

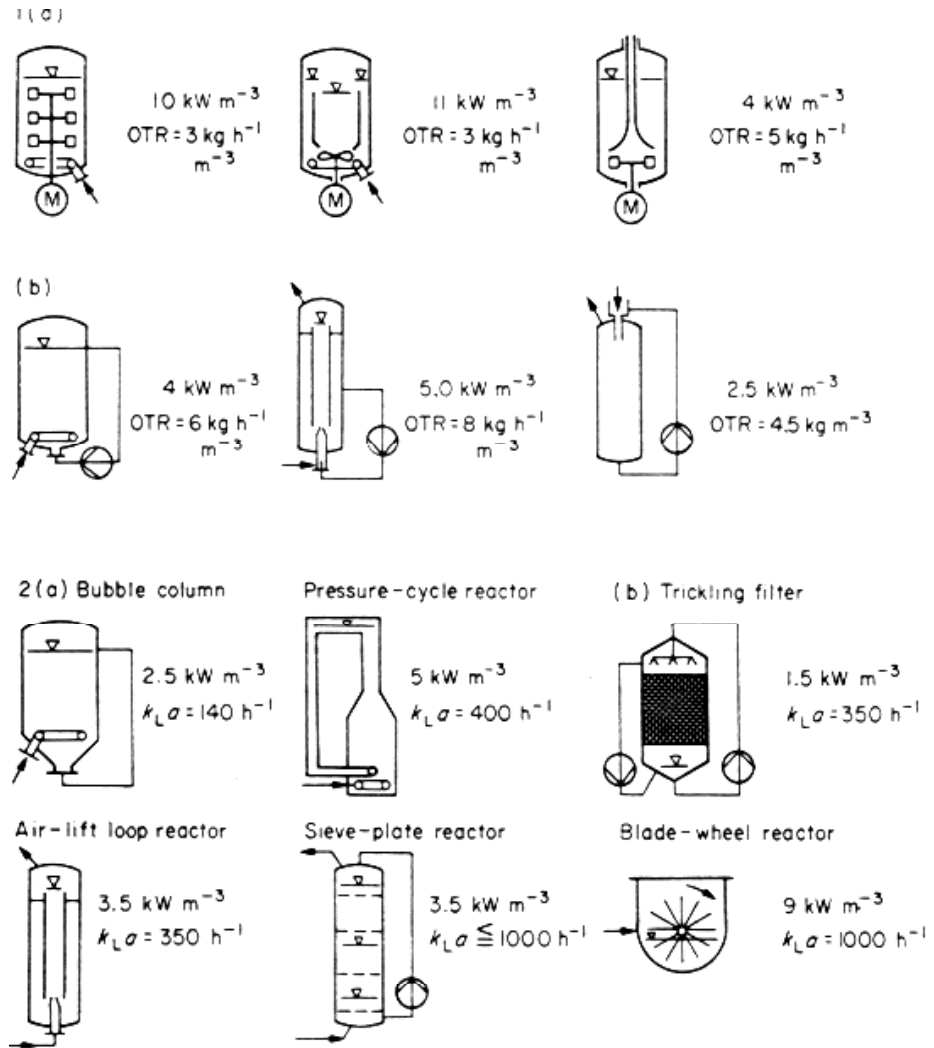
# **Anlagenkonzeption und Optimierung von Fermentationsverfahren**

**Wolfgang Sittig**

## Anlagenkonzeption

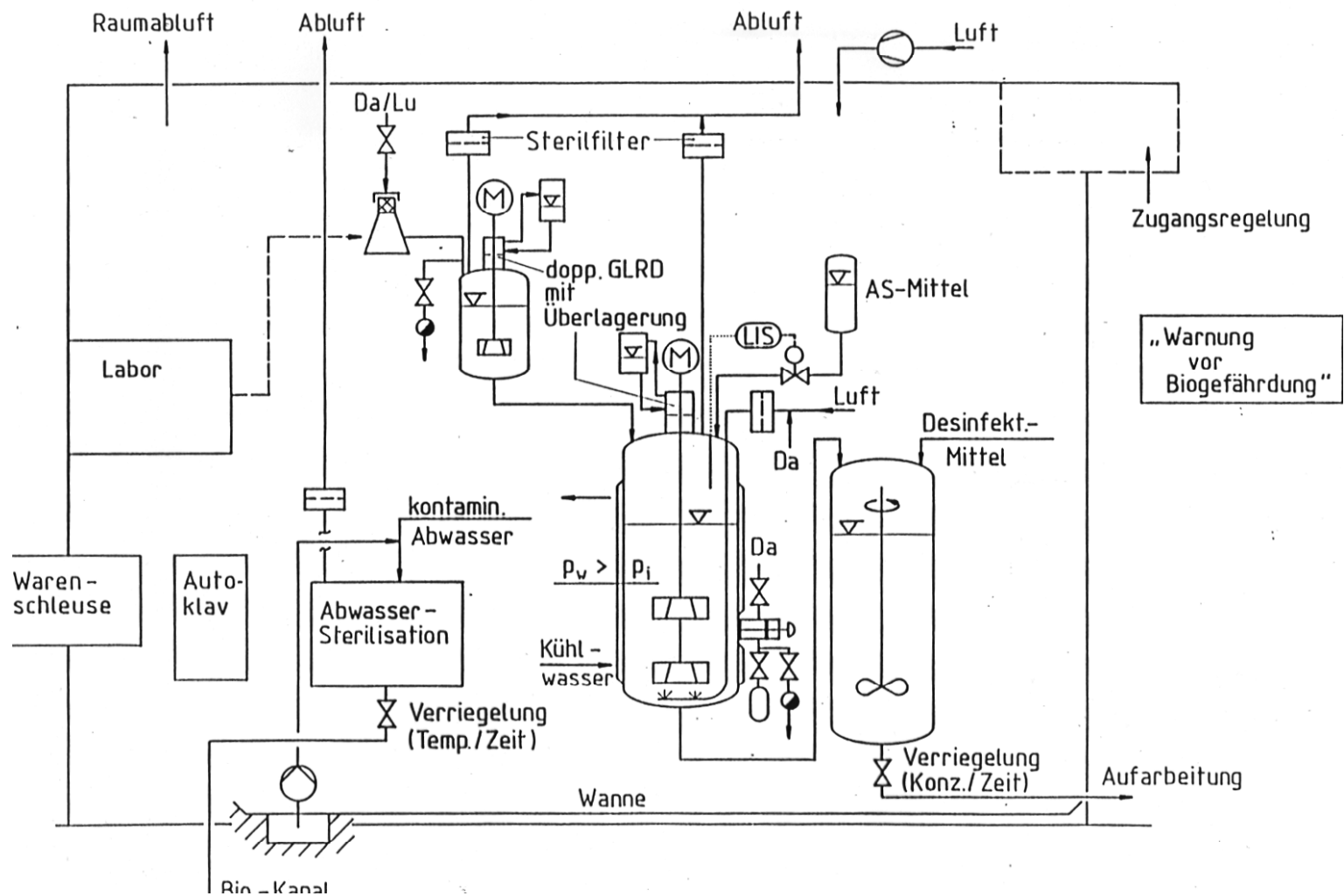
<b>Vorgegeben:</b>	der mikrobielle Stamm, die Produktmenge, Raum-Zeit-Ausbeute, Gesamt-Kulturlösungsmenge, Rohstoffbedarf, Belüftungsrate, Energiebedarf
Häufig:	Betriebsfläche, Gebäudehöhen
Immer:	das Budget
<b>Wählbar:</b>	Schlankheitsgrad H/D Füllgrad Größenabstufung der Anzuchtfermenter Zahl der Produktionsfermenter Typ des Rührantriebs Drehzahl Leistung
<b>Beeinflussbar:</b>	Montagefreundlichkeit Reparaturfreundlichkeit Austauschbarkeit Bedienungsfreundlichkeit

