

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

Biologische Innovation und Ökonomie (BIO)

Forschungsvorhaben: BioIndustrie2021 - Biokatalyse2021. Verbundprojekt:
Tools zur Prozessentwicklung für Fermentationen unter extremen Bedingungen
(ProTool - Teilprojekt TUHH)

Förderkennzeichen: 0315169A

Ausführende Stelle: Technische Universität Hamburg-Harburg – 21071 Hamburg

Projektleitung: Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner

Laufzeit: 01.08.2008 bis 30.04.2012

"Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315169A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor".

I. Kurze Darstellung zu

I.1. Aufgabenstellung

Ziel des Verbundprojekts ProTool war die Bereitstellung eines Systems für die Entwicklung unterschiedlicher biotechnischer Prozesse unter modellgestützter Bewertung von Prozessdaten. Hierzu gehörten die Elemente

- modulare Bioreaktorsysteme
- effiziente Strategien zum Monitoring sowie zur Steuerung und Regelung der Prozesse
- Trainings- und Optimierungssimulatoren

Diese wurden beispielhaft zur Prozessentwicklung für Suspensions- und immobilisierte Kultivierungen eingesetzt. Hierdurch wurde die Anwendbarkeit des komplexen Entwicklungstools auf verschiedenste biokatalytische Fragestellungen und Systeme nachgewiesen.

Die Arbeiten der TUHH konzentrierten sich auf reaktionstechnische Fragen bei der Kultivierung von Mikroorganismen (insbesondere Milchsäurebakterien) in Festbettreaktoren, bei denen die Mikroorganismen in makroporösen Trägermaterialien immobilisiert werden. Vorteile dieser Reaktoren sind kontinuierlicher Betrieb, geringeres Reaktorvolumen, gleichzeitige Gewinnung von Zellen und Produkten, hohe Produktivität durch kurze Verweilzeiten und somit hohe Durchsatzraten, hohe Stabilität und Prozesssicherheit, geringe Komplexität des Prozesses, geringerer Regelungsaufwand und Scale-up-Fähigkeit. Allerdings gibt es bislang nur wenige technische Anwendungen. Grund hierfür sind vielfach technische Schwierigkeiten beim Scale-up, da bei immobilisierten Systemen Limitierungen durch Stofftransportprozesse oder komplexe fluiddynamische Probleme zu berücksichtigen sind.

Die gewonnenen Erkenntnisse flossen in die Entwicklung des Multi-Reaktorsystems mit integrierten Festbetten bei der Fa. Medorex ein. Die Modellierung der Prozesse erfolgte in Zusammenarbeit mit der HS Bremen.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Im Rahmen eines Kooperationsvertrages wurde festgelegt, dass der Koordinator (Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner, TUHH) die Interaktionen der am Projekt beteiligten Gruppen organisiert. Alle Schritte innerhalb der Zusammenarbeit wurden zwischen den benannten Projektleitern, bzw. zwischen ihren Vertretern, regelmäßig abgestimmt.

Es fanden 2mal jährlich Treffen aller am Projekt beteiligten Mitarbeiter statt, um den aktuellen Stand der Arbeiten zu diskutieren sowie das weitere Vorgehen abzustimmen. Darüber hinaus haben sich die beteiligten Mitarbeiter regelmäßig bilateral getroffen.

Für die interne Kommunikation wurden die erstellten Berichte den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

Das Projekt wurde am 1.8.2008 gestartet und einschließlich einer kostenneutralen Verlängerung zum 30.04.2012 beendet. Das Teilprojekt der TUHH umfasste die folgenden Arbeitspakete:

- WP1 Vorbereitende mikrobielle und analytische Arbeiten (Etablierung der Stammkulturen, Etablierung der Routineanalytik)
- WP2 Aufbau Festbettreaktor Labormaßstab (10 - 100 mL Festbett)
- WP3 Auswahl Trägermaterialien

WP4	Langzeitexperimente im Labormaßstab
WP5	Modellierung (zusammen mit HS Bremen)
WP6	Testung Multi-Bioreaktorsystem Suspension (zusammen mit medorex)
WP7	Untersuchungen mit Pilot-Festbett
WP 8	Testung Multi-Bioreaktorsystem Festbett (zusammen mit medorex)

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Festbettreaktoren werden am Markt z. B. für die Kultivierung von tierischen und humanen Zellen angeboten. Hierzu lagen zu Projektbeginn in der AG Pörtner auch umfangreiche Erfahrungen vor. Dabei handelt es sich häufig um Spezialentwicklungen, die sich nicht auf die Kultivierung von Mikroorganismen übertragen lassen. Zudem fehlen belastbare prozesstechnische Daten zur Auslegung und zum Scale-up mikrobieller Festbettkulturen.

Die AG Pörtner befasst sich seit langem mit der Entwicklung von Bioreaktoren, insbesondere Festbettreaktoren für Zellkulturen und mikrobielle Reaktionen sowie mit Steuerungs- und Regelungskonzepten. Im Bereich der Wirkstoffproduktion mit tierischen Zellen (monoklonale Antikörper, rekombinante Proteine etc.) wurden ingenieurtechnische Aspekte zur Steigerung der Leistungsfähigkeit von Zellkulturprozessen untersucht. Hierzu gehören die adaptive, modellgestützte Steuerung von Fed-Batch-Prozessen, Festbettkulturen mit immobilisierten Zellen (Reaktorauslegung, strömungstechnische Beschreibung, Scale-up etc.) sowie die Anwendung von Dialyseverfahren zur Metabolitenabtrennung und Produktanreicherung. In Vorarbeiten zu dem hier beschriebenen Projekt wurden auch erste Festbettkulturen mit anaerob wachsenden Mikroorganismen durchgeführt.

