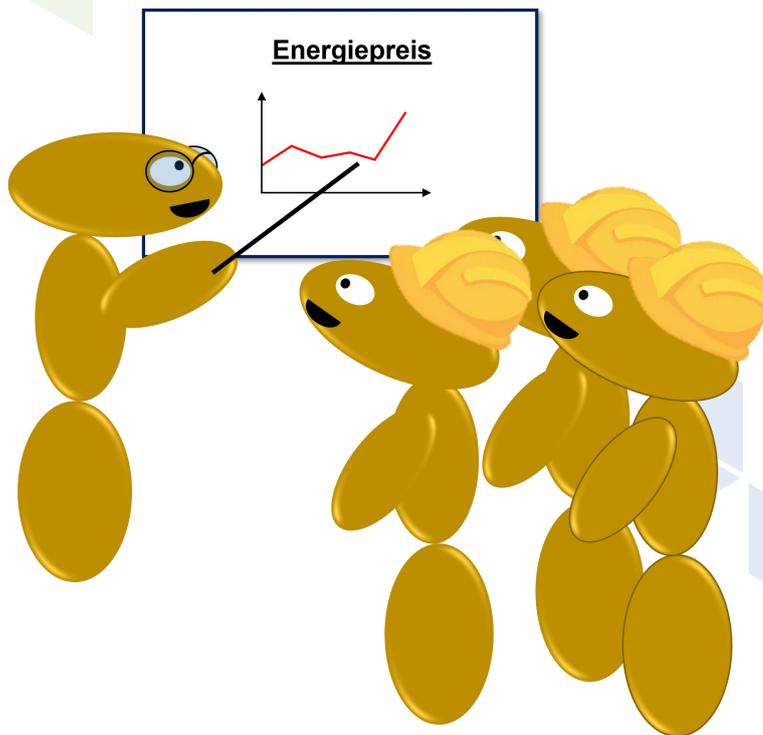


Wettbewerb um den besten

99 € - BIOREAKTOR

Phytaseproduktion
mit *Blastobotrys adenivorans*



Dresden, 13. - 14. Juli 2023

gesponsert von:



Adresse:
Netzwerk Bioverfahrenstechnik e.V.
Bergstraße 120
01069 Dresden

Telefon: 0351 / 463 32420
Fax: 0351 / 463 37761
E-Mail: vorstand@netzwerk-bioverfahrenstechnik.de
www.netzwerk-bioverfahrenstechnik.de

99 € - Bioreaktor zur Phytaseproduktion mit *Blastobotrys adenivorans*

HINTERGRUND

Herzlich Willkommen zum jährlich stattfindenden 99 €-Bioreaktorwettbewerb, der in diesem Jahr das Thema "Phytaseproduktion mit *Blastobotrys adenivorans*" behandelt! Dieser Wettbewerb richtet sich an alle Studierenden im Bereich der Bioverfahrenstechnik und verwandten Fachrichtungen, die sich für die technische Umsetzung eines Enzymproduktionsprozesses im Spannungsfeld zwischen maximaler Ausbeute und begrenztem finanziellen sowie energetischen Budget interessieren.

Die effektive Nutzung von begrenzten Ressourcen ist ein wichtiges Optimierungsziel bei der Entwicklung und der technischen Umsetzung von Produktionsprozessen. Im Zuge der im vergangenen Jahr stark angestiegenen Energiepreise und mithin der Preise vieler Ausgangsstoffe ist dies in besonderem Maße in den Fokus gerückt. Aber auch die allgemeinen Anstrengungen dem Klimawandel entgegenzuwirken gebieten einen schonenden Einsatz von Ressourcen.