# Fermentervarianten



# Elemente einer Produktionsanlage

Sicherheitsstufe P3



## Die Luftversorgung

- Versorgung aus Netz bevorzugt
- Sonst durch 2 Schraubenverdichter
- Ölfreie Qualität
- Druck > 4 bar abs.
- Sterilfiltriert über Membrankerzenfilter
- Integritätstest der Filterelemente vor Einbau
- Sauerstoff-Anreicherung der Luft möglich  
(ex-Schutz beachten)
- Sterilisation des Luftverteilungssystems zusammen mit Fermenterkessel

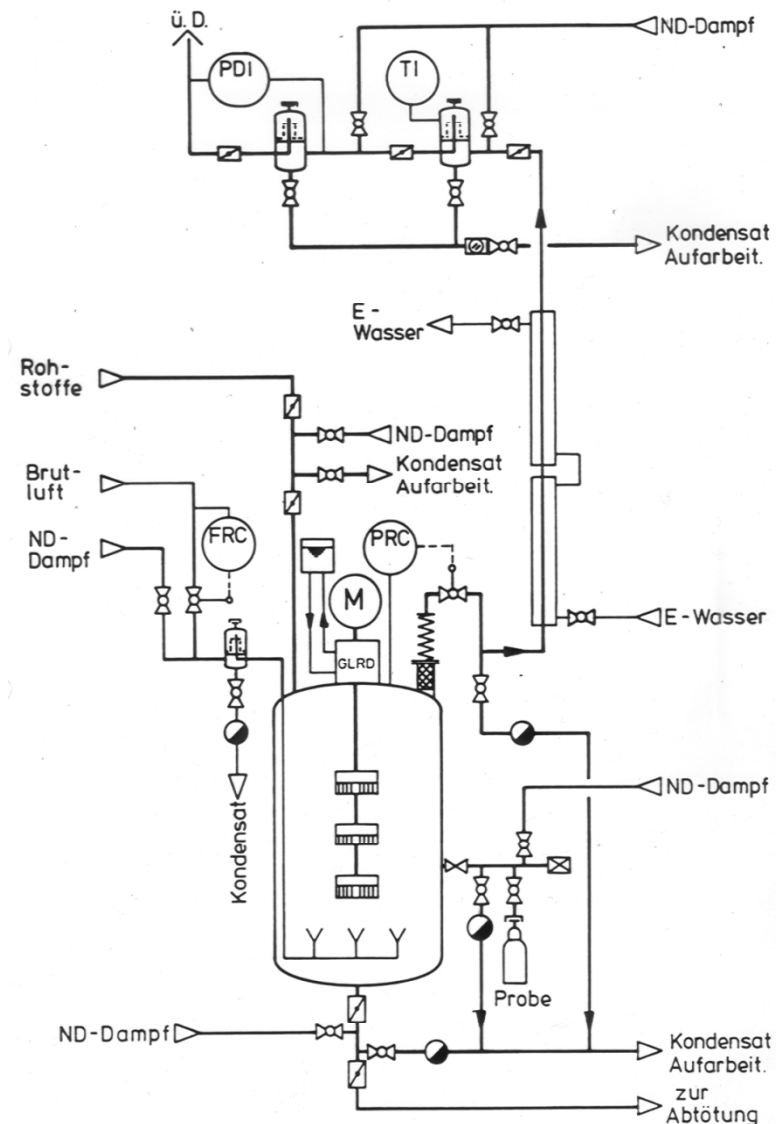
## Ausschleusung der Abluft

Problem der Wasserbilanz infolge:

- wachsendem Feuchtegehalt bei sinkendem Druck
- Mitreißen von KL-Tröpfchen aus KL aus KL

Gegenmaßnahmen:

- Nachspeisen von Kondensat
- Tropfenabscheidung und -rückführung durch Einbau von Abscheidern



## Tropfenabscheidung im Krümmer

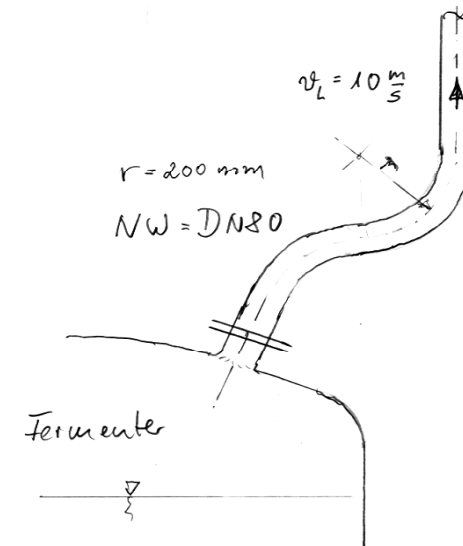
Sinkgeschwindigkeit von Tropfen in Luft im Schwerefeld:

Stoke'sches Gesetz:  $v = 1/18 * (\rho_T Z d^2 / \eta_L)$

Beispiel:

Luftgeschwindigkeit 10 m/s

Abluftleitung DN 80 mit Krümmungsradius von 200 mm



Zentrifugalbeschleunigung durch Umlenkung:  $Z = v^2 / r = 50 * g$

Die Sinkgeschwindigkeit bei dieser Beschleunigung beträgt für Tröpfchen von 40  $\mu\text{m}$  nach Stokes ca 2,6 m/s.

Die Verweilzeit im der Krümmer liegt bei :  $t = r * \pi/2 v = 0,03 \text{ s}$ .

In dieser Zeit legen die Tröpfchen von 40  $\mu\text{m}$  einen Weg von etwa 80 mm zurück, erreichen also die Wand. Eine quantitative Abscheidung von Tropfen > 40  $\mu\text{m}$  darf also erwartet werden.

## Rückhaltung von Mikroorganismen im Abluftstrom

Gentechnikgesetz: Minimalisierung des Austritts von Mikroorganismen aus dem Primärcontainment.

GMP-Regeln: Weitestgehende Verhinderung des Austritts von Organismen aus dem Fermenter empfohlen.

Stand der Technik: Membranfiltration durch Kerzenfilter.

Integritätstest der Kerzen in der Regel vor dem Einbau der Filter.

Test im eingebauten Zustand nur bei kleinen Fermentern möglich

In große Einheiten, die mit einer Vielzahl von parallel angeströmten Kerzen arbeiten, sind defekte Kerzen nicht mehr mit hinreichender Sicherheit erkennbar.

Problem: Blockade der Membranen durch übersättigte Abluft.

