

# Bioreaktoren und Prozess-Design

In der industriellen Produktion und Verarbeitung werden Verfahren der Biotechnologie bereits heute mit großem Erfolg eingesetzt. Die biotechnologische Produktion erfolgt dabei überwiegend durch Mikroorganismen oder Enzyme in Bioreaktoren oder Fermentern, die das Kernstück jeder biotechnologischen Produktionsanlage darstellen.

Die großtechnische Herstellung von Enzymen erfolgt überwiegend durch Mikroorganismen in geschlossenen Systemen (Bioreaktoren oder Fermenter). Wenn nicht die Mikroorganismen selbst zur Biokatalyse eingesetzt werden, können die aus ihnen isolierten Enzyme verwendet werden. Der Bioreaktor oder Fermenter ist das Kernstück jeder biotechnologischen Produktionsanlage. Betriebsreaktoren haben Fassungsvermögen von bis zu 1,5 Millionen Litern.

In biotechnologischen Produktionen werden Reaktoren eingesetzt, die eine exakte Prozesskontrolle und -führung gewährleisten. Das gängigste Modell ist der Rührreaktor, der thermostatiert ist, über Rührwerk und Begasung verfügt und sterile Zuleitungen und Probenentnahmeventile besitzt. Man unterscheidet heute drei Gruppen von Verfahren in Bioreaktoren:

1. **Das diskontinuierliche Verfahren (Batch- oder Chargenverfahren), bei dem der Reaktionsraum zu Beginn mit dem gesamten Ausgangsmaterial und den Mikroorganismen gefüllt wird. Der Tank wird nach Beendigung der Reaktion geleert und das Produkt gereinigt.**
2. **Das kontinuierliche Verfahren, bei dem dem Reaktor ständig die Ausgangsstoffe zugeführt und ein Reaktionsgemisch entnommen werden. Ein Fließgleichgewicht zwischen Durchflussrate und Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen muss sich dabei einstellen.**
3. **Es gibt auch die semi-kontinuierliche Produktion, bei der in bestimmten Intervallen Fermentationsbrühe aus dem Reaktionsraum abgezogen und durch neues Medium ersetzt wird oder lediglich neues Medium zugegeben wird.**

Das entscheidende Problem beim Züchten freier Zellen ist die homogene Durchmischung des gesamten Fermentationsguts. Bei aeroben Prozessen ist darüber hinaus ein ausreichender Sauerstoffeintrag erforderlich. In einem Rührreaktor erfolgt die Durchmischung mit Hilfe von Rührwerken, Pumpen oder Turbinen, die Luft einblasen und dispergieren.

In Membranreaktoren werden keine homogenen Mischungen aus Medium und Zellen verwendet, sondern das Produkt

wird vom Katalysator (Zelle oder Enzym) durch eine Membran getrennt. Beim Hohlfasereaktor sind die Katalysatoren auf der äußeren Oberfläche von Hohlfasern immobilisiert, durch die das Medium strömt. In Festbettreaktoren wird eine Oberflächenvergrößerung durch die Füllung mit Trägermaterial erreicht, das aus porösem Glas oder Cellulose bestehen kann.

Eine Immobilisierung der Katalysatoren hat verschiedene Vorteile, z. B. die Erhöhung der Katalysatorstabilität, die Verlängerung der Lebensdauer, die Möglichkeit einer Mehrfachverwendung, eine einfachere Produktreinigung und oft auch eine verbesserte Produktqualität. Enzyme können dabei nicht nur in wässrigem Milieu bzw. Medium aktiv sein, sondern auch in apolaren Lösungsmitteln (z. B. organische Lösungsmittel). Für das biotechnologische Verfahren ist dann ein Zweiphasensystem erforderlich, d. h. der Einschluss der Enzyme in geeignete Hydrogele oder cross-linked enzyme crystals (CLEC).



Jede mikrobielle Fermentation muss überwacht werden, um sicherzugehen, dass das Verfahren richtig abläuft. Das Wachstum der Mikroorganismen und die Produktbildung müssen ständig kontrolliert werden. Im Zuge der rasanten Entwicklung der Sensortechnik ist eine Erfassung von Temperatur, pH-Wert, Zellmasse, Nährstoffkonzentration und Produktkonzentration in Echtzeit möglich. Durch den Einsatz von moderner Computer- und Datenverarbeitung im Zusammenspiel mit immer empfindlicherer Mess- und Regelungstechnik ist eine echte Regelung aller Prozessparameter mit minimalem Personalaufwand möglich.

Die vorbereitenden Maßnahmen für die Fermentation und die Aufbereitung der Substratlösung für den Bioreaktor wird „Upstream-Processing“ genannt – die Schritte, die von

der Fermentationslösung über die Abtrennung des Produkts bis zum gereinigten Endprodukt notwendig sind, nennt man „Downstream-Processing“.

