

Wettbewerb um den besten

99 € - BIOREAKTOR

γ -Polyglutaminsäureproduktion
mit *Bacillus subtilis var. natto*



Dresden, 11. - 12. Juli 2024

gesponsert von:



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

Telefon: 0351 / 463 32781
Fax: 0351 / 463 37761
E-Mail: vorstand@netzwerk-bioverfahrenstechnik.de
www.netzwerk-bioverfahrenstechnik.de

99 € - Bioreaktor zur γ -Polyglutaminsäureproduktion mit *Bacillus subtilis var. natto*

HINTERGRUND

--Schon lange in Laboren bekannt und 2023 vom VAAM zur Mikrobe des Jahres gekürt--
Der Modellorganismus *Bacillus subtilis* steht im Fokus des diesjährigen 99 €-Bioreaktorwettbewerbs. *B. subtilis* ist ein vielseitiges, grampositives und ubiquitäres Bakterium, das aufgrund seiner robusten Natur auch in harschen Umgebungen überleben kann. Es wird als Modellorganismus in der biologischen Forschung genutzt, um grundlegende Prozesse wie Sporenbildung, Genregulation und Zelluläre Differenzierung zu untersuchen. Seine Fähigkeit Enzyme, Antibiotika und andere nützliche Verbindungen zu produzieren, macht es in der Biotechnologie und Pharmazie äußerst wertvoll. Als robustes Bakterium mit breiter Substrattoleranz spielt es eine bedeutende Rolle in verschiedenen Wissenschafts- und Industriebereichen.

Weiterhin ist die Variante *Bacillus subtilis var. natto* aus der Herstellung der japanischen Spezialität „Natto“ bekannt. Bei der Fermentation der Sojabohnen entsteht dabei unter anderem Polyglutaminsäure (γ -PGA). Dieses wasserlösliche Biopolymer wird beispielsweise in Katastrophenfällen zur Aufbereitung von Böden und Trinkwasser eingesetzt. In der Lebensmittelindustrie verbessert es als Zusatzstoff Textur und Stabilität von Lebensmitteln und kann sogar zur Verlängerung der Haltbarkeit beitragen. Kosmetikprodukte profitieren von den feuchtigkeitsspendenden Eigenschaften von γ -PGA, während es in der Medizin als Arzneimittelträger, um Wirkstoffe gezielt freizusetzen, bei der Geweberegeneration und als Wundauflage eingesetzt wird. Zudem kann es als umweltfreundliche Alternative zu herkömmlichen Verpackungsmaterialien eingesetzt werden.

Die Nutzung von *B. subtilis var. natto* zur Produktion von γ -Polyglutaminsäure eröffnet eine Fülle von innovativen Lösungen für verschiedenste Industriezweige und Herausforderungen. Allerdings führt die Produktion von γ -PGA zu einer Erhöhung der Mediumviskosität, wodurch die Prozessführung erschwert wird. Der Anstieg der Viskosität dient gleichzeitig als Zielparameter zur Bestimmung der Bildung von Polyglutaminsäure. Im Rahmen dieses Wettbewerbs sind die Teilnehmenden aufgefordert, diese Potenziale zu erkunden. Dabei gilt es kreative Lösungen zum Reaktordesign und zur Prozessführung zu finden, um die Problemstellung zu bewältigen und möglichst hochviskoses Medium zu erzeugen.

gesponsert von:



ABLAUF & TERMINE

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

Anmeldung			bis zum 03.06.2024
Donnerstag	11.07.2024	12.00 Uhr	Begrüßung aller Teams, Laborführung, Platzeinweisung & Aufbau der Bioreaktoren
		15:00 Uhr	Inokulation der Bioreaktoren & Fermentationsstart
		20.00 Uhr	Abendveranstaltung
Freitag	12.07.2024	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 *Bacillus subtilis var. natto* zur Produktion von γ -Polyglutaminsäure konstruiert und gebaut werden. Das Budget hierfür darf maximal 99,- € (brutto) betragen. Ziel der Prozessführung soll es sein, mit dem Organismus die höchstmögliche Viskosität in der Fermentation zu erreichen. Nach 24-stündiger Versuchsdauer wird der gesamte Reaktorinhalt geerntet und um den Anteil des verdampften Mediums mit VE-Wasser wieder aufgefüllt. Aus dieser Lösung wird eine repräsentative Probe genommen und deren Viskosität bestimmt. Eine genauere Beschreibung der Probenvorbereitung und der Analytik ist dem Anhang zu entnehmen. Die Vergabe der Plätze basiert auf der Höhe der erreichten Viskosität im Fermentationsmedium.