Literatur

- Pörtner, R. and H. Märkl: Dialysis cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 403-414 (1998)
- Fassnacht, D. and R. Pörtner: Experimental and theoretical considerations on oxygen supply for animal cell growth in fixed bed reactors. *Journal of Biotechnology* 72 (3): 169 - 184 (1999)
- Fassnacht, D.; I. Reimann, R. Pörtner und H. Märkl: Scale-up von Festbettreaktoren zur Kultivierung tierischer Zellen. *Chemie Ingenieur Technik* 73: 1075 – 1079 (2001)
- Pörtner, R.; M. Seemuk; R.-Ch. Schlothauer; D. Elsser: Anaerobe Kultivierung von *Lactococcus lactis* im Festbettreaktor. *Chemie-Ingenieur-Technik*, 76, 10: 1599-1602 (2004)
- Pörtner, R.; St. Nagel-Heyer; Ch. Goepfert; P. Adamietz and N. M. Meenen: Bioreactor design for tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3): 235-245 (2005).
- Nehring, D.; R. Gonzales; R. Pörtner and P. Czermak: Experimental and modelling study of different process modes for retroviral production in a fixed bed reactor. *Journal of Biotechnology*, 122 (2), 239-253 (2006)

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Arbeiten wurden in enger Zusammenarbeit mit den übrigen Partnern des Verbundprojektes durchgeführt. Hierzu gehörten:

- medorex e.K, Nörten-Hardenberg
- Ingenieurbüro Dr.-Ing. Schoop Hamburg
- Prof. Dr.-Ing. Volker C. Hass, Hochschule Bremen (HS Bremen)
- ZytoVision GmbH, Bremerhaven

Des Weiteren waren die folgenden Partner assoziiert:

- OrganoBalance GmbH (Unterauftrag zur Bereitstellung und Evaluierung von Milchsäurebakterien)
- Bremerhavener Gesellschaft für Investitionsförderung und Stadtentwicklung mbH

II. Eingehende Darstellung

II.1. Ergebnisse

Zu WP1

Zunächst wurde für *Lactococcus lactis* eine Stammkultur sowie eine Routineanalytik (u.a. Glukose, Laktat, Biomassekonzentration) etabliert und die Auswahl eines geeigneten Kultivierungsmediums durchgeführt. Des Weiteren wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Zeng, TUHH in ähnlicher Weise die Kultivierung des Milchsäurebakteriums *Lactobacillus reuteri* etabliert. Dieses Bakterium ist prinzipiell in der Lage, aus Glycerin den „Building-Block“ 3-Hydroxypropionic Acid (3-HPA) zu synthetisieren, der u.a. zur Herstellung von 1,3-Propandiol genutzt werden kann. Bislang sind in der Literatur keine ausreichenden Daten zur kontinuierlichen und somit wirtschaftlichen Kultivierung dieses Stammes in Festbettreaktoren bekannt. Ein weiterer Beispielorganismus sollte im Rahmen eines Unterauftrages von der Fa. Dr. Riexs GmbH bereitgestellt werden. Leider musste die Firma Ende 2008 Insolvenz anmelden. Als Ersatz wurde in Absprache mit dem Projektträger und dem Lenkungsgremium des Forschungsverbundes „Biokatalyse2021“ die Fa. OrganoBalance gebeten, diesen Unterauftrag zu übernehmen. Die Fa. OrganoBalance hat als Unterauftragnehmer nach eingehendem Screening einen speziellen *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* -Stamm ausgewählt und der TUHH übergeben. Für diesem Stamm wurden Stammkulturen und eine Working Cell Bank angelegt sowie ein Medienvergleich durchgeführt.

Zu WP2

Zur Durchführung von Festbett-Experimenten im Labormaßstab wurden in Zusammenarbeit mit medorex verschiedene Festbettreaktorsysteme (10 - 100 mL Festbett, inkl. Mess- und Regelungstechnik) etabliert.

Zu WP3

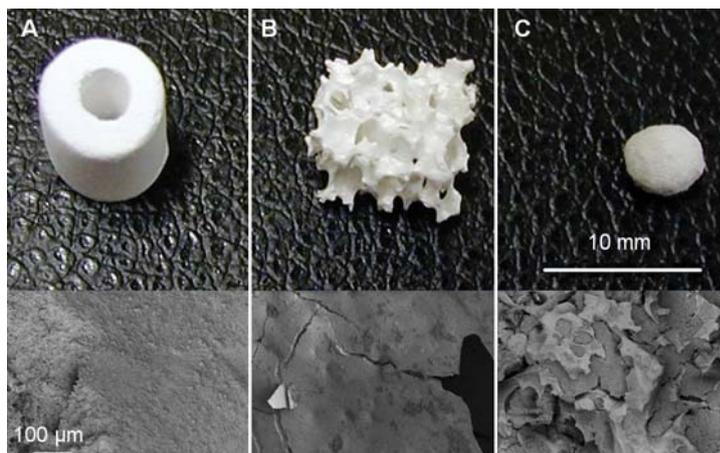


Abb. 1: Träger zur Immobilisierung von Milchsäurebakterien
A: CERAMTEC EO/90 (CERAMTEC), B: Sponceram (Zellwerk), C: SIRAN (QVF)
Oben: native Träger; unten: REM von besiedelten Trägern aus Festbettkultivierung