Werden die Produkte von den verwendeten Mikroorganismen in das Medium abgesondert, ist die Aufreinigung durch Filtration einfacher (Bsp. Penicillin). Schwieriger ist die Gewinnung des Produktes, wenn die Mikroorganismen und Zellen erst aufgeschlossen werden müssen und das Produkt von den restlichen Zellinhalten getrennt werden muss. Das Produkt kann dann in weiteren Schritten z. B. chromatographisch gereinigt und aufkonzentriert werden.

Für das Übertragen biotechnologischer Prozesse aus dem Labor auf den großtechnischen Maßstab sind umfangreiche verfahrenstechnische Kenntnisse erforderlich. Die Maßstabsvergrößerung ist ein komplizierter Schritt in der Industriellen Biotechnologie. Problematisch sind dabei vor allem Belüftung und Mischung in einem industriellen Fermenter. Von einem

Laborfermenter erfolgt zunächst der Schritt zu einer Pilotanlage, bevor man das Verfahren in einem kommerziellen Fermenter testet. Durch den Einsatz von Computersimulation können Reaktionsbedingungen biotechnologischer Prozesse in nächstgrößeren Verfahrensmaßstäben simuliert werden. Mit Hilfe geeigneter Software kann der Molekülfluss im Reaktor oder die Stoffwechselaktivität der Zellen bzw. Enzyme vorab berechnet („*in silico*“) werden. Mathematische Modelle können dafür verwendet werden, die Wirkung verschiedener Parameter auf Wachstum und Produktausschüttung zu ermitteln. Mit einem solchen Ansatz kann die Maßstabsübertragung (das Scale-up) vom Labor in die industrielle Produktion zur Verringerung aufwändiger Vorversuche erleichtert werden. Grundlage hierfür sind nicht nur bioinformatische Programme und leistungsstarke Rechner, sondern auch ein sehr genaues Verständnis der Stoffwechselvorgänge in den verwendeten Mikroorganismen.

### BMBF-Projekt Bioproduktion „*Physcomitrella patens* als Bioreaktor zur Produktion heterologer, pharmazeutisch relevanter Proteine“

Das BMBF-geförderte Projekt „*Physcomitrella patens* als Bioreaktor zur Produktion heterologer, pharmazeutisch relevanter Proteine“ beschäftigt sich mit der Weiterentwicklung des Moosbioreaktors. Er wurde 1999 von der Firma greenovation Biotech in Freiburg zum Patent angemeldet. Das Besondere der Technologie ist die Verwendung von Moosen in biotechnologischen Prozessen als Proteinproduktionssystem. Durch gentechnische Veränderungen kann das Moos *Physcomitrella patens* in die Lage versetzt werden, pharmazeutische Proteine wie z. B. Antikörper oder Enzyme zu produzieren. In Mooszellen können die Zuckerketten gezielter und konsistenter verändert werden als dies in anderen Zellkultursystemen möglich ist. Zahlreiche Proteine in biologischen Systemen tragen Zuckerketten. Diese Zuckerketten sind an wichtigen biologischen Abläufen beteiligt

und für zahlreiche Eigenschaften von Proteinen verantwortlich. Sie beeinflussen z. B. Bindungseigenschaften, Verträglichkeit, Aktivität oder Stabilität. Bei der Herstellung rekombinanter Proteine mit biotechnologischen Verfahren besteht eine der Schwierigkeiten darin, die natürlichen Zuckerstrukturen der Proteine nachzubilden. Dies ist besonders bei den Proteinen von Bedeutung, die in Form von Medikamenten eingesetzt werden sollen, also den Biopharmazeutika.

In dem BMBF-Projekt wurde unter Leitung der greenovation Biotech GmbH in Zusammenarbeit mit den Universitäten Karlsruhe und Freiburg der menschliche Blutgerinnungsfaktor IX als Zielprodukt ausgewählt. Dabei sollte der Moosbioreaktor vom Versuchsstadium zu einem technischen Maßstab weiterentwickelt werden. Hierfür mussten zunächst die einzusetzenden Moosstämmen optimiert werden, d. h. sie mussten gentechnisch so verändert werden, dass sie die Proteine mit den gewünschten Zuckerverbindungen herstellen konnten. In weiteren Schritten wurden die Kulturbedingungen und die verwendeten Expressionsprozesse angepasst und die gewonnenen Proteine optimiert. Um das Problem der Produktion in industriellem Maßstab zu lösen, wurde auf ein bestehendes Konzept aus der Algenkultivierung zurückgegriffen. Dabei werden große Volumina durch eine gewundene Glasröhre erreicht, in der das Medium mit der Produktionspflanze zirkulieren kann und in der die optimale Lichtausbeute, die das Moos für das Wachstum benötigt, gewährleistet ist. Der Produktionsorganismus „Moos“ konnte im Laufe des BMBF-Projektes für die industrielle Produktion von Proteinen etabliert werden. Dies ist besonders für die Produktion von Biopharmaka wichtig, da Zuckerstrukturen kontrolliert beeinflusst werden können.



Bioreaktor mit *Physcomitrella patens*