TEAMS

Die Empfehlung zur Teamzusammensetzung sind ca. drei bis vier Studierende, die von einem Doktoranden/ Postdoc als Teamleiter unterstützt werden. Unter dem Begriff Studierende sind Teilnehmende ohne Master- bzw. Diplomabschluss zu verstehen. Das Team wird von einem Teamleiter angeführt, der einen Abschluss auf dem Gebiet der Bioverfahrenstechnik/ Biotechnologie/ Chemical Engineering oder Vergleichbarem hält. Ein Teammitglied muss als Kontaktperson gegenüber dem Veranstalter angegeben werden.

gesponsert von:



VERSUCHSBEDINGUNGEN

BEREITGESTELLTE ANSCHLÜSSE:

- 1 x elektrischer Anschluss 230 V AC (max. 1.000 W)
- Druckluft (max. 3 bar), Anschluss über Schlauchverbindung mit Adapter
- Kühlwasser (12 – 15 °C), Anschluss über Schlauchverbindung mit Adapter,
- Aufbauort im Labor der TU Dresden, Bioverfahrenstechnik: 1 x Standardwerkbank, Raumtemperatur 22 – 28 °C (nicht klimatisiert),
- Zugang zur Sterilwerkbank für Versuchsvorbereitung.

ZUM WETTBEWERB BEREITGESTELLTER ORGANISMUS:

- *Bacillus subtilis* var. *natto* (**Zusendung des Stamms nach Anmeldung** für Vorversuche auf Agar-Platte **durch den Veranstalter**)
- Vorkultur: 24 h kultiviert in Kulturmedium (Tabelle 1), beimpft von Agar-Platten (Tabelle 2)
- Inokulum: 10 mL Vorkultur aus exp. Phase, $OD_{600} \sim 1$

ANFORDERUNGEN AN DEN ZU ENTWERFENDEN BIOREAKTOR:

- Startvolumen: 710 mL (inklusive Inokulum),
- Arbeitsvolumen: ~ 1.200 mL,
- Inokulation erfolgt am Bioreaktorstandort (z. B. über Spritze / Kanüle durch Septum),
- Aufbau des bereits sterilisierten Bioreaktors vor Ort (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 **spritzwasser- 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,
- Vorrichtung zum Auffangen von eventuellem Überlauf und Vorsehen eines Schlauchanschlusses als Reaktorabluft.

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 + 10 mL Inokulum
- bereitgestellte Menge Feed-Medium: 300 mL
- Auf Wunsch bereitgestellte Substanzen:
 - bis zu 100 mL 2 M NaOH-Lösung
 - bis zu 50 mL 1 M H₂SO₄-Lösung

ANALYTIK ZUR BESTIMMUNG DER VISKOSITÄT:

- Protokoll zur Bestimmung der Volumina und Detektion der relativen dynamischen Viskosität befinden sich im Anhang

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 DIN A0 vor, auf dem der eigene 99 € - Bioreaktor vorgestellt wird. Eine **digitale tabellarische Auflistung aller verwendeten Bauteile** des Reaktorsystems zusammen mit einer Auflistung der Kosten (**brutto**) aller Einzelpositionen, sowie aller Belege über die entstandenen Kosten ist zu erstellen. Zur Kostenabrechnung ist die vom Veranstalter gestellte tabellarische Vorlage zu nutzen. Die Abrechnung ist dem Veranstalter wenigstens 1 Woche (bis zum 05. Juli 2024) vor Wettbewerbsende in digitaler Form zu zusenden. Bei Nichteinhaltung der Kostenobergrenze von 99,- € (**brutto**) behält der Veranstalter sich vor, eine Abwertung der Teamplatzierung vorzunehmen.