Durch den weltweit steigenden Bedarf an Fleischprodukten erfährt die Optimierung der Ausbeute in der Produktion durch den Einsatz spezieller Futtermittel eine zunehmend hohe Bedeutung. Phytase ist ein Enzym, das in der Tierfütterung eingesetzt wird, um Phosphor aus Futtermitteln freizusetzen und so eine effizientere Nutzung von Phosphatquellen bei der Tieraufzucht von Geflügel und Schweinen zu ermöglichen. Damit trägt der Einsatz zur Reduzierung der Phosphatbelastung in der Landwirtschaft bei und somit zum sorgsamem Umgang mit Grundwasser. Ein vielversprechender Produktionsstamm für Phytase ist der Hefepilz *Blastobotrys adenivorans*. Die Verwendung von Bioreaktoren stellt eine kostengünstige und effiziente Methode zur Produktion von Phytase in großen Mengen dar. Der Wettbewerb bietet den Teilnehmerinnen und Teilnehmern die Möglichkeit, ihre Fähigkeiten und ihr Wissen in der Bioreaktions- und -prozesstechnik einzusetzen, um eine kosteneffektive und nachhaltige Methode zur Produktion von Phytase mit einem begrenzten Budget von 99,- € zu entwickeln.

Wir sind gespannt auf eure kreativen und innovativen Lösungen und wünschen euch allen viel Erfolg!

gesponsert von:



ABLAUF & TERMINE

Durchführung des Demonstrationsexperiments an der Technischen Universität Dresden im Labor der Professur für Bioverfahrenstechnik:

Anmeldung			bis zum 01.06.2022
Donnerstag	13.07.2023	12.00 Uhr	Begrüßung aller Teams, Laborführung, Platzeinweisung & Aufbau der Bioreaktoren
		15:00 Uhr	Inokulation der Bioreaktoren & Fermentationsstart
		20.00 Uhr	Abendveranstaltung
Freitag	14.07.2023	15.00 Uhr	Fermentationsstop & Probenahme
		bis 17.00 Uhr	Auswertung der Zielparameter
		ab 19.00 Uhr	feierliche Siegerehrung mit Preisübergabe & Posterpräsentation der Bioreaktoren, Sommerfest der Dresdener Bioverfahrenstechnik.

VERSUCHSZIEL

Für den diesjährigen 99 € - Bioreaktorwettbewerb soll ein Bioreaktor zur Kultivierung des Mikroorganismus *Blastobotrys adenivorans* konstruiert und gebaut werden. Das Budget hierfür darf maximal 99,00 € (brutto) betragen. Ziel der Prozessführung soll es sein, mit der Hefe die größtmögliche, auf das eingesetzte Flüssigvolumen bezogene Gesamtaktivität des Enzyms Phytase bei gleichzeitig minimalem Energieeinsatz zu produzieren. Nach 24-stündiger Versuchsdauer wird eine repräsentative Probe aus dem Bioreaktor entnommen und die Phytaseaktivität photometrisch bestimmt, das genutzte Flüssigvolumen gemessen und die eingesetzte elektrische Gesamtwirkleistung ermittelt. Den erste bis dritte Platz werden jene Teams belegen, welche die höchste, zweithöchste und dritthöchste energiebezogene Phytaseausbeute mit ihrer Prozessführung im selbst gebauten Reaktor realisieren können. Der Sonderpreis für den technisch innovativsten Bioreaktor wird von einer Jury aus Vertretern der diesjährigen Sponsoren vergeben.

gesponsert von:



VERSUCHSBEDINGUNGEN

BEREITGESTELLTE ANSCHLÜSSE:

- 1x elektrischer Anschluss 230 V AC (max. 2.000 W) über NOUS A1T Stromzähler-Steckdose
- Kühlwasser (12 – 15 °C; maximal 3 L/min), Anschluss z. B. über DN 20,
- Aufbauort im Labor der TU Dresden, Bioverfahrenstechnik: 1 x Standardwerkbank, Raumtemperatur 22 – 28 °C (nicht klimatisiert),
- Zugang zur Sterilwerkbank für Versuchsvorbereitung.
- **Druckluft** zur Begasung wird **nicht bereitgestellt** und muss bei Bedarf von jedem Team selbst implementiert werden

ZUM WETTBEWERB BEREITGESTELLTER ORGANISMUS:

- *Blastobotrys adenivorans* CBS 8335
- Vorkultur: 2 Tage kultiviert in Hefeminimalmedium + 20 g/L D-Xylose, beimpft von Agar-Platten mit Phytinsäure als einziger Kohlenstoff- und Phosphatquelle (Hefeminimalmedium + 5 g/L Phytinsäure Natriumsalz + 15 g/L Agar-Agar)
- Inokulum: 70 mL Vorkultur aus exp. Phase, $OD_{600} \sim 10$

ANFORDERUNGEN AN DEN ZU ENTWERFENDEN BIOREAKTOR:

- Startvolumen: 700 mL (inklusive Inokulum),
- max. Arbeitsvolumen: 1.000 mL,
- Inokulation erfolgt am Bioreaktorstandort (z. B. über Spritze / Kanüle durch Septum),
- Aufbau des bereits sterilisierten Bioreaktors vor Ort in Dresden (alternativ: Autoklavieren am Vortag),
- Fermentationsdauer: 24 h,
- Sensorik und Aktorik zum Betrieb aller notwendigen Steuer- und Regelkreise,
- weitere elektrische und elektronische Komponenten (z. B. Spannungsquelle, Benutzerschnittstelle, etc.),
- Programme für die Steuerung und Regelung müssen nach Versuchsbeginn autark agieren (ein zusätzlicher Laptop/PC zur Steuerung, sofern er nicht im Budget enthalten ist, ist nach dem Start nicht erlaubt),
- alle **elektronischen Einrichtungen** müssen **spritz- und berührungsgeschützt** gehaust sein; zudem ist ein elektrischer Kurzschluss im Falle einer Überflutung der Werkbank (Wasserstand 10 mm) konstruktiv auszuschließen; bei Nichteinhaltung behält sich der Veranstalter den Ausschluss des Teams vom Wettbewerb vor.

Der Bioreaktor muss außerhalb der bereitgestellten Schnittstellen autark sein.

NÄHRMEDIUM ZUM WETTBEWERB:

- Medienzusammensetzung befindet sich im Anhang
- bereitgestellte Menge für initiale Batch-Phase: 700 mL
- bereitgestellte Menge Feed-Medium: 350 mL
- auf Wunsch bereitgestellte Substanzen:
 - 1 mL Antischaum auf Silikonölbasis oder auf Basis von alkoxylierter Fettsäureester (z. B. Struktol® J 673 A)
 - bis zu 100 mL wässrige Ammoniaklösung (12,5% (w/w))
 - bis zu 50 mL 2 M HCl-Lösung

gesponsert von:



ALLGEMEINE BESTIMMUNGEN

Das Nährmedium, das Inokulum und alle sonstigen Verbrauchsmaterialien, welche während der Durchführung des Wettbewerbs in den Räumlichkeiten der Professur für Bioverfahrenstechnik der TU Dresden genutzt werden, sowie die Infrastruktur für die Quantifizierung der Zielparameter werden durch den Veranstalter gestellt. Die Zusammensetzung der Nährmedien und die Analysemethoden sind im Anhang des digitalen Dokuments zur Ausschreibung des diesjährigen 99 € - Bioreaktorwettbewerbs beschrieben.

Alle ordentlich angemeldeten Teams erhalten 99,- € zum Entwurf und Bau des Bioreaktors. Jedes Team bereitet ein **Poster** im Format A0 vor, auf dem der eigene 99 € - Bioreaktor vorgestellt wird. Eine **tabellarische Auflistung aller verwendeten Bauteile** des Reaktorsystems zusammen mit einer Auflistung der Kosten aller Einzelpositionen, sowie aller Belege über die entstandenen Kosten müssen dem Veranstalter zum Wettbewerbstag vorliegen.

KONTAKTDETAILS

Veranstalter

Technische Universität Dresden, Institut für Naturstofftechnik

Professur für Bioverfahrenstechnik & Netzwerk Bioverfahrenstechnik Dresden e.V.

Ansprechpartner: Prof. Dr.-Ing. Thomas Walther
Dipl.-Ing. Tim Lauterbach

Telefon: 0351 / 463 32420
0351 / 463 32781

E-Mail: 99Euro-Bioreaktor@netzwerk-bioverfahrenstechnik.de

Web: www.netzwerk-bioverfahrenstechnik.de

gesponsert von:



ANHANG

Tabelle 1 - Zusammensetzung Hefeminimalmedium

Fraktion	Komponenten	Konzentration [g/L]	Sterilisation
I	NaNO ₃	3,70	Autoklavieren
	KH ₂ PO ₄	6,75	
	K ₂ HPO ₄	1,75	
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,00	
II	Borsäure (H ₃ BO ₃)	0,0005	Sterilfiltrieren
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,0001	
	KI	0,0001	
	MnSO ₄ x 1 H ₂ O	0,000556	
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,0001	
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,0004	
III	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,0001	Sterilfiltrieren
IV	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,02	
V	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	0,02	Autoklavieren
	Ca-D-Pantothemat	0,002	
	Thiamindihydrochlorid	0,002	
	Nicotinsäure	0,0005	
	Pyrodoxin	0,002	
VI	Biotin	0,00002	Sterilfiltrieren
	Inositol	0,02	
	D-Xylose	20,0	
Feed	D-Xylose	500	Autoklavieren

gesponsert von:



ANHANG MEDIENZUSAMMENSETZUNG

Tabelle 2 - Flüssig-Medium – Zubereitung von 1 L Medium

Fraktion	Volume [mL]
Fraktion I: Salze (5xStock)	200
Fraktion II: Spurenelemente (1000xStock)	1
Fraktion III: FeCl ₃ (1000xStock)	1
Fraktion IV: Ca(NO ₃) ₂ (1000xStock)	1
Fraktion V: Vitamine (200xStock)	5
Fraktion VI a): D-Xylose (10xStock)	100
VE-H ₂ O	Bis 1 L

Tabelle 3 - Agar-Medium mit Phytinsäure – Zubereitung von 500 mL Medium

Fraktion	Volume [mL]
Fraktion I: Salze <u>ohne Phosphat</u> (5xStock)	100
Fraktion II: Spurenelemente (1000xStock)	0,5
Fraktion III: FeCl ₃ (1000xStock)	0,5
Fraktion IV: Ca(NO ₃) ₂ (1000xStock)	0,5
Fraktion V: Vitamine (200xStock)	2,5
Fraktion VI b): Phytinsäure Natriumsalz (10xStock)	50
VE-H ₂ O + 7,5 g Agar-Agar	346 mL

Zur Herstellung der selektiven Phytinsäure-Agar-Platten 346 mL VE-Wasser mit 7,5 g Agar-Agar autoklavieren und im Anschluss auf 60 °C temperieren. Nach Komplementierung mit den übrigen Medienbestandteilen können die Platten gegossen werden und bei 4 °C gelagert werden.

gesponsert von:



ANHANG MEDIENZUSAMMENSETZUNG

STAMMLÖSUNGEN

Tabelle 4 - **Fraktion I:** Salze 5xStock; für die Agar-Platten sollten die Salze phosphatfrei hergestellt werden; für 1 L;

Komponente	Konzentration in Stammlösung	eingewiegen
NaNO ₃	18,5 g/L	18,50 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5,00 g/L	5,00 g
KH ₂ PO ₄	33,75 g/L	33,75 g
K ₂ HPO ₄	8,75 g/L	8,75 g

pH 7 einstellen mit KOH; autoklavieren 121 °C / 20 min

Tabelle 5 - **Fraktion II:** Spurenelemente 1000xStock; für 50 mL (z. B. Falcon-Tube);

Komponente	Konzentration in Stammlösung	eingewiegen
Borsäure (H ₃ BO ₃)	500 mg/L	0,025 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	100 mg/L	0,005 g
KI	100 mg/L	0,005 g
MnSO ₄ x 1 H ₂ O	556 mg/L	0,0278 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg/L	0,005 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	400 mg/L	0,02 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg/L	0,005 g

sterilfiltrieren.

gesponsert von:



ANHANG MEDIENZUSAMMENSETZUNG

Tabelle 6 - **Fraktion III:** FeCl_3 in 1% HCl 1000xStock; für 10 mL (z. B. Falcon-Tube);

Komponente	Konzentration in Stammlösung	eingewiegen
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	20 g/L	0,2 g
37% HCl	1%	0,27 g

sterilfiltrieren.

Tabelle 7 - **Fraktion IV:** $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1000xStock ; für 10 mL (z. B. Falcon-Tube);

Komponente	Konzentration in Stammlösung	eingewiegen
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	20 g/L	0,2 g

sterilfiltrieren / autoklavieren möglich .

Tabelle 8 - **Fraktion V:** Vitamine 200xStock ; für 250 mL;

Komponente	Konzentration in Stammlösung	eingewiegen
Ca-D-Pantothenat	400 mg/L	0,1 g
Thiamindihydrochlorid	400 mg/L	0,1 g
Nicotinsäure	100 mg/L	0,025 g
Pyrodoxin	400 mg/L	0,1 g
Biotin	4,0 mg/L	0,001 g
Inositol	4000 mg/L	0,2 g

sterilfiltrieren.

gesponsert von:



ANHANG MEDIENZUSAMMENSETZUNG

Tabelle 9 - **Fraktion VI a):** D-Xylose 10xStock ; für 500 mL;

Komponente	Konzentration in Stammlösung	eingewiegen
D-Xylose	200 g/L	100 g

autoklavieren 121 °C / 20 min.

Tabelle 10 - **Fraktion VI b):** Phytinsäure Natriumsalz 10xStock ; für 100 mL;

Komponente	Konzentration in Stammlösung	eingewiegen
Phytinsäure Natriumsalz	50 g/L	5 g

sterilfiltrieren.

Tabelle 11 - **Fraktion VII:** D-Xylose Feed ; für 500 mL;

Komponente	Konzentration in Stammlösung	eingewiegen
D-Xylose	500 g/L	250 g

autoklavieren 121 °C / 20 min.

gesponsert von:



ANHANG ANALYSEMETHODEN

PHYTASE ASSAY (EC 3.1.3.8)

1. Zielsetzung

Ziel dieses Nachweises ist es, die Aktivität der sekretierten Phytase zu bestimmen.

2. Anwendung

Der Rahmen dieses Assays umfasst die folgende Reaktion:

Phytinsäure + H₂O $\xrightarrow{\text{Phytase}}$ p-Myo-Inositol 1,2,4,5,6-PKP + P_i

Methode = Kolorimetrische Bestimmung, Temperatur (T) = 55 °C, pH = 4,5, A_{400nm},
Lichtweg = 1 cm

Definition der Phytaseaktivität = Ein Unit ist definiert als die Freisetzung von 1 µmol anorganischem Phosphat pro Minute bei pH 4,5 und 55 °C.

3. Material

Substanz	Stocklösung	Herstellung
<i>Natriumacetat Puffer pH 4.5</i> Natriumacetat	50 mM	in H ₂ O, pH 4.5 mit HCl
<i>Phytinsäure Lösung pH 4.5</i> Phytinsäure Natriumsalz Hydrat (C ₆ H ₁₈ O ₂₄ P ₆ · xNa ⁺ · yH ₂ O)	2 mM	in Natriumacetat Puffer
<i>Ammoniummolybdat Lösung</i> Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	10 mM	in H ₂ O
<i>Schwefelsäure</i> 95-98 % Schwefelsäure	5 N/ 2,5 M	in H ₂ O
<i>Aceton</i>		
<i>Kaliumphosphat Lösung</i> Kaliumdihydrogenphosphat → Standard	50 mM	in H ₂ O

Farbreagenz

Frisch herstellen!

Substanz	Volume
Ammoniummolybdat Lösung	25 mL
Schwefelsäure	25 mL
Aceton	50 mL

gesponsert von:



ANHANG ANALYSEMETHODEN

PHYTASE ASSAY (EC 3.1.3.8)

4. Durchführung

Kalibriergerade

Phosphatkonz. in Assay [mM]	Phosphatkonz. in Stocklösung [mM]	Volumen des Phosphat-Stock [µL]	Volumen H ₂ O [µL]
0	0	0	
0,1	2,5	10	190
0,25	6,25	25	175
0,5	12,5	50	150
0,75	18,75	75	125
1	25	100	100

Assay

Reagenz	Volumen [mL]
Natriumacetat Puffer	0.23
Probe/Standard	0.02
<i>Erwärmen bis 55 °C</i>	
Phytinsäure	0.25
<i>Mixen durch Inversion und exakt 30 min bei 55 °C inkubieren</i>	
Farbreagenz	1
<i>Mixen durch Inversion und Messung der A_{400nm}</i>	

Durchführung des Assays mit frischem Überstand:

Allgemeiner Hinweis: Es ist zu empfehlen, den Aktivitätsassay direkt im Anschluss an die Fermentation durchzuführen, um eine Inaktivierung der sekretierten Phytase vorzubeugen.

1. Verdünnung des zellfreien Überstandes (1:5 bis 1:20, je nach Phytaseaktivität) in zweifacher Ausführung (Probe, Proben-Blank)
2. Inaktivierung der sekretierten Phytase (Proben-Blank) durch Inkubation bei 97 °C für 20 min
3. Vorlage der Standards/ Proben/ Proben-Blank (20 µL) und Zugabe des Natriumacetat-Puffers (230 µL) in 2 mL Reaktionsgefäß
4. Erwärmen der Probe für mind. 2 min bei 55 °C
5. Zugabe von 250 µL 2 mM Phytinsäure-Lösung
6. Inkubation für 30 min bei 55 °C, Schütteln ist optional
7. Stoppen der Reaktion durch Zugabe (1 mL) der Farbreagenz
8. Transfer der Ansätze in Küvetten
9. Messung der Absorption bei $\lambda = 400 \text{ nm}$, Blanken gegen phosphatfreien Standard

gesponsert von:



ANHANG ANALYSEMETHODEN

PHYTASE ASSAY (EC 3.1.3.8)

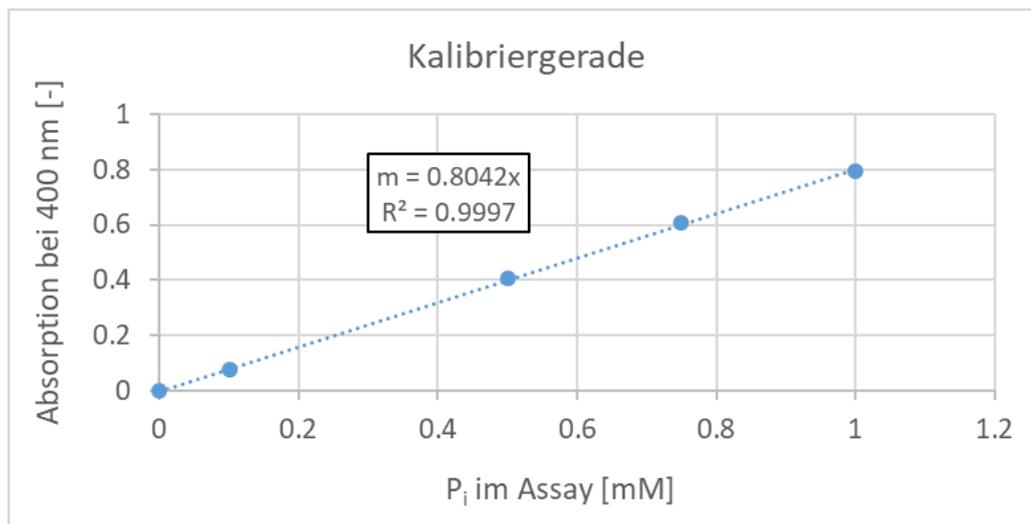
4. Durchführung

Formel zur Berechnung der Enzymaktivität

$$v_{\text{Phytase}} \left[\frac{\text{mU}}{\text{mL}} \right] = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{Proben-Blank}}) * 500 [\mu\text{L}] * VF * 1000 \left[\frac{\text{mU}}{\text{U}} \right]}{m_{\text{Kalibrierung}} \left[\frac{1}{\text{mM}} \right] * 30 \text{ min} * 20 [\mu\text{L}]}$$

v_{Phytase} ...	volumenbezogene Enzymaktivität der Phytase
A_{Probe} ...	Absorption der Probe
$A_{\text{Proben-Blank}}$...	Absorption der inaktivierten Probe
VF ...	Verdünnungsfaktor
$m_{\text{Kalibrierung}}$...	Steigung der Kalibriergerade

Typische Kalibriergerade (Blank gegen phosphatfreien Standard):



gesponsert von:



ANHANG ANALYSEMETHODEN

MESSUNG DER ELEKTRISCHEN WIRKLEISTUNG

1. Zielsetzung

Ziel der Messung ist es, die für die Prozessführung aufgewendete elektrische Wirkleistung zu bestimmen. Diese wird über die zeitliche Integration zur Ermittlung der eingesetzten elektrischen Energie herangezogen und zur Bestimmung der energiespezifischen, volumenbezogenen Phytaseaktivität verwendet.

2. Material

Steckdose mit integriertem Stromzähler: NOUS A1T (Auflösung Leistungsmessung: 1W; Auflösung Energie: 1Wh). Die Stromzähler werden im Vorfeld alle mithilfe eines reinen Ohm'schen Verbrauchers kalibriert. Der Veranstalter behält sich vor, die Integration der Leistungswerte zum Energieverbrauch über ein selbst erstelltes Skript vorzunehmen.

3. Durchführung

Jedes Team erhält am Auftag eine kalibrierte Steckdose mit integriertem Stromzähler, über die der gesamte Strombedarf des Reaktoraufbaus bezogen werden muss. Der Stromzähler misst die eingesetzte Wirk- und Blindleistung über die gesamte Kultivierungszeit des Wettbewerbs. Bei Ermittlung des Energiebedarfs wird die Wirkleistung herangezogen.

gesponsert von:



ANHANG ANALYSEMETHODEN

MESSUNG DES EINGESETZTEN FLÜSSIGVOLUMENS

1. Zielsetzung

Ziel der Messung ist es, das für die Prozessführung eingesetzte Flüssigvolumen zu bestimmen.

2. Material

Präzisionswaage.

3. Durchführung

Das gegebene Gesamtflüssigkeitsvolumen, also die Summe der Volumen des Batch-Mediums, des Inokulums und des Feed-Mediums, ist bekannt und wird am Aufbau den Teams übergeben. Das Batch-Medium und das Inokulum werden in Gänze im Reaktionsansatz verwendet. Für die Ermittlung des eingesetzten Volumens des Feed-Mediums wird die Feed-Flasche mitsamt Schlauchverbindung zunächst vor der Übergabe an die Teams gravimetrisch gemessen und protokolliert. Nach dem Prozessstopp wird die Feed-Flasche mitsamt Schlauchverbindung erneut gravimetrisch vermessen und protokolliert. Mithilfe der Dichte des Feed-Mediums und der gemessenen Massedifferenz der Feed-Flasche wird das eingesetzte Feed-Medium-Volumen bestimmt und dem Batchansatzvolumen hinzugerechnet. Somit wird das eingesetzte Gesamtflüssigkeitsvolumen ermittelt.

gesponsert von:

