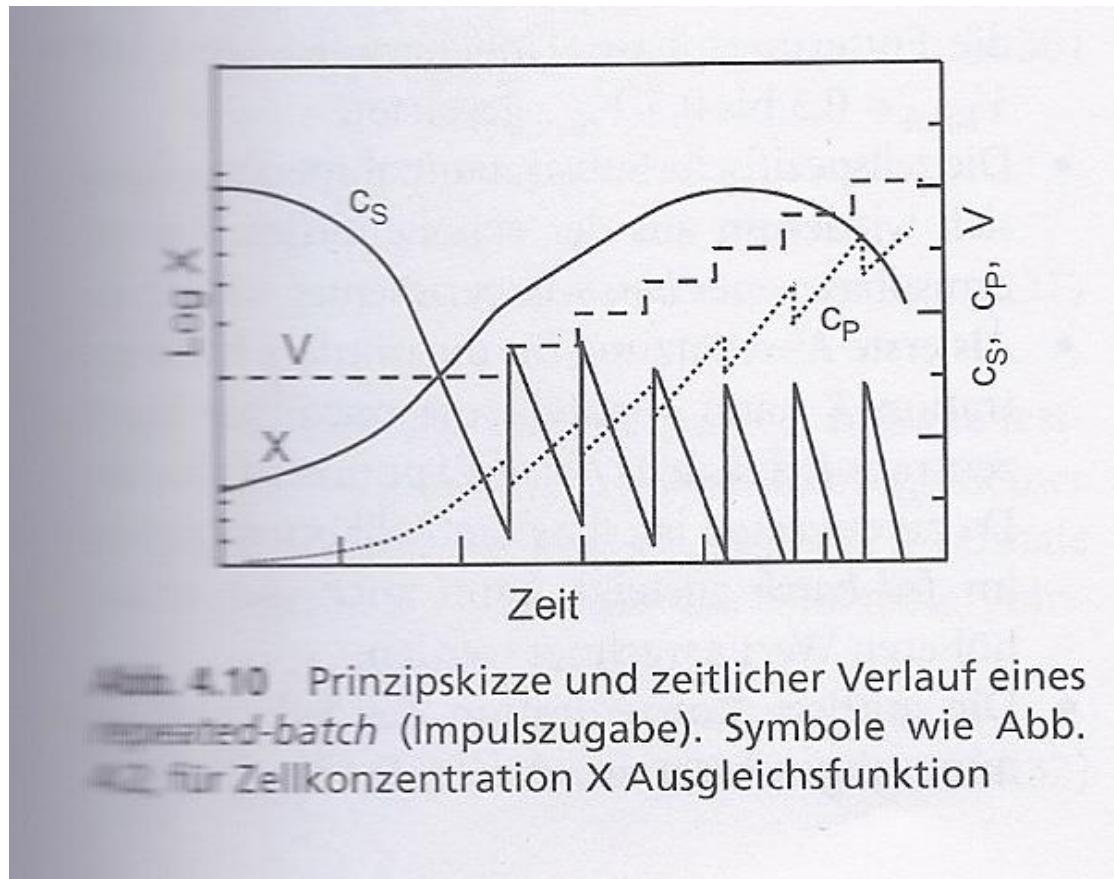


Abb. 4.10 Prinzipskizze und zeitlicher Verlauf eines *fed-batch* (Impulszugabe). Symbole wie Abb. 4.9 für Zellkonzentration X Ausgleichsfunktion

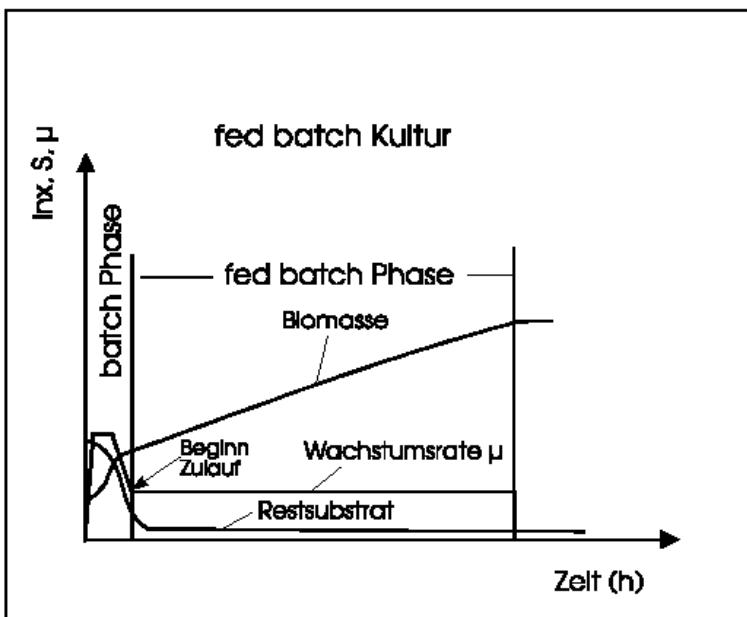
X = Biomassenkonzentration
 C_s = Substratkonzentration
 C_p = Produkt-Metabolitenkonzentration
 V = Volumen

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

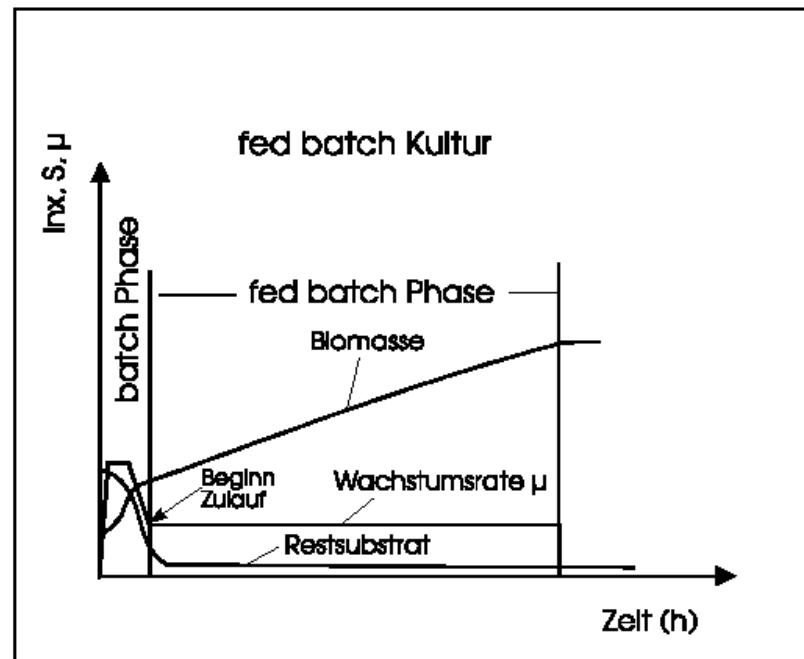


Prozess muss oft unter Substratlimitierung gefahren werden
 → Unterdrückung limitierender Metaboliten, d.h.
 zu gefütterte Menge an Substrat sollte unterhalb
 der max. umsetzbaren Menge bleiben

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

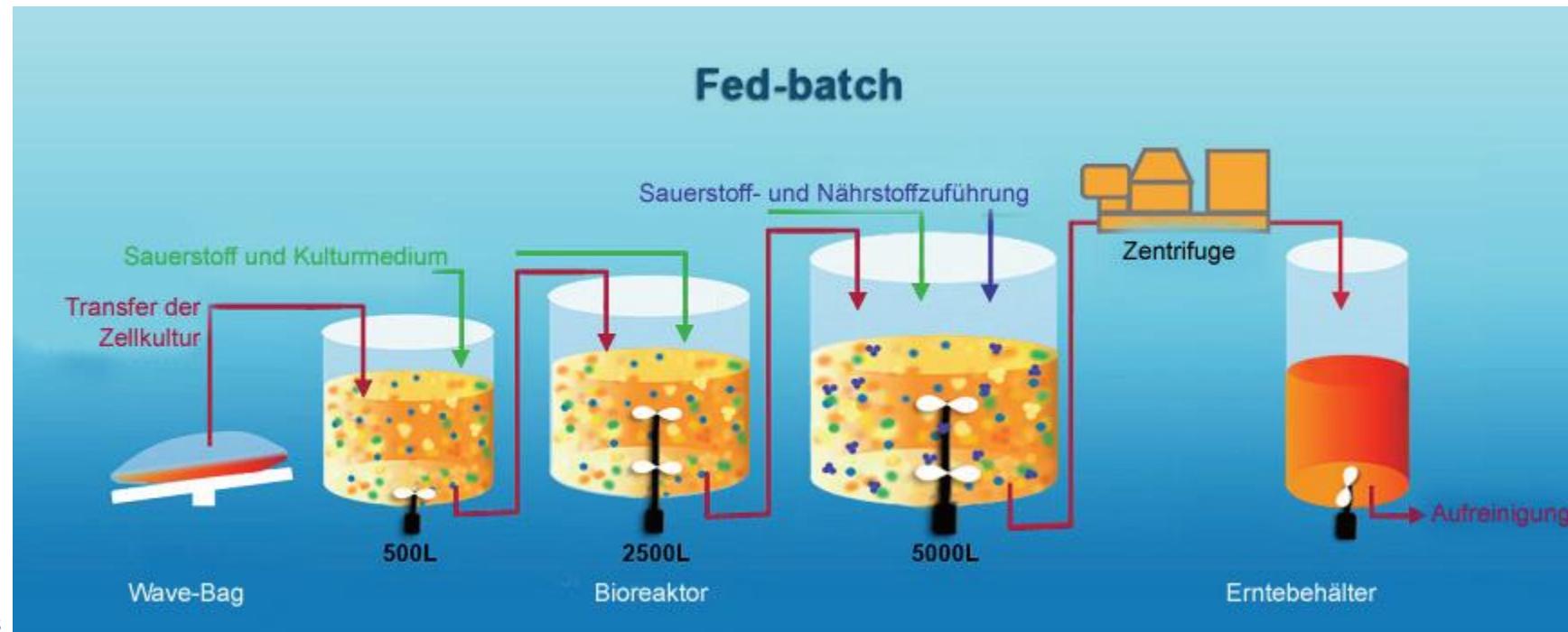
Vermutung: MOs benötigen Sauerstoff, ist der Sauerstoff schnell angestiegen, weniger MOs, da weniger Wachstum durch nicht vorhandenes Substrat

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

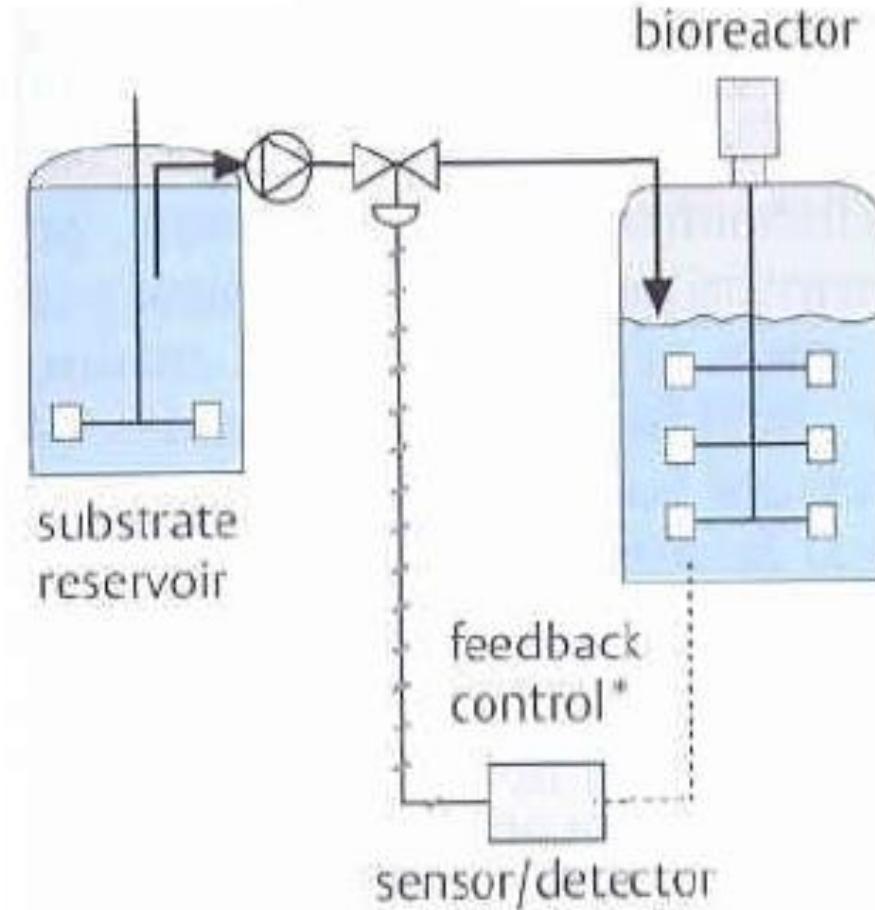
Limitierte online-Messgrößen stehen zur Verfügung

→ Erschwerung der Konzeption der Mess- und Regeltechnik

→ Gefahr der Apoptose durch Substratlimitierung oder Metabolit-Inhibierung

fed-batch – Fermentation Zusammenfassung

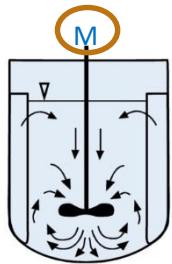
- Kontinuierliche Nährstoffzufuhr ist gewährleistet
- Substratinhibierung ausgeschlossen
- Höhere Konzentrationen an Biomasse/Produkt
- Regulation der Wachstumsrate
- geringere Akkumulation von toxische Metaboliten
- Reaktorvolumen begrenzt die Kultivierungsdauer
- Einfache Prozesssteuerung
- „Geringer“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



Betriebsweisen eines Bioreaktors

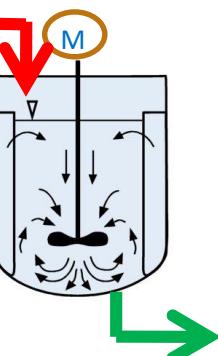
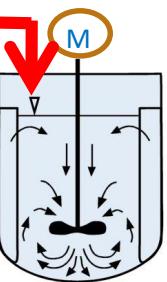
1. Teiloffene Systeme = Diskontinuierlich

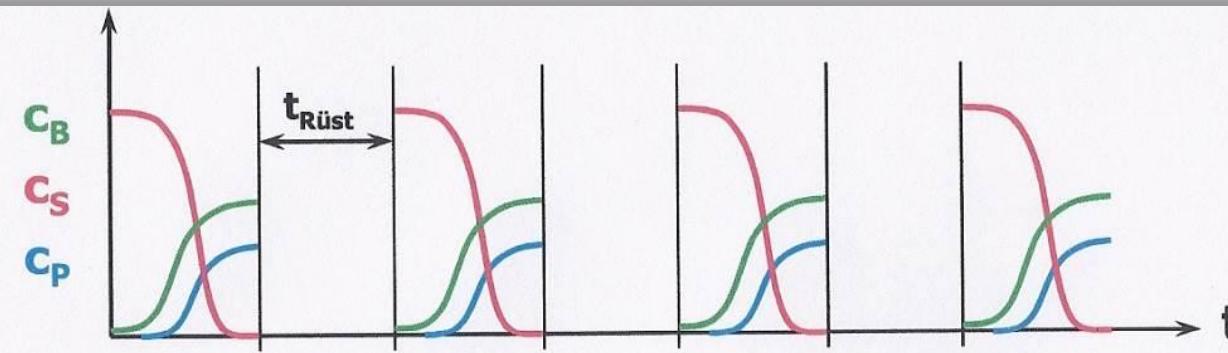
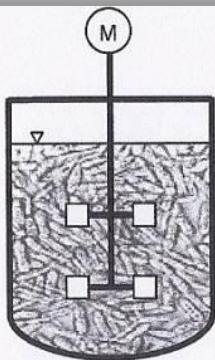
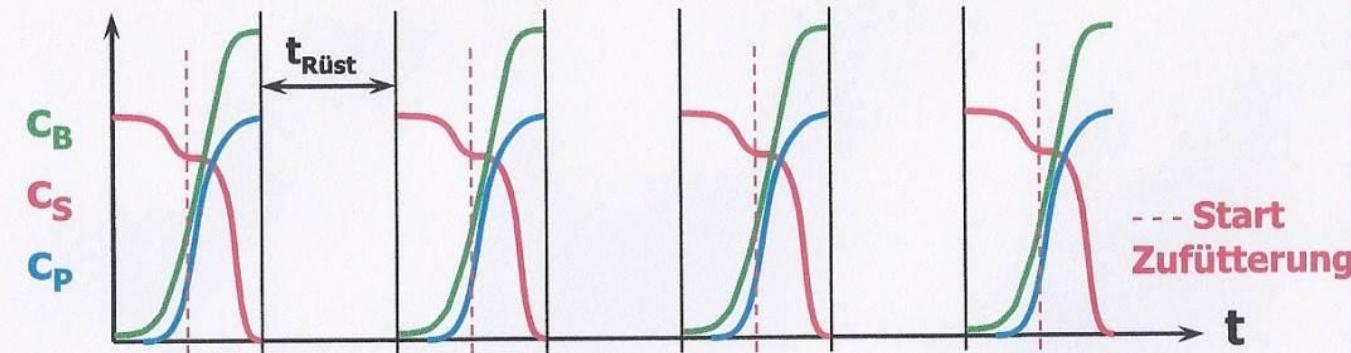
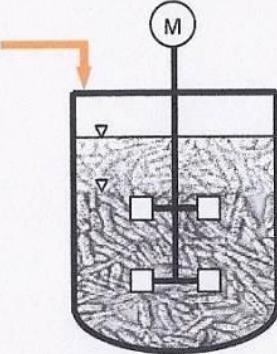
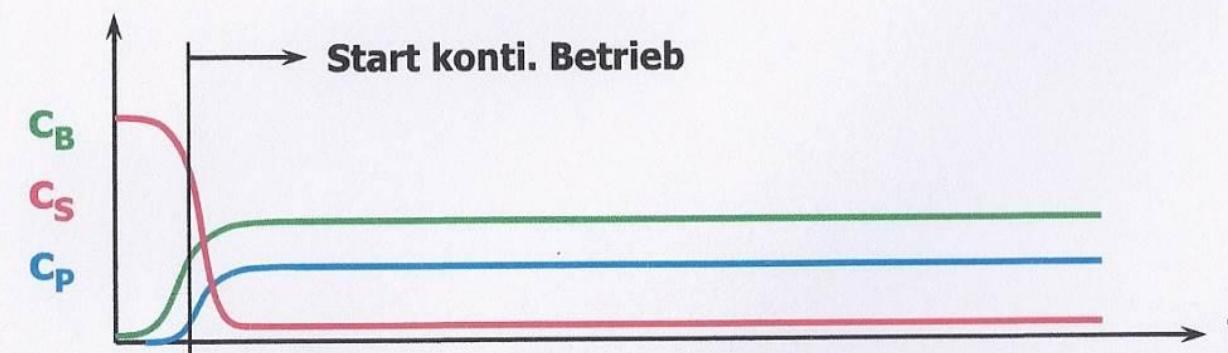
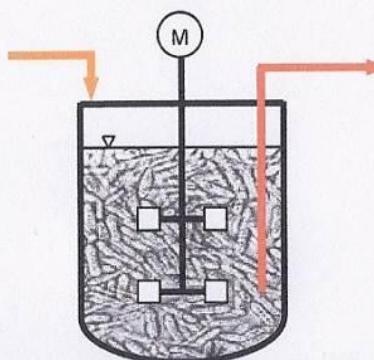
- Batch/ Satzbetrieb
- Fed-Batch/ Zulaufbetrieb



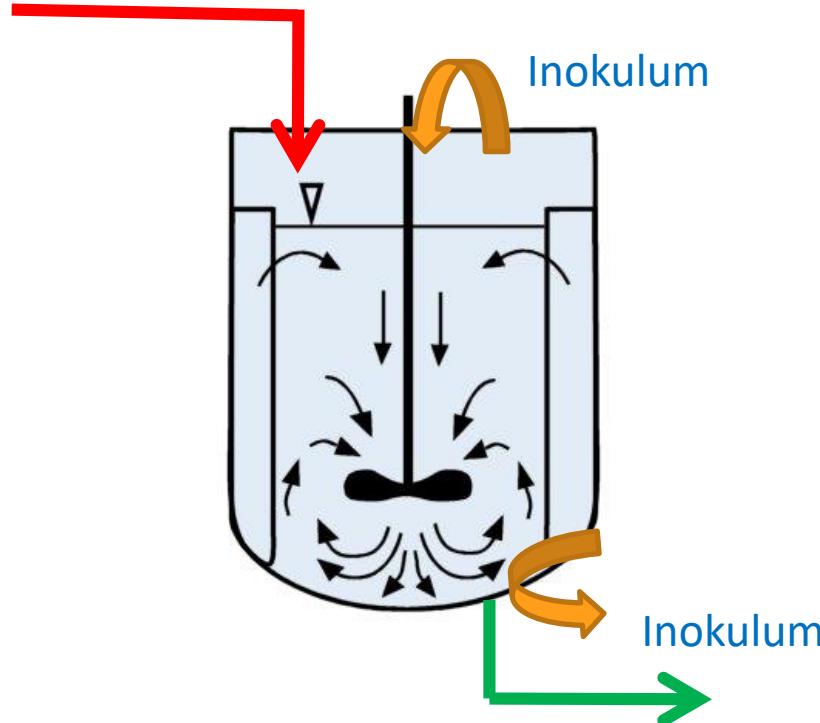
2. Offene Systeme = Kontinuierlich

- **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)



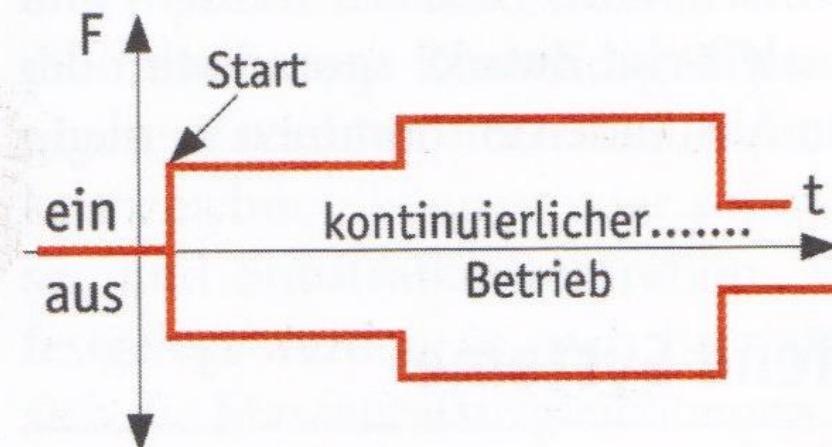
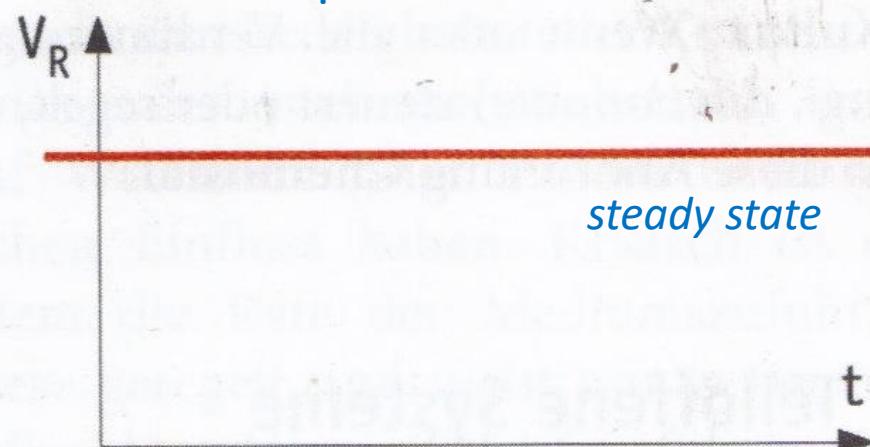
- System ist ständig offen
 - Substrat (und Inokulum) wird zugeführt
 - Produkt (und Inokulum) wird abgeführt
- der Volumenstand im Reaktor bleibt konstant
 $V = \text{const.}$,
- *steady-state Phase*, Fließgleichgewicht

Produktbildung *kontinuierlich*

Systembeschreibung ➔

Offenes System

➔ Chemostat
➔ Perfusion

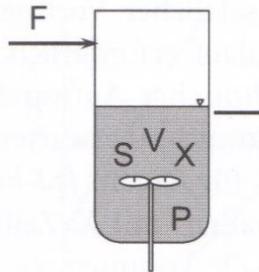


offenes System

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

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

kontinuierlich– Fermentation

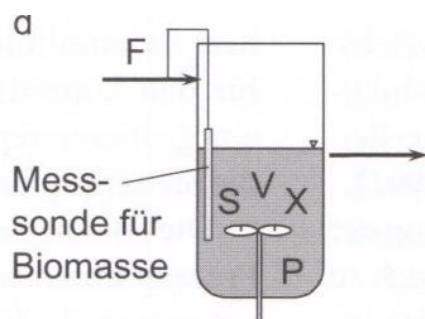


Chemostat
= kontinuierlicher Prozess
ohne Biomasserrückhaltung

steady state

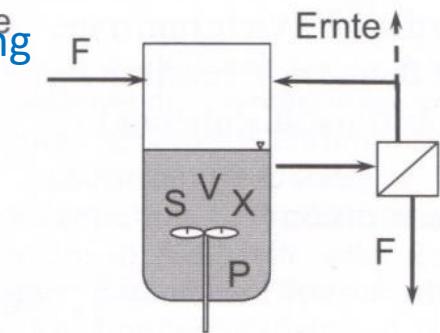
Rückkopplungs-Regulation

steady state

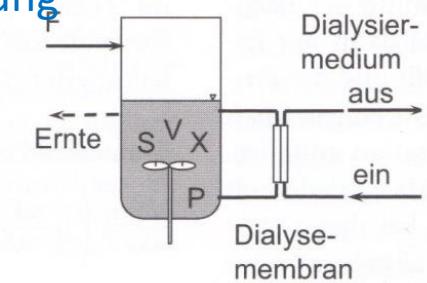


Turbidostat
= kontinuierlicher Prozess
ohne Biomasserrückhaltung,
mit Regelung der Biomassenkonzentration
– konstante Trübung, konstante Zellmasse
– variabler Zufluss von Nährlösung

Perfusion
= kontinuierlicher Prozess
mit Biomasserrückhaltung

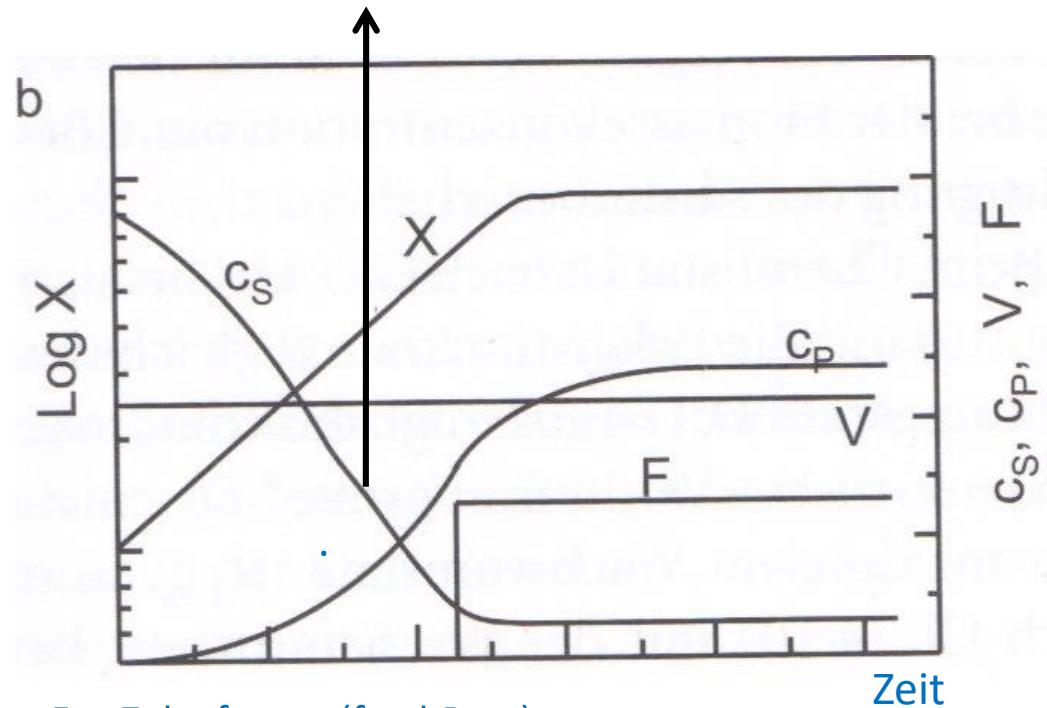


Dialyse
= kontinuierlicher Prozess
mit Zell- und Produktrückhaltung



Chemostat- kontinuierliche Fermentation

= ohne Biomasserrückhaltung, variable Entnahme von Zellmasse und Produkt



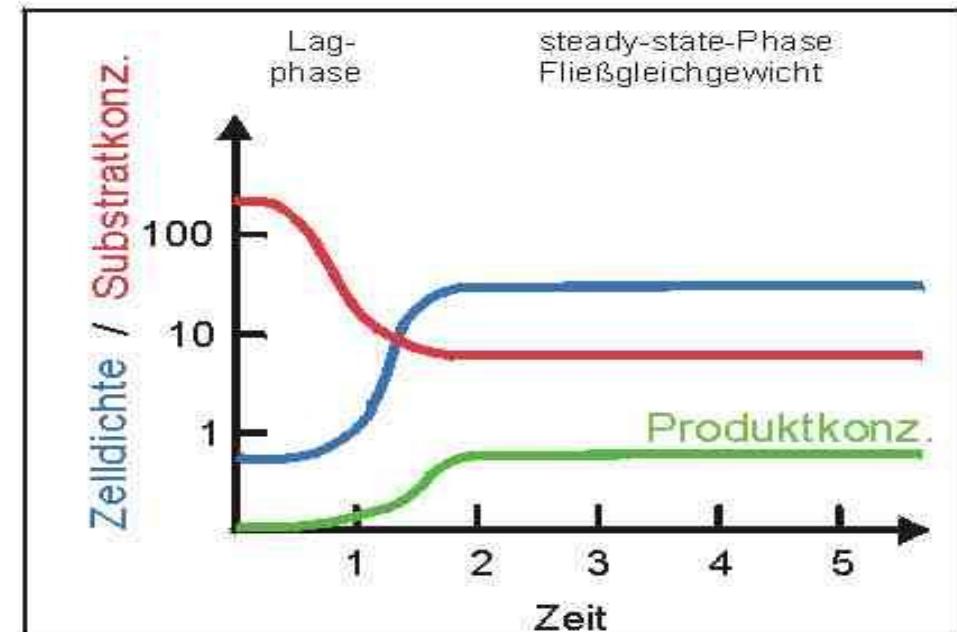
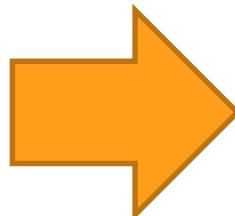
F = Zulaufstrom (feed-Rate)

X = Biomassenkonzentration

V = Reaktionsvolumen

C_S = Substratkonzentration

C_P = Produkt-Metabolitenkonzentration



Geregelte Zu- / Ablaufrate (F)
= Verdünnungsrate D

Chemostat – Verdünnungsrate D

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

\dot{D} = Verdünnungsrate [h⁻¹]

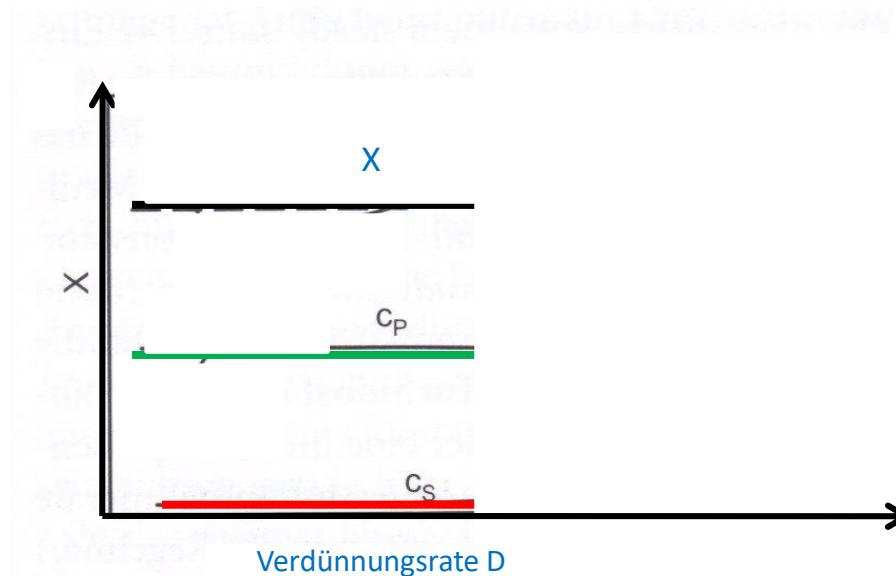
\dot{F} = Zufluss [l/h]

V = Reaktionsvolumen

X = Biomassenkonzentration

C_s = Substratkonzentration

C_p = Produkt-Metabolitenkonznetration



-niedere Verdünnungsraten → konstante Biomassenkonzentration

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

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

Chemostat: Anwendung

Hager + Elsässer GmbH

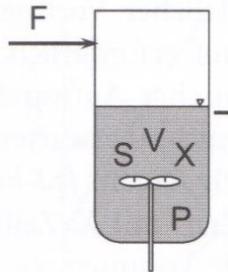


1. in der aeroben Abwasserreinigung
2. Biogasanlagen

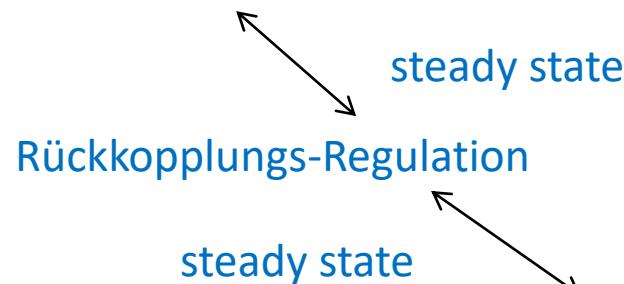
Einschränkungen der Anwendung:

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

Kontinuierliche Prozesse

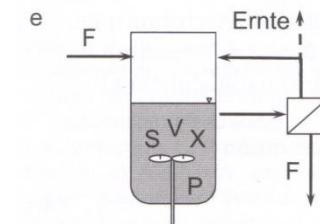


Chemostat
= kontinuierlicher Prozess
ohne Biomasserrückhaltung

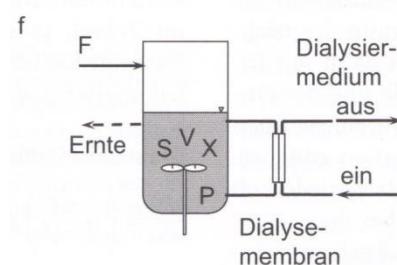


Turbidostat
= kontinuierlicher Prozess
ohne Biomasserrückhaltung,
mit Regelung der Biomassenkonzentration
– konstante Trübung, konstante Zellmasse
– variabler Zufluss von Nährlösung

Perfusion
= kontinuierlicher Prozess
mit Biomasserrückhaltung



Dialyse
= kontinuierlicher Prozess
mit Zell- und Produktrückhaltung



Perfusion

= kontinuierlicher Prozess mit Biomassenrückhaltung

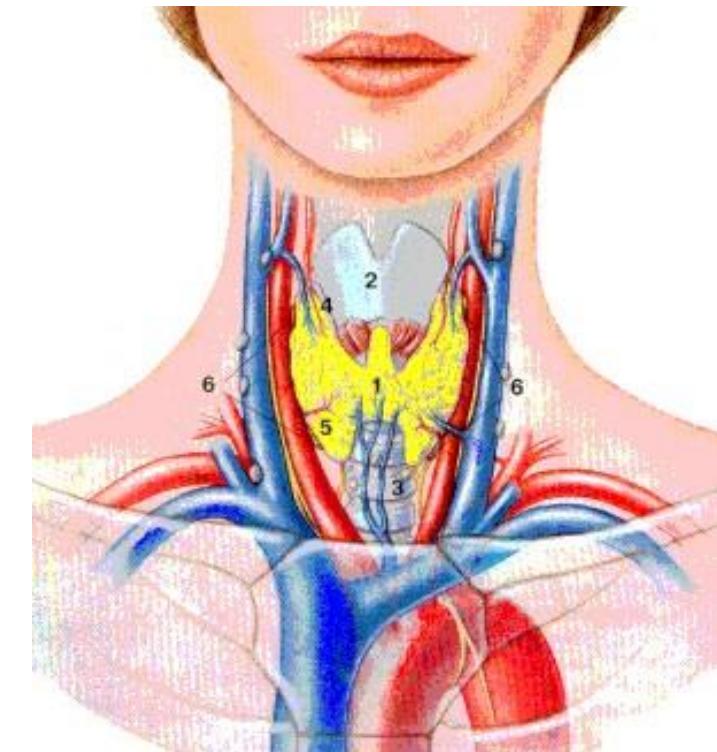
Vorteil:

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

Anwendung in den industriellen Prozessen:

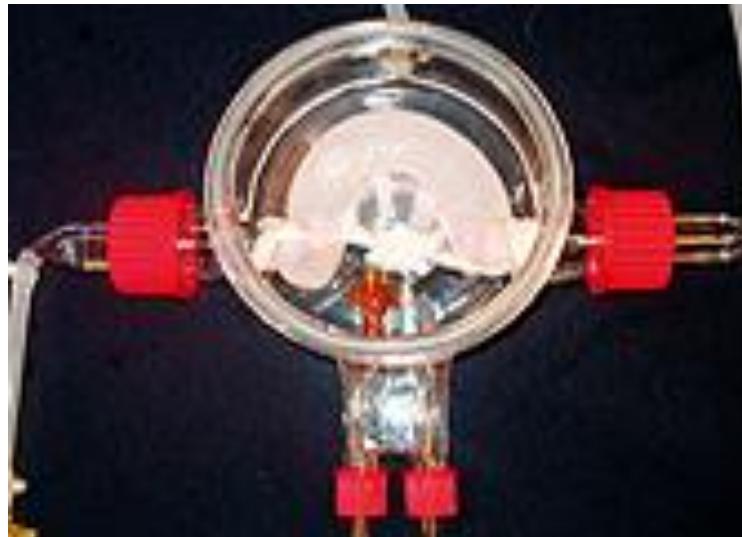
- Produktion von Wirkstoffen mit tierischen Zellen
- Wachstumshormone
- rekombinante Proteine

- regenerative Medizin, Tissue engineering





Fraunhofer
IGB



Anwendungsbeispiel: Regenerative Medizin

Vaskularisierte Matrix im Bioreaktor

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

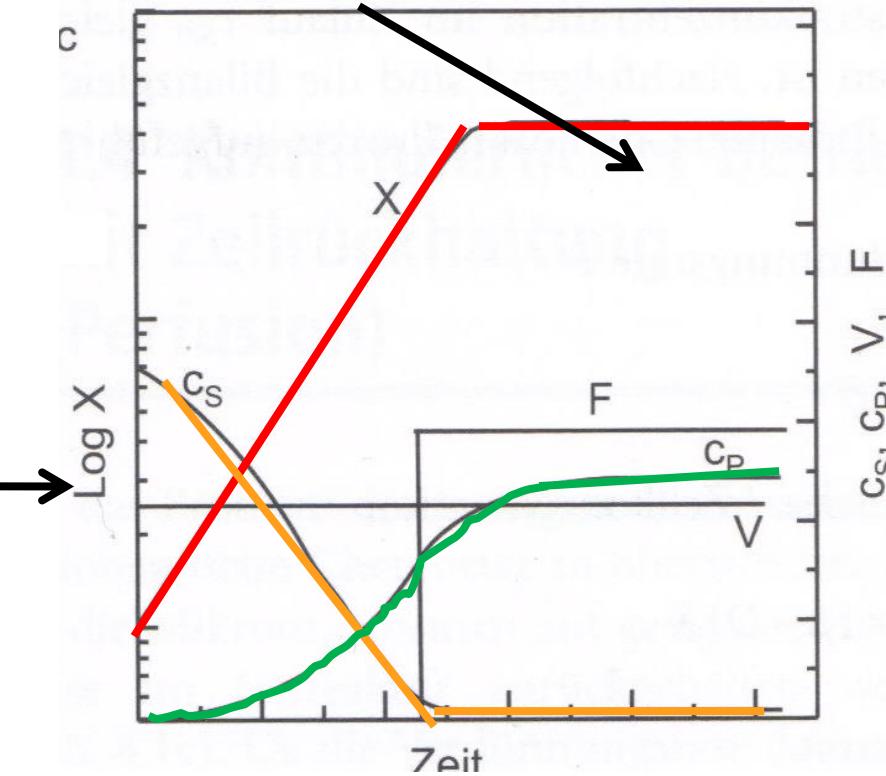
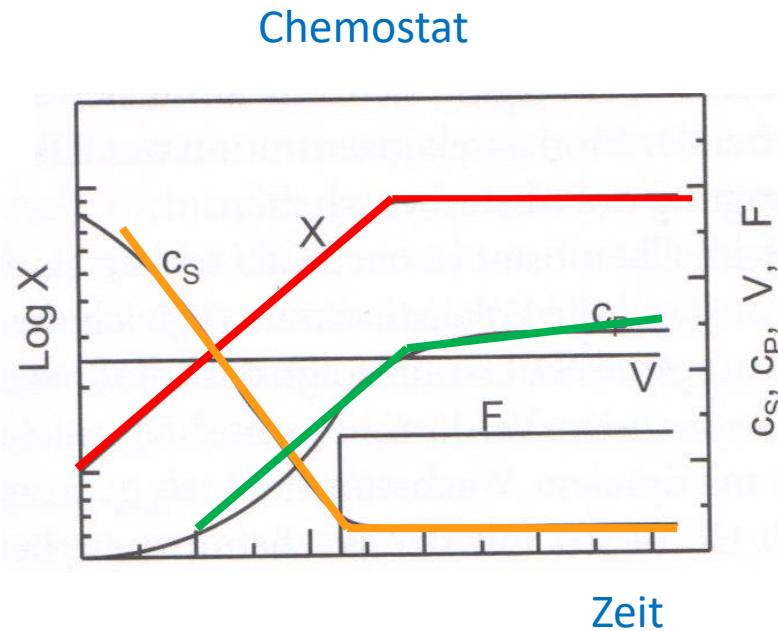
Ein durchgängiges, artifizielles Blutsystem verbessert

- 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

Vergleich der Betriebsweisen im idealen Reaktor

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	- einfache Automatisierung - geringe Lohnkosten, kürzere Rüstzeiten - gleichbleibende Produktqualität bei wachstumsabhängiger Produktion	- Geringe Flexibilität - hohe Investitionskosten - hoher Regelaufwand - Sterilität - Mutationsgefahr – Plasmid Verlust - > als 500h - wirtschaftlich