Für die Auswahl und Bewertung von Trägermaterialien zur Immobilisierung der Zellen (zunächst *Lactococcus lactis*) wurden nach einer kritischen Vorauswahl die folgenden Trägermaterialien für weitergehende Experimente vorgesehen: CERAMTEC EO/90 (CERAMTEC), Sponceram (Zellwerk), SIRAN (QVF). Nach orientierenden Besiedlungsexperimenten wurden mit allen drei Trägern kontinuierliche Kultivierungen in einem 100 mL-Festbettreaktor über einen Zeitraum von 170 h durchgeführt.

Dabei wurde jeweils in den letzten 100 h eine konstante Durchflussrate von $D=1,5 \text{ h}^{-1}$ angelegt, um im Reaktor einen stationären Zustand herbeizuführen. Die gewählte Durchflussrate lag deutlich über der maximalen Wachstumsrate der Mikroorganismen. Grundsätzlich ließen sich auf allen drei Trägern *Lactococcus*-Spezies gut kultivieren (siehe Abb. 1). Als Maß

für die Zellaktivität wurde die mittlere volumenspezifische Laktatproduktivität im stationären Zustand herangezogen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Letztendlich wurden die Träger der Firma Ceramtec für weitere Versuche ausgewählt, da diese Katalysatorträger in großen Mengen für die chemische Industrie produziert und im Vergleich zu den Trägern der Firma Zellwerk sehr kostengünstig zu beziehen sind. SIRAN wird zumindest in kleineren Mengen nicht mehr angeboten.

Zu WP4

Nach Auswahl eines geeigneten Trägermaterials in WP 3 wurden mit *Lactococcus*-Spezies erste Langzeitkulturen in einem 100 mL-Festbettreaktor durchgeführt. In Abb. 2 ist die erfolgreiche kontinuierliche Kultivierung über einen Zeitraum von 50 Tagen dargestellt. Danach ist das System für eine stabile Langzeitkultivierung dieser Organismen sehr gut geeignet. Ein weiteres Augenmerk galt der Frage, ob eine stabile Kultivierung auch bei Durchflussraten deutlich über der maximalen Wachstumsrate der Mikroorganismen ($\mu_{\max} \approx 1,5 \text{ h}^{-1}$) möglich ist, um somit die Produktivität des Systems zu steigern. In weiteren Experimenten wurde die Durchflussrate bis auf das 3fache der maximalen Wachstumsrate gesteigert. Auch bei diesen Durchflussraten konnte das System stabil betrieben werden. Die in Tab. 1 dargestellten Prozessparameter belegen, dass die Produktion an freigesetzten Zellen bis zu 5-mal höher und die volumenspezifische Laktat-Produktivität bis zu 10-mal höher war als in einem Batch-Experiment.

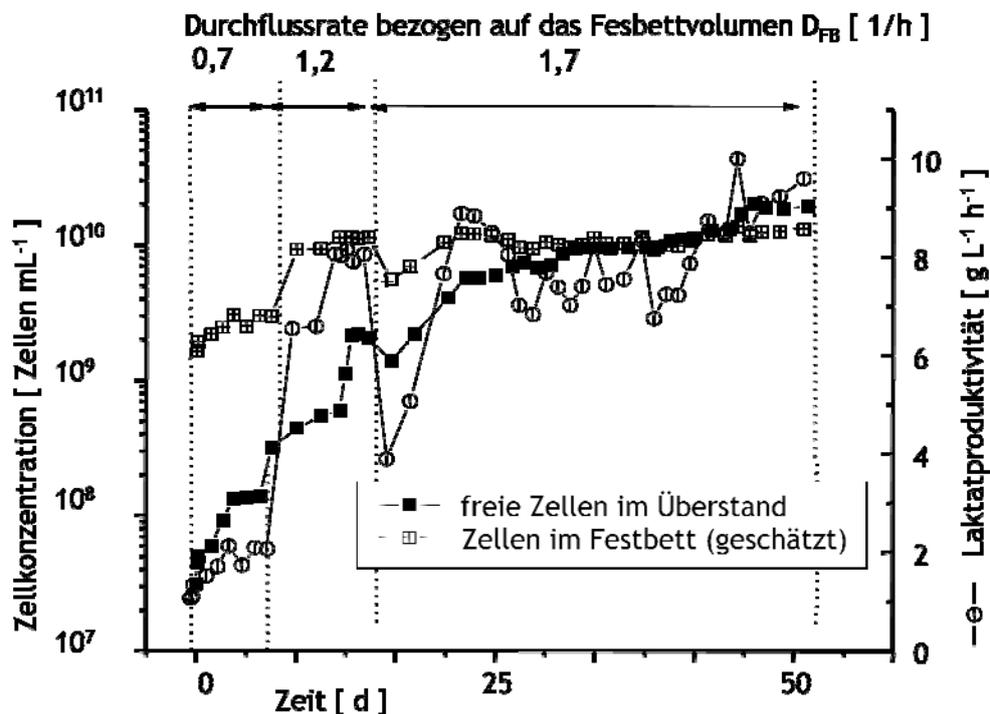


Abb. 2: Lang-Zeit-Kultivierung von *Lactococcus* spec. in einem 100 mL Festbettreaktor (Trägermaterial: CERAMTEC EO/90)

Tab. 1: Kontinuierliche Kultivierung von *Lactococcus spec.* in einem 100 mL Festbettreaktor (Trägermaterial: CERAMTEC EO/90) bei verschiedenen Durchflussraten. Stationäre Werte für relevante Prozessparameter

Durchflussrate D [1/h]	0 (Batch)	0,5	1	1,5	2	2,5	3,5	4,5
Laktat-Konzentration [g L ⁻¹]	1,91	2,383	3,087	2,439	2,050	1,720	1,163	1,166
freigesetzte Zellen [10 ⁸ Zellen ⁻¹ mL ⁻¹]	-	12,89	12,67	9,488	6,870	9,808	7,020	6,690
Zellproduktion [10 ¹¹ Zellen L ⁻¹ h ⁻¹]	5,83	6,445	12,67	14,23	13,74	24,52	24,57	30,11
vol. spezif. Laktat-Produktivität [g L ⁻¹ h ⁻¹]	0,533	1,192	3,087	3,658	4,100	4,299	4,071	5,245

Die weitergehenden Arbeiten im Rahmen von WP 4 konzentrierten sich zunächst auf die kontinuierliche Kultivierung des Milchsäurebakteriums *Lactobacillus reuteri* in einem 100 mL-Festbettreaktor. *L. reuteri* wird in der Literatur als Organismus beschrieben, der sich zur fermentativen Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) aus Glycerin eignet. 3-HPA dient als Ausgangssubstanz (Building Block) für verschiedenste Anwendungen in der Lebensmittelindustrie (Konservierungsmittel), der pharmazeutischen Industrie (Antibiotikum, Desinfizierungsmittel), der chemische Industrie (Biopolymere) sowie der Medizin (Gewebe-sterilisation, Synthese Blutersatzstoff). Allerdings beschränken sich die derzeitigen Fermentations-Ansätze im Wesentlichen auf 2-stufige- Batch-Verfahren zur Gewinnung des sehr instabilen 3-HPA. Kontinuierliche Verfahren wurden nicht beschrieben.

Eine kontinuierliche Kultivierung von *Lactobacillus reuteri* im 100 ml Festbettreaktor konnte sowohl mit Siran-Trägern als auch mit Ceramtec-Trägern durchgeführt werden. Die Anhaftung der Organismen an den Trägeroberflächen und -poren war gut. Aufgrund der lockeren Packung der größeren Ceramtec-Träger war hier die Abführung von eingeleiteter Luft und sich bildendem Kohlendioxid durch das Festbett besser, so dass für weitere Versuche dieses Trägermaterial empfohlen wird. Die Produktion von 3-HPA im kontinuierlichen Reaktorbetrieb war möglich. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist dies erstmalig gelungen. Allerdings waren die gemessenen Konzentrationen von 5 bis 17 mM je nach Medium und Versuchsdauer noch erheblich geringer als in dem 2-stufigen- Batch-Verfahren. Hier besteht noch weiterer Forschungsbedarf.

Auch der von der Fa. OrganoBalance bereitgestellte *Lactobacillus*-Stamm ließ sich grundsätzlich sehr gut kontinuierlich im Festbett auf den CERAMTEC-Trägern kultivieren. Nach einem „Proof-of-Concept“ konzentrierten sich die Arbeiten auf die Optimierung der Prozessbedingungen (Durchflussraten etc.). Dabei zeigte der Stamm ein anderes Verhalten als die vorab untersuchten *Lactococcus lactis*-Stämme. Bei Variation der Durchflussraten zeigte sich zwar auch hier, dass die volumenspezifische Laktatproduktivität als Indikator für die Zellaktivität im Festbett deutlich höher war als bei batch-Experimenten mit suspendierten

Zellen. Allerdings konnten bei Durchflussraten, die unterhalb der maximalen Wachstumsrate lagen (ca. 0,3 1/h), zwar stationäre Zustände im Festbett erreicht werden, aber kaum Zellen im Erntestrom gefunden. Dies wurde erst bei Durchflussraten von 1 1/h beobachtet. Daraufhin wurden Experimente im Festbett, die bei unterschiedlichen Durchflussraten durchgeführt wurden, einer vertieften Analyse unterzogen und mit Daten verglichen, die für Festbettkultivierungen mit *Lactococcus lactis* ermittelt wurden (s.o.). Abb.3 belegt sehr eindrucksvoll, dass die Zellaktivität im Festbett für beide untersuchten Stämme mit steigender Durchflussrate deutlich anstieg und um ein Vielfaches höher lag als in batch-Experimenten. Zum einen wurde somit der Nachweis erbracht, dass auch diese Stämme bei Durchflussraten deutlich über der maximalen Wachstumsrate im Festbett immobilisiert bleiben und kontinuierlich kultiviert werden können. Zum anderen scheint zumindest für die Kultivierung von Milchsäure-Stämmen eine minimale Durchflussrate von ca. 1 1/h erforderlich zu sein, um im Erntestrom nennenswerte und ggf. nutzbare Konzentrationen an Zellen zu erzielen.

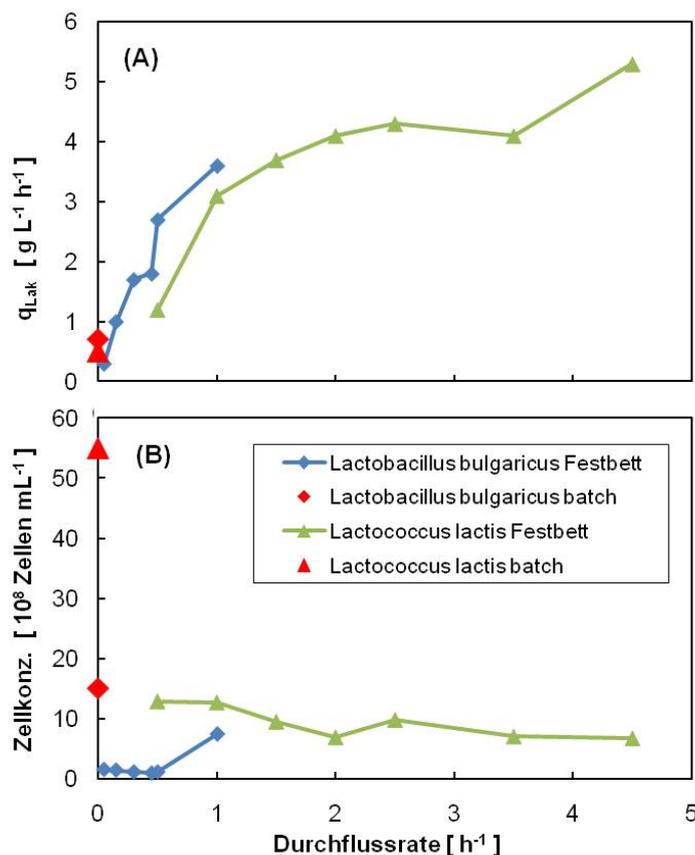


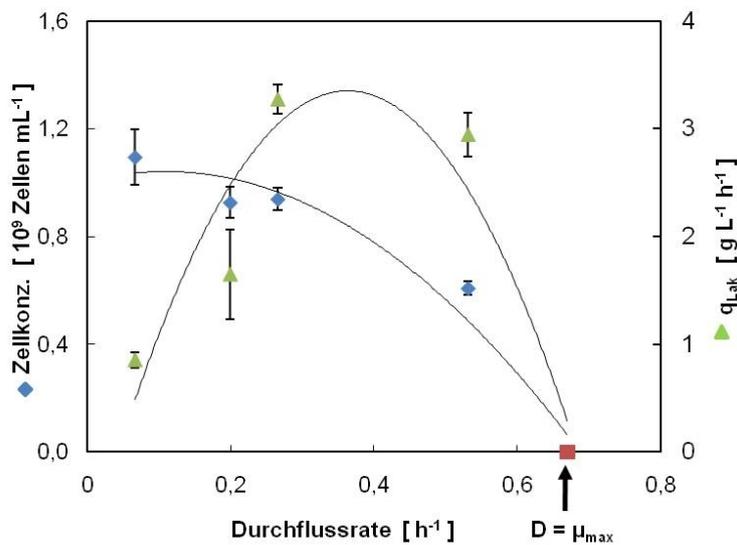
Abb. 3: Kontinuierliche Kultivierung in einem Festbettreaktor
 (A) volumenspezifische Laktatproduktivität q_{Lak} vs. Durchflussrate
 (B) Zellkonzentration im Ausfluss des Festbettreaktors vs. Durchflussrate

In diesem Zusammenhang sei auch noch einmal auf die oben beschriebene kontinuierliche Kultivierung des *L. lactis* über einen Zeitraum von 50 Tagen hingewiesen. Dort konnte beobachtet werden, dass die volumenspezifische Laktatproduktivität zwar schon nach wenigen Tagen konstante Werte annahm, dass die Zellkonzentration im Ausfluss aber über den gesamten Zeitraum langsam anstieg und letztlich Werten von über 10^{10} Zellen/ml erreichte. Demnach ist zu erwarten, dass die Effizienz des Festbettsystems mit zunehmender Laufzeit immer besser wird. Anhand von Aktivitätstests an Zellen, die mit hoher Strömungsgeschwindigkeit aus dem Festbett ausgespült worden waren, konnte ferner gezeigt werden, dass die im Festbett immobilisierten Zellen eine Vitalität > 90 % und eine ähnliche Aktivität wie Zellen aus Suspensionskulturen aufweisen.

Zu WP5

Das wesentliche Problem im Hinblick auf eine kinetische Modellierung der Milchsäurebakterien ist in den verwendeten Komplexmedien zu sehen, die eine eindeutige Zuordnung von Limitierungen bzw. Inhibierungen schwierig machen. Daher wurden die analytischen Voraussetzungen (Trockengewichtsbestimmung, Kohlenstoffanalytik etc.) geschaffen, um eine ge-

geschlossene Kohlenstoff-Massenbilanz über den Reaktor erstellen zu können. Des Weiteren wurden hierzu zunächst ein Versuchsaufbau für Batch- und Chemostat-Kulturen mit pH-Regelung und Abgasanalytik für suspendierte Mikroorganismen erstellt. Erste Versuche mit dem Stamm *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* zeigten, dass eine Berücksichtigung des ggf. gebildeten Kohlendioxids auf Grund der sehr geringen Mengen nicht erforderlich ist. Im Anschluss daran wurden Batch- und Chemostat-Kulturen, letztere bei verschiedenen Durchflussraten, mit pH-Regelung durchgeführt und ausgewertet. Abb. 4 zeigt den zu erwartenden Zusammenhang zwischen Zellkonzentration bzw. volumenspezifischer Laktatproduktivität in Abhängigkeit von der Durchflussrate für Chemostat-Kulturen. Die Zellkonzentration nimmt mit zunehmender Durchflussrate ab, bis bei einer Durchflussrate, die



der maximalen Wachstumsrate entspricht, der komplette „Wash-out“ erfolgt. Die volumenspezifische Laktatproduktivität weist bei einer Durchflussrate von ca. 0,4 1/h ein Maximum auf und fällt dann erwartungsgemäß ab. Eine detailliertere Auswertung zeigt für die Chemostat-Experimente einen linearen Zusammenhang zwischen der zellspezifischen Laktatproduktivität und der zellspezifischen Wachstumsrate (Abb. 5).

Abb. 4: Chemostat-Kultur von *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* in Suspension. Zusammenhang zwischen Zellkonzentration bzw. volumenspezifischer Laktatproduktivität q_{Lak} und Durchflussrate

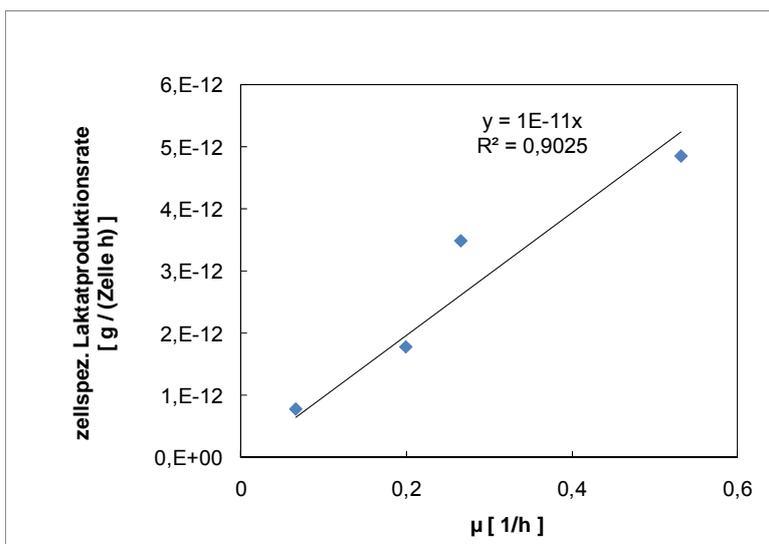


Abb. 5: Chemostat-Kultur von *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* in Suspension. Zusammenhang zwischen zellspezifischer Laktatproduktivität und Wachstumsrate

Aus den Daten für Zellkonzentration X [Zellen/mL], optische Dichte ΔOD , Biotrockenmasse c_{BTM} [g/L] und Kohlenstoffgehalt in der Biotrockenmasse C_{C_BTM} [g/L] ließen sich die folgenden Beziehungen ableiten:

$$(1) X = f(\Delta OD) : \quad y = 3E-09x \quad R^2 = 0,9439$$

$$(2) c_{BTM} = f(X) : \quad y = 1E-09x \quad R^2 = 0,8779$$

$$(3) C_{C_BTM} = f(C_{BTM}) : \quad y = 0,4418x \quad R^2 = 0,8883$$

Eine Auswertung bezüglich der Kohlenstoff-Massenbilanz ergab folgende Abweichungen zwischen Start und Ende: batch 1,34 %, Chemostat ($D = 0,1 \text{ 1/h} - 0,8 \text{ 1/h}$) $< 1 \%$. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Kohlenstoff-Massenbilanz schließen lässt.

Im zweiten Schritt sollte eine Kohlenstoffbilanz über ein kontinuierlich betriebenes Festbett (ca. 100 mL Volumen) erstellt werden. Dazu wurde eine Festbettkultivierung über einen Zeitraum von 300 h bei verschiedenen Durchflussraten durchgeführt und Daten für Zellkonzentration, Konzentrationen an Glukose, Laktat und Kohlenstoff im Zulaufmedium sowie im Erntemedium bzw. der Biomasse im Erntemedium erhoben. Des Weiteren wurde die Biotrockenmasse im Erntemedium sowie nach Beendigung des Versuches aus dem Festbett bestimmt.

Auch hier ließ sich die Massenbilanz über den gesamten Versuchszeitraum bis auf einen Fehler von ca. 7 % schließen. Allerdings erscheint eine Abschätzung der im Festbett immobilisierten Biomasse basierend auf der Kohlenstoffbilanz wenig sinnvoll, da die am Ende des Experimentes aus dem Festbett isolierte Menge an Biomasse nur etwa 10 % des Fehlers betrug und somit in der Bilanz vernachlässigbar klein ist.

Daher wurde in einer weitergehende Analyse untersucht, ob die Daten zu Laktat- und Zellproduktivität sowie zur Biomassekonzentration eine plausible Abschätzung der Zellkonzentration im Festbett erlauben.

Aus der am Ende des Experimentes ermittelten Biomassekonzentration ergibt sich unter Zuhilfenahme von Gl. 2 (s.o.) eine Zellkonzentration von $7,95e9$ Zellen/mL, etwa 8mal mehr als im Chemostat (siehe Abb. 4). Aus der in Abb. 5 dargestellten Beziehung und der gemessenen volumenspezifischen Produktionsrate ergibt sich bei einer Wachstumsrate von $\mu = 0,01 \text{ 1/h}$ eine Zellkonzentration von $6,97e9$ Zellen/mL. Um zu Überprüfen, ob diese zunächst angenommene Wachstumsrate sinnvoll ist, wurde aus der im Auslauf gemessenen Zellkonzentration die bei dieser Wachstumsrate erforderliche Zellkonzentration im Festbett abgeschätzt ($8,2e9$ Zellen/mL). Demnach führen alle drei Abschätzungen zu Werten, die in Anbetracht der Messgenauigkeit als gleich anzusehen sind.

Damit wurde zusätzlich die These belegt, dass die Wachstumsrate der Zellen im Festbett deutlich reduziert ist und sich zumindest für den *Lactobacillus*-Stamm eine deutlich verringerte zellspezifische Laktatbildungsrate einstellte.

Die Daten wurden zur weiteren Modellierung an die HS Bremen gegeben.

Zu WP6

In Zusammenarbeit mit medorex wurden 2 Vario-Suspensionsreaktorsysteme inkl. Steuerung und Regelung als Teilkomponenten eines Multi-Bioreaktorsystems etabliert und erfolgreich getestet (siehe Abb. 6). Hierfür wurde vom Ingenieurbüro Dr.-Ing. Schoop ein neues Prozessleitsystem geliefert.

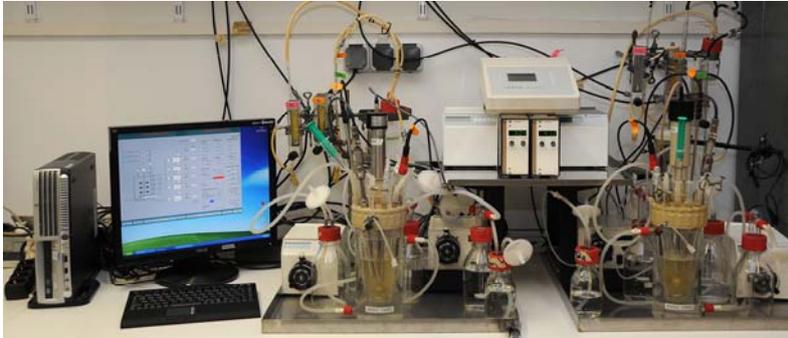


Abb. 6: Komponenten einer Multi-Fermenter-Anlage (medorex) mit WinErs-Prozessleitsystem (Ingenieurbüro Dr.-Ing. Schoop)

Zu WP7

Als Festbett-Reaktorsystem im Pilot-Maßstab wurde ein Festbett (1 L) mit radialer Durchströmung sowie der zugehörigen Peripherie (Pumpen, Vorlage- und Erntetanks etc.)



Abb. 7: 1L-Festbettreaktor mit radial durchströmter Schüttung und 150 L-Vorlagetank

etabliert. Bei den zu erwartenden Durchflussraten sind Volumenströme von ca. 50 L/d erforderlich. Daher wurden Vorlage- und Erntetanks mit 150 L Fassungsvermögen integriert (siehe Abb. 7). Damit ist die derzeit realisierbare und betreibbare Reaktorgröße erreicht.

Festbettkulturen wurden mit *Lactococcus*-Spezies durchgeführt. Im Vergleich zum 100 mL-Festbett zeigte sich hinsichtlich

der volumenspezifischen Laktatproduktivität eine sehr gute Übereinstimmung (Abb. 8). Danach sind Daten aus dem 100 mL-System gut auf das 1 L-System übertragbar. Da sich mit einem 1 L-Festbett bereits Volumenströme von 50 - 100 L/d realisieren lassen, kann man von einem „Pilot-Scale“ sprechen.

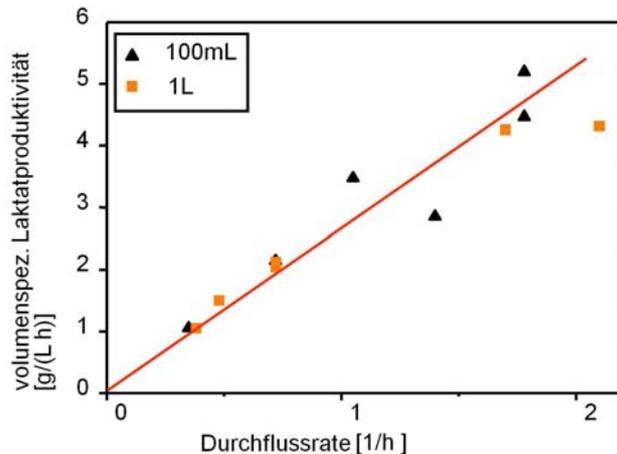


Abb. 8: Kontinuierliche Kultivierung von *L. lactis* im Festbettreaktor
 Vergleich 1L-Festbettreaktor mit radial durchströmter Schüttung und 100 mL-Festbettreaktor axial durchström

Zu WP 8

Von der Fa. medorex wurde ein Multi-Bioreaktorsystem mit integriertem Festbett inkl. Steuerung zur Verfügung gestellt (siehe Bericht medorex). Das Reaktorsystem wurde erfolgreich ersten Funktionstests unterzogen und steht jetzt für Kultivierungen bereit.

II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

- € 178349,26 für Personal
- € 10747,11 für Studenten
- € 17850,00 für Aufträge an Dritte
- € 1204,78 für Verbrauch
- € 2407,64 für Reisen

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Insgesamt war mit den im Rahmen des Projektes angestrebten Zielen ein hohes Risiko verbunden, dass von den als KMU eingestuftten Firmen nicht getragen werden konnten. Die Hochschulgruppen verfügen über keine eigenen Ressourcen, um ein derartiges Projekt in der skizzierten Form durchzuführen. Andere Fördermöglichkeiten (z.B.) DFG kamen auf Grund der anwendungsnahen Zielsetzungen nicht in Betracht.

Die dargestellten Ergebnisse unterstreichen, dass die gestellten Zielsetzungen mit den bewilligten Mitteln erreicht werden konnten. Somit ist die Förderung als angemessen anzusehen.

II.4. Voraussichtlicher Nutzen (Verwertbarkeit)

Die Ergebnisse des Teilprojektes sind essentiell für die Durchführung des Verbundprojektes und verbreitern massiv die wissenschaftliche Expertise und Reputation des Antragstellers, was auch durch die Vielzahl von Veröffentlichungen belegt wird. Damit wird die Grundlage für eine weitergehende Untersuchungen an der TU Hamburg-Harburg und für die Initialisierung weiterer Forschungsprojekte mit Bezug zur Biokatalyse gelegt.

Im Hinblick auf eine wirtschaftliche Verwertung wird der Antragsteller in die Lage versetzt, gegenüber Industrieunternehmen als Dienstleister für die Entwicklung von Produktionsprozessen für komplexe pharmazeutische Wirkstoffe aufzutreten.

II.5. Fortschritt anderer Stellen

Vergleichbare Studien anderer Institutionen sind nicht bekannt.

II.6. Erfolgte bzw. geplante Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

- Pörtner, R.; M. Seemuk; Th. Linz; R. Janke; D. Gölling: Continuous pilot scale cultivation of *Lactococcus spec.* in a fixed bed reactor. 14. Heiligenstädter Kolloquium "Technische Systeme für die Lebenswissenschaften" 22.-24.09.2008
- Pörtner, R.; V. C. Hass; K.-U. Gollmer; R. Luttmann: Modellgestützte Simulationstools in einer Lernumgebung für die Bioprozesstechnik. ProcessNet-Jahrestagung 8. – 10. September 2009, Mannheim
- Kuhnen, F.; R. Pörtner; V. C. Hass: Robustness of Model Based Process Optimization in Biotechnology. ESBES 2010
- Pörtner R, Platas O, Gölling D, Zenneck C: Prozesstechnische Entwicklung von Festbett-Bioreaktoren mit immobilisierten Zellen. DECHEMA VORTRAGS- UND DISKUSSIONSTAGUNG: BIOVERFAHRENSTECHNIK AN GRENZFLÄCHEN - 30. MAI - 01. JUNI 2011, POTSDAM
- Pörtner, R.; O. Platas; Ch. Goepfert; St. Meyer, R. Janke, D. Nehring, P. Czermak; C. Zenneck: Modulare Festbett-Bioreaktoren zur Entwicklung von Prozessen mit immobilisierten Zellen. 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 21.–23. September 2010, Aachen
- Pörtner, R.; O. Platas Barradas; F. Kuhnen; V. C. Hass: „Design of Experiments“ mit dem BioProzessTrainer. 28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 21.–23. September 2010, Aachen
- Pörtner, R., Platas-Barradas, O., Gradkowski, J., Gautam, R., Kuhnen, F., Hass, V. „BioProzessTrainer“ as training tool for design of experiments. 1st European Congress of Applied Biotechnology, Berlin, Germany, 25.-29.11.2011
- Pörtner R: Modellgestützte Entwicklung biotechnologischer Prozesse. Forum Industrielle Biotechnologie, BIOTECHNICA, 12.10.2011
- Pörtner R, Platas O, Linsenmeier L, Aasif M, Goelling D, Zenneck C, Hass VC, Schwarz S: Prozesstechnische Charakterisierung und Modellierung von Festbett-Bioreaktoren mit immobilisierten Milchsäurebakterien. ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2012, 10. - 13. September 2012, Karlsruhe
- Pörtner R, Platas O, Brosch M, Marotzki St, Hass VC: Fermentationsexperimente mit „Low-cost“-Komponenten in der biotechnologischen Ausbildung. ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2012, 10. - 13. September 2012, Karlsruhe
- Hass VC, Gerlach I, Schoop KM, Mandenius CF, Pörtner R: Neue Erfahrungen mit Trainingssimulatoren in der bioprozesstechnischen Ausbildung. ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2012, 10. - 13. September 2012, Karlsruhe

Bücher

- Hass, V. und R. Pörtner: Praxis der Bioprozesstechnik, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag (2011) ISBN: 978-3-8274-2828-8