

Einführung in Biotechnologie

Literatur:

Antranikian: Angewandte Mikrobiologie, Springer 2006

Renneberg: Biotechnologie für Einsteiger, Elsevier Spektrum, 2006

Thieman, Paladino: Biotechnologie, Pearson Studium, 2007

Brock: Mikrobiologie, Pearson Studium, 2007

Unterlagen: TUG online

Biotechnologie

**Produkte mit lebenden Organismen
oder Teilen davon herstellen**

Enge Definition

- ◆ Industrielle Produktion in Bioreaktoren - Mikroorganismen, Zellkulturen
- ◆ Enzymtechnik und Biokatalyse - Enzyme

Breitere Definition

- ◆ Spezifisch modifizierte Pflanzen und Tiere als Produzenten (Transgene Organismen)
- ◆ Direkte medizinische Applikationen (z.B. Gentherapie)
- ◆ Bio-Nanostrukturen

**B
I
O
T
E
C
H
N
O
L
O
G
I
E**

Molekulare Biotechnologie
Engineering von Biosystemen

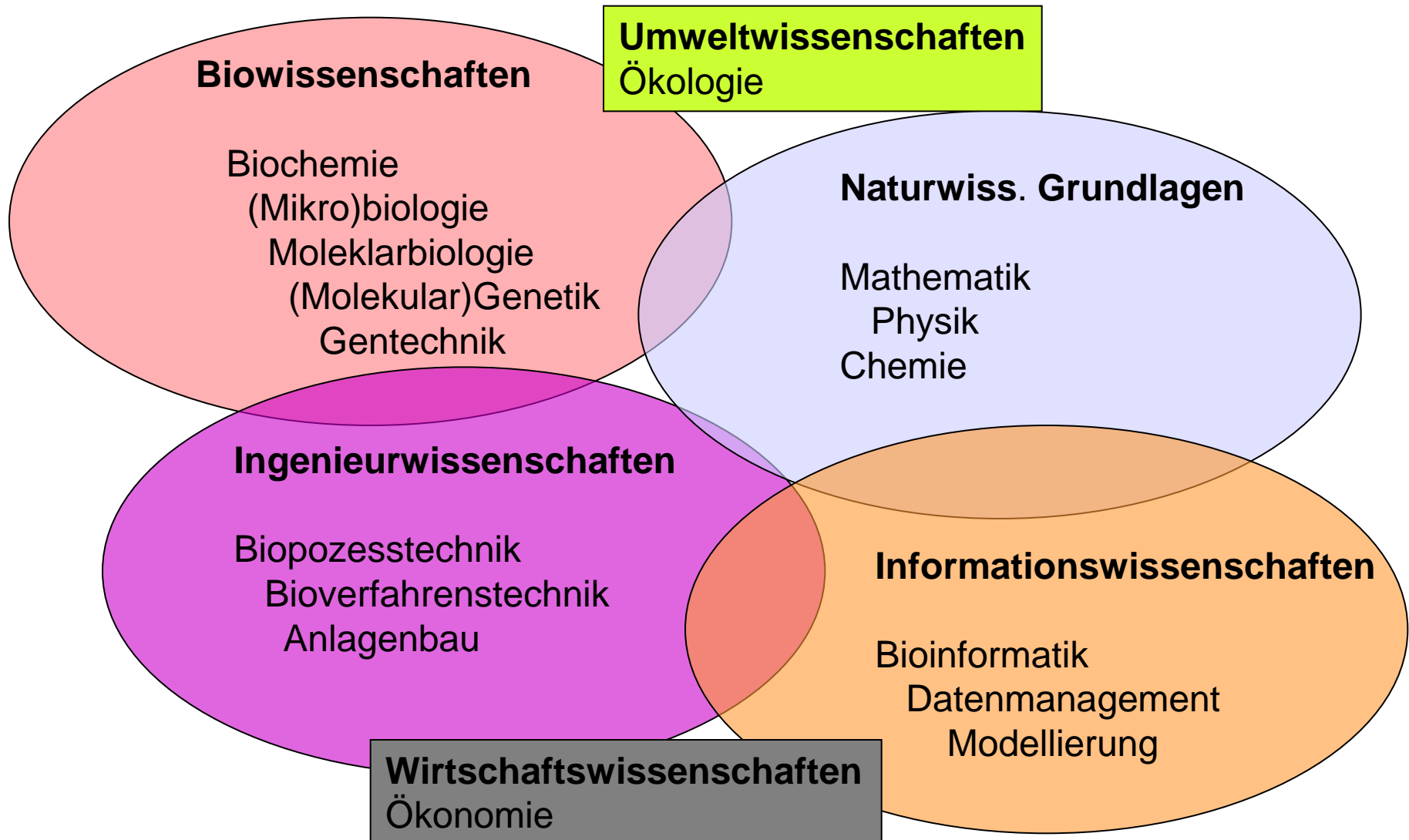
Zell-Engineering
Stoffwechsel-Engineering
Protein-Engineering

Integrierte Vernetzung

Bioprozesstechnik
Engineering von Produktionsverfahren

Prozessentwicklung
Reaktionstechnik
Aufarbeitungstechnik

Biotechnologie – Interdisziplinäre Wissenschaft



Innovationsfelder
Moderner Technologien

Elektronik

Software

Neue Materialien

Nanotechnologie

Bio-
techno-
logie

Biotechnologie - Frontfelder

Gentechnik

Zellkultur- & Zellfusionstechnik

Bioprozesstechnik

Biosensorik

Strukturbiologie
Mol. Modeling

Gen-
Transcript-
Prote-
Metabol-
omics

**Systems
Biotechnology**

Zell-
Protein-
Engineering

**Synthetic
Biotechnology**

Geschichte der Biotechnologie

•Prä-Pasteur-Ära(vor 1865)

– unbewusste Nutzung v. Mikroorganismen bei der Nahrungsmittelherstellung [Gärungen –Wein, Bier, Essig, Käse, Sauerteig, Joghurt]

•Pasteur-Ära(1865 –1940)

– Verfahren ohne absoluten Ausschluss von Fremdkeimen [Fermentation (Butanol,Aceton, Ethanol), Oberflächenkultur (Citronensäure), Biomasse (Bäckerhefe, Futterhefe)]

•Antibiotika-Ära(1940 –1960)

– Steriltechnik und selektionierte Stämme [Submers-Verfahren (Penicillin), tier. Zellkultur [Virus-Impfstoffe], Biotransformationen [Cortison, Vitamin B12, Ovulationshemmer)]

•Post-Antibiotika-Ära(1960 –1975)

– Bioprozesstechnik (Reaktorform, Immobilisierung, Steuerung, etc) [SCP, Enzyme (Waschmittel), Polysaccharide (Xanthan), Fructosesirup, Biogas, Industrie-Alkohol]

•Neue Biotechnologie(1975 -)

– Gezielte Optimierung von Biosystemen [Hybridoma-Technik (MAK); rekombinante Proteine (Insulin, Impfstoffe), etc.]

Klassische Biotechnologie



Empirie
Gefühl
Erfahrung

Geschichte der Biotechnologie

•Prä-Pasteur-Ära(vor 1865)

– unbewusste Nutzung v. Mikroorganismen bei der Nahrungsmittelherstellung [Gärungen –Wein, Bier, Essig, Käse, Sauerteig, Joghurt]

•Pasteur-Ära(1865 –1940)

– Verfahren ohne absoluten Ausschluss von Fremdkeimen [Fermentation (Butanol,Aceton, Ethanol), Oberflächenkultur (Citronensäure), Biomasse (Bäckerhefe, Futterhefe)]

•Antibiotika-Ära(1940 –1960)

– Steriltechnik und selektionierte Stämme [Submers-Verfahren (Penicillin), tier. Zellkultur [Virus-Impfstoffe], Biotransformationen [Cortison, Vitamin B12, Ovulationshemmer)]

•Post-Antibiotika-Ära(1960 –1975)

– Bioprozesstechnik (Reaktorform, Immobilisierung, Steuerung, etc) [SCP, Enzyme (Waschmittel), Polysaccharide (Xanthan), Fructosesirup, Biogas, Industrie-Alkohol]

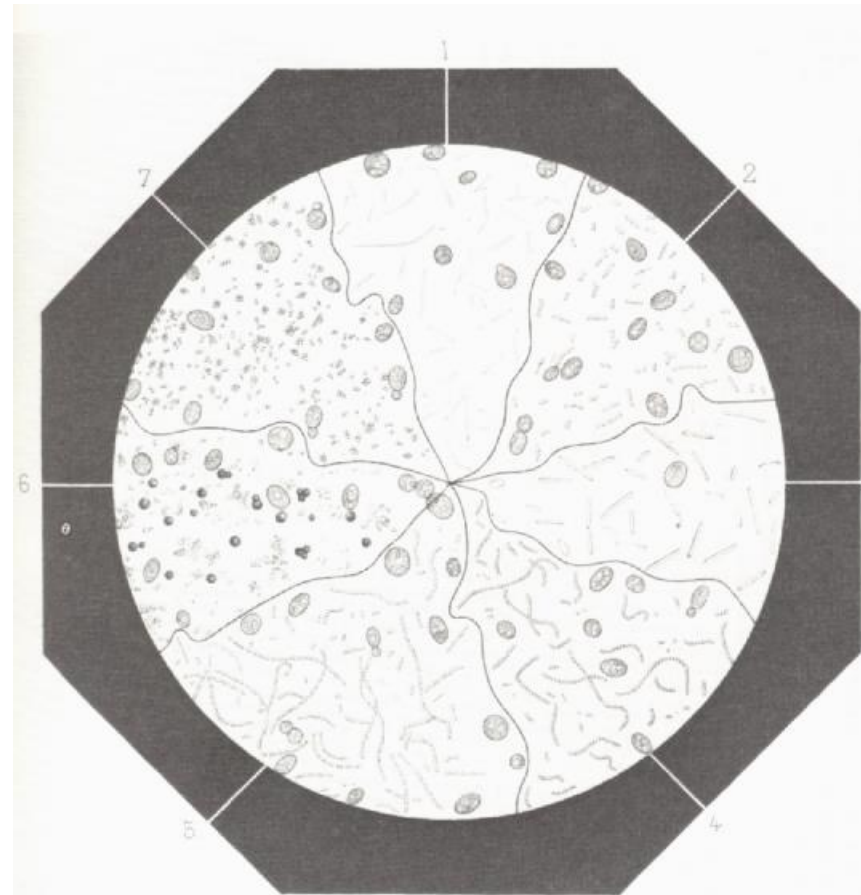
•Neue Biotechnologie(1975 -)

– Gezielte Optimierung von Biosystemen [Hybridoma-Technik (MAK); rekombinante Proteine (Insulin, Impfstoffe), etc.]

Luis Pasteur
1884



**Mikroorganismen
sind für Gärvorgänge
verantwortlich**



Geschichte der Biotechnologie

•Prä-Pasteur-Ära(vor 1865)

– unbewusste Nutzung v. Mikroorganismen bei der Nahrungsmittelherstellung [Gärungen –Wein, Bier, Essig, Käse, Sauerteig, Joghurt]

•Pasteur-Ära(1865 –1940)

– Verfahren ohne absoluten Ausschluss von Fremdkeimen [Fermentation (Butanol,Aceton, Ethanol), Oberflächenkultur (Citronensäure), Biomasse (Bäckerhefe, Futterhefe)]

•Antibiotika-Ära(1940 –1960)

– Steriltechnik und selektionierte Stämme [Submers-Verfahren (Penicillin), tier. Zellkultur [Virus-Impfstoffe], Biotransformationen [Cortison, Vitamin B12, Ovulationshemmer)]

•Post-Antibiotika-Ära(1960 –1975)

– Bioprozesstechnik (Reaktorform, Immobilisierung, Steuerung, etc) [SCP, Enzyme (Waschmittel), Polysaccharide (Xanthan), Fructosesirup, Biogas, Industrie-Alkohol]

•Neue Biotechnologie(1975 -)

– Gezielte Optimierung von Biosystemen [Hybridoma-Technik (MAK); rekombinante Proteine (Insulin, Impfstoffe), etc.]

Gregor Mendel

Um 1860



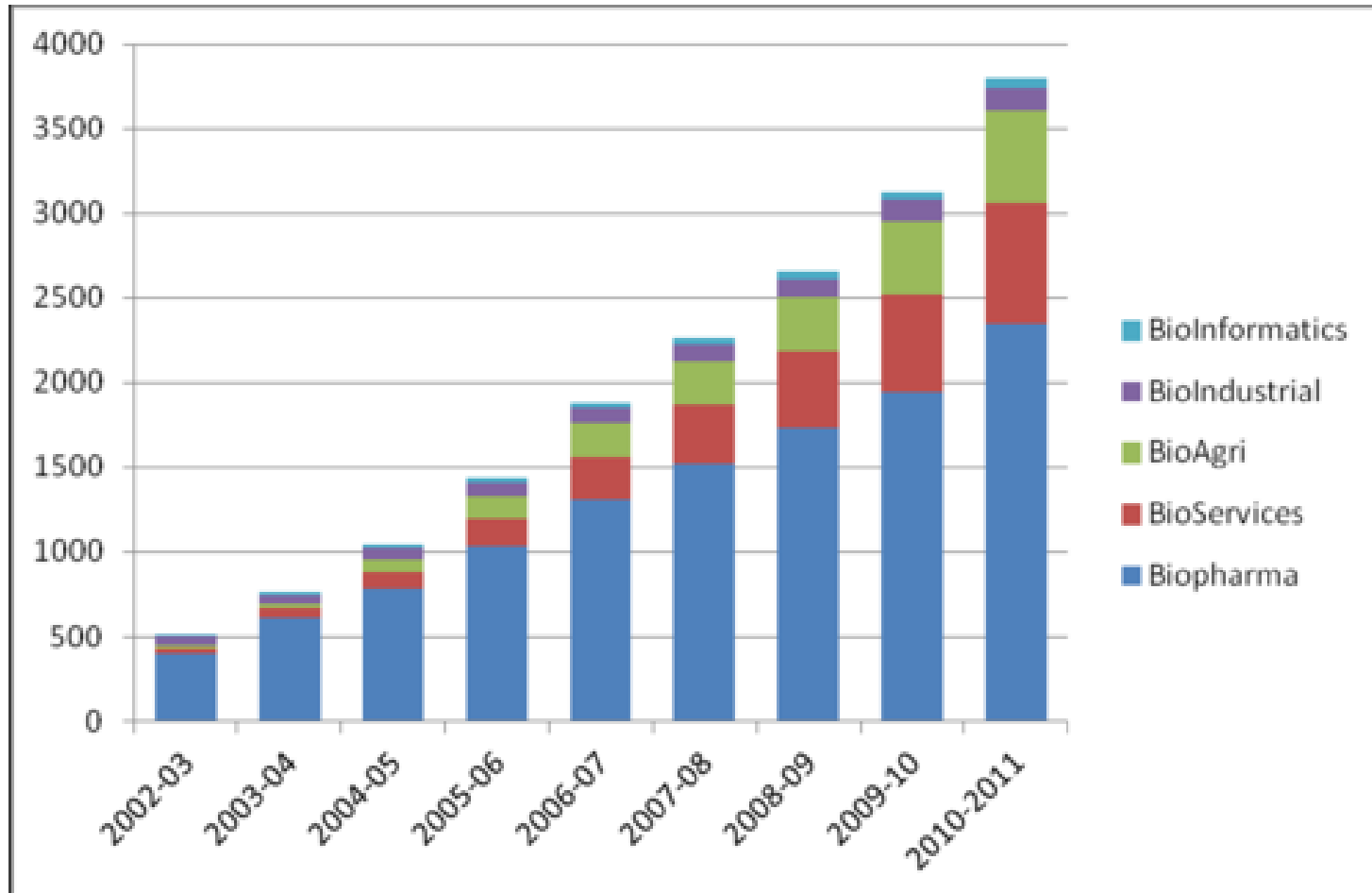
**Gene bestimmen
Eigenschaften
von Lebewesen**



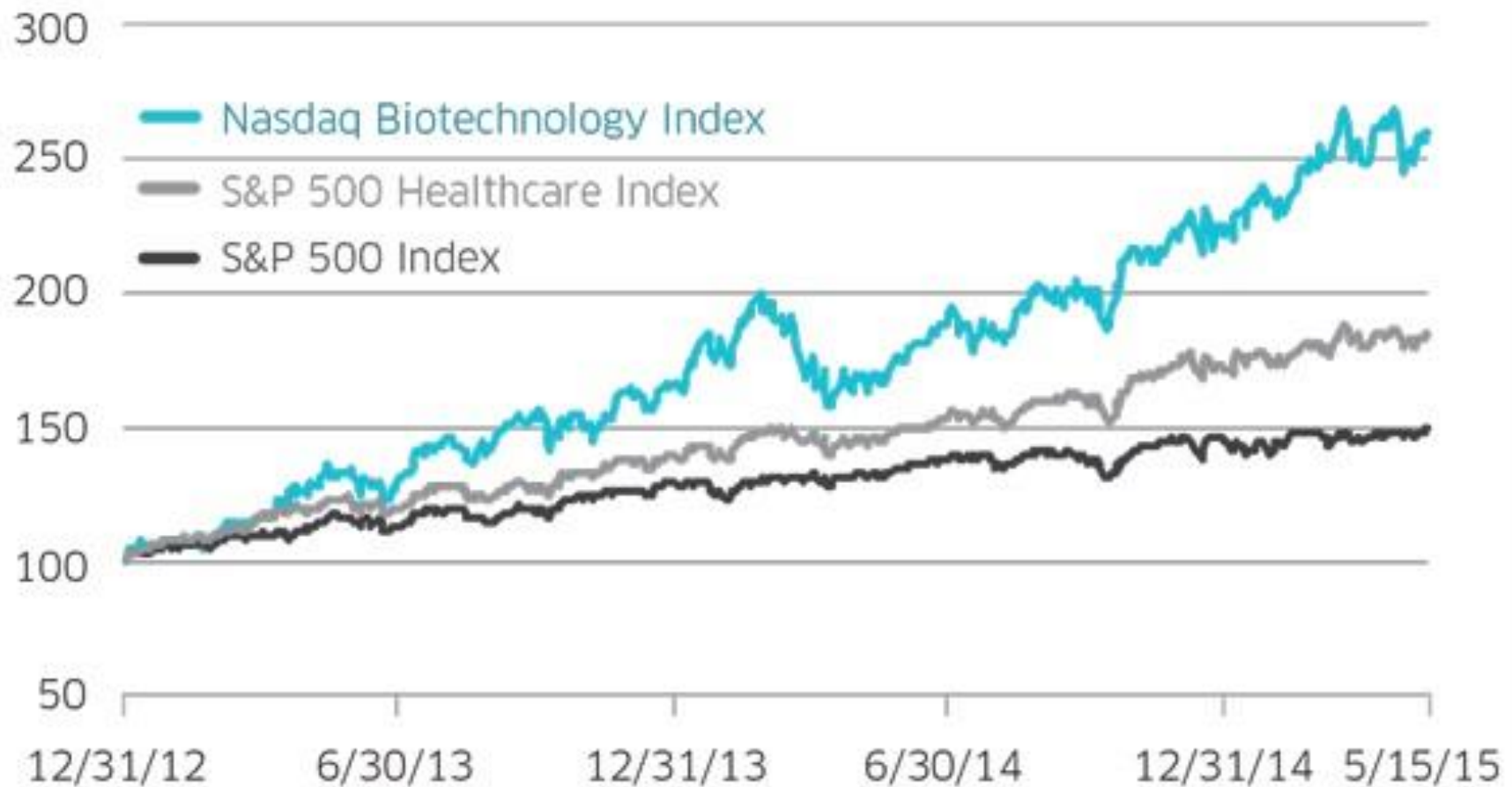
Geschichte der Biotechnologie

- **Prä-Pasteur-Ära**(vor 1865)
 - unbewusste Nutzung v. Mikroorganismen bei der Nahrungsmittelherstellung [Gärungen –Wein, Bier, Essig, Käse, Sauerteig, Joghurt]
- **Pasteur-Ära**(1865 –1940)
 - Verfahren ohne absoluten Ausschluss von Fremdkeimen [Fermentation (Butanol, Aceton, Ethanol), Oberflächenkultur (Citronensäure), Biomasse (Bäckerhefe, Futterhefe)]
- **Antibiotika-Ära**(1940 –1960)
 - Steriltechnik und selektionierte Stämme [Submers-Verfahren (Penicillin), tier. Zellkultur [Virus-Impfstoffe], Biotransformationen [Cortison, Vitamin B12, Ovulationshemmer)]
- **Post-Antibiotika-Ära**(1960 –1975)
 - Bioprozesstechnik (Reaktorform, Immobilisierung, Steuerung, etc) [SCP, Enzyme (Waschmittel), Polysaccharide (Xanthan), Fructosesirup, Biogas, Industrie-Alkohol]
- **Neue Biotechnologie**(1975 -)
 - Gezielte Optimierung von Biosystemen → Gentechnik, Synthetic Biology [Hybridoma-Technik (MAK); rekombinante Proteine (Insulin, Impfstoffe), etc.]

Biotechnologie - Marktanteile



https://www.google.com/search?q=biotechnology+market&tbm=isch&imgil=cO_oGbnVgo6irM%253A%253BcXM4s8r8QivAFM%253Bhttp%25253A%25252F%25252Fwww.differding.com%25252Fpage%25252Fpharma_and_biotechnology_activities_in_india%25252Ff1.html&source=iu&pf=m&fir=cO_oGbnVgo6irM%253A%25252CcXM4s8r8QivAFM%25252C_&biw=882&bih=436&usg=__XNXaZy-MeNX2ZFTRGCLddoYJr8Y%3D&ved=0CDYQyjdqFQoTCJ-L8ZHYxcgCFUQ6FAod9X0Eka&ei=iT4gVt-iGcT0UPX7kYAJ#tbm=isch&tbs=rimg%3ACXDv6Bm51YKOljhGHQqr2SjNzrpR4fflVqtzQ0MtCXqgFIZ57vJXp5thaLWjANgXNkgsPSTfmB1CvB0yjjU0v0E7sCoSCUYdBCvZIk3OEYXX3vZThyx8KhIJulHh98hWq3MRVWWitnV7jGoqEglDQy0JeqAUhhGfcEhZ8xUTKyoSCXnu8lenm2FoEflIQtnXPQErKhIJaMA2Bc2SCwR4ZoS3VK1PqEqEgk9JN-YHUK8HRGIFqPn22RJFCoSCTKONTS_1QTuwEZMpaPNB-9cc&q=biotechnology%20market&imgrc=cO_oGbnVgo6irM%3A



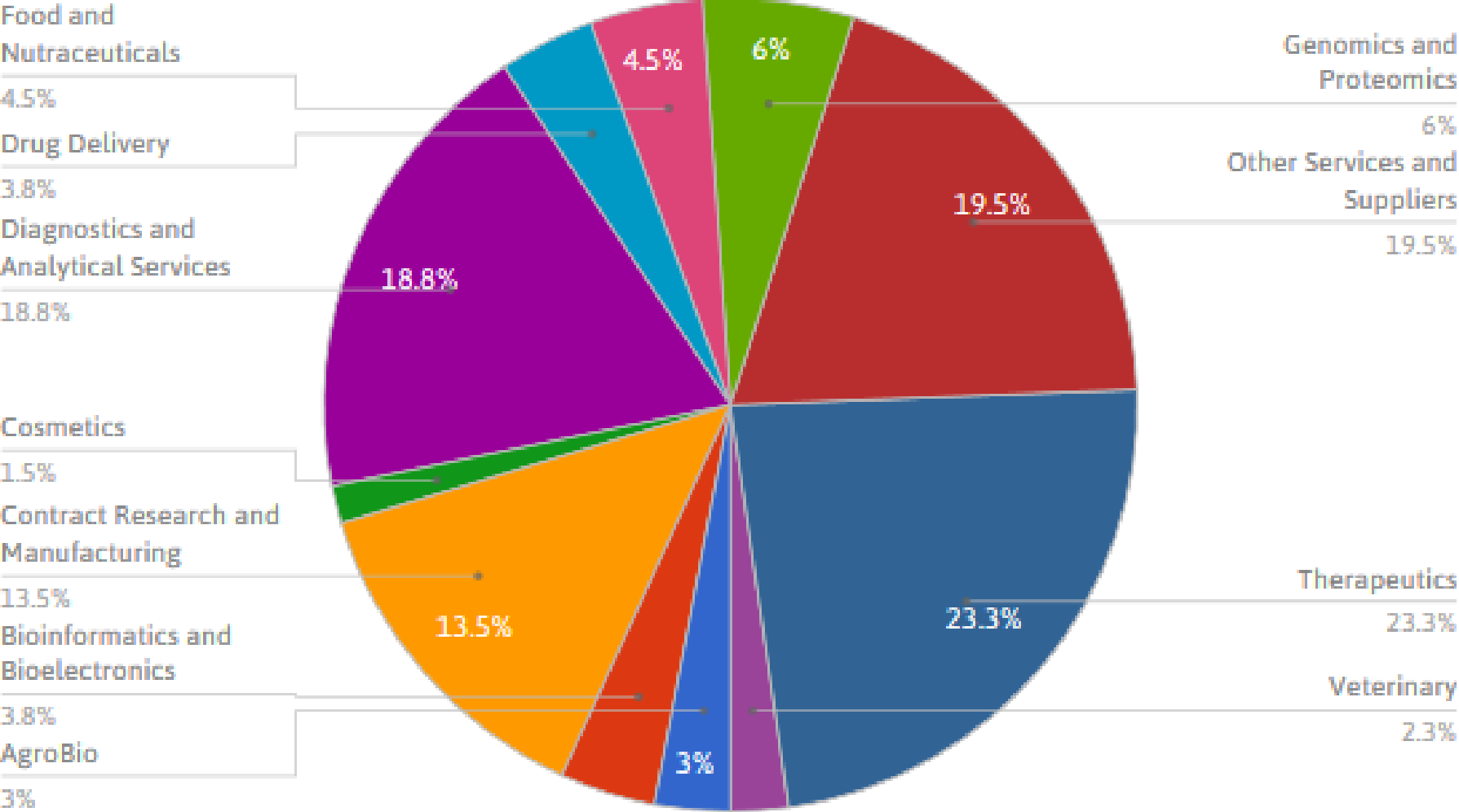
<http://business.nasdaq.com/marketinsite/2015/Biotech-The-Growth-Story-Continues.html>

Der S&P 500 (Standard & Poor's 500) ist ein Aktienindex, der die Aktien von 500 der größten börsennotierten US-amerikanischen Unternehmen umfasst.

Marktzahlen einiger Bioprodukte (um 2000)

	~ Menge	~ Wert	
Bier	130000000 t	330 Mrd. €	2,50 €/kg
Ethanol	19000000 t	5 Mrd. €	0,25 €/kg
Glutaminsäure	800000 t	800 Mio. €	1,00 €/kg
Citronensäure	700000 t	700 Mio. €	1,00 €/kg
Waschmittelprotease	100000 t	300 Mio. €	3,00 €/kg
Cephalosporine	-	4,5 Mrd. €	-
Aspartam	10000 t	50 Mio. €	5,00 €/kg
Tetracycline	5000 t	250 Mio. €	50,00 €/kg
Insulin	8 t	1 Mrd. €	125,00 €/kg
Erythropoietin	-	4 Mrd. €	-

Biotech Companies in Austria



Biotechnologie in Österreich

Firma	Größe	Produkte
Baxter AG	>4000	Impfstoffe, therap. Proteine
Berglandmilch	>500	Sauermilchprodukte, Käse
Biochemie → Sandoz	>1000	Antibiotika, Alkaloide, rekomb. Proteine
Boehringer	>1000	rekomb. Proteine; Gentherapeutika
Brau Union	>500	Bier (8 Braustätten)
Altec Umwelttechnik	> 50	biol. Bodensanierung
Centeon Pharma	> 50	Blutplasmaderivate
Jungbunzlauer	> 50	Citronensäure, Xanthan
STAMAG	> 50	Braumalz; Backhilfsmittel
Vogelbusch	> 50	Apparatebau
Intercell → Valneva	> 200	Gentechnische Impfstoffe
Polymun	> 50	Rekombinante Antikörper



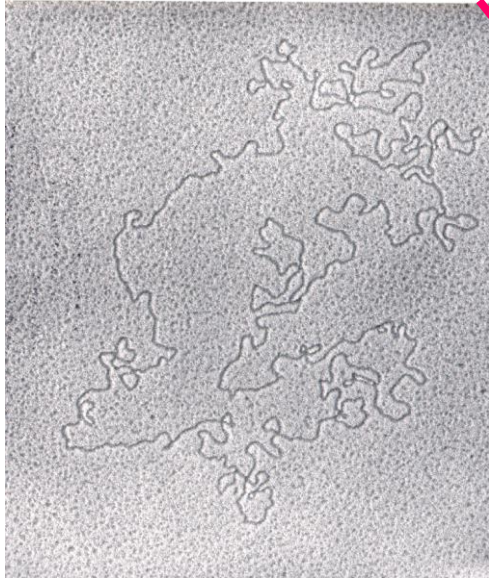
Bier (Österreich) 8,6 Mio hl; 960 Mio €; 115 Braustätten; 4400 Beschäft.

Wein (Österreich) 2,2 Mio hl; 35.000 Betriebe

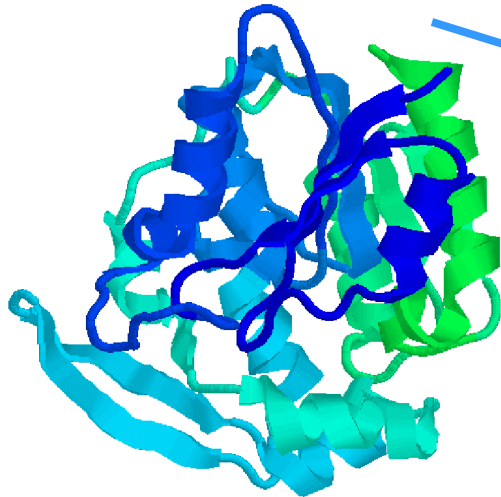
Moderne Biotechnologie → Knowledge based

Die Zellfabrik

Steuerzentrale

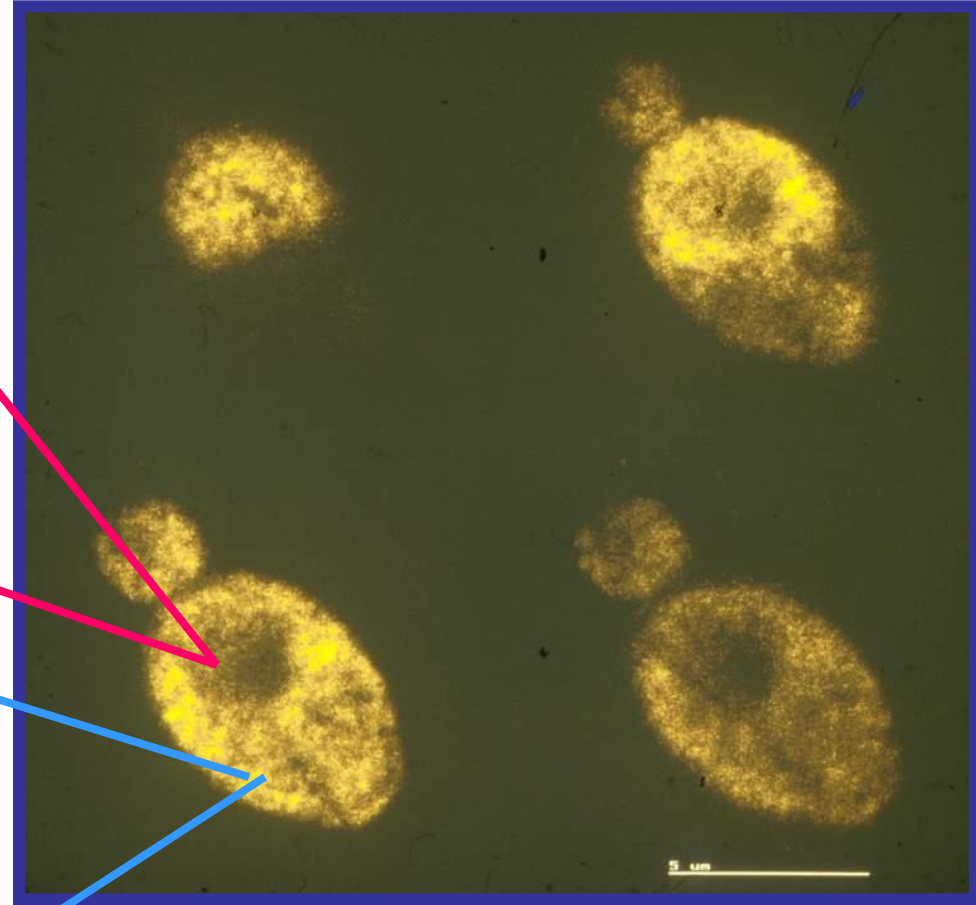


DNA



Proteine
Enzyme

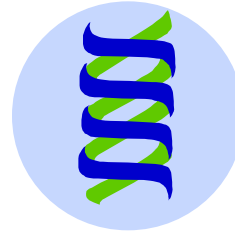
Produktionsstätte



Moderne Biotechnologie → Knowledge based

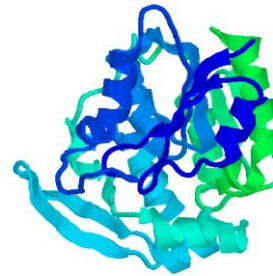
ORGANISMEN

GENOM

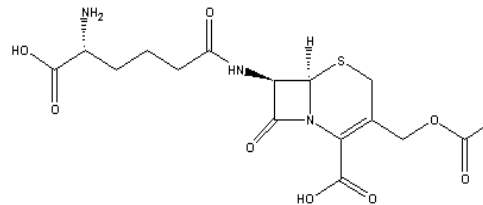


TRANSKRIPTOM

PROTEOM

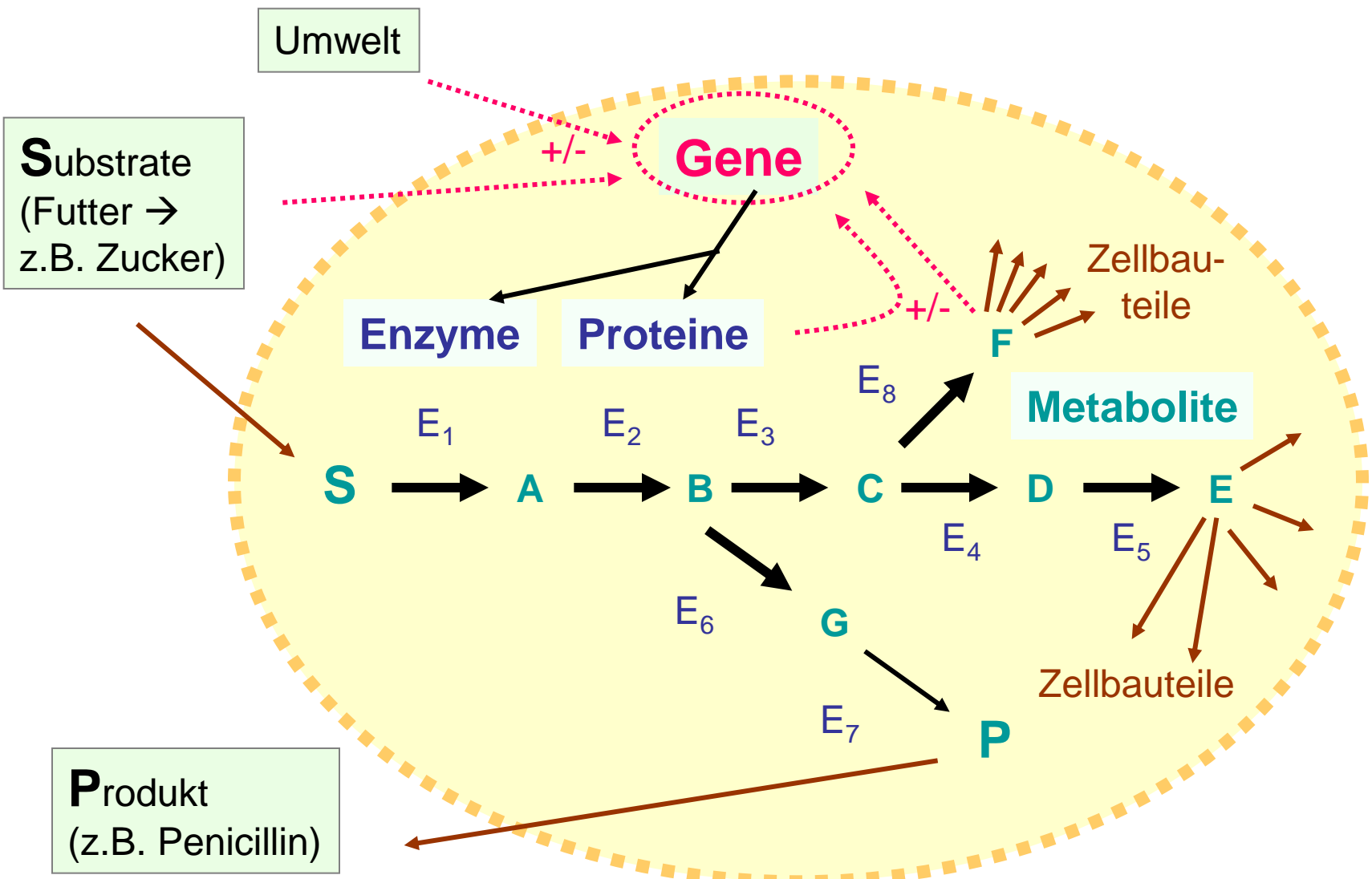


METABOLOM



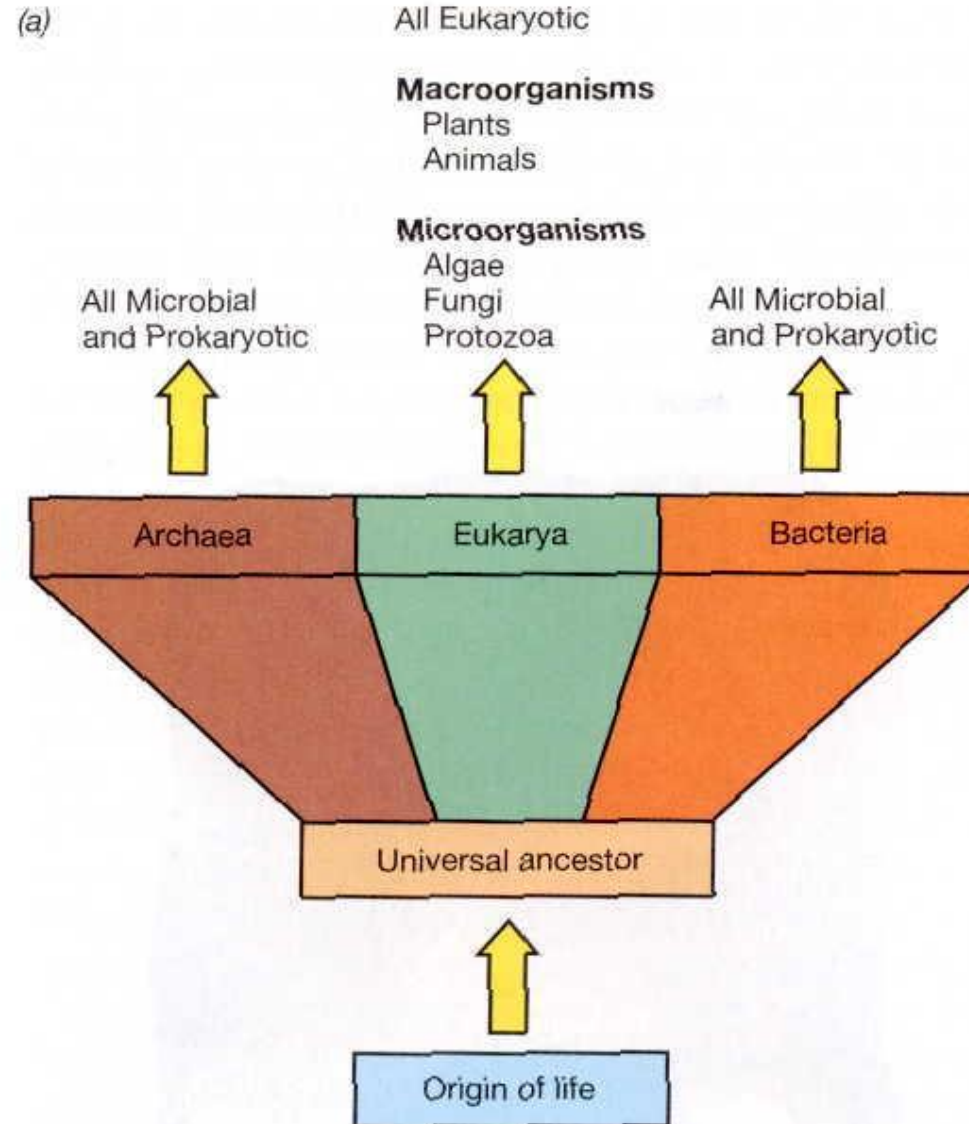
Moderne Biotechnologie → Knowledge based

Zelle - Funktion



1. Schritt zur Etablierung eines Biotechnologischen Prozesses

Suche nach geeigneten Organismen in der Biodiversität der Natur



Natur

Breite Biodiversität

1. Schritt zur Etablierung eines Biotechnologischen Prozesses

Suche nach geeigneten Organismen in Biodiversität der Natur

Genutzte Biosysteme in der Biotechnologie

Mikroorganismen

Bakterien

Milchsäurebakterien
Corynebakterien
Streptomyceten
Bacilli
Escherichia coli

Pilze

Hefen
(*S. cerevisiae*, *P.pastoris*)
Filamentöse Pilze
(*Aspergillus* sp.,
Penicillium chrysogenum)

Algen

Pflanzen

Zellkulturen
Kalluskulturen
Transgene Pflanzen

Tiere

Zellkulturen
Insektenzellen
Säugerzellen (CHO)
Transgene Tiere

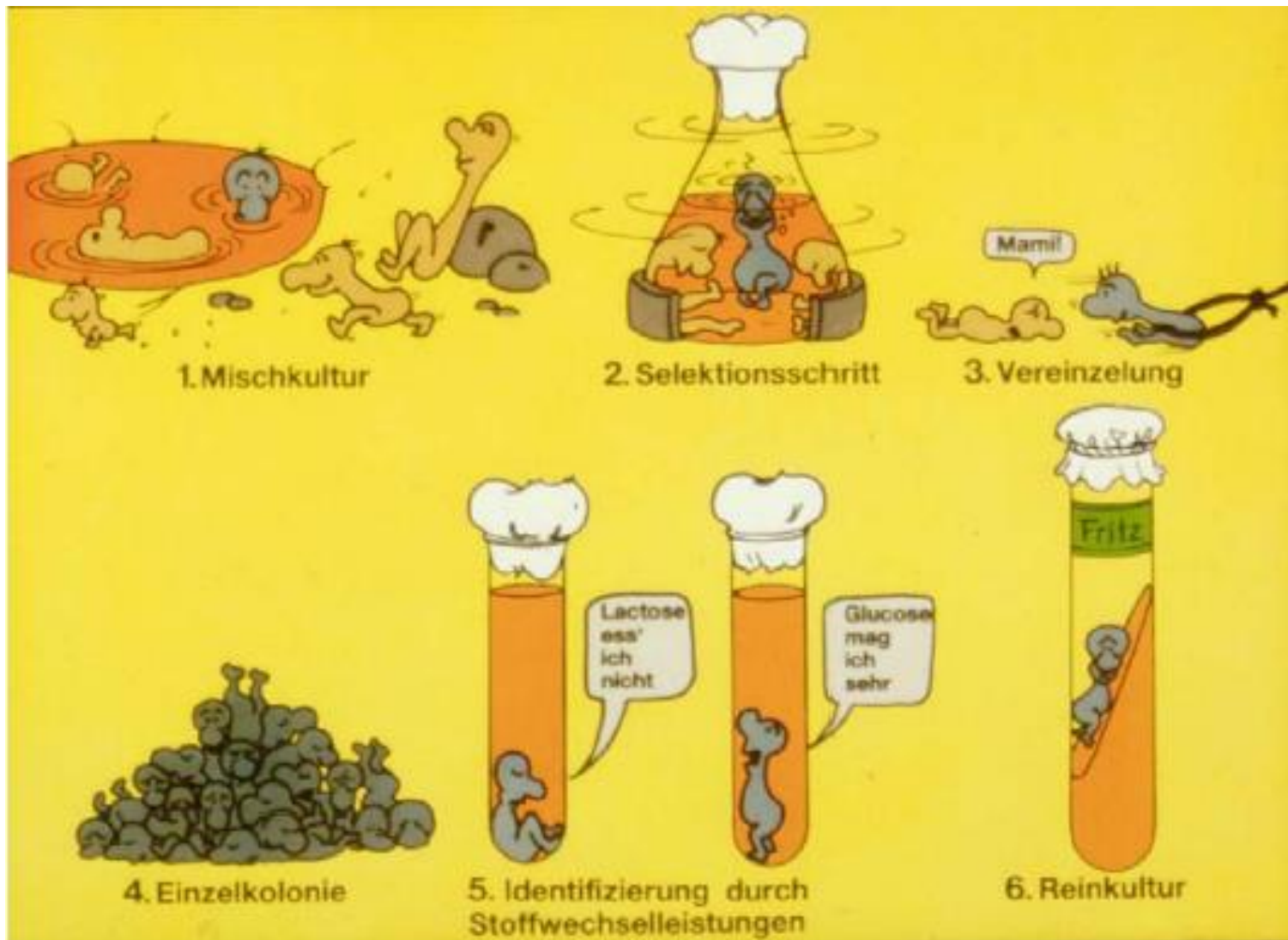
Enzyme → Enzymtechnik & Biokatalyse

Isolierte Enzyme

1. Schritt zur Etablierung eines Biotechnologischen Prozesses

Suche nach geeigneten Organismen in der Biodiversität der Natur

→ Definierte Biologie = Reinkulturen



2. Schritt zur Etablierung eines Biotechnologischen Prozesses

Entwicklung des biologischen Systems

Aus der Natur isolierte Stämme sind zwar fähig, gewünschtes Produkt herzustellen
→ aber meist sind viele Parameter nicht zufriedenstellend

z.B.:

Wachstumsverhalten
Produktbildung
Zelleigenschaften

Verwertung von Nährstoffen
Bildung von Nebenprodukten
Generelle Prozesseigenschaften

Optimierung im Labormaßstab

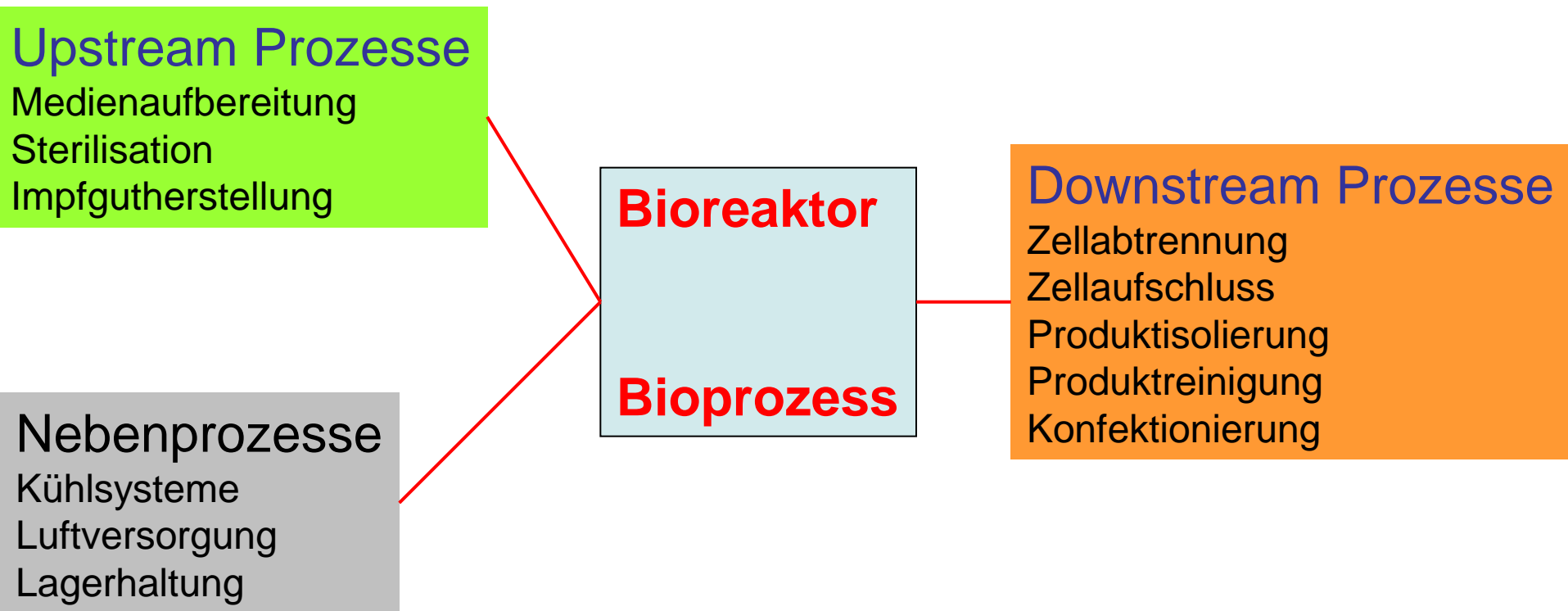
Physiologische Bedingungen
- Nährmedien, Substrate
- physikal./chem. Parameter: T, pH, O₂
- Prozessführung (batch, kontinuierlich)

Genetische Optimierung
- Evolutionäre Verfahren
- Gezieltes Engineering
- Metabolic Engineering
- Protein Engineering

Optimiertes Laborverfahren

3. Schritt zur Etablierung eines Biotechnologischen Prozesses

Prozessentwicklung



Scale – up

Laborverfahren →

Pilot Plant

→

Produktionsanlage

Upstream Prozesse

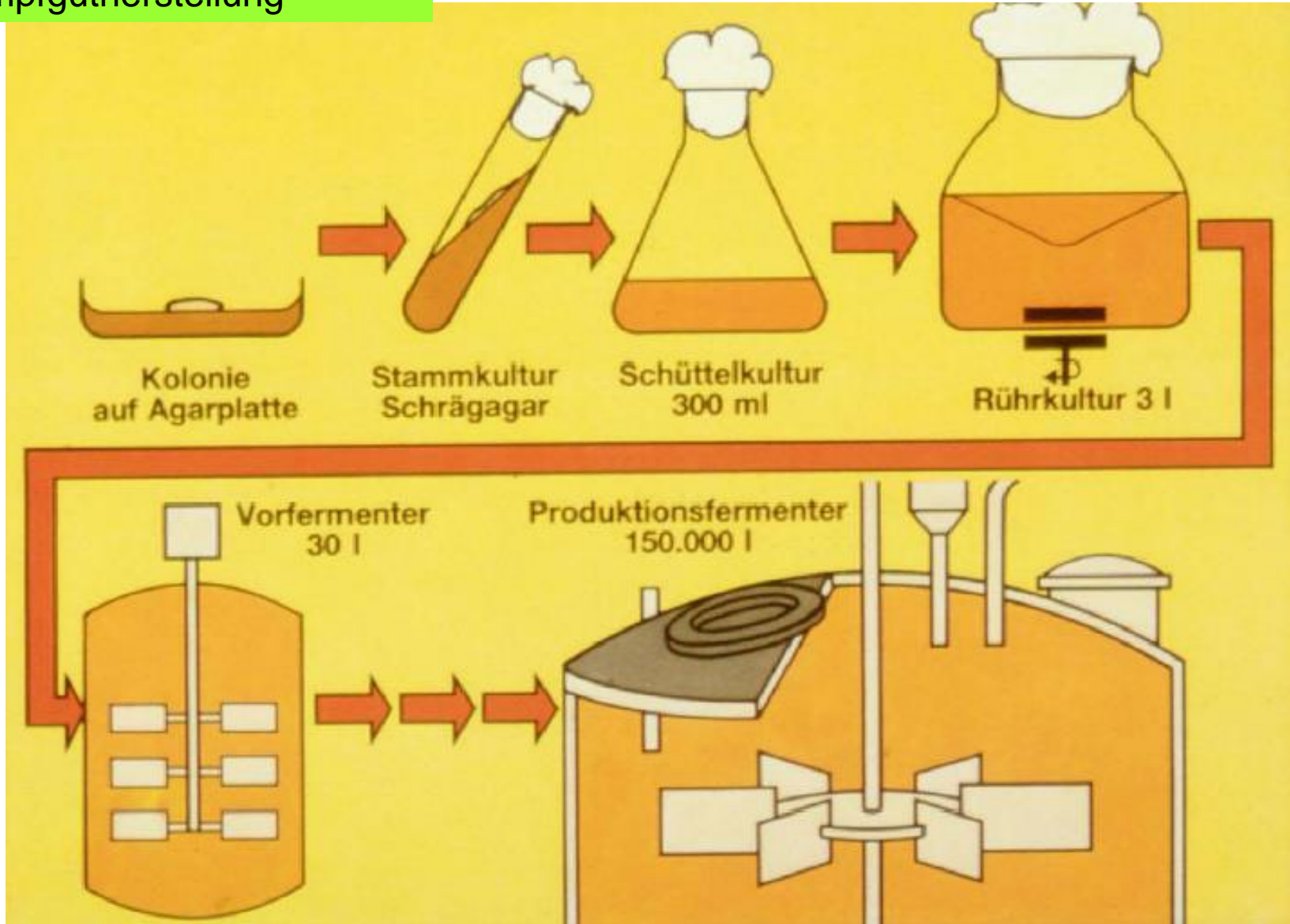
Medienaufbereitung

Sterilisation

Impfgutherstellung

Abfolge eines Bioprozesses

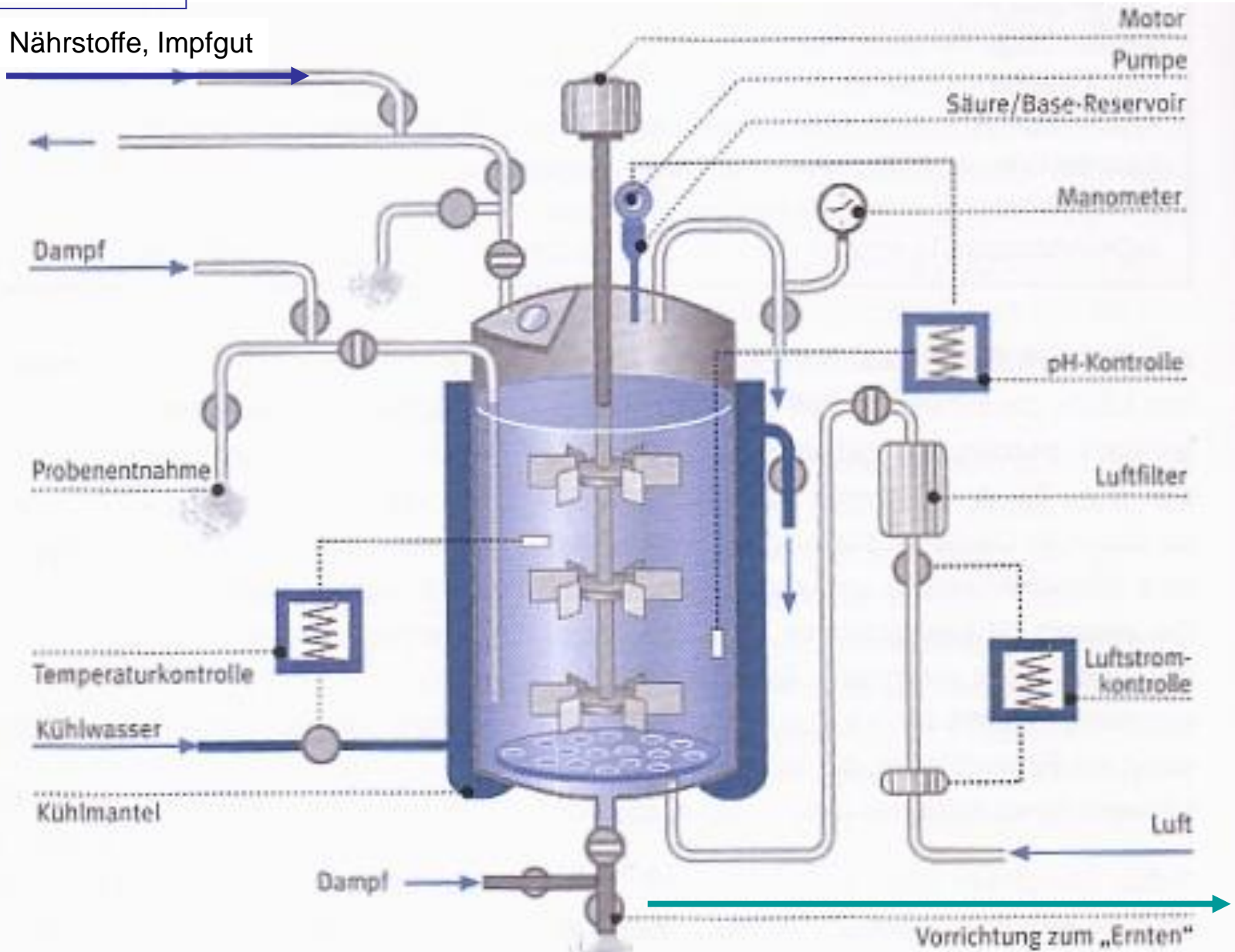
Kulturführung



Bioreaktor – System zur kontrollierten Züchtung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Upstream

Nährstoffe, Impfgut



Downstream



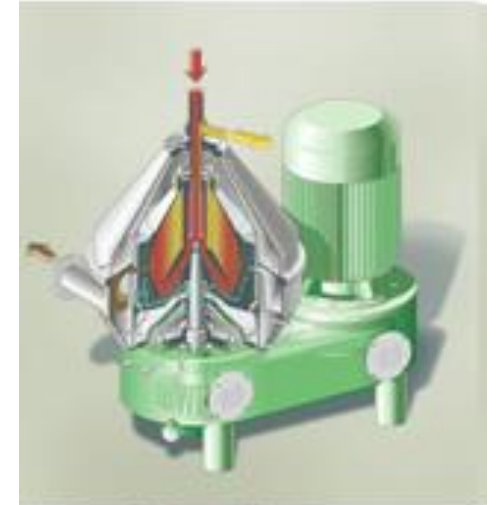
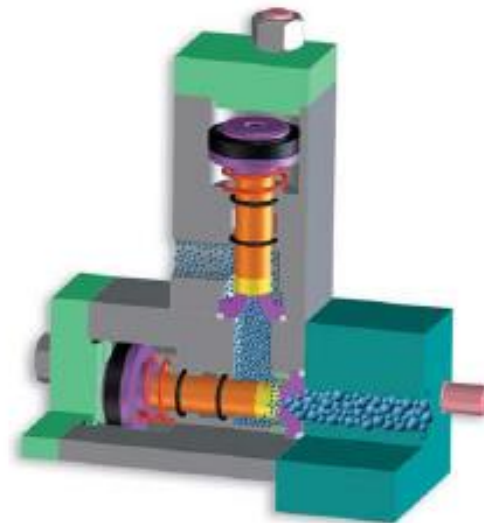
Downstream Prozesse

Zellabtrennung
Zellaufschluss
Produktisolierung
Produktreinigung
Konfektionierung

Zellabtrennung

Filtration

Zentrifugation



Zellaufschluss
Hochdruckhomogenisatoren

Für den Bioprozess wichtige Phasen im Biosystem

Wachstum von Mikroorganismen → Produktion der Biomasse

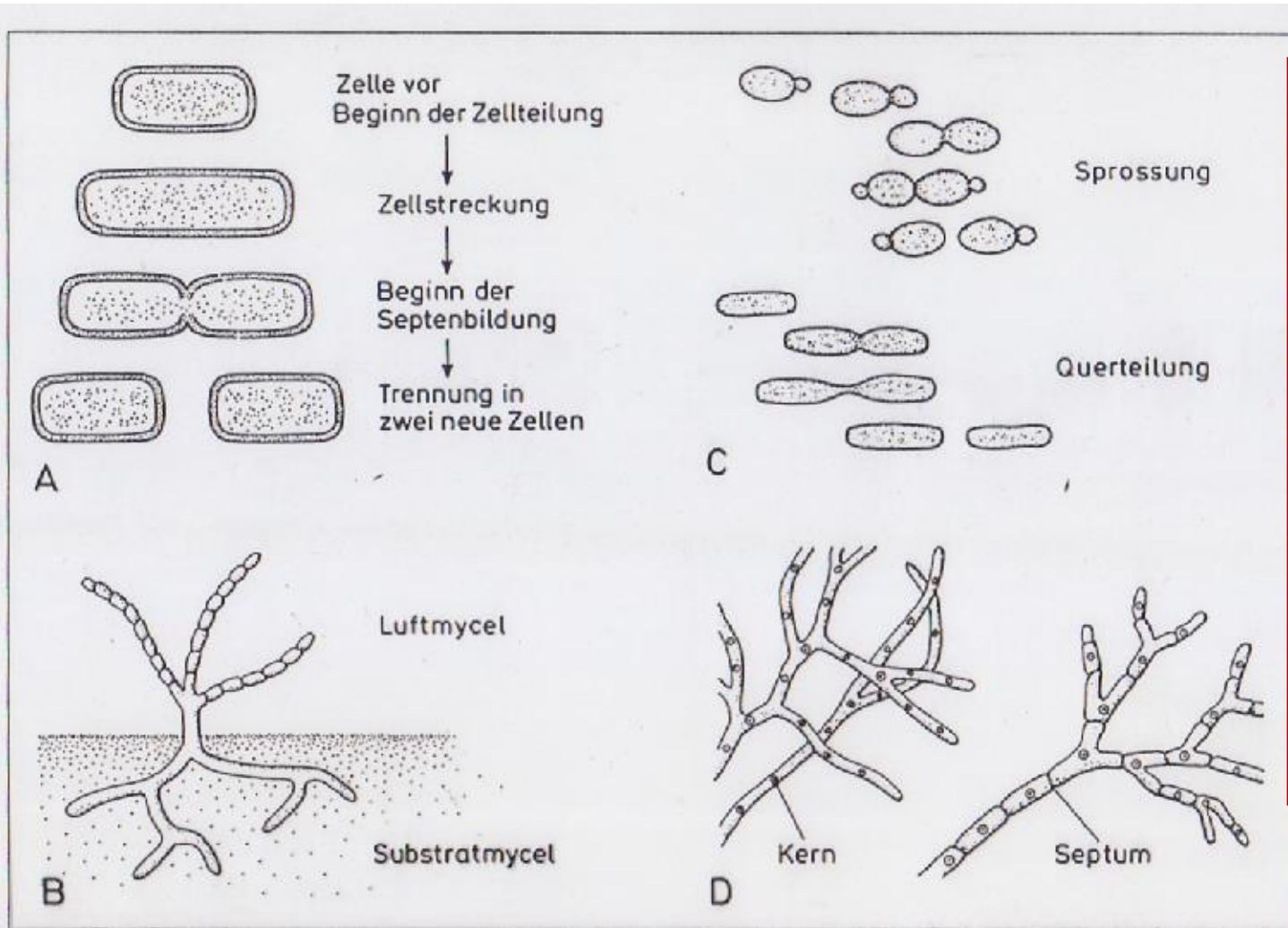
Biomasse → Produkt

Biomasse → biokatalytische Kapazität

Produktbildung

Metabolische Fähigkeiten
Genexpression

Wachstum von Mikroorganismen



Einzellig

- symmetrisch
- asymmetrisch
- Kettenwachstum

Hyphenwachstum

- mehrkernig
- septiert

Flockenbildung

Pelletbildung

Biofilme

Abb. 2-46. Vermehrung von Mikroorganismen-Zellen. A: Querteilung bei Bakterien. B: Substrat- und Luftmycel bei Streptomyceten. C: Sprossung (z. B. *Saccharomyces*) und Querteilung (z. B. *Schizosaccharomyces*) bei Hefen. D: Längenwachstum und Verzweigungen bei septierten und nicht-septierten mycelbildenden Pilzen.

Wachstum von Mikroorganismen

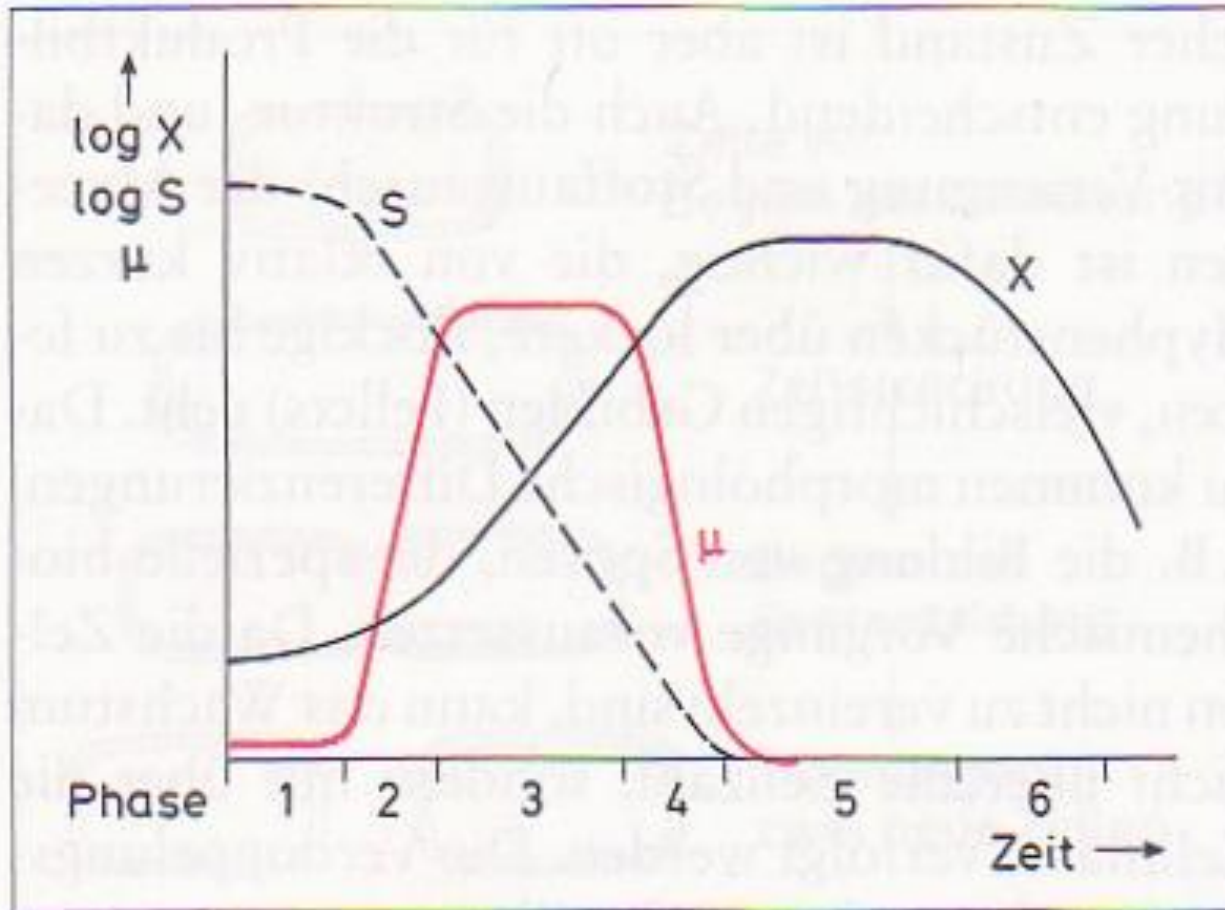


Abb. 2–47. Verlauf einer Satz-(*batch*)Kultur. X = Zelldichte (Trockenmasse/Volumen), S = Substratkonzentration, μ = spezifische Wachstumsrate, 1 = lag-Phase, 3 = exponentielle Phase, 2 und 4 = Übergangsphasen, 5 = stationäre Phase, 6 = Absterbephase.

Wachstum von Mikroorganismen

Exponentielles Wachstum

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

X = Biomasse
N = Zellzahl
 μ = spez. Wachstumsrate

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu$$

Integration

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu \cdot t$$

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Verdoppelungszeit

$$\ln \frac{2 X_0}{X_0} = \mu \cdot \tau$$

$$\frac{\ln 2}{\mu} = \tau$$

Substrat-limitiertes Wachstum

Monod

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot X$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

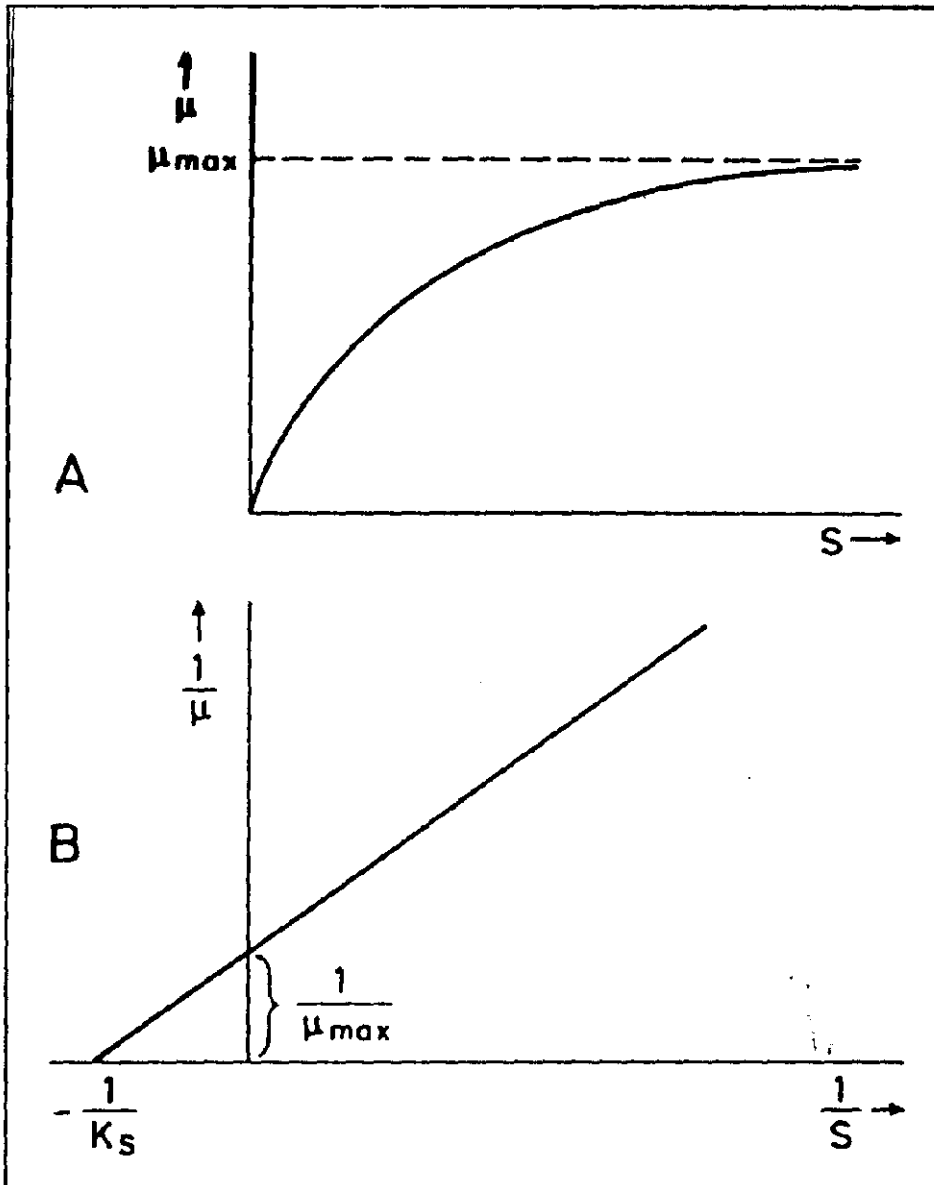


Abb. 2-48. Wachstum als Funktion der Substratkonzentration. **A:** Die spezifische Wachstumsrate μ nähert sich mit zunehmender Substratkonzentration μ_{\max} . **B:** Grafische Bestimmung der Substratsättigungskonstante K_S .

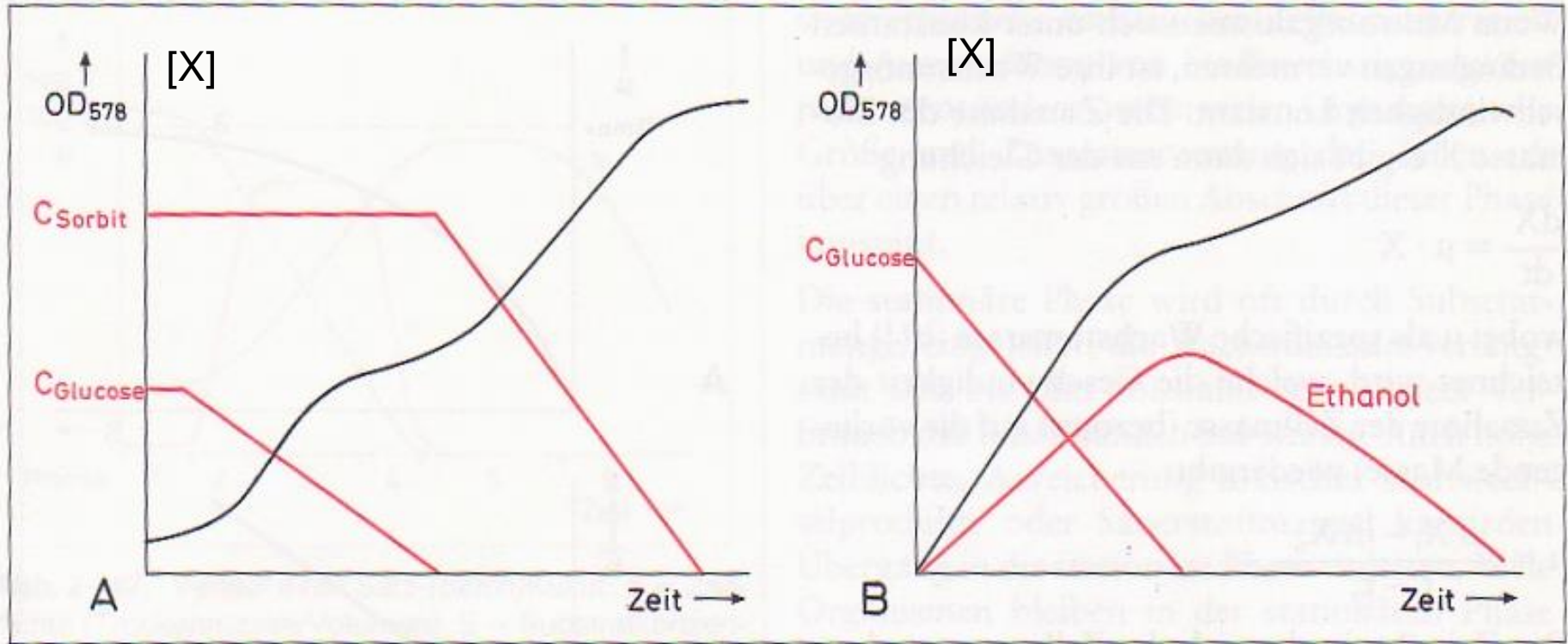


Abb. 2-49. Zweiphasiges Wachstum. **A:** *Escherichia coli* auf Glucose: Sorbit = 1:2. **B:** *Saccharomyces cerevisiae* auf Glucose. Zweite Wachstumsphase durch Abbau des (bei hohen Glucose-Konzentrationen) in der ersten Phase gebildeten Ethanols.

Wachstum – Temperaturabhängigkeit

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \alpha X$$

Zuwachs - Absterben

α = spez. Absterberate

$$\mu = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

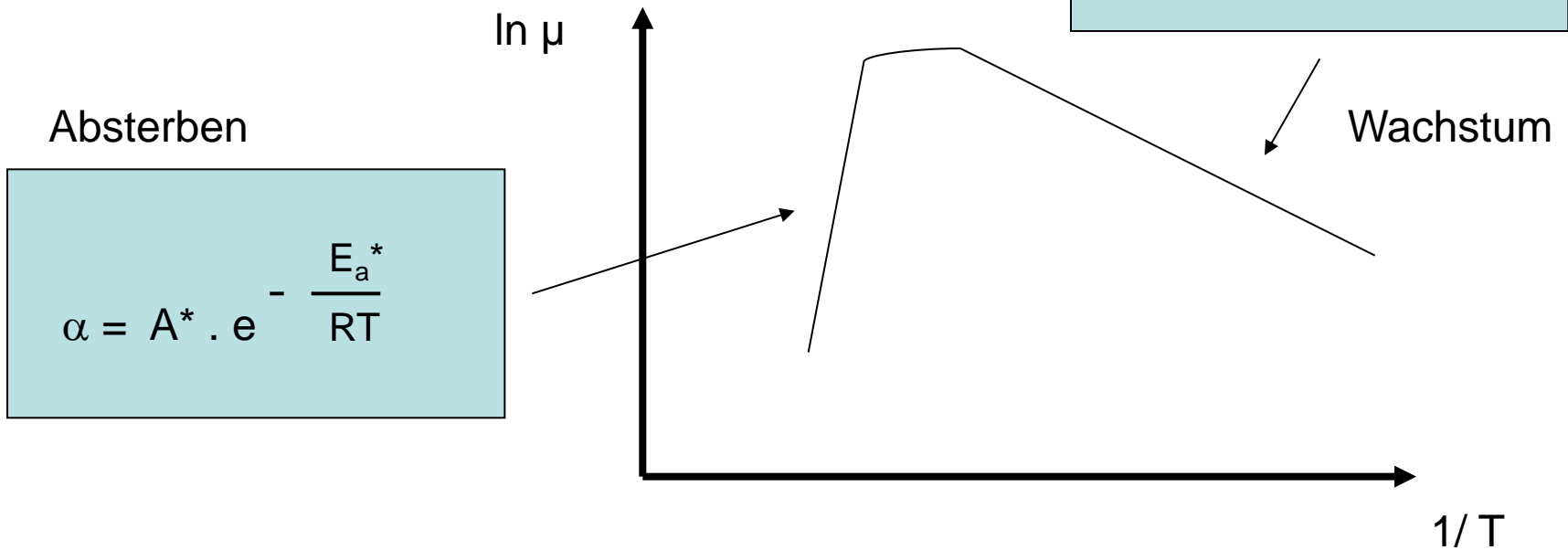
Absterben

$$\alpha = A^* \cdot e^{-\frac{E_a^*}{RT}}$$

$\ln \mu$

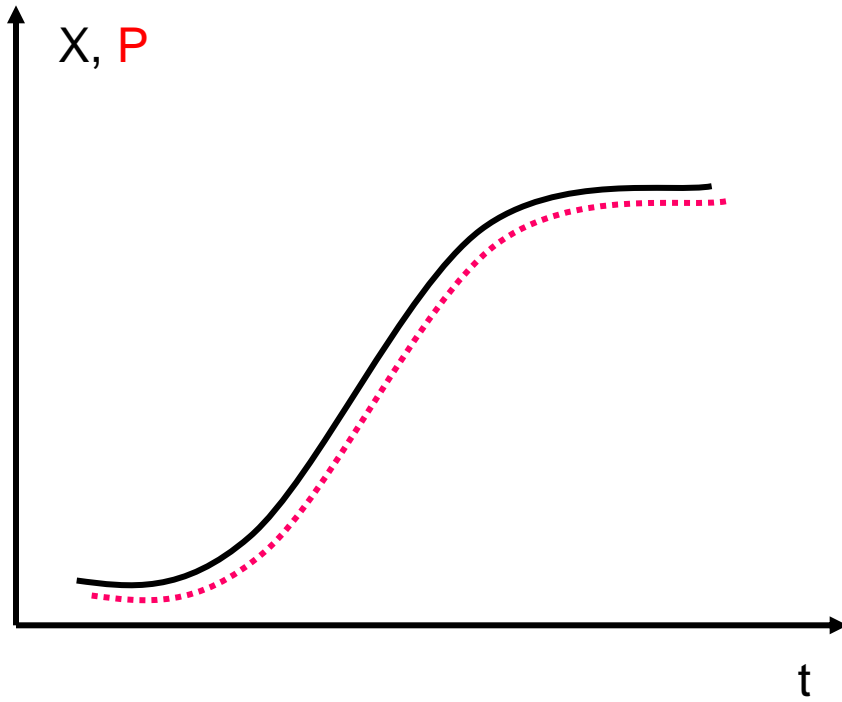
Wachstum

$1/T$

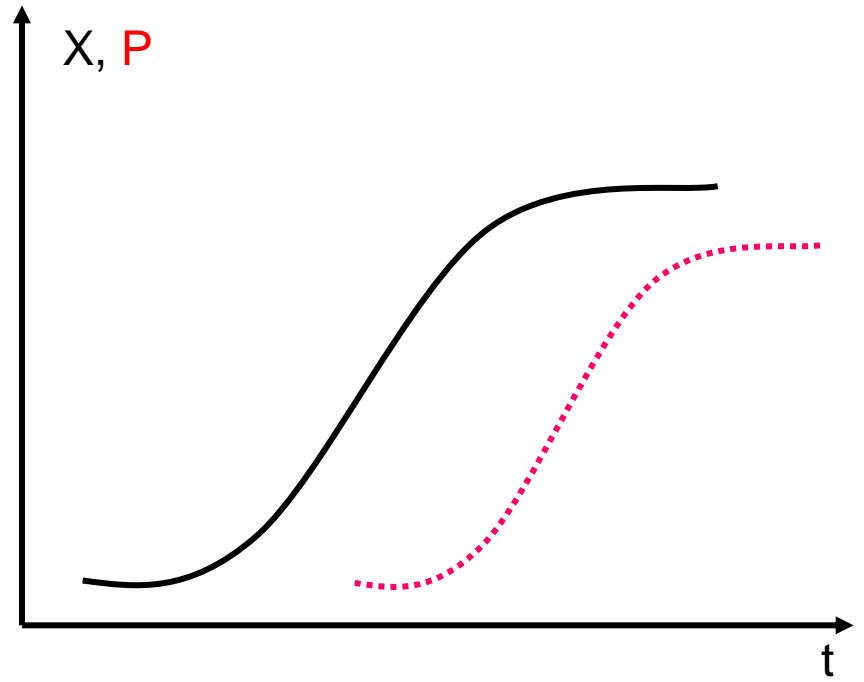


Produktbildung

Wachstumsassoziiert



Nicht wachstumsassoziiert



Zellzahl (nur einzellige Organismen)
Thoma Zählkammer (mikroskopisch)
Cell Counter
CFU (colony forming units)

in situ ← → ex situ
online ← → offline

Biomasse (direkte Verfahren): **Gravimetrisch - Volumetrisch**

ZTM (Zelltrockenmasse)
ZFM (Zellfeuchtmasse)
Frischvolumen (Zentrifugation)

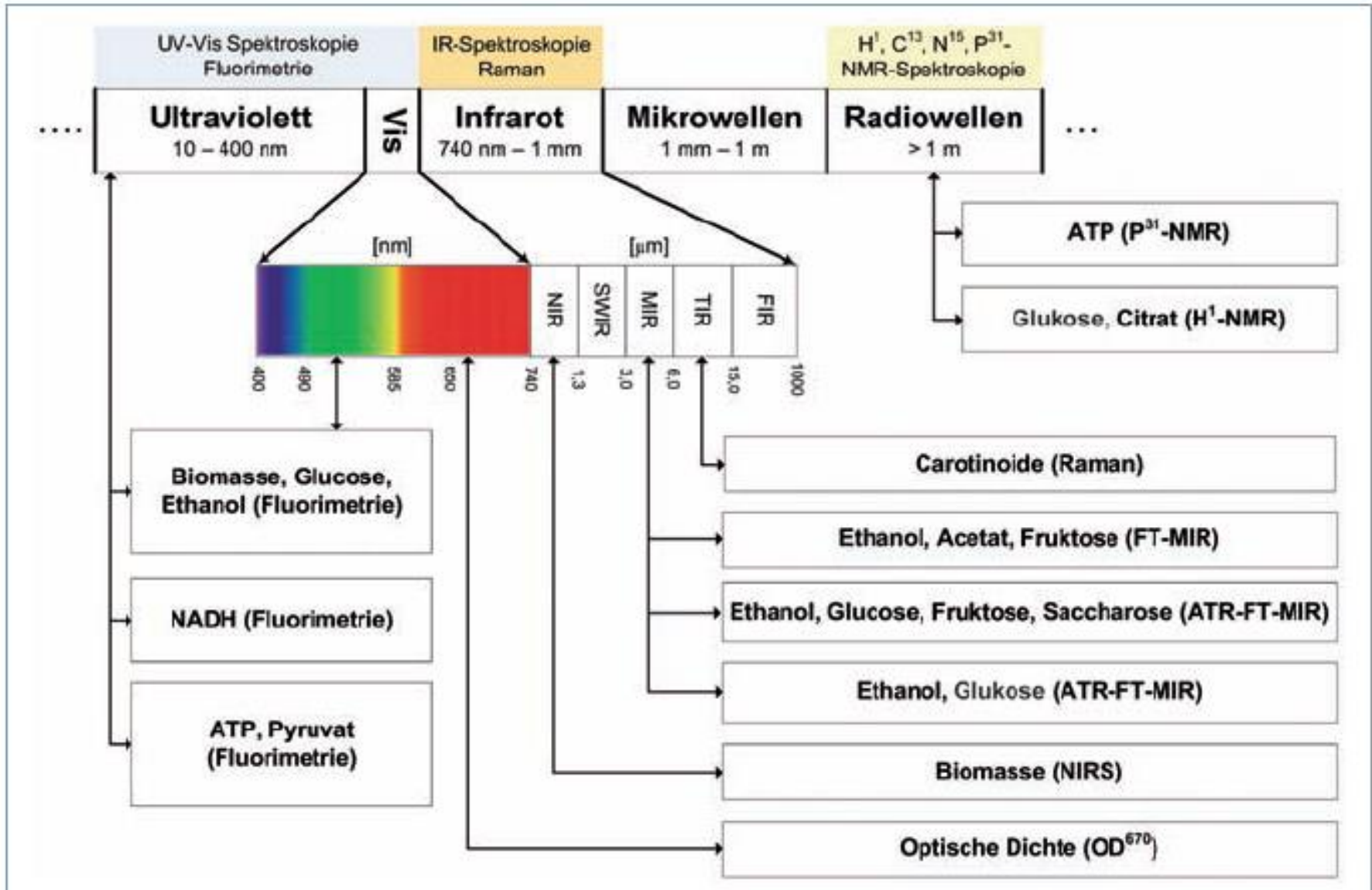
Probleme: **Feststoffe in Medium**

Biomasse (indirekte Verfahren)

Trübungsmessung (Optische Dichte)
Viskosität, Dichte
Redoxpotential
Stoffwechselfparameter (z.B. dO_2/dt , dCO_2/dt , dpH/dt etc.)
Zellinhaltsstoffe (z.B. DNA, RNA, ATP, N-Gehalt, Proteingehalt etc.)
Energiebilanz (Wärmebildung)
Spektroskopie (NMR, IR – Raman, UV-Vis, Fluorimetrie)

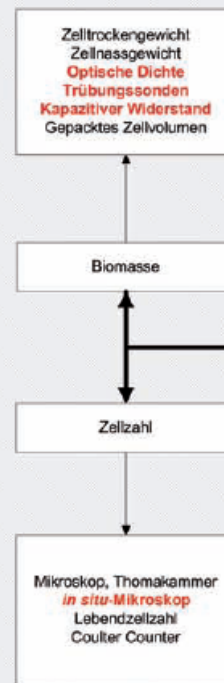
Probleme: **Abhängigkeit von physiolog. Zustand der Biomasse**

Elektromagnetisches Spektrum und Beispiele der Anwendung optischer Messungen zur Bestimmung von biotechnologischen Prozessgrößen.

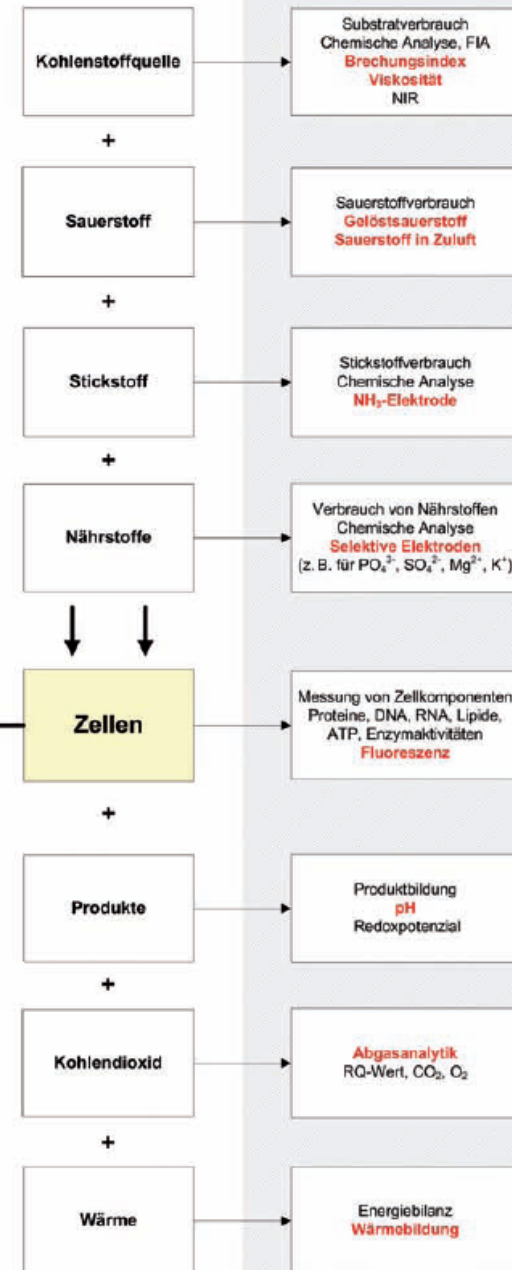


Überblick über direkte und indirekte Methoden zur Bestimmung der Biomasse in Bioprocessen. Mittels direkter Methoden wird die Zelldichte oder Biomassekonzentration direkt gemessen. Die indirekten Methoden messen Stoffwechselereignisse, um daraus Rückschlüsse auf die Biomassenkonzentration zu ziehen. Beispielsweise kann die Menge verbrauchter Lauge zur

Direkte Methoden



Indirekte Methoden



Off-line methods for biomass determination

Principle	Method	Comments
Cell mass concentration: dry weight	Separation by filtration	May be rapid; not generally applicable; smaller volumes required; washing step simple; drying and weighing very time-consuming; laborious
	Separation by centrifugation	Takes certain minimal time; larger volumes due to higher dead weight of vial; error propagation; washing tricky; drying and weighing very time- consuming; laborious
	No separation	Quick drying with IR heater: result includes all non volatile solutes
Cell number concentration: cell count	Total cells	– Microscope: statistically questionable; unsafe with small or mobile cells – electrical or optical detection in flow capillary: single cells? debris?
	Viable cells	Staining procedure; specificity
	Potentially viable germs: colony forming units	Plating and incubation; single cells? do all cells give rise to a colony? including spores; representativity of serial dilutions; eventually statisti- cally questionable
Typical (intra)cellular substances	ATP DNA NAD((P)H) Lipids Proteins Dipicolinic acid	Sampling and sample preparation procedures vs. biological relaxation times of substances; probable side reactions during sample preparation; specificity; dependence of relative amount on physiological state; questionable calibration and validation
Cellular activities	INT-dehydrogenase	Not generally applicable; representativity = $f(\text{sampling} + \text{reaction in vitro})$

On-line methods for biomass determination

Principle	Method	Comments
Suspensions turbidity; optical density (OD)	<ul style="list-style-type: none"> - Residual transmission, forward scatter - 90° scatter - reflection - or any combination thereof 	<p>General problems: calibration; dynamic range; attachment of cells or anti-foam to optical windows; interferences with gas and particles; temporal changes of basic level and gain of interferences because coalescence = $f(t)$</p> <p>⇒ some work-arounds:</p> <ul style="list-style-type: none"> - directly; single or multiple beams - suck an aliquot 'out', degas it and measure - dilution: physical (batch/FIA) or optical (pathlength/intensity) - protection from interfering species using a stainless steel screen
Typical (intra)- cellular substances	Culture fluorescence	Specific for NAD(P)H, F420, ... relative amount depends on physiological state, too! calibration?
	Infra red absorption	Selectivity: proteins and other components; entire spectra with high speed
Density	ARD	Reference problem: important temporal changes due to variations of solutes
Electric properties	Capacitance ('Bugmeter')	Detects polarizable membrane enclosed fluid elements, not other solids; interferences by bubbles; greatly limited by conductivity
	Conductivity (impedance)	Substantial temporal changes due to variations of solutes
	Fuel cells	Very slow and unspecific (redox only)
Filtration	Permeate flux and filter cake	Requires aseptic sampling; large volumes; bulky apparatus; fungi only
Software sensors	Metabolic activities	Heat production; oxygen consumption; carbon dioxide formation
	Compare with historical data	Pattern recognition; sets of fuzzy membership; neural networks
	Models	Deterministic models preferred; state estimators
	Elementary balances	Verification of assumptions; only very limited amount of unknowns possible