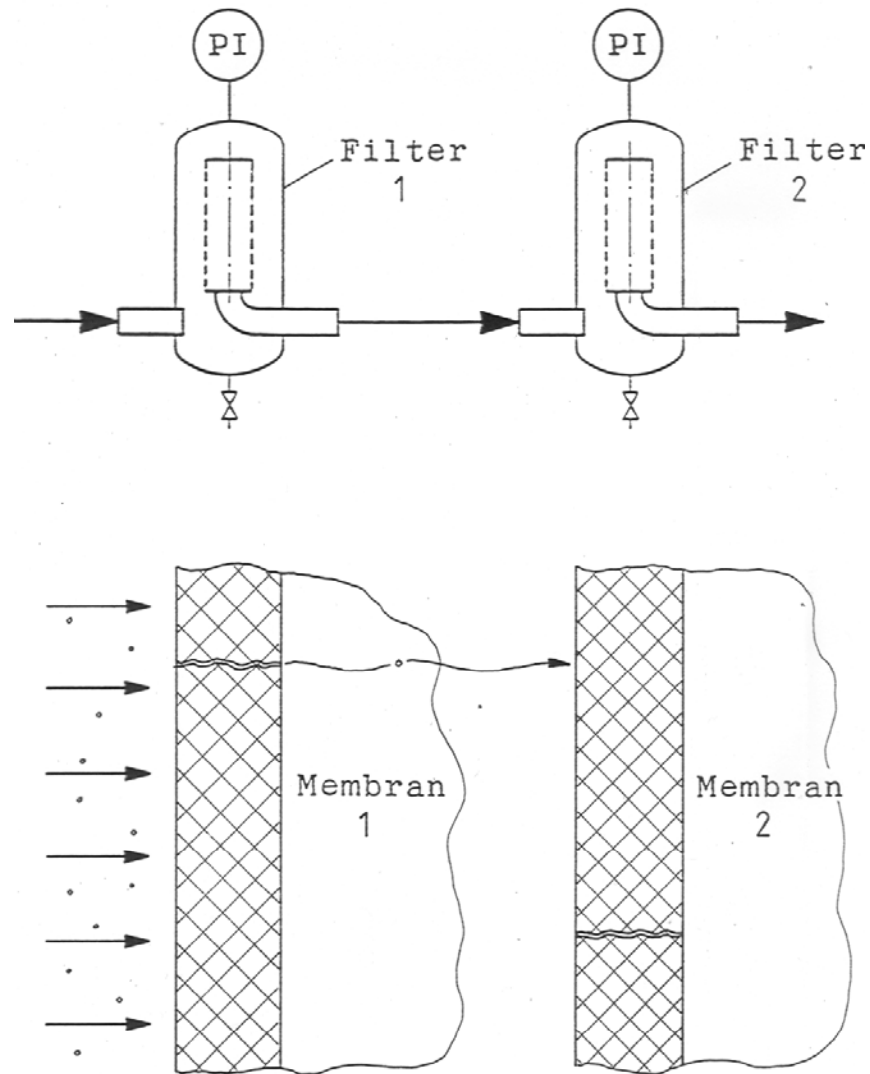
Lösung: a. Trocknung der Luft durch vorgeschaltete Erhitzung  
b. Trocknung der Luft durch Drosselung vor dem Filter.

Problem: Passage von als gefährlich eingestuften Organismen durch defektes Filter

Lösung: Zwei Filter in Reihe



## Rückhaltung von Mikroorganismen im Abluftstrom



## Erste Aufgabe des Rührsystems

### Kühlung der Kultursuspension

Wesentlich: ausreichende Geschwindigkeit des Fluids an den Kühlflächen.  
Wandkühlung: bei kleineren Einheiten ausreichend.

Folge der Vergrößerung:

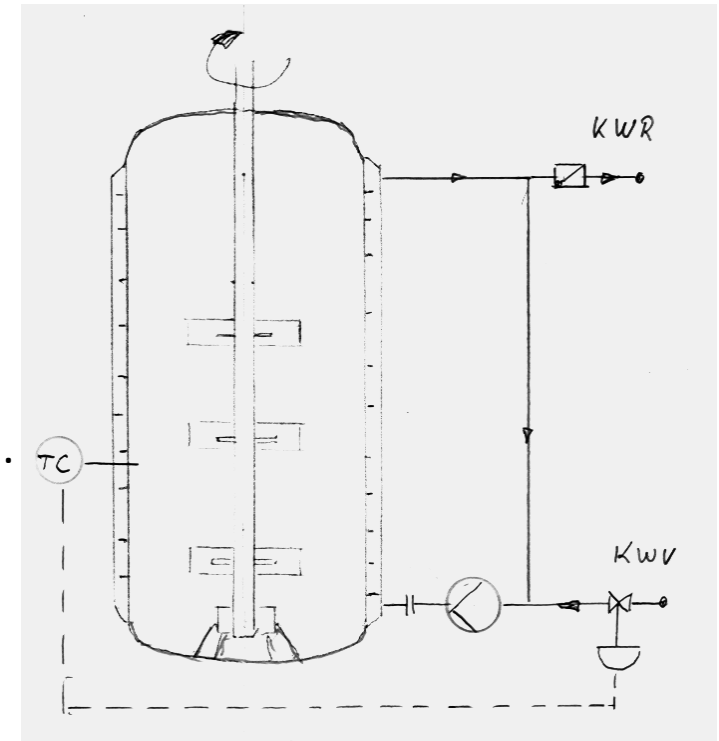
Flächenzunahme  $\rightarrow (\text{Durchmesser})^2$

Volumenzunahme  $\rightarrow (\text{Durchmesser})^3$

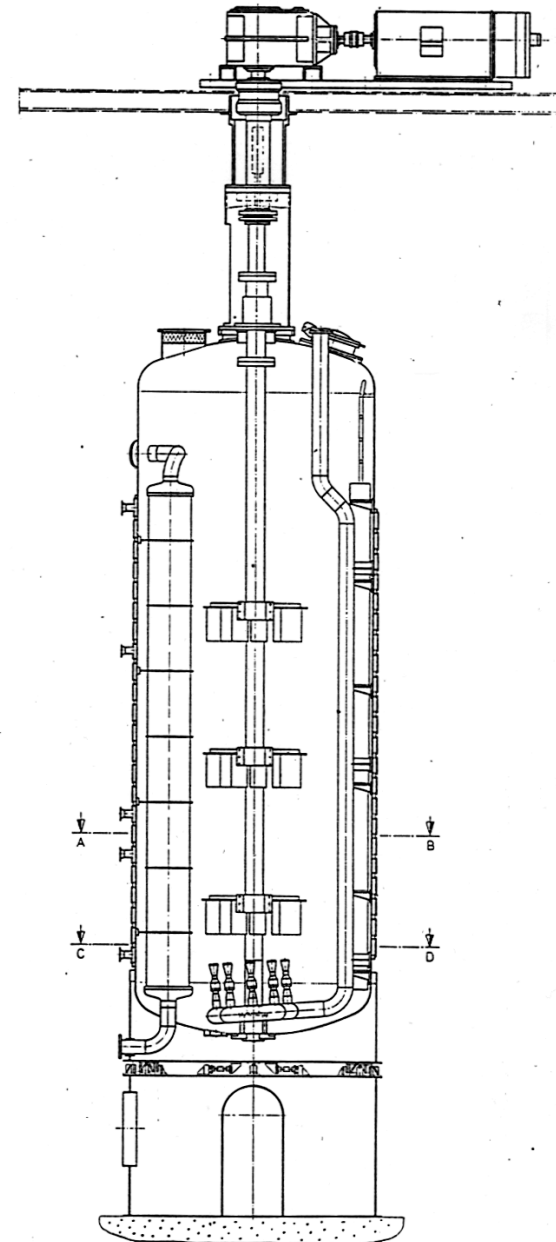
Folge: Größere Einheiten benötigen Zusatzkühlflächen.

Kühlbedarf: während des Prozessverlaufs variabel entspr. Wachstum und Produktbildung.

Lösung: Sekundärkreislauf zur Sicherung der Regelungsgüte



# Produktionsfermenter mit Kühlregister



## Zweite Aufgabe des Rührsystems

### Mischen des Fermenterinhalt

	<b>Labor</b>	<b>Produktion</b>
<b>Mischzeit</b>	kurz	lang
<b>Transportstrecken</b>	kurz	lang
<b>Homogenität</b>	angenähert	unerreichbar

Das Rührsystem lässt sich als Pumpe verstehen:

**Rührleistung:**  $P \rightarrow k * \Delta p * Q \rightarrow k * n^3 * d^5 * \rho$

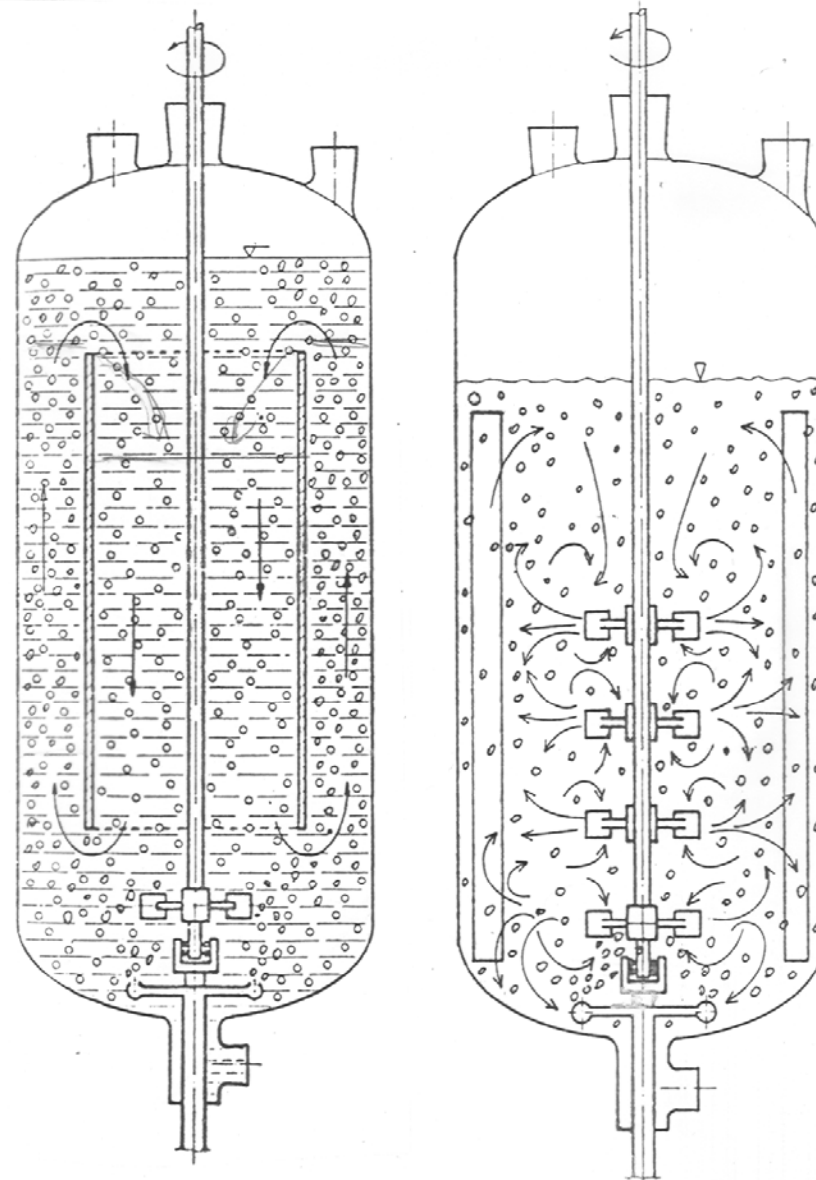
Konsequenz: größerer Maßstab, kleinere Drehzahl  $n$

Angestrebt:  $n * d = \text{const}$  oder  $P / V = \text{const}$

Dimensionslose Mischzeit (Mersmann et al.):

$$n * \theta = k * (d/d_T)^{-5/3} * Ne^{-1/3}$$

# Fließmuster eines Umwurf – und eines Mehrstufenfermenters



## Dritte Aufgabe des Rührsystems

### Dispergierung der Luft in der Suspension

Blasenbildung und –beständigkeit abhängig von:

Konstruktion,

Energieeintrag,

Stoffeigenschaften (Ionenstärke, Oberflächenspannung,

Zähigkeit,...)

Für Scheibenrührer und koaleszenzfördernde Medien (n.Zlokarnik) :

$$\text{OTR} = k_L * a * \Delta c \rightarrow (P * q)^{0,5}$$

Gültig bis zur Überflutungsgrenze (für untersten Rührer)

Blasenverteiler: Einfluss üblicher Konstruktionen gering

Blasenerzeugung benötigt Zusammenführung von kontinuierlicher und zu dispergierender Phase

## Nachgaben

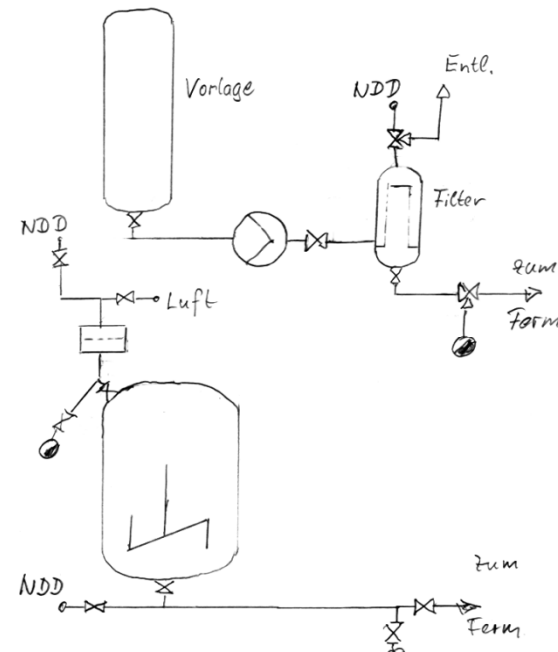
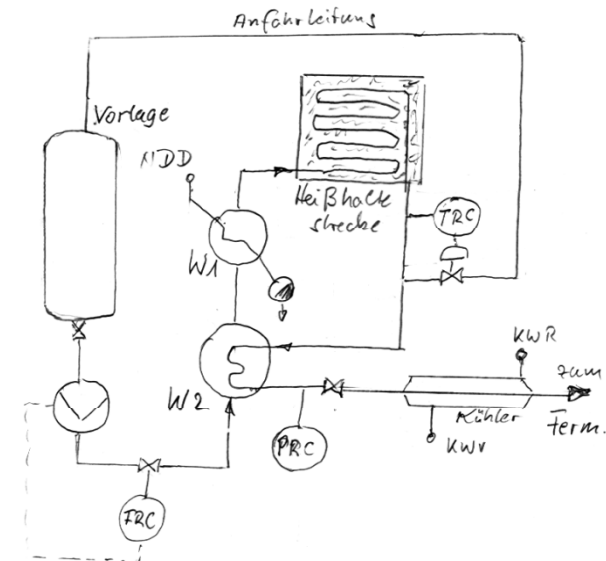
Schüttelkolben:

Nachgaben: keine, batch-System

Submersfermenter:

Nachgaben:

- Über eine quasi-kontinuierliche Hitzesterilisationsstrecke
- Über eine Sterilfiltration
- Aus mitsterilisierten Behältern



## **Anlagensteuerung**

Ersatz normierter (z. B. PID-) Regler durch IT-Regelmodule

Rückverfolgbarkeit von Änderungen und Abläufen

Stringente Sollwertvorgaben anstelle von Handeingriffen

Führung des Personals durch das System

Protokollierung von Grenzwertverletzungen

Protokollierung von Alarmen

Ermöglichung flexibler Regelungsstrategien (z. B. Vorgabe von Stufen, Pausenzeiten, beliebigen Kurven)

Einführung bedingter Parameter

Remote Control

Häufig Anlagenferne des Programmierers



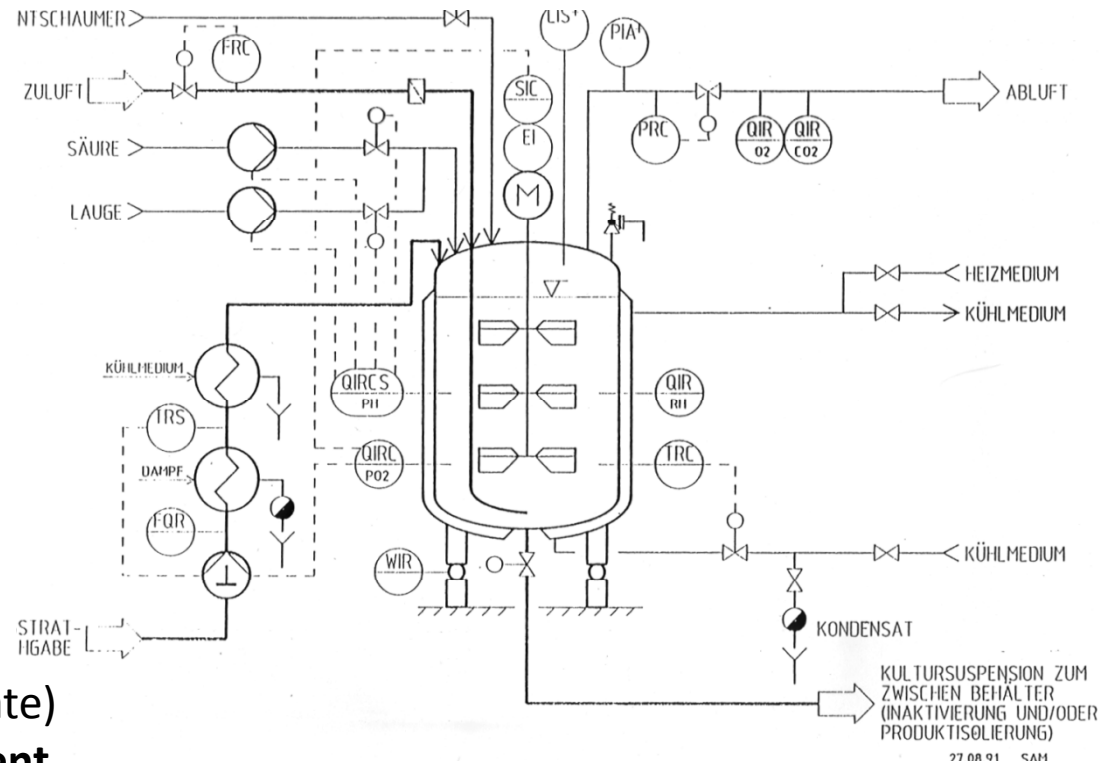
## Messwerterfassung

### Außerhalb des Containment

- Leistungseintrag
- Drehzahl
- Füllgewicht
- Drücke
- Temperaturen
- Durchflüsse
- Trübung
- Schaumkontrolle
- Abluftanalysen  
( $O_2$ ,  $CO_2$ , flüchtige Substrate)

### Mit Durchbrechung des Containment

- Ionenselektive Sonden (z. B. pH)
- Potentiometrische Sonden  
(z. B. Sauerstoffpartialdruck) lokal!
- Enzymatische Sonden (Glucose etc.)
- Bypassanalytik
- Probenahme  
(einschl. mikrobiologische Beurteilung)



## Prozessoptimierung

Abgleich der Ergebnisse mit den Vorgaben

Wenn übertroffen: → weitermachen

Wenn nicht erreicht: → Überprüfen, welcher Parameter bei Vergrößerung des Maßstabs geändert werden muss.

Hilfreich: Scale-Down

Suche nach limitierendem Faktor (Probenlabor)

Abgasanalyse, da für ganzen Fermenter repräsentativ,  
Echtzeit-nahe, jederzeit überprüfbar.

Wandnahe Messungen nur repräsentativ, wenn Änderungen deutlich langsamer als die Mischzeit des Systems.

Sinnvoll, so weit möglich den Wachstums- und den Produktbildungsprozess getrennt zu analysieren.

## **Mathematische Modellierung**

Eingeschränkt verwendbar, überwiegend für Laborbereich.  
Selten auf Produktionsanlagen übertragbar.

### **Im Laborbereich**

Vorteil: Annähernd homogen durchmischt  
Mischzeit klein gegen Substratverbrauchszeit  
Geringe Materialkosten  
Impfstress gering  
Parallelbetrieb mehrerer Einheiten möglich  
Nachteil: Probemenge limitiert

### **Im Produktionsbereich**

Nachteil: In der Regel nur Einzelversuche möglich  
Systembedingt Zonen unterschiedlicher physikalischer Bedingungen,  
Randbedingungen für Modellierung zwischen Zonen unbekannt.  
Mischzeit groß  
Behälterinneres nicht einsehbar.  
Kultur erleidet beim Transfer nachhaltigen Impfstress.  
Vorteil: Große Probemenge verfügbar

## Anfahrpraxis

Nach erfolgreicher Installation und Qualifizierung stehen im Wesentlichen folgende Einflussgrößen zur Verfügung:

- Füllmenge

- Luftmenge

- Druck der Abluft

- Fermenter-Innentemperatur (i. d. R. vorgegeben)

- Rührerdrehzahl

- Nährlösungszusammensetzung

- Nachgaben

- Menge und Dichte der Impfkultur

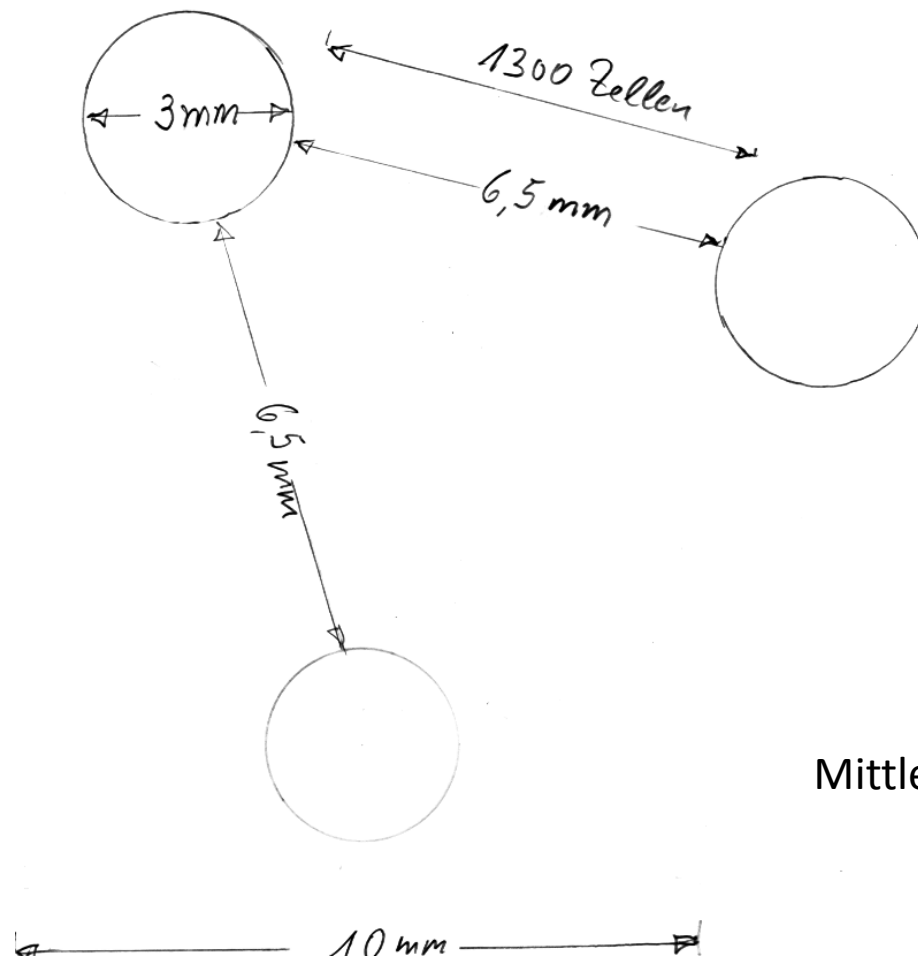
Sobald das System mechanisch läuft, dicht ist und steril, beginnt die Lernkurve.

## Der Stamm

Die große Zahl der Zellen bilden den eigentlichen Bioreaktor.  
Der Fermenter bietet nur Schutz, Milieu, Versorgung und  
Entsorgung für die Zellen.



## Momentaufnahme der Submerskultur



Mittlerer Blasendurchmesser sei :  $d_B = 3 \text{ mm}$

Luftgehalt der KL:  $\varepsilon = 5\%$

Der Zelltiter liege bei:  $N_Z = 8 \cdot 10^{12} \text{ cfu/l}$

## Annahmen für Modellfermenter

Behälter $V_R$	$1 \text{ m}^3$
Gasgehalt $\varepsilon$	5%
Belüftung $Q$	$1 \text{ m}^3 / \text{m}^3 \cdot \text{min}$
Füllung $H_L$	1,5 m
mittl. Druck $p$	2 bar abs
Temperatur $T$	30° C
Blasen $\phi$ $d_B$	3 mm
Blasenvol. $V_B$	$1,41 \cdot 10^{-2} \text{ ml}$

Aus  $\varepsilon$  und  $Q$  bei 2 bar abs folgt  
die Verweilzeit  $t_v = 6 \text{ s}$

Aus  $V_B$  und  $Q$  folgt die  
Zahl der Blasen  $N_B = 3,5 \cdot 10^7 / \text{min}$

Zu jedem Zeitpunkt präsent sind der Verweilzeit entsprechend davon 1/ 10, also  
 $3,5 \cdot 10^6$  Blasen.

## Sauerstoffbedarf und aktiver Transport

Die Sauerstoffaufnahme (OUR) beträgt 1 bis 10 kg O<sub>2</sub> / h\*m<sup>3</sup>

Die O<sub>2</sub>-Sättigungskonzentration aus Luft in Wasser : c\* = 15 g/m<sup>3</sup>  
bei 2 bar abs und 30 °C

O<sub>2</sub> – Angebot in 60 cbm/h → 18 kg/h

Ausnutzung bei OUR von 1 kg/h → 5,6%

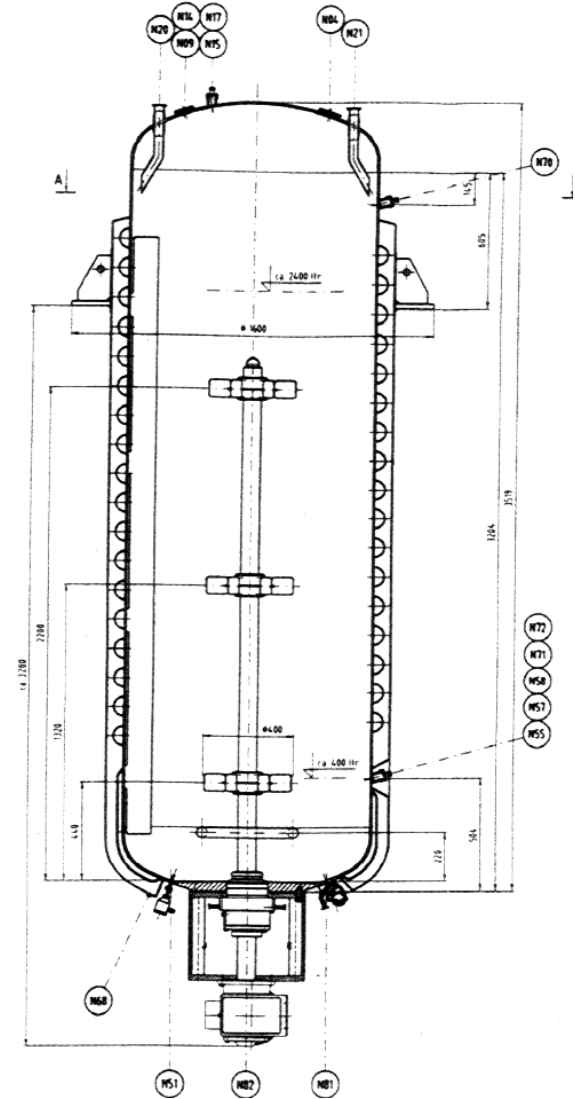
Diffusion von O<sub>2</sub> in Luft >> als in Wasser  
Daher Fick'sches Gesetz vereinfacht zu

$$\begin{aligned} dc_L / dt &= D_L / \delta * a * (c_L^* - c_L) - OUR \\ &= k_L * a * (c_L^* - c_L) - OUR \end{aligned}$$

D<sub>L</sub> → 2 \* 10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup>/s für Wasser

„a“ steht für die Kontaktfläche pro cbm

δ ist die Dicke des Grenzschichtfilms zwischen Blasen und KL.





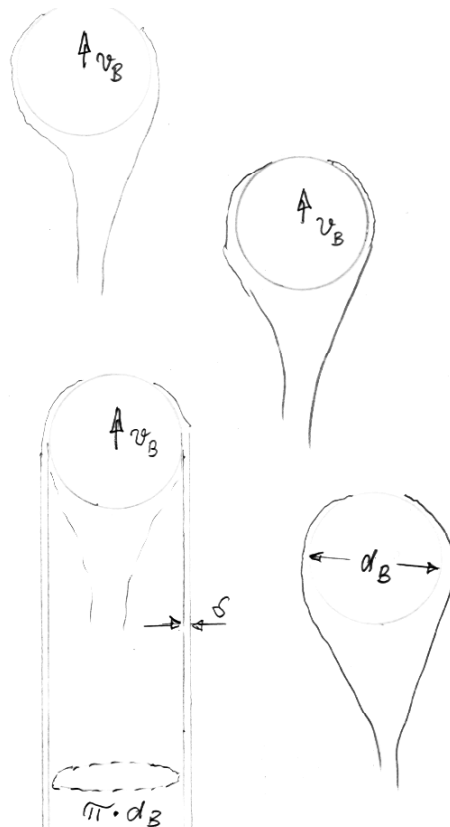
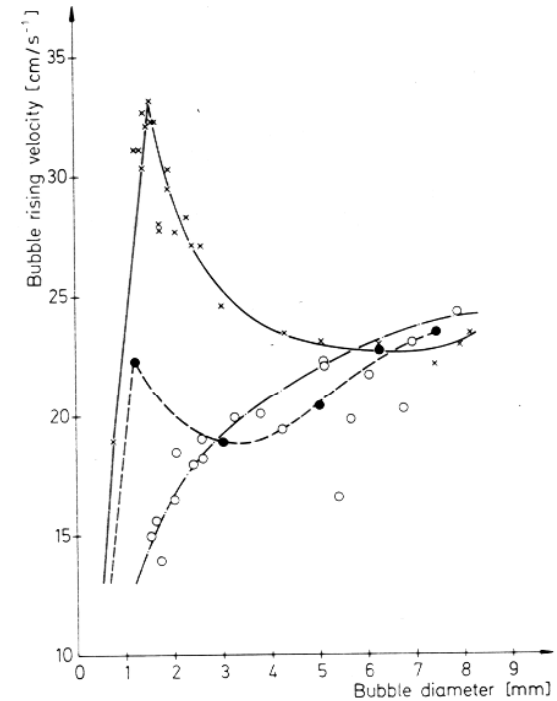
# Filmerneuerungshypothese

Transport durch Diffusion zu allen Zellen unzureichend.  
Blasenkonvektion maßgeblich für Transportleistung.

Für das Beispiel gewählt:  $w_B = 0,25 \text{ m/s}$

Kontrolle: Verweilzeit  $t_V = H_L / w_B = 1,5 / 0,25 \text{ s} = 6 \text{ s}$

Beim Aufsteigen kommt jede Blase mit einer dünnen Grenzschicht der Flüssigkeit in Kontakt und „verliert“ Sauerstoff an sie.



$$a_B = \text{Blasenumfang} \times (\text{Weg bis oben})$$

$$= d_B \cdot \pi \cdot H_L \text{ für } d_B \text{ von } 3 \text{ mm}$$

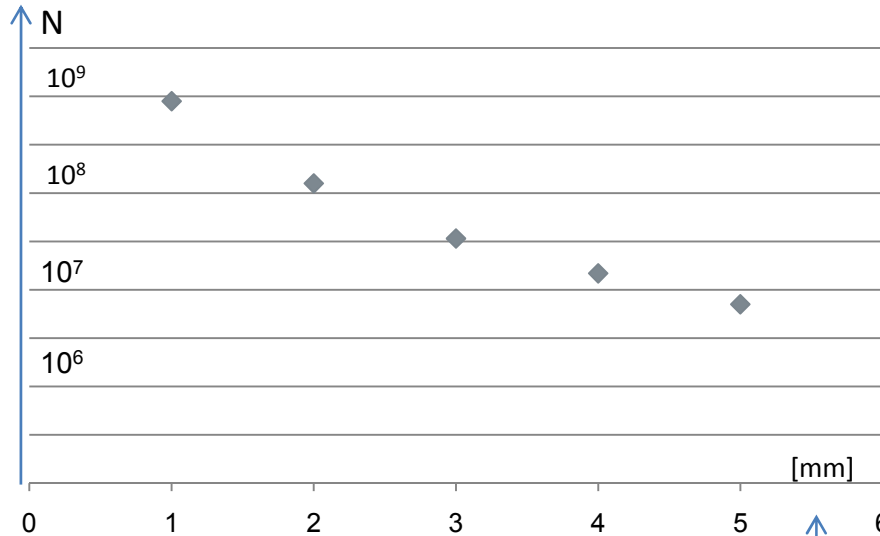
$$= 1,41 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2 \text{ für } N_B = 3,5 \cdot 10^7 / \text{min} \rightarrow$$

$$a = 5 \cdot 10^5 \text{ m}^2 / \text{min}$$

Eine Filmdicke von  $5 \mu\text{m}$  ergibt ein kontaktiertes Volumen von  $a \cdot \delta = 2,5 \text{ m}^3 / \text{m}^3 \cdot \text{min}$ .

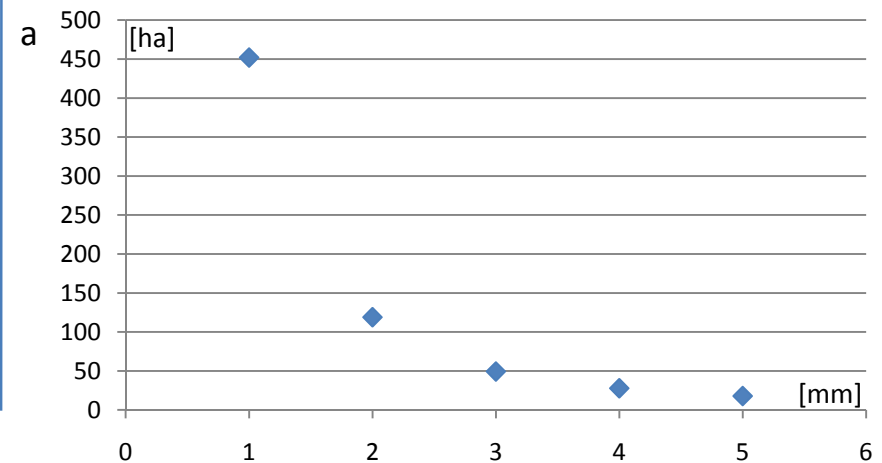
D.h. jeder cbm der KL wird durchschnittlich alle 24 Sekunden mit Sauerstoff versorgt.

## Einfluss der Blasengröße



Zahl der frischen Blasen (N)  
(pro  $m^3$  und Minute) in  
Abhängigkeit von  $d_B$

Kontaktierte Phasengrenzfilmfläche (a)  
(ha pro  $m^3$  und Minute) in  
Abhängigkeit von  $d_B$



## Optimierungsüberlegungen

Wie weit weicht die Realität von den Modell-Annahmen ab?

Erzielt der Rührer ausreichende Homogenität?

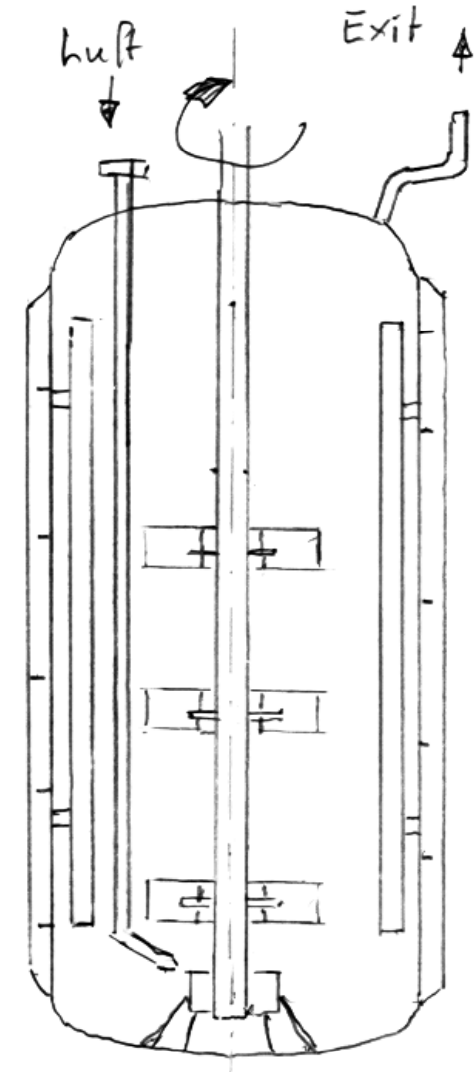
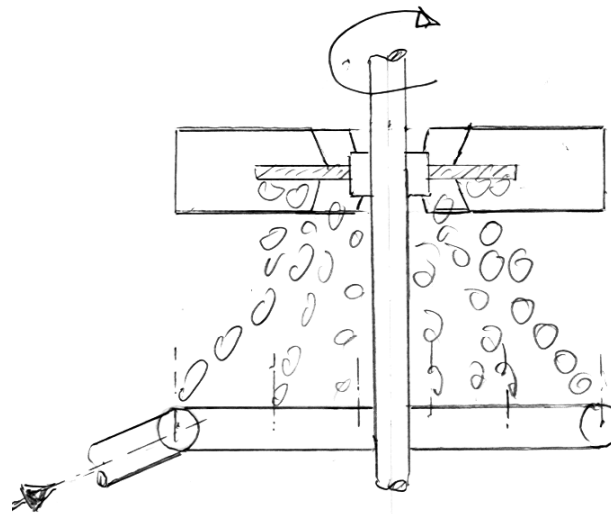
Werden Blasen von 3 mm mittlerem Durchmesser erzeugt?

Werden die Blasen annähernd gleichmäßig über den Fermenterquerschnitt verteilt?

Ist die Vorverteilung der Luft in der Ringbrause effektiv?

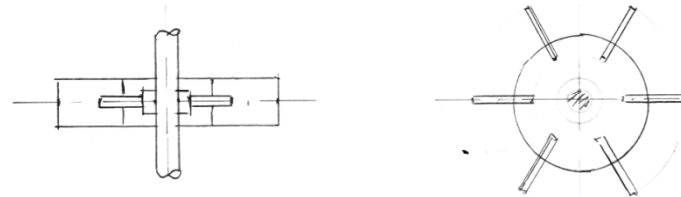
Nimmt das Volumen unter dem Luftverteiler am Prozess teil?

Umbau-Option: Verschiebung des Rührorgans auf der Welle

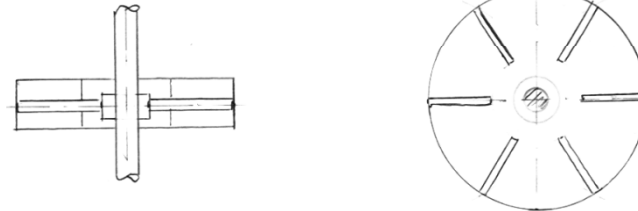


## Austausch der Rührorgane

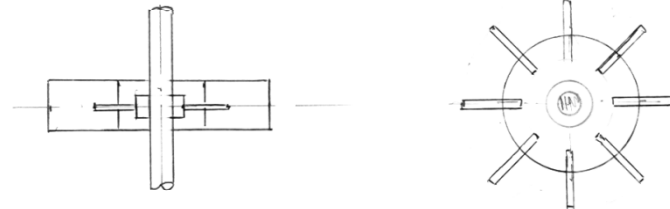
Schaufelrührer



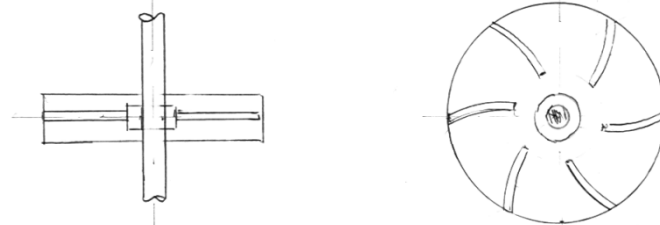
Scheibenrührer



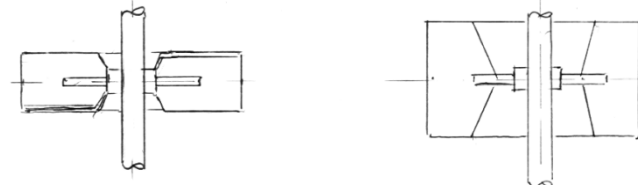
Schaufelrührer mit  
höherer Schaufelzahl



Turbinenrührer

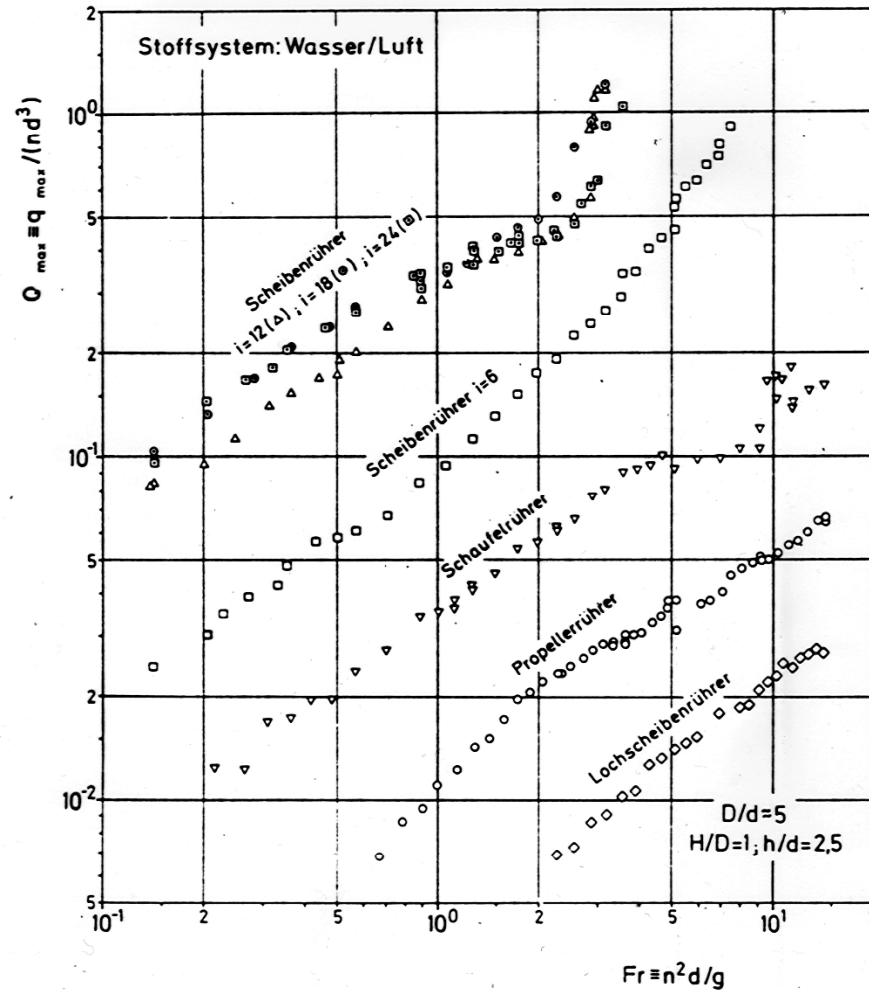


Schrägblattrührer



Schaufelrührer mit  
höheren Schaufeln

# Einfluß der Schaufelzahlen auf die Gasdispersion



ÜBERFLUTUNGSGRENZE VERSCHIEDENER RÜHRER (NACH SCHÜGERL, HANDBUCH DER BIOTECHNOLOGIE (1982)) Akadem. Verlagsgesellschaft, Wiesbaden

## Stoffübergang im Schüttelkolben

Weithalskolben Inhalt

250 ml

Füllung

50 ml

Benetzte Innenfläche

250 cm<sup>2</sup>

Schüttelfrequenz

300 min<sup>-1</sup>

Wandfilmbildung

250 cm<sup>2</sup> / U

Wandfilmbildung

7,5 m<sup>2</sup> / min

Spez. Filmbildung

150 m<sup>2</sup> / l \* min entspr. 15 ha / m<sup>3</sup>

Filmdicke

> 22 µm → Filmvolumen von 65 ml / min

Die Füllung wird demzufolge ca 3,3 mal pro Minute mit Sauerstoff versorgt.