KONTAKTDETAILS

Veranstalter

Technische Universität Dresden, Institut für Naturstofftechnik

Professur für Bioverfahrenstechnik

&

Netzwerk Bioverfahrenstechnik Dresden e.V.

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

Telefon: 0351 / 463 32781

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

Web: www.netzwerk-bioverfahrenstechnik.de

gesponsert von:



ANHANG NÄHRMEDIUM

ZUSAMMENSETZUNG DES FLÜSSIGMEDIUMS

Für die Kultivierung wird sowohl für die Vorkultur als auch für die Hauptkultur ein Komplexmedium mit Glucose und Glutaminsäure verwendet (Tabelle 1). Zur Herstellung von 1 L Kulturmedium werden zunächst die Komponenten der Fraktion I nacheinander in VE-Wasser gelöst und anschließend auf 800 mL mit VE-Wasser aufgefüllt. Für die Fraktion II wird 15 g Glutaminsäure unter Rühren und Zugabe von ca. 10 mL 10 M NaOH in VE-Wasser gelöst und anschließend auf 100 mL mit VE-Wasser aufgefüllt. Danach werden die Fraktionen I und II vereint und der pH-Wert mit 1 M NaOH oder 1 M H₂SO₄ auf 7 eingestellt. Anschließend wird die Lösung mit VE-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 L aufgefüllt und die Lösung sterilfiltriert (z.B.: 0,45 µm; PES). Zur Durchführung der Vorkultur im Schüttelkolben wird das Kulturmedium ohne weitere Zusätze eingesetzt. Für die Hauptkultur im Bioreaktor werden zu 698 mL des Kulturmedium zusätzlich 2 mL Antischaummittel (alkoxylierter Fettsäureester auf pflanzlicher Basis) hinzugegeben, welches durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert werden kann. Weiterhin stehen bei der Kultivierung 300 mL einer 400 g L⁻¹ Glucoselösung als Feed zur Verfügung.

Tabelle 1 - Zusammensetzung des Flüssigmediums für die Vor- und Hauptkultur.

Fraktion	Komponenten	Mengenangabe [g L ⁻¹]	Sterilisation
I	Trypton	10	Sterilfiltration
	Hefeextrakt	5	
	NaCl	15	
	D-Glucose	20	
II	Glutaminsäure	15	Sterilfiltration
III	Struktol J 673 A	-	Autoklavieren
Feed	D-Glucose	400	Autoklavieren

Für die Stammhaltung wird ein Festmedium verwendet (Tabelle 2). Zur Herstellung des Mediums werden die Komponenten in VE-Wasser gelöst und autoklaviert (121 °C, 20 min) und im Anschluss gegossen.

Tabelle 2 - Zusammensetzung des Festmediums (LB-Agar nach Miller).

Komponenten	Konzentration [g L ⁻¹]	Sterilisation
Trypton	10	Autoklavieren
Hefeextrakt	5	
NaCl	10	
Agar	15	

gesponsert von:



ANHANG ANALYSEMETHODEN

MESSUNG DES EINGESETZTEN FLÜSSIGVOLUMENS

1. Zielsetzung

Ziel der Messung ist es, das für die Prozessführung eingesetzte Flüssigvolumen zu bestimmen, um den verdampften Anteil des Prozessmediums festzustellen.

2. Material

Präzisionswaage.

3. Durchführung

Das gegebene Gesamtflüssigkeitsvolumen, also die Summe der Volumen des Batch-Mediums (Dichte: $1,02 \text{ g cm}^{-3}$), des Inokulums, des Feed-Mediums (Dichte: $1,17 \text{ g cm}^{-3}$) und der Lösungen zur Regelung des pH-Werts (Dichte 1 M H_2SO_4 : $1,06 \text{ g cm}^{-3}$, Dichte 2 M NaOH: $1,09 \text{ g cm}^{-3}$), ist bekannt und wird am Aufbau-Tag den Teams übergeben. Das Batch-Medium und das Inokulum werden in Gänze im Reaktionsansatz verwendet. Für die Ermittlung des eingesetzten Volumens des Feed-Mediums, sowie Säure und Base, wird die Feed-Flasche mitsamt Schlauchverbindung zunächst vor der Übergabe an die Teams gravimetrisch gemessen und protokolliert. Nach dem Prozessstopp werden die Lösungsflaschen mitsamt derselben Schlauchverbindung erneut gravimetrisch vermessen und protokolliert. Mithilfe der Dichten der jeweils eingesetzten Lösungen und der gemessenen Massedifferenz der Lösungen werden die eingesetzten Volumina bestimmt und dem Batchansatzvolumen hinzugerechnet. Somit wird das gesamte eingesetzte Flüssigkeitsvolumen ermittelt.

gesponsert von:



ANHANG ANALYSEMETHODEN

MESSUNG DES VERBLIEBENEN FLÜSSIGVOLUMENS

1. Zielsetzung

Ziel der Messung ist es, das nach Prozessstop verbliebene Flüssigvolumen zu bestimmen.

2. Material

500 mL VE-Wasser zum Ausspülen von Rückständen aus dem Reaktor und Messzylinder.

3. Durchführung

Nach Prozessende werden die Reaktoren von jedem Team in ein eigenes bereitgestelltes Gefäß entleert. Zum Ausspülen von etwaigen Rückständen wird den Teams 500 mL VE-Wasser zur Verfügung gestellt, die ebenfalls vollständig in das bereitgestellte Gefäß überführt wird. Im Anschluss daran wird von den Veranstaltern das Volumen festgestellt und protokolliert.

gesponsert von:



ANHANG BESTIMMUNG DES ZIELPARAMETERS

BESTIMMUNG DER RELATIVEN DYNAMISCHEN VISKOSITÄT

1. Zielsetzung

Ziel der Messung ist es, die relative dynamische Viskosität des verbliebenen Mediums nach der Fermentation in Bezug auf die Dichte von Wasser bei 20 °C zu bestimmen. Das verbliebene Medium wird dabei vor der Messung mit VE-Wasser auf die eingesetzte Gesamtflüssigkeitsmenge (siehe Anhang Messung des verbliebenen Flüssigkeitsvolumens), zuzüglich der 500 mL Spüllösung, aufgefüllt. Über die Bestimmung der Viskosität sollen Rückschlüsse auf die Produktion von Polyglutaminsäure gezogen werden.

2. Material

Verwendet wird ein Mikrokugelrollviskosimeter (z.B.: Lovis 2000M, Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) zur Bestimmung der relativen dynamischen Viskosität. Zur Vorbereitung ist eine Zentrifuge zum Erstellen des zellfreien Fermentationsmedium notwendig und eine Spritze zum blasenfreien Überführen der Probe. Zum Aufnehmen der Blindprobe wird unfermentiertes Medium (wie in Tabelle 1 beschrieben) genutzt.

3. Durchführung

Die Viskosität des Mediums wird über die relative dynamische Viskosität η [mPa s], bezogen auf die Dichte von Wasser bei 20 °C ermittelt. Es wird angenommen, dass Wasser eine Dichte von 1 g cm^{-3} besitzt. Als Probe wird das abzentrifugierte (10 min bei 10.000 rpm) zellfreie Fermentationsmedium verwendet. Zur Berücksichtigung von Konzentrierungseffekten wird das Fermentationsmedium vor der Probenahme, mit VE-Wasser, auf das eingesetzte Gesamtflüssigkeitsvolumen zuzüglich der 500 mL Spüllösung gebracht. Es wird ein Mikrokugelrollviskosimeter (z.B.: Lovis 2000M, Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) mit einer Glaskapillare (Durchmesser: 1,59 mm) sowie einer goldbeschichteten Kugel (Durchmesser: 1,50 mm; Dichte: $7,88 \text{ g cm}^{-3}$) zur Bestimmung der Viskosität eingesetzt. Die Goldkugel und 0,5 mL der Probe werden blasenfrei mit einer Spritze in die Kapillare überführt. Anschließend wird die Probe 120 s bei 20 °C vorkonditioniert. Das Mikrokugelrollviskosimeter misst die Durchlaufzeit der Kugel bei 70° Neigung. Je Messdurchgang wurden sechs Einzelmessungen durchgeführt. Das unfermentierte Medium der Hauptkultur entspricht dem Blindwert.

gesponsert von:

