

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. August 2003 (28.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/070873 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12M

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/01663

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Februar 2003 (19.02.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 06 772.4 19. Februar 2002 (19.02.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): HÖFER BIOREACT GMBH [DE/DE]; Kirschallee
1, 53115 Bonn (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖLKER, Udo
[DE/DE]; Kirschallee 1, 53115 Bonn (DE).

(74) Anwälte: HELBING, Jörg usw.; Von Kreisler Selting
Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/070873 A2

(54) Title: CULTIVATION METHOD FOR MICRO-ORGANISMS AND BIOREACTOR

(54) Bezeichnung: KULTIVIERUNGSVERFAHREN FÜR MIKROORGANISMEN UND BIOREAKTOR

(57) Abstract: The invention relates to a cultivation method for micro-organisms, and a suitable bioreactor. The principle of the trickle-bed method is combined with that of the fluidized bed method in said bioreactor, thus providing a completely novel cultivation principle using the above-mentioned type of bioreactor.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Kultivierungsverfahren für Mikroorganismen sowie einen hierfür geeigneten Bioreaktor. In diesem Bioreaktor wird das Prinzip des Rieselbettverfahrens mit dem des Wirbelbettverfahrens kombiniert und ein völlig neues Kultivierungsprinzip mit Hilfe dieses Bioreaktortyps zur Verfügung gestellt.

Kultivierungsverfahren für Mikroorganismen und Bioreaktor

Die Erfindung betrifft ein Kultivierungsverfahren für Mikroorganismen sowie einen hierfür geeigneten Bioreaktor. In diesem Bioreaktor wird das Prinzip des Rieselbettverfahrens mit dem des Wirbelbettverfahrens kombiniert und ein völlig neues Kultivierungsprinzip mit Hilfe dieses Bioreaktortyps zur Verfügung gestellt.

Hintergrund der Erfindung

Die Grundprinzipien und Applikationen des Rieselfilmverfahrens, z.B. biologische Abwasserreinigung, biologische Abluftreinigung und Anwendung zur Hydrogenierungen etc. und die des Wirbelbettverfahrens (gelegentlich auch als Fließbettverfahren bezeichnet), z. B. anaerobe Abwasserbehandlung, Nitrifikation und Denitrifikation von Trink- und Abwasser etc. sind bekannt.

Die Hauptschwierigkeit beim Betrieb von Rieselfilmreaktoren und den entsprechenden Verfahren wie z.B. der genannten Abluftreinigung liegen in der Tatsache begründet, dass die durch die Verstoffwechslung der angebotenen Substrate entstehende Biomasse zum Zuwachsen und letztendlich zum Verstopfen des Reaktors führt, da die freien Zwischenräume der Füllkörperschüttung bzw. des festen Substrats durch die Biomasse zugesetzt werden. Dadurch steigt der Druckverlust über dem Festbett an und die Abbauleistung bzw. Produktionsleistung wird durch Kanalbildung und Todzonen erheblich vermindert. Dies ist insbesondere bei Rieselfilmreaktoren mit hohen Raum-Zeitausbeuten der Fall, die entsprechend sehr schnell verblocken können.

Es gibt verschiedene patentierte und aus der Literatur bekannte Systeme, die mittels verschiedener Verfahrensvarianten Lösungen für diese Problematik aufzeigen.

- 2 -

So wird in den VDI-Berichten 1104 (1994) die Verzögerung des Aufwachsens der Biomasse durch z.B. N-Limitierung beschrieben. Der Nachteil ist, dass die Verblockung nur hinausgezögert und nicht grundsätzlich verhindert wird und zudem die entsprechenden Abbauleistungen stark reduziert sind. In DE 3227678 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem über den gesamten Reaktionsverlauf nicht nur Rieselwasser zugeführt wird, sondern soviel Wasser, dass gleichzeitig auch überschüssiger Bewuchs mitgerissen wird, indem das Wasser durch die Zwischenräume des Trägerkörpers herabrieselt. Zusätzlich wird der Reaktorkörper zeitweise geflutet und mit dem Flutungswasser von unten nach oben durchströmt. Dabei werden die dort beschriebenen speziellen Microcarrier aufgeschwemmt und gegeneinander verwirbelt, wobei die überschüssige Biomasse durch Schwerkräfte abgelöst und gegebenenfalls mit den Microcarriern zusammen ausgetragen wird. Dieses Verfahren ist aber nicht geeignet die Füllkörperschüttung erfolgreich zu reinigen, da die Scherwirkung, die aus dem Aufschwemmen des Füllkörpers alleine resultiert, zu gering ist, um eine Verblockung nachhaltig zu verhindern. Ähnliches gilt für die in DE 3938507 und DE 3204597 dargestellten Verfahren, die eine Auflockerung mittels Rührereinbau beschreiben, was allerdings für längere Standzeiten ebenfalls unzureichend ist.

DE 19608805 beschreibt ein Verfahren, welches eine Auflockerung mittels Schneckenrührung und Fluten beschreibt, wobei die Rührzeit zwischen 5 bis maximal 60 min beträgt und die Drehzahl zwischen 3 bis maximal 30 U/min liegt. Gleichzeitig wird ein Wasserstrom von mindestens 0.05 m^3 pro m^2 und Stunde bis maximal 5 m^3 pro m^2 und Stunde zur Flutung des Reaktorraumes eingesetzt.

In DE 19609053 wird ein Verfahren benannt, bei dem das Festbett zunächst geflutet und später die Festbettschüttung von unten nach oben mit Flutungswasser durchströmt wird, wobei gleichzeitig Gas parallel mit steigender Geschwindigkeit durch das Festbett hindurchgeleitet wird und ferner Druckgaspulse gegeben werden. Hierdurch kommt es zu Turbulenzen

im Festbett, wodurch die überschüssige Biomasse durch Scherkräfte abgelöst und über den Flüssigkeitsstrom ausgetragen wird. Ein Wirbelbett wird nicht genannt.

Dauer und Stärke der in den genannten Verfahren erzeugten Scherkräfte zur Auflockerung des Festbetts mögen für spezielle Anwendungen (Abgasreinigung vornehmlich mit Hilfe von Bakterien) ausreichen, tun dies jedoch nicht allgemein. Insbesondere kommt es bei der biotechnologischen Nutzung mancher filamentöser Pilze in Rieselbettverfahren nicht nur zu einem Bewachsen der Mikropartikel sondern auch - durch die Bildung von Hyphen - zu einer Vernetzung der Partikel untereinander, wodurch der Grad der Verblockung wesentlich erhöht ist.

Kurzbeschreibung der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist einen Bioreaktor und ein Kultivierungsverfahren von Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen, das die Nachteile des oben genannten Stands der Technik nicht aufweist. Insbesondere sollte der Bioreaktor/das Kultivierungsverfahren nicht wie bekannte Rieselfilmreaktoren zum Verstopfen neigen und insbesondere für die Anwendungen

- a) Produktion von Proteinen,
- b) Produktion von Sekundärmetaboliten,
- c) Behandlung von pflanzlichem Material (Holz, Faserstoffe, Einjahrespflanzen),
- d) Einsatz als Biokatalysatorsystem bei der chemischen Synthese,
- e) Einsatz in der Schadstoffentfernung aus Abwasser und
- f) Abbau von Xenobiotika,

verbunden mit der gleichzeitigen Möglichkeit der Produktanalyse, Produktextraktion und Produktvorreinigung (a-d), geeignet sein.

Völlig überraschend wurde gefunden, dass bei einer Kombination des klassischen Rieselbettverfahrensprinzips mit dem klassischen Wirbelbettverfahrensprinzip die Nachteile des Stand der Technik nicht mehr

auftreten. Bei dem neuen Verfahrensprinzip wird während der Wirbelbettverfahrensweise das Wirbelbett extern begast und dabei optional zu Beginn oder während der Wirbelbettverfahrensweise zusätzlich Druckgaspulse zur Auflockerung des Festbetts gegeben. Es verhindert vor allem eine Verblockung der entsprechenden Kulturen bei Batch-, Fedbatch und vor allem kontinuierlicher Kulturführung mit langen Standzeiten (wie aus ökonomischen Gründen meistens gefordert).

Zusätzlich werden als Vorteile die zwingend erforderliche Separierung/Aufteilung der Füllkörper von Biofilmen bzw. bei Pilzbewuchs die Separierung/ Aufteilung der Mattenstruktur erreicht, was durch die erfindungsgemäß kombinierte Wirbelbettverfahrensweise mit Hilfe des neuen Reaktortyps zu einem wesentlich verbesserten (Neu-)Anwachsen der vermehrten "Inokulationskeimzellen" bei der nachfolgenden Rieselfilmreaktor-Fahrweise führt, sodass also nicht nur die Verblockung aufgehoben wird, sondern auch die Produktivität und/oder die Abbauraten stark erhöht werden können.

Die Erfindung betrifft somit

(1) ein Kultivierungsverfahren für Mikroorganismen, umfassend eine Kombination aus Verfahrensschritten, die für einen Rieselbettreaktor charakteristisch sind, mit solchen, die für einen Wirbelbettreaktor charakteristisch sind, wobei

(a) Mikroorganismenkulturen auf einem Festbett unter Rieselbettreaktor-Verfahrensführung kultiviert werden, wobei das Reaktionsmedium durch Rieseldüsen aufgebracht wird, die Belüftung von unterhalb und/oder innerhalb des Festbetts erfolgt und die durch die Festbettschicht ablaufende Lösung, welche die Reaktions-/Abbauprodukte der Mikroorganismenkulturen enthält, entweder solange, bis die gewünschte Produktivität, das gewünschte Produkt bzw. das gewünschte Abbauprodukt oder der gewünschte Abbaugrad erreicht sind, zurückgeführt wird oder die abgelaufene Lösung unmittelbar zur weiteren Auftrennung weiterbehandelt wird und

- (b) zur Änderung der Kultivierungsbedingung oder bei Überschreiten eines bestimmten Druckverlustes über die Befüllung des Festbetts durch Einleiten von Wasser oder Nährlösung und Luft die Kulturführung für einen gewissen Zeitraum von der Rieselbettreaktor-Verfahrensführung in eine Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung umgeschaltet wird, um gegebenenfalls einem Verstopfen des Festbettes zu begegnen;
- (2) einen Bioreaktor zur Kultivierung von Mikroorganismen, insbesondere zur Durchführung des unter (1) beschriebenen Verfahrens, mit einem Reaktionsbehälter (10), einer in dem Reaktionsbehälter (10) angeordneten Festbettauflage (14) zum Anordnen eines Festbettes (12) auf der Festbettauflage (14), oberhalb der Festbettauflage (14) angeordneten Rieseldüsen (18) zur Berieselung des Festbettes (12) mit Nährstofflösung oder dgl., so dass der Bioreaktor im Rieselbettverfahren betrieben werden kann und einer Belüftungseinrichtung (30, 32, 34, 36) zur Belüftung des Festbettes (12) bzw. des Innenraums des Reaktors (10), so dass der Bioreaktor im Wirbelbettverfahren betrieben werden kann; und
- (3) einen Bioreaktor zur Aufzucht von Mikroorganismenkulturen, insbesondere einen wie in (2) beschriebenen Bioreaktor, und/oder zur Durchführung des Kultivierungsverfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 6, mit einem Reaktionsbehälter (10), einer in dem Reaktionsbehälter (10) angeordneten Festbettauflage (14) zum Anordnen eines Festbettes (12) auf der Festbettauflage (14), oberhalb der Festbettauflage (14) angeordneten Rieseldüsen (18) zur Berieselung des Festbettes (12) mit Nährstofflösung oder dgl., so dass der Bioreaktor im Rieselbettverfahren betrieben werden kann und einer mit dem Reaktionsbehälter (10) verbundenen Druckerzeugungseinrichtung (80) zum Hindurchpressen von Reaktionsmedium (56) durch die Festbettauflage (14) und insbesondere durch die unterhalb der Festbettauflage (14) angebrachte Filter (64, 66).

Das erfindungsgemäße Verfahren (1) ist

- 6 -

- a) zur Produktion von Proteinen,
- b) zur Produktion von Sekundärmetaboliten,
- c) zur Behandlung von pflanzlichem Material (Holz, Faserstoffe, Einjahrespflanzen),
- d) zum Einsatz als Biokatalysatorsystem bei der chemischen Synthese,
- e) zum Einsatz in der Schadstoffentfernung aus Abwasser und Luft und
- f) zum Abbau von Xenobiotika

verbunden mit der gleichzeitigen Möglichkeit der Produktanalyse, Produktextraktion und Produktvorreinigung (a-d) aus der Flüssigkeit geeignet.

Der erfindungsgemäße Bioreaktor (2) zur Aufzucht von Mikroorganismenkulturen, der insbesondere zur Durchführung des vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist, weist einen Reaktionsbehälter auf. Innerhalb des Reaktionsbehälters ist auf einer Festbettauflage, wie einem Sieb oder einem Gitter, ein Festbett angeordnet. Oberhalb des Festbettes sind entsprechend einem Rieselbett-Reaktor zur Berieselung des Festbettes mit Nährstofflösung oder dgl. Rieseldüsen angeordnet. Die Rieseldüsen sind vorzugsweise regelmäßig über die gesamte Fläche des Festbettes verteilt angeordnet. Erfindungsgemäß weist der Bioreaktor ferner eine Belüftungseinrichtung auf, die oberhalb, innerhalb und/ oder unterhalb des Festbettes angeordnet sein kann. Durch die Belüftungseinrichtung ist ein Zuführen von Luft oder anderen Gasen möglich, um das Fließbett zu belüften, so dass der Reaktor im Wirbelbettverfahren betrieben werden kann. Durch das Zuführen von Luft oder anderen Gasen, beispielsweise in regelmäßigen Abständen oder in Abhängigkeit eines Druckverlustes über dem Festbett, kann ein Verstopfen oder Verblocken des Festbettes und die hierdurch hervorgerufenen Beeinträchtigungen der Reaktionsabläufe vermieden werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Bioreaktor (3), der eine selbständige Erfindung darstellt, ist zur Erzielung derselben Vorteile an Stelle einer Belüftungseinrichtung eine Druckerzeugungseinrichtung mit dem Reaktionsbehälter verbunden. Durch die Druckerzeugungseinrichtung kann innerhalb des Reaktionsbehälters

Druck erzeugt werden, durch den das im Festbett entstehende Reaktionsmedium durch das Rückhalteelement und ggf. weitere, innerhalb des Reaktionsbehälters angeordnete Siebe oder Gitter hindurchgedrückt werden kann. Durch dieses vorzugsweise kurzzeitige und/ oder stoßweise Erhöhen des Drucks ist ein Verstopfen bzw. Verblocken des Festbettes sowie ggf. vorhandener Filter etc. vermieden bzw. kann gelöst werden.

Die beiden vorstehend beschriebenen Ausführungsformen weisen vorzugsweise eine oberhalb der Festbettauflage, insbesondere oberhalb des Festbettes, und einer Rückhaltevorrichtung (z. B. einen Sieb oder dergleichen) für die Wirbelbettreaktorführung angeordnete Entnahmeeinrichtung auf. Hierdurch ist eine Mediumabfuhr möglich. Das abgeführte Medium kann im Kreislauf gepumpt werden. Dies ist insbesondere beim Fluten des Reaktors vorteilhaft, wobei durch das Fluten des Reaktors die Reinigung des Rückhalteelements sowie ggf. vorgesehener Filter und Siebe sowie das Verhindern des Verstopfens des Festbettes unterstützt werden kann.

Bei einer besonders bevorzugten Weiterbildung der vorstehend beschriebenen Erfindungen ist unterhalb der Festbettauflage mindestens ein Filterelement angeordnet. Durch das Filterelement kann das Reaktionsmedium noch innerhalb des Reaktors gefiltert bzw. gereinigt werden. Vorzugsweise sind hierbei in Flussrichtung des Reaktionsmediums mehrere Filterelemente hintereinander angeordnet, wobei sich deren Maschenweite bzw. Porengröße in Flussrichtung, d.h. in Richtung eines Auslasses des Bioreaktors verringert.

Vorzugsweise ist den Filterelementen eine Spüleinrichtung zur Reinigung der Filterelemente zugeordnet. Insbesondere weist dieses Filterelement eine besondere Spüleinrichtung auf. Mit Hilfe der Spüleinrichtung kann eine Spülflüssigkeit über das Filterelement bewegt werden. Dies kann beispielsweise durch Düsen erfolgen, die eine Spülflüssigkeit auf die Filterelemente spritzt. Hierdurch ist die Gefahr des Verstopfens der Filterelemente verringert. Besonders bevorzugt ist es, die Filterelemente geneigt anzuordnen, so dass eine Spülflüs-

sigkeit über die Filter fließen und dabei die Verunreinigungen herausschwemmen kann. Hierzu kann je Filterelement ein zusätzlicher Auslass vorgesehen sein, um Spülflüssigkeit zusammen mit herausgewaschenen Verunreinigungen abführen zu können. Durch die Neigung der Filterelemente ist ferner die Gefahr des Verstopfens auch während des Reaktionsprozesses verringert, da auch das Reaktionsmedium zum Teil über die Filterelemente fließt und hierbei Verunreinigungen abtransportiert.

Kurzbeschreibung der Figuren

Nachfolgend wird die Erfindung anhand bevorzugter Ausführungsformen unter Bezugnahme auf die anliegenden Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 eine vereinfachte Prinzipskizze des erfindungsgemäßen Bioreaktors mit Belüftungseinrichtung,
- Fig. 2 eine schematische Draufsicht des in Fig. 1 dargestellten Bioreaktors,
- Fig. 3 eine detaillierte Prinzipskizze des in Fig. 1 dargestellten Bioreaktors,
- Fig. 4 eine Prinzipskizze des in den Fig. 1 - 3 dargestellten Bioreaktors mit zusätzlichen Filterelementen und
- Fig. 5 eine schematische Schnittansicht in Längsrichtung des in Fig. 4 dargestellten Bioreaktors.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Bei dem erfindungsgemäßen Kultivierungsverfahren (1) der Erfindung sind die Mikroorganismenkulturen vorzugsweise ausgewählt aus Bakterien, Hefen, Pilzen usw., tierischen oder pflanzlichen Zellen (einschließlich rekombinanter und immortalisierter Zellen), die immobilisiert sein können, immobilisiertem pflanzlichen und tierischen Gewebe usw. Besonders bevorzugt sind filamentöse Pilze.

Weiterhin bevorzugt ist, dass bei der Wirbelbettverfahrensweise das Medium im Kreis gepumpt wird. Durch die Wirbelbettverfahrensweise wird ein Überlaufen von bewachsenem Füllkörper oder bewachsenen Festbettbestandteilen verhindert.

Das Anwachsen der Mikroorganismenkultur (d. h. der Verfahrensschritt vor dem eigentlichen Kultivieren) kann unter Rieselbett- oder Wirbelbettreaktorführung erfolgen. Das Reaktionsmedium, das für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden kann ist vorzugsweise ausgewählt aus Wasser, Nährlösung (wie z. B. Czapek Dox Broth Medium), wässrigen Lösungsmitteln, umzusetzendes Substrat usw.

In Abhängigkeit von dem Reaktionsmedium und den Mikroorganismen wie filamentösen Pilzen (besonders Penicilli, Aspergilli, Fusarien, Trichodermen), Hefen und Bakterien umfassen die Reaktions-/Abbauprodukte der Mikroorganismenkulturen, Proteine einschließlich Enzymen, Antikörper usw., Sekundär-Stoffwechselprodukte, umgewandelten Substrate einschließlich Alkohole, Aldehyde, Ketone organischer Säuren, Alkaloide, Pigmente, Aromastoffe usw., gereinigten Abwässer oder umgewandelte Xenobiotika. Besonders bevorzugte Reaktions-/Abbauprodukte sind Enzyme (insbesondere Hydrolasen, Oxidasen, Transferasen usw.) und Sekundärmetaboliten (insbesondere Alkaloide).

Das erfindungsgemäße Verfahren kann darüber hinaus die weitere Auftrennung, das Abtrennen von festen Partikeln und Mikroorganismen durch Filtrieren, Sedimentieren usw. und/oder Trennen mittels Ultrafiltration und/oder Chromatographie umfassen. Es ist weiterhin bevorzugt, dass bei Überschreitung eines Druckverlustes über der Befüllung des Fließbetts von > 100 Pa/m Schütthöhe oder Festbettfüllung, vorzugsweise > 50 Pa/m von der Rieselbettreaktor-Verfahrensführung in die Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung umgeschaltet wird.

Der Zeitraum, in dem die Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung erfolgt, wird vorzugsweise so gewählt, dass bei der nachfolgenden Rieselbettreaktor-Verfahrensführung die Überschreitung des Druckverlustes zurückgeführt ist. Sie dauert vorzugsweise wenigstens 1 Minute, insbesondere 10 min bis 4 h. Die Wirbelbettverfahrensweise kann dabei auch dazu genutzt werden, dass

hiermit gewünschten Produktions-, Stoffumwandlungs-, Abbaueffekte und Ablösungseffekte der Produkte vom Wirbelbett erreicht werden.

Das Kultivierungsverfahren der Erfindung kann weiterhin die Beaufschlagung von Druck umfassen, wobei das Reaktionsmedium durch unter dem Festbett gegebenenfalls vorhandene Sieb- und Filterböden gepresst wird. Diese Sieb- und Filterböden können dabei verschiedene Maschenweiten/ Porengrößen, insbesondere absteigend, abhängig vom Bettmaterial zwischen 1 mm bis zum Ultrafiltrationsbereich von ca. 5000 Dalton, aufweisen. Durch den Einsatz solcher Sieb- und Filterböden kann eine sukzessive Isolierung von Partikeln verschiedener Größenordnungen erzielt werden. Weiterhin bevorzugt ist dabei eine schräge Anordnung der Filter- und Siebböden, die es ermöglicht, die Produkte durch Abwaschen durch Wasser/Puffer einzeln zu eluieren und getrennt für die Weiterverarbeitung aufzufangen.

In dem Kultivierungsverfahren der Erfindung kann vorzugsweise als Festbett alle möglichen organischen festen Substrate einschließlich Holz, Einjahrespflanzen, anderes Pflanzenmaterial, Humus, Kohle, organische Abfälle aller Art sowohl pflanzlicher als auch tierischer Herkunft als Einzelstoffe oder als Gemische für die Anzucht von Mikroorganismen-Reinkulturen oder Gemische eingesetzt werden. Ebenso kann als Festbett Füllkörper, insbesondere solche aus Kunststoffen, Keramik, Glas und mineralischen Materialien, Aktivkohle, Kieselerde oder Schlacken eingesetzt werden, worauf die Mikroorganismenkulturen als Reinkulturen oder Gemische frei oder immobilisiert zum Wachsen gebracht werden.

Den auf dem Festbett befindlichen Mikroorganismen können zusätzlich Enzyme, bevorzugt Hydrolasen und/oder Oxidoreduktasen, frei oder immobilisiert (bevorzugt über das Reaktionsmedium) zugegeben werden. Es ist auch bevorzugt, beim Kultivieren dem Mikroorganismus Co-Enzyme zuzugeben, die frei oder immobilisiert oder mit dem jeweiligen Enzym co-

immobilisiert sein können. Solche Co-Enzyme sind vorzugsweise ausgewählt sind aus NAD, NADP, FAD, CoA, PAL, TPP, ATP usw.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des Kultivierungsverfahrens wird beim Kultivieren eine Auftrennung, partielle Aufreinigung oder Konzentrierung der gebildeten Produkte oder umgewandelten Substrate erzielt. Es ist weiterhin besonders bevorzugt, dass bei der Rieselbettreaktor-Verfahrensführung unterschiedliche Organismen oder Organismen-Mischkulturen eingesetzt werden als bei der Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung und insbesondere auch verschiedene Enzyme und Co-Enzyme den verschiedenen Reaktorfahrweisen zugegeben werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Produktion von Enzymen, zur Produktion von Sekundärmetaboliten, zur Behandlung von pflanzlichen Material, insbesondere Holz und Einjahrespflanzen, zum Einsatz als Biokatalysatorsystem bei der chemischen Synthese, zum Einsatz in der Schadstoffentfernung aus Abwasser und zum Abbau von Xenobiotika eingesetzt. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren können bei einer sukzessiven Produktion von Enzymen, Sekundärmetaboliten, chemischen Zwischen- oder Endprodukten in der Rieselbettreaktor-Verfahrensführung und/oder der Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung die entsprechenden Produkte durch die vorhandenen Separierungsmöglichkeiten des Bioreaktors vorgereinigt werden.

Bei der Behandlung von pflanzlichen Material (Holz, Einjahrespflanzen), beim Einsatz in der Schadstoffentfernung aus Abwasser und beim Abbau von Xenobiotika ergibt sich durch die Möglichkeit der verschiedenen Verfahrensführung eine Verbesserung der Behandlungsleistung oder Abbauleistung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Kultivierungsverfahren durch im Reaktor vorhandene Sensoren zur pH-, pO₂-Messung, zur Messung von Feuchte, Temperatur und Druck eine Reaktorsteuerung über Soll/Istwert-Regelung kontrolliert. Weiterhin können mehrere der Bioreaktoren in Serie geschaltet sein, so dass die Produkte des

ersten Bioreaktors dem zweiten beziehungsweise den folgenden als Substrate zugeführt werden. Schließlich kann die bei der Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung segmentierte Rieselbettkultur als Animpfkultur für die nächste Scale-up Stufe des Rieselbetts (und/oder Wirbelbetts) dienen, in dem sie teilweise oder ganz in die nächste Scale-up Stufe überführt wird.

Bei einer ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Bioreaktors (2) (Fig. 1 - 3) dessen Prinzip in Fig. 1 vereinfacht dargestellt ist, ist in einem Reaktionsbehälter 10 ein Festbett 12 angeordnet. Das Festbett 12 wird durch eine Festbettauflage 14, wie ein Gitter oder Sieb, gehalten und ist innerhalb des Reaktionsbehälters 10 angeordnet. Auf Grund der Formgebung des Reaktionsbehälters 10, der sich in Fig. 1 nach unten, d.h. in Richtung eines Auslasses 16, verjüngt, kann die Festbettauflage 14 auf einfache Weise in den im Querschnitt dreieckigen Reaktionsbehälter eingelegt werden. Eine gesonderte Befestigung oder Aufnahme für die Festbettauflage 14 kann vorgesehen sein. Es ist somit möglich, das Rückhalteelement 14 durch einfaches Herausheben aus dem Reaktionsbehälter zu entnehmen.

Oberhalb der in der Höhe variabel gestaltbaren Festbettoberfläche (beispielhaft 13) sind mehrere Rieseldüsen 18 angeordnet, die über eine gemeinsame Zuleitung 20 versorgt werden. Die einzelnen Rieseldüsen 18 sind von oben gesehen (Fig. 2) über den gesamten Querschnitt des Reaktionsbehälters 10 im Wesentlichen regelmäßig verteilt angeordnet. Die Rieseldüsen 18 sind über die Rohrleitung 20 mit unterschiedlichen Tanks 22, 24, 26, 28 verbunden. In diesen kann beispielsweise eine Säure, eine Lauge, Wasser, eine Pufferlösung und/ oder eine Nährstofflösung vorgesehen sein. Durch derartig angeordnete Pumpen und Ventile können diese Flüssigkeiten in vorgegebenen Mengen und/ oder Verhältnissen über die Rieseldüsen 18 dem Reaktor 10 zugeführt werden.

Ferner ist eine Belüftungseinrichtung 30 mit mehreren Belüftungsdüsen 32, 34, 36 vorgesehen. Im dargestellten Ausführungsbeispiel sind die Düsen 32 (im Rieselbettverfahrensnachweis) oberhalb des Festbettes 12 angeordnet

oder ragen nur geringfügig in das Festbett 12 hinein. Die Düsen 34 sind innerhalb des Festbettes 12 angeordnet und die Düsen 36 sind unterhalb des Festbettes 12 angeordnet. Durch die Belüftungseinrichtung 30 kann Luft oder ein anders Gas in den Reaktionsbehälter 10 eingebracht werden, um ein Verstopfen des Festbettes 12 zu vermeiden. Auch kann über die Belüftungseinrichtung 30 ein die Reaktion in dem Bioreaktor beeinflussendes Gas zugeführt werden.

Über eine Entnahmeeinrichtung 38, die geeignete Absperrventile und ggf. eine Pumpe aufweist, kann im dargestellten Ausführungsbeispiel oberhalb des Festbettes 12 Medium aus dem Reaktor 10 entnommen werden. Das Medium wird sodann über ein Rohr 40 abgeführt, wobei es möglich ist, das abgeführte Medium erneut über das Rohr 20 und die Rieseldüsen 18 dem Behälter 10 zuzuführen, bevorzugt aber für den Wirbelschichtbetrieb über Rohr 40, 42 durch 16 wieder dem Bioreaktor zuzuführen. Ferner ist es möglich, das über die Entnahmeeinrichtung 38 und das Rohr 40 abgeführte Medium über Rohrleitungen 42, 44, 48 beispielsweise zu entsorgen oder einer Aufbereitung oder Weiterbehandlung zuzuführen. Hierbei kann ggf. ein Filter 50 zwischengeschaltet sein. Über ein mit dem Rohr 44 verbundenes Rohr 52 kann das abgeführte Medium auch einem Vorratstank 54 zugeführt werden.

In dem spitz zulaufenden bzw. sich verjüngenden unteren Bereich des Reaktionsbehälters 10 wird das Reaktionsmedium 56 gesammelt. Das Reaktionsmedium 56 kann über den Auslass 16 und die Rohrleitungen 46, 52 dem Vorratstank 54 oder über die Rohrleitung 48 einem weiteren Prozess etc. zugeführt werden.

Zur Unterstützung des Lösens von Partikeln und dgl. innerhalb des Rückhalteelementes 14 und/oder des Festbettes 12 ist es möglich, den Bioreaktor 10 zu fluten. Hierzu wird die Förderrichtung des Fluids umgekehrt und beispielsweise aus dem Vorratstank 54 durch die Rohre 52, 42 und den sodann als Einlass dienenden Auslass 16 Reaktionsflüssigkeit 56 in den Bioreaktor gepumpt. Die Reaktionsflüssigkeit kann ggf. über die Entnahmeeinrichtung 38 abgeführt und

über das Rohr 42 dem Bioreaktor 10 wieder zugeführt werden. Um, deutlich unterschiedlich zum Stand der Technik, ein Verblocken des Festbetts aufzulösen, kann nach dem Fluten durch 32 und/oder 34 und/oder 36 Druckluft in oder unter das Festbett gepumpt werden, um das besonders bei filamentösen Pilzen entstandene Mycelgeflecht zu zerstören und das Festbett so zu entblocken.

Des Weiteren weist der erfindungsgemäße Bioreaktor eine Messwerterfassungseinrichtung 58 auf, die mit einer oder mehreren Messsonden 60 verbunden ist. Die Messsonden 60 sind beispielsweise innerhalb des Festbettes 12 angeordnet und dienen beispielsweise zur Aufnahme des Feuchtigkeitsgehalts, des pH-Wertes etc.

Des Weiteren ist mit dem inneren des Bioreaktors ein Abluftrohr 62 verbunden, das ggf. über ein Ventil verschließbar ist und zur Regelung des innerhalb des Bioreaktors 10 herrschenden Drucks dient.

Fig. 3 entspricht prinzipiell der Fig. 1, wobei zusätzlich die erforderlichen Pumpen und Ventile schematisch dargestellt sind.

Die in den Fig. 4 und 5 dargestellte Ausführungsform der Erfindung stellt eine Erweiterung der anhand der Fig. 1 - 3 beschriebenen Erfindung dar. Identische oder ähnliche Bestandteile sind daher mit denselben Bezugszeichen bezeichnet.

Bei dieser Ausführungsform (Fig. 4 und 5) sind zusätzlich unterhalb des Rückhaltelements 14 Filterelemente 64, 66 vorgesehen. Die Filterelemente 64, 66 dienen zum Filtern des erzeugten Reaktionsmediums, wobei die Porengröße des Filterelements 66 kleiner ist, als die Porengröße des Filterelements 64.

Im dargestellten Ausführungsbeispiel sind die Filterelemente 64, 66 geneigt angeordnet (Fig. 5). Zur Produktentnahme sowie zur Reinigung der

Filterelemente 64, 66 ist jeweils eine Spüleinrichtung 68, 70 vorgesehen. Mit dieser ist es möglich, über Einlässe 72, 74 eine Spülflüssigkeit auf die Filterelemente 64, 66 zu leiten. Auf der den Spüleinrichtungen 68, 70 gegenüberliegenden Seite des Bioreaktors 10 sind Abführeinrichtungen 76, 78 vorgesehen, durch die die Produkte und die Reinigungsflüssigkeit wieder abgeleitet werden kann. Wie aus Fig. 4 ersichtlich, kann als Spülflüssigkeit Medium über die Entnahmeeinrichtung 38 und das Rohr 42 entnommen und zum Spülen der Filtereinrichtung 64, 66 genutzt werden.

Des Weiteren ist eine Druckerzeugungseinrichtung 80 vorgesehen, die mit der Belüftungseinrichtung 30 verbunden ist. Durch die Druckerzeugungseinrichtung 80 kann innerhalb des Bioreaktors 10 ein Druck erzeugt werden, wobei der Druck oberhalb des Festbettes 12 höher ist, so dass Reaktionsmedium durch das Rückhalteelement 14 und die Filterelemente 64, 66 gedrückt werden kann. Hierdurch kann zusätzlich eine Reinigung des Rückhalteelements 14 sowie der Filterelemente 64, 66 erfolgen.

Die Filterelemente 64, 66 sind in den sich verjüngenden Teil des Bioreaktors 10 eingelegt. Hierzu können entsprechende Auflagen an der Innenwand des Bioreaktors vorgesehen sein. Ebenso ist es möglich, den Bioreaktor selbst in diesem Bereich stufenförmig auszubilden, so dass die Filterelemente auf entsprechende Stufen gelegt werden können.

Eine entsprechende Druckerzeugungseinrichtung kann auch in der anhand der Fig. 1 - 3 beschriebenen Erfindung vorgesehen werden.

Mit dem beschriebenen neuen Prinzip der Kombination eines Rieselbettreaktors mit dem Wirbelbettreaktor ist es möglich, alle möglichen organischen festen Substrate wie z.B. Holz, Einjahrespflanzen, anderes Pflanzenmaterial, Humus, Kohle, organische Abfälle aller Art sowohl pflanzlicher als auch tierischer Herkunft als Einzelstoffe oder als Gemische als Festsubstrat (Festbett) für die An-

zucht von Mikroorganismen-Reinkulturen (Bakterien, Hefen, andere Pilze) oder Mischkulturen zu benutzen.

Dabei ist es auch möglich, dass den Kulturen zusätzlich Enzyme aus allen Klassen nach der „International Enzyme Nomenclature: Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (Enzyme Nomenclature, Academic Press, Inc., 1992)“, bevorzugt Hydrolasen und/oder Oxidoreduktasen zugegeben werden und diese als freie Enzyme oder immobilisiert zugegeben werden. Dabei kann die Immobilisierung nach allen gängigen Methoden des Standes der Technik wie z.B. kovalente Bindung, adsorptive Bindung, Kreuz-verknüpfung an Trägermoleküle oder Carrier, durch Matrixeinbindung in z.B. Poly-saccharidmatrices (Algin, etc.), Copolymerisation von Enzymen an Zellen und durch Mikroverkapselung durchgeführt werden.

Zusätzlich ist es möglich, dass frei oder immobilisiert oder mit dem jeweiligen Enzym co-immobilisiert vorliegende Co-Enzyme zugegeben werden.

Des Weiteren ist es möglich, dass die Kulturen auf Füllkörpern (Carriern) (hauptsächlich ringförmig, rund) aus z.B. Kunststoffen, Keramik oder Glas und mineralischen Materialien wie z.B. Aktivkohle, Kieselerde oder Schlacken etc. aufgebracht werden und frei oder immobilisiert zum Wachsen gebracht werden, wobei die Nährstoffzufuhr hauptsächlich über die Flüssigkeitsversorgung bereit gestellt wird. Auch hier ist eine zusätzliche Zugabe von Enzymen und/oder Co-Enzymen frei, immobilisiert oder co-immobilisiert möglich.

Dabei ist es unter Umständen nicht nötig, dass bei der Fahrweise als Wirbelbettreaktor die organismenbewachsenen Substrate oder Carrier eine Dichte besitzen über der Dichte von Wasser, um durch den Auftrieb in Schwebelage gehalten zu werden, da durch ein Auf- und Absinken der bewachsenen Substrate/Carrier eine weitere gewünschte Loslösung von Organismen erfolgt.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der vorliegenden Erfindung ist die Möglichkeit der während der Kulturdauer stattfindenden weiteren Auftrennung/Aufreinigung der gebildeten Produkte wie z.B. Enzyme, Stoffwechselprodukte oder umgewandelten, d.h. chemisch veränderten Substrate.

Dies wird erfindungsgemäß dadurch gelöst (Fig. 1 - 3), dass a) (abhängig von der Aufgabenstellung und dem Druckverhalten des bewachsenen Rieselfestbettes) durch Druck oder Abpumpen die unter dem Rieselfestbett aufgefangene Flüssigkeit durch eine Vorfiltereinheit und Sterilfiltrationseinheit in ein Zusatzgefäß gepumpt wird und entweder nach Messung der kulturrelevanten Produktparameter die Lösung weiterverarbeitet wird (Ultrafiltration/ Flüssigchromatographie/ Analytik etc.) oder bei nicht ausreichender Produktqualität und/oder Konzentration in die Fermentationseinheit über die Rieseinheit zurückgeführt wird. Die entsprechenden Messungen im Zusatzgefäß können manuell nach Probenentnahme oder kontinuierlich durch FIA (flow injection analysis) erfolgen. Die aufgefangene Flüssigkeit kann auch direkt ohne Durchgang durch ein Zusatzgefäß nach Partikel- und Sterilfiltration über ein Ultrafiltrationsmodul eingeeengt werden.

Dies wird ebenfalls erfindungsgemäß dadurch gelöst (Fig. 4 und 5), dass b) (abhängig von der Aufgabenstellung und dem Druckverhalten des bewachsenen Rieselfestbettes) speziell unter dem Rieselbett Siebböden und Filterböden angeordnet werden, durch die optional mit Druckbeaufschlagung das Medium durch spezielle Siebe bzw. Filter gepresst werden kann, welche verschiedene Maschenweiten/ Porengrößen (absteigend, abhängig vom Bettmaterial zwischen 1 mm bis zum Ultrafiltrationsbereich von ca. 5000 Dalton) haben und eine sukzessive Isolierung von Partikeln verschiedener Größenordnungen erlauben.

Durch die schräge Anordnung der Filter und/ oder Siebe 64, 66 können die Produkte durch seitliches Einspritzen von Wasser/Puffer einzeln eluiert und getrennt für die Weiterverarbeitung aufgefangen werden. Dies dient zusätzlich

der Reinigung der Filter. Ein Verstopfen der Filter wird zusätzlich behoben, indem von unten Medium in den Bioreaktor 10 eingebracht wird und die Filter 64, 66 unter Druck von unten freigespült werden. Nichtumgesetzte Substrate, die sich über den Filtern 64, 66 ablagern, können nach dem Spülen wieder dem Reaktor 10 zugeführt werden.

Diese neue Verfahrensführung ist von sehr großer Wichtigkeit, da sie die sukzessive Aberntung von z.B. Enzymen erlaubt. So ist z.B. beschrieben, dass lignolytische Enzyme bei vielen Weißfäulepilzen z.B. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* u.a. auf vielen Nährböden und auch beim Wachstum auf festen Substraten nacheinander gebildet werden z.B. in der Reihenfolge: Mangan-Peroxidase → Laccase (z.B. bei *Trametes*).

Es wäre von erheblichem Vorteil, die verschiedenen Enzymspezies zumindest mit wesentlich weniger Kontamination durch andere Begleitenzyme erhalten zu können. Dies ist zum ersten Mal mit Hilfe dieser Fermenterfahrweise in erheblichen Ausbeuten möglich. Die Kulturführung kann als Batchverfahren, als Fed-batch-Verfahren oder kontinuierlich erfolgen (abhängig vom Trägermaterial und der Fragestellung). Als Prozesssteuerungsparameter können pH, Temperatur, pO_2 , Feuchte, Biomasse und Druck gemessen werden.

Ein weiteres Merkmal der vorliegenden Erfindung ist, dass man durch Unter-einanderschaltung oder Nebeneinanderschaltung (mit verschiedenen Breiten- und/oder Höhenabmessungen der Reaktorgefäße) des in Abbildung I dargestellten Bioreaktoraufbaus zu einem Mehrfach-Bioreaktorsystem kommen kann, bei dem durch die unterschiedlichen Volumina fassenden Rieselreaktor-Festbette und entsprechenden Wirbelbette eine völlig neue Möglichkeit des Scale-up dieser Reaktorfahrweise möglich wird. So können mehrere Reaktoren parallel geschaltet werden, in denen sich Festbette und Wirbelbette abwechseln und die gebildeten Produkte des einen vom anderen in einem kontinuierlichen Verfahren weiterverarbeitet werden. Es kann ebenfalls nach der Fließbett-/Wirbelschichtfahrweise die durch diese Fahrweise segmentierte Riesel-

bettkultur als Animpfkultur für die nächste Scale-up Stufe des Rieselbetts (und oder Wirbelbett) dient, in dem sie teilweise oder ganz in die nächste Scale-up Stufe überführt wird.

Detailliertere Beschreibung der Fermenterfunktion

Die erfindungsgemäße Bauweise, wie z. B. in Fig. 1 - 3 gezeigt, erlaubt eine sehr gute Regelung der Feuchte, was oft ein sehr großes Problem bei Festbettreaktoren darstellt.

Über die Rieseldüsen 18 kann Nährlösung aus dem Nährlösungstank 28 oder Wasser/Puffer über den Wasser- bzw. Puffertank 26 auf das Festbett 12 gepumpt werden.

Ebenso kann zur pH-Einstellung bzw. pH-Nachstellung Säure aus dem Tank 24 oder Lauge aus dem Tank 22 über die Rieseldüsen 18 zugegeben werden. Die Luftzufuhr erfolgt über die Belüftungseinrichtung 30. Die Abluft wird über den Auslass 62 abgeleitet.

Die aus dem Festbett 12 austretende Flüssigkeit 56 gelangt in einen Bodentank und kann über die Rieseldüsen 18 über eine Leitung 42, 20 wieder auf das Festbett 12 zurückgeführt werden.

Die Flüssigkeit 56 aus dem Bodentank kann auch über eine Pumpe durch den Partikelfilter 50 und dem Sterilfilter 51 in den Vorratstank 54 gepumpt werden. Bei eventuell erforderlichem höheren Druck für die Filtrationen erfolgt dies durch die Druckstützen 32.

Die Flüssigkeitsparameter im Vorratstank 54 können manuell gemessen werden oder z.B. durch FIA automatisch bestimmt werden. Optional ist eine sofortige Einengung der Flüssigkeit mittels Ultrafiltration vor der Befüllung des Vorratstanks 54 möglich.

- 20 -

Über die Messwerterfassung 58 werden pH, pO₂, Temperatur, Feuchte und Druck außerhalb des oder im Reaktorbett 12 durch entsprechende Sensoren 60 erfasst, und die Zugabe von Säure/Base, Sauerstoffzufuhr, Temperatureinstellung (doppelwandiger temperierter Reaktormantel, gesteuerte Luftpulse, temperierte Berieselung), Feuchte (Berieselungsmenge bei mangelnder Feuchte oder Zufuhr trockener Luft bei zu hoher Feuchte) und Druck (Änderung der Verfahrensführung: Rieselbett → Wirbelbett) geregelt.

Bei Änderung der Verfahrensführung von Rieselbett zu Wirbelbett wird durch Luft über Druckerhöhung über die Belüftungszufuhr 30, 32, 34, 36 bei ggf. gleichzeitiger Flutung des Festbettes 12 mit (optional) Nährlösung/ Wasser/ Puffer das Festbett 12 aufgelöst und über die Luftzufuhr 30, 32, 34, 36 die Wirbelbettverfahrweise aufrechterhalten. Über die Leitung 40 wird die Flüssigkeit im Kreislauf gefahren. Durch Beendigung der Belüftung, Beendigung der Flüssigkeitszufuhr über den Bodentank und Starten der Berieselung über die Rieseldüsen 18 kann die Rieselbettfahrweise nach optionaler Trocknung des Bettes 12 mittels der Belüftungseinrichtung 30 erneut gestartet werden.

Die in Fig. 4 und 5 dargestellte Bioreaktorvariante mit Sieb- und Filterkompartimentierung unter dem Festbett 12 erlaubt die Möglichkeit der Partikeltrennung in der durch das Festbett geleiteten Flüssigkeit. Dazu sind Siebe/ Filter 64, 66 unter dem Festbett 12 eingebaut. Eine Entleerung der einzelnen Stufen ist über die Ausgänge 76 oder 78 (Bodentank) durch Druckbeaufschlagung oder Abpumpen möglich. Ein Verstopfen der Filter 64, 66 wird dadurch gelöst, dass a) die Filter 64, 66 freigespült werden, und/ oder (b) dass die Kompartimente unterhalb der Filter 64, 66 kontrolliert sukzessiv geflutet werden und die Filter von unten unter Druck freigespült werden.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert, soll aber nicht auf diese beschränkt sein.

Beispiele

Beispiel 1: Produktion und sukzessive Gewinnung von lignolytischen Enzymen mittels Kombination aus Wirbelbettreaktor.

Der Reaktor mit einem Festbett-Volumen von ca. 8 l wird mit Zellstoff (Softwood/ Kraft) in solcher Weise befüllt, dass nach Durchmischen mit einer mit Hilfe eines Waring blender's gemixten Standkultur von *Trametes versicolor* und pH-Einstellung auf pH 4.5 ca. 4-6% Stoffdichte resultiert. Es wird soviel Zellstoff/Inokulummenge auf die Siebplatte (13, Fig. 1 - 3) gegeben, dass eine Festbetthöhe von ca. 5-8 cm erhalten wird. Das Verhältnis Zellstoff/Inokulum beträgt ca. 30:1 bis 10:1. Die Kultur wird mit Beginn der Berieselung und Belüftung gestartet. Die Berieselungsflüssigkeit enthält 0.05 bis 0.5% Glukose und 0.01 bis 0.1% Stickstoff in Form von Asparagin bei pH 4.5.

Die Abflüssigkeit wird nach Überführung in das Vorratsgefäß nach Laccase und Mangan-Peroxidase detektiert.

Nach ca. 3-5 Tagen wird zunächst die Mangan-Peroxidase und zwischen Tag 5-8 die Laccase geerntet, die durch diese sukzessive Aberntung nur ca. 10-20% mit dem jeweils anderen Enzym verunreinigt ist.

Nach ca. 10 Tagen Kulturdauer ist eine relativ starke Verblockung des Festbetts (> 100 Pa/ m Festbett) festzustellen.

Um diese Verstopfung zu beheben und auch durch das Ändern der Kulturfahrweise eine Vereinzelnung (Zerkleinerung) der gebildeten Mycelmatte zu erreichen, wird durch Druckbeaufschlagung über die Belüftungseinrichtung 30 bei gleichzeitiger Flutung des Festbettes 12 und Beendigung der Berieselung von der Rieselbettreaktor-Fahrweise auf die Wirbelbett-Fahrweise umgeschaltet, dergestalt, dass das Medium von unten in den Kreislauf gepumpt wird und die Belüftung über die Belüftungseinrichtung 30 so eingestellt wird, dass auch ohne Abdeck-Filter kein bewachsener Zellstoff ausgetragen wird. Es wird eine starke Segmentierung des Mycels erhalten, welches nach Beendigung der Wir-

- 22 -

belbett-Fahrweise nach ca. 4 Stunden und erneutem Start der Rieselbettreaktor-Fahrweise (Drosselung der Belüftung, nur noch Belüftung, Anschalten der Berieselung) zu einem guten Anwachsen der Kultur führt.

Nach ca. 3-5 Tagen Kulturdauer kann wieder eine Ernte von zunächst Mangan-Peroxidase und zwischen Tag 5-8 eine Ernte von Laccase erhalten werden, die entsprechend der ersten Aberntung ebenfalls nur ca. 10-20% mit dem jeweils anderen Enzym verunreinigt ist. Insgesamt sind ca. 4 Zyklen mit relativ guten Ausbeuten möglich.

Bei nötiger steriler Fahrweise wird das Aufschlag-Gefäß des Waring Blendor`s dampfsterilisiert und die zum Mischen von Kultur/Inokulum, Einstellen des pHs etc. benutzten Teile eines Starmixers oder eines Hobartmixers, die mit dem Mixgut in Berührung kommen mit Ethanol (75%ig) oder 2M NaOH über Nacht sterilisiert. Mixen, Mischen und das Überführen des Mixgutes in das Festbett des Fermenters können unter einer sterilen Werkbank erfolgen.

Beispiel 2: Die Nutzung des Wirbelbettmodus ist nicht auf die Entblockung des Festbetts beschränkt. Anders als vom Stand der Technik bekannt, kann das Medium in der erfindungsgemäßen Ausführung des Bioreaktors im Kreislauf gepumpt und extern belüftet (mit O₂-angereichert) werden. So ist es möglich, Mikroorganismen zunächst im aeroben Wirbelschichtbetrieb auf einem Träger (z.B. Polyurethan, Perlite, Sinterglas, Biopolymere etc.) scherkraftarm anwachsen zu lassen, um im darauf folgenden Rieselfilm-Betrieb von den Mikroorganismen sekretierte Produkte (z.B. Enzyme, Sekundärmetabolite, organische Säuren) abzuernten.

Verfahren A: Eine Conidiosporenlösung (10⁵ Sporen/ml) von *Aspergillus niger* wird im Wirbelschichtmodus, in einer 14% Glucose, 0.04 % (NH₃)x(NH₃SO₄), 0.25 %KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7 H₂O, 0.001% FeSO₄, 0.00025% ZnSO₄, pH 5.5) enthaltenden Lösung, langsam im Kreislauf gepumpt. Im Bioreaktor (10 Liter Festbettvolumen) besteht ein Wirbelbett aus Pulyurethan-Stücken (Kantenlänge 0,2-1 cm). Die Sporen setzen sich nach einigen Stunden auf

- 23 -

dem Polyurethan-Träger fest. Wenn die Zahl der freien Sporen unter 10^3 /ml gesunken ist, wird das weiter im Kreislauf gefahrene Medium in einer externen Blasensäule belüftet um das schonende Anwachsen des Pilzes zu begünstigen. Nach vollständigem Anwachsen des Pilzes (1-2 Tage) wird das Verfahren in den Rieselfilmmodus umgestellt. Der angewachsene Pilz beginnt auf dem Polyurethan zu sporulieren und Zitronensäure zu bilden. Die Zitronensäure wird in definierten Abständen (10-30 h) durch die Rieseldüsen mit 200 ml vom Festbett abgewaschen. In nicht optimierten *Aspergillus*-Stämmen werden so Zitronensäurekonzentrationen bis 3% in der Rieselflüssigkeit erhalten. Optional kann die Rieselflüssigkeit im Kreislauf gepumpt werden bis Citratkonzentrationen um 5% erreicht werden.

Nach dem bereits bekannten Verblocken des Festbetts, dass unter diesen Bedingungen nach ca. 14 Tagen auftritt, wird erneut auf den Wirbelschichtmodus umgestellt und das Festbett durch den Flüssigkeitsstrom, unterstützt durch Druckluftpulse, durchwirbelt. Durch dieses Verfahren zerreißen, anders als im Stand der Technik bekannt, die die Polyurethan-Stücke verbindenden Hyphen des Pilzes durch die starke Verwirbelung des Festbetts.

Verfahren B: Eine Conidiosporenlösung (10^5 Sporen/ml) von *Aspergillus oryzae* wird im Wirbelschichtmodus, in einer 2% Glucose, 1% Pepton, 1% Yeast Extract, 0,6% Na-Acetat Lösung, 0,2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01% KH_2PO_4 , 0,05% KCl, 0,01% $MnSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0,01% $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,01% NaCl - Lösung langsam im Kreislauf gepumpt. Im Bioreaktor (8-Liter Festbettbettvolumen) besteht ein Wirbelbett aus Perlit-Kugeln (Durchmesser 0,1-0,5 cm). Die Sporen setzen sich nach einigen Stunden in den Poren des inerten Trägers fest. Wenn die Zahl der freien Sporen unter 10^3 /ml gesunken ist, wird das weiter im Kreislauf gefahrene Medium in einer externen Blasensäule belüftet um das Anwachsen des Pilzes zu begünstigen. Nach vollständigem Anwachsen des Pilzes (2 Tage) wird das Verfahren in den Rieselfilmmodus umgestellt. Durch die Rieseldüsen werden dünnflüssige Lipide (z.B. Olivenöl, Sojaöl) auf das Festbett geprüht. Der Pilz reagiert mit der

Produktion des Enzyms Lipase, welches in 24-48 stündigen Abständen täglich durch 300 ml Pufferlösungen (z.B. Phosphatpuffer 50mM, pH 7) im Rieselfilmverfahren vom Festbett gespült wird. Pro ml Puffer können über 30 U Lipase gewonnen werden. Ein Verblocken des Festbetts nach ca. 10 Tagen wird durch die starken Scherkräfte, die nach Medienstromumkehr und Druckluftzufuhr zwischen den Trägermaterialien entstehen aufgelöst.

Verfahren C: Eine homogenisierte Mycellösung eines Sekundärmetabolitsekretierenden (z.B. Antibiotika, Mycotoxine, Pigmente) Ascomyceten, z.B. *Penicillium chrysogenum*, wird so lange im Wirbelschichtmodus durch das Wirbelbett (Volumen 1 L, bestehend aus einer Mischung aus Holzspänen, Roggen, Lignozellulose (Gewichtsverhältnis 1:1:2)) gepumpt und dabei extern belüftet, bis in der Animpflösung mikroskopisch kein Mycel mehr sichtbar ist. Durch das scherkraftarme Rieselfilmverfahren wächst der Pilz bei externer Belüftung an. Zur Produktion der Metabolite wird auf den Rieselfilmmodus umgestellt. Das Festbett wird durch die im Reaktor befindliche Belüftungseinrichtung angetrocknet, um bei Bedarf einen für Pilze günstige geringere Wasseraktivität des Festbettes einzustellen.

Die Metabolite werden über die durch die Rieseldüsen gegebenen Puffer oder Lösungsmittel vom Festbett abgewaschen. Ein Verblocken des Festbetts nach ca. 8 Tagen wird durch die starken Scherkräfte, die nach Medienstromumkehr und Druckluftzufuhr zwischen den Trägermaterialien entstehen aufgelöst.

Ansprüche

1. Kultivierungsverfahren für Mikroorganismen, umfassend eine Kombination aus Verfahrensschritten, die für einen Rieselbettreaktor charakteristisch sind, mit solchen, die für einen Wirbelbettreaktor charakteristisch sind, wobei
 - (a) Mikroorganismenkulturen auf einem Festbett unter Rieselbettreaktor-Verfahrensführung kultiviert werden, wobei das Reaktionsmedium durch Rieseldüsen aufgebracht wird, die Belüftung von unterhalb und/oder innerhalb des Festbetts erfolgt und die durch die Festbettschicht ablaufende Lösung, welche die Reaktions-/Abbauprodukte der Mikroorganismenkulturen enthält, entweder solange, bis die gewünschte Produktivität, das gewünschte Produkt bzw. das gewünschte Abbauprodukt oder der gewünschte Abbaugrad erreicht sind, zurückgeführt wird oder die abgelaufene Lösung unmittelbar zur weiteren Auftrennung weiterbehandelt wird und
 - (b) zur Änderung der Kultivierungsbedingung oder bei Überschreiten eines bestimmten Druckverlustes über die Befüllung des Festbetts durch Einleiten von Wasser oder Nährlösung und Luft die Kulturführung für einen gewissen Zeitraum von der Rieselbettreaktor-Verfahrensführung in eine Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung umgeschaltet wird.

2. Kultivierungsverfahren nach Anspruch 1, wobei
 - (i) die Mikroorganismenkulturen ausgewählt sind aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen oder pflanzlichen Zellen, immobilisierte pflanzlichen und tierischen Gewebe usw. und insbesondere filamentöse Pilze sind; und /oder
 - (ii) bei der Wirbelbettverfahrensweise das Medium im Kreis gepumpt wird um ein Überlaufen von bewachsenem Füllkörper oder bewachsenen Festbettbestandteilen zu verhindern; und oder
 - (iii) das Anwachsen der Mikroorganismenkultur unter Rieselbett- oder Wirbelbettreaktorführung erfolgt; und/oder

- 26 -

- (iv) das Reaktionsmedium ausgewählt ist aus Wasser, Nährlösung, Lösung mit umzusetzendem Substrat usw.; und/oder
 - (v) die Reaktions-/Abbauprodukte der Mikroorganismenkulturen, Proteine einschließlich Enzymen, Antikörper usw., Sekundär-Stoffwechselprodukte, umgewandelten Substrate einschließlich Alkohole, Aldehyde, Ketone, Alkaloide, organischer Säuren, Pigmente, Aromastoffe usw., gereinigten Abwässer oder umgewandelte Xenobiotika sind und insbesondere Proteine und Sekundärmetaboliten sind; und/oder
 - (vi) die weitere Auftrennung das Abtrennen von festen Partikeln und Mikroorganismen durch Filtrieren, Sedimentieren usw. und/oder Trennen mittels Ultrafiltration, Chromatographie usw. umfasst; und/oder
 - (vii) bei Überschreitung eines Druckverlustes über der Befüllung des Fließbetts von > 100 Pa/m Schütthöhe oder Festbettfüllung, vorzugsweise von > 50 Pa/m, von der Rieselbettreaktor-Verfahrensführung in die Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung umgeschaltet wird; und/oder
 - (viii) der Zeitraum in dem Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung erfolgt, so gewählt ist, dass bei der nachfolgenden Rieselbettreaktor-Verfahrensführung die Überschreitung des Druckverlustes zurückgeführt ist, vorzugsweise wenigstens 1 Minute, insbesondere 10 min bis 4 h dauert, und/oder die durch diese zusätzliche Fahrweise gewünschten Produktions-, Stoffumwandlungs-Abbaueffekte erreicht werden.
3. Kultivierungsverfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei
- (i) das Verfahren das Beaufschlagung von Druck umfasst, wobei das Reaktionsmedium durch unter dem Festbett gegebenenfalls vorhandene Sieb- und Filterböden gepresst wird; und
 - (ii) die Sieb- und Filterböden von (i) verschiedene Maschenweiten/ Porengrößen, insbesondere absteigend, abhängig vom Bettmaterial zwischen 1 mm bis zum Ultrafiltrationsbereich von ca. 5000 Dalton, aufweisen, was eine sukzessive Isolierung von Partikeln verschiedener Größenordnungen erlaubt; und

- (iii) eine die schräge Anordnung der Filter- und Siebböden von (i) und (ii) es ermöglicht, die Produkte durch Abwaschen durch Wasser/Puffer einzeln zu eluieren und getrennt für die Weiterverarbeitung aufzufangen.
4. Kultivierungsverfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei
- (i) als Festbett alle möglichen organischen festen Substrate einschließlich Holz, Einjahrespflanzen, anderes Pflanzenmaterial, Humus, Kohle, organische Abfälle aller Art sowohl pflanzlicher als auch tierischer Herkunft als Einzelstoffe oder als Gemische für die Anzucht von Mikroorganismen-Reinkulturen oder Gemische eingesetzt werden; und/oder
 - (ii) als Festbett Füllkörper, insbesondere solche aus Kunststoffen, Keramik, Glas und mineralischen Materialien, Aktivkohle, Kieselerde oder Schlacken eingesetzt werden, worauf die Mikroorganismenkulturen als Reinkulturen oder Gemische frei oder immobilisiert zum Wachsen gebracht werden; und/oder
 - (iii) den Mikroorganismen des Festbetts zusätzlich Enzyme, bevorzugt Hydrolasen und/oder Oxidoreduktasen, frei oder immobilisiert zugegeben werden; und/oder
 - (iv) beim Kultivieren Co-Enzyme zugegeben werden, die frei oder immobilisiert oder mit dem jeweiligen Enzym co- immobilisiert sein können; und/oder
 - (v) die Co-Enzyme von (iv) vorzugsweise ausgewählt sind aus NAD, NADP, FAD, CoA, PAL, TPP, ATP usw.
5. Kultivierungsverfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, wobei
- (i) beim Kultivieren eine Auftrennung, partielle Aufreinigung oder Konzentrierung der gebildeten Produkte oder umgewandelten Substrate erfolgt; und/oder
 - (ii) bei der Rieselbettreaktor-Verfahrensführung unterschiedliche Organismen oder Organismen-Mischkulturen eingesetzt werden als bei der

Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung und insbesondere auch verschiedene Enzyme und Co-Enzyme den verschiedenen Reaktorfahrweisen zugegeben werden; und/oder

(iii) das Verfahren zur Produktion von Enzymen, zur Produktion von Sekundärmetaboliten, zur Behandlung von pflanzlichen Material, insbesondere Holz, Einjahrespflanzen, zum Einsatz als Biokatalysatorsystem bei der chemischen Synthese, zum Einsatz in der Schadstoffentfernung aus Abwasser und zum Abbau von Xenobiotika einsetzbar ist; und/oder

(iv) bei einer sukzessiven Produktion von Enzymen, Sekundärmetaboliten, chemischen Zwischen- oder Endprodukten in der Rieselbettreaktor-Verfahrensführung und/oder der Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung die entsprechenden Produkte durch die vorhandenen Separierungsmöglichkeiten des Bioreaktors vorgereinigt werden; und/oder

(v) bei der Behandlung von pflanzlichen Material (Holz, Einjahrespflanzen), beim Einsatz in der Schadstoffentfernung aus Abwasser und beim Abbau von Xenobiotika die Möglichkeit der verschiedenen Verfahrensführung eine Verbesserung der Behandlungsleistung oder Abbauleistung ermöglicht.

6. Kultivierungsverfahren nach Anspruch 1, wobei

(i) durch im Reaktor vorhandene Sensoren zur pH-, pO_2 -Messung, zur Messung von Feuchte, Temperatur und Druck eine Reaktorsteuerung über Soll/Istwert-Regelung erfolgt; und/oder

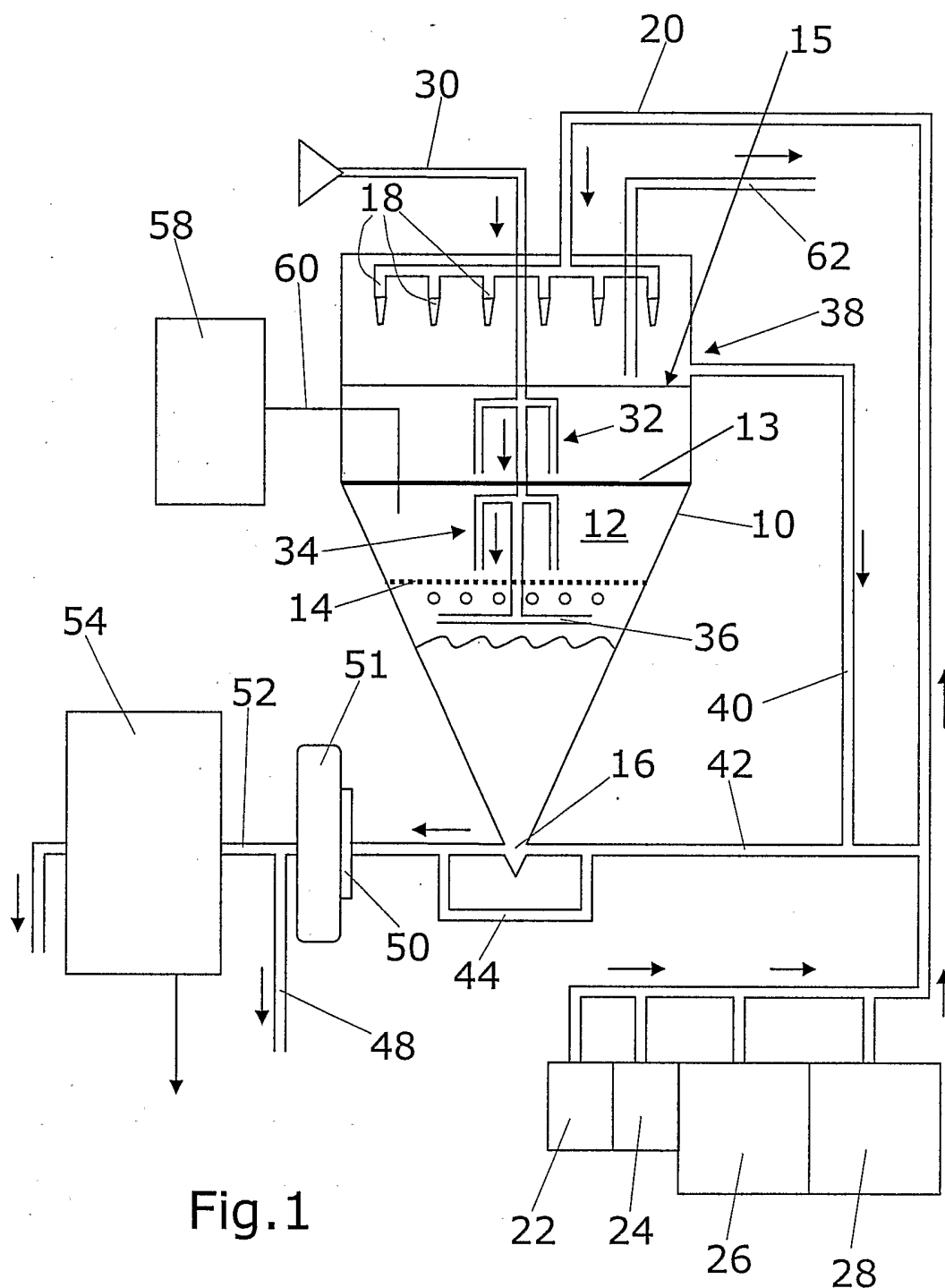
(ii) mehrere der Bioreaktoren in Serie geschaltet sind und bei denen die Produkte des ersten Bioreaktors dem zweiten beziehungsweise den folgenden als Substrate zugeführt werden; und/oder.

(iii) die bei der Wirbelbettreaktor-Verfahrensführung segmentierte Rieselbettkultur als Animpfkultur für die nächste Scale-up Stufe des Rieselbetts (und/oder Wirbelbetts) dient, in dem sie teilweise oder ganz in die nächste Scale-up Stufe überführt wird.

7. Bioreaktor zur Kultivierung von Mikroorganismen, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 6, mit einem Reaktionsbehälter (10), einer in dem Reaktionsbehälter (10) angeordneten Festbettauflage (14) zum Anordnen eines Festbettes (12) auf der Festbettauflage (14), oberhalb der Festbettauflage (14) angeordneten Rieseldüsen (18) zur Berieselung des Festbettes (12) mit Nährstofflösung oder dgl., so dass der Bioreaktor im Rieselbettverfahren betrieben werden kann und einer Belüftungseinrichtung (30, 32, 34, 36) zur Belüftung des Festbettes (12) bzw. des Innenraums des Reaktors (10), so dass der Bioreaktor im Wirbelbettverfahren betrieben werden kann.
8. Bioreaktor zur Aufzucht von Mikroorganismenkulturen, insbesondere nach Anspruch 7 und/oder zur Durchführung des Kultivierungsverfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 6, mit einem Reaktionsbehälter (10), einer in dem Reaktionsbehälter (10) angeordneten Festbettauflage (14) zum Anordnen eines Festbettes (12) auf der Festbettauflage (14), oberhalb der Festbettauflage (14) angeordneten Rieseldüsen (18) zur Berieselung des Festbettes (12) mit Nährstofflösung oder dgl., so dass der Bioreaktor im Rieselbettverfahren betrieben werden kann und einer mit dem Reaktionsbehälter (10) verbundenen Druckerzeugungseinrichtung (80) zum Hindurchpressen von Reaktionsmedium (56) durch die Festbettauflage (14).
9. Bioreaktor nach Anspruch 7 oder 8, gekennzeichnet durch eine oberhalb der Festbettauflage (14) angeordnete Rückhaltevorrichtung (15) für die Wirbelbettreaktionsführung und/oder durch eine oberhalb der Festbettauflage (14) und oberhalb der Rückhalteelemente (15) angeordnete Entnahmeeinrichtung (38) zur Mediumabfuhr, insbesondere in geflutetem Zustand.

10. Bioreaktor nach einem der Ansprüche 7 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass sich der Reaktionsbehälter (10) zumindest unterhalb der Festbettauflage (14) in Richtung eines Auslasses (16) verjüngt.
11. Bioreaktor nach einem der Ansprüche 7 - 10, gekennzeichnet durch mindestens ein unterhalb der Festbettauflage (14) angeordnetes Filterelement (64, 66).
12. Bioreaktor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass
 - (i) mehrere Filterelemente (64, 66) vorgesehen sind, deren Maschenweite/Porengröße in Richtung des Auslasses (16) abnimmt; und/oder
 - (ii) eine dem Filterelement (64, 66) zugeordnete Spüleinrichtung (68, 70) zur Reinigung des Filterelements (64, 66) vorgesehen ist; und/oder
 - (iii) das Filterelement (64, 66) in dem Reaktionsbehälter (10) vorzugsweise geneigt angeordnet ist.
13. Bioreaktor nach einem der Ansprüche 8 - 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Druckerzeugungseinrichtung (80) derart mit dem Reaktionsbehälter (10) verbunden ist, dass das Reaktionsmedium (56) zusätzlich durch das bzw. die Filterelemente (64, 66) hindurchpressbar ist.

-1/5-



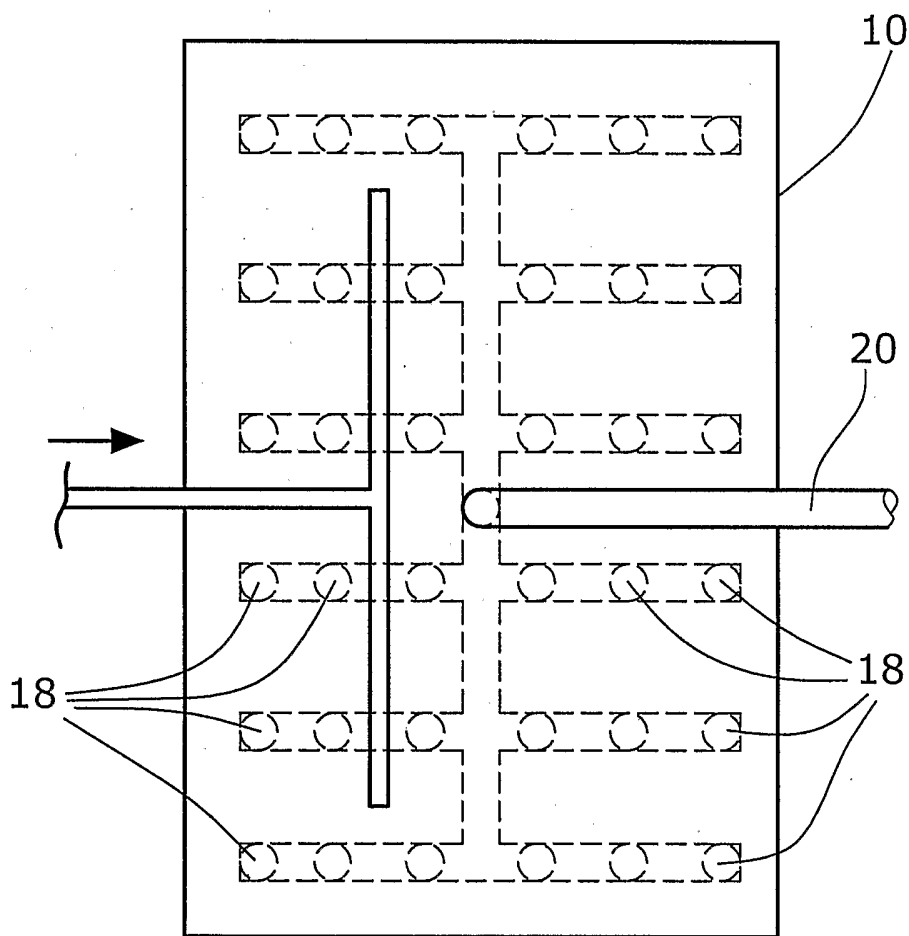


Fig.2

-3/5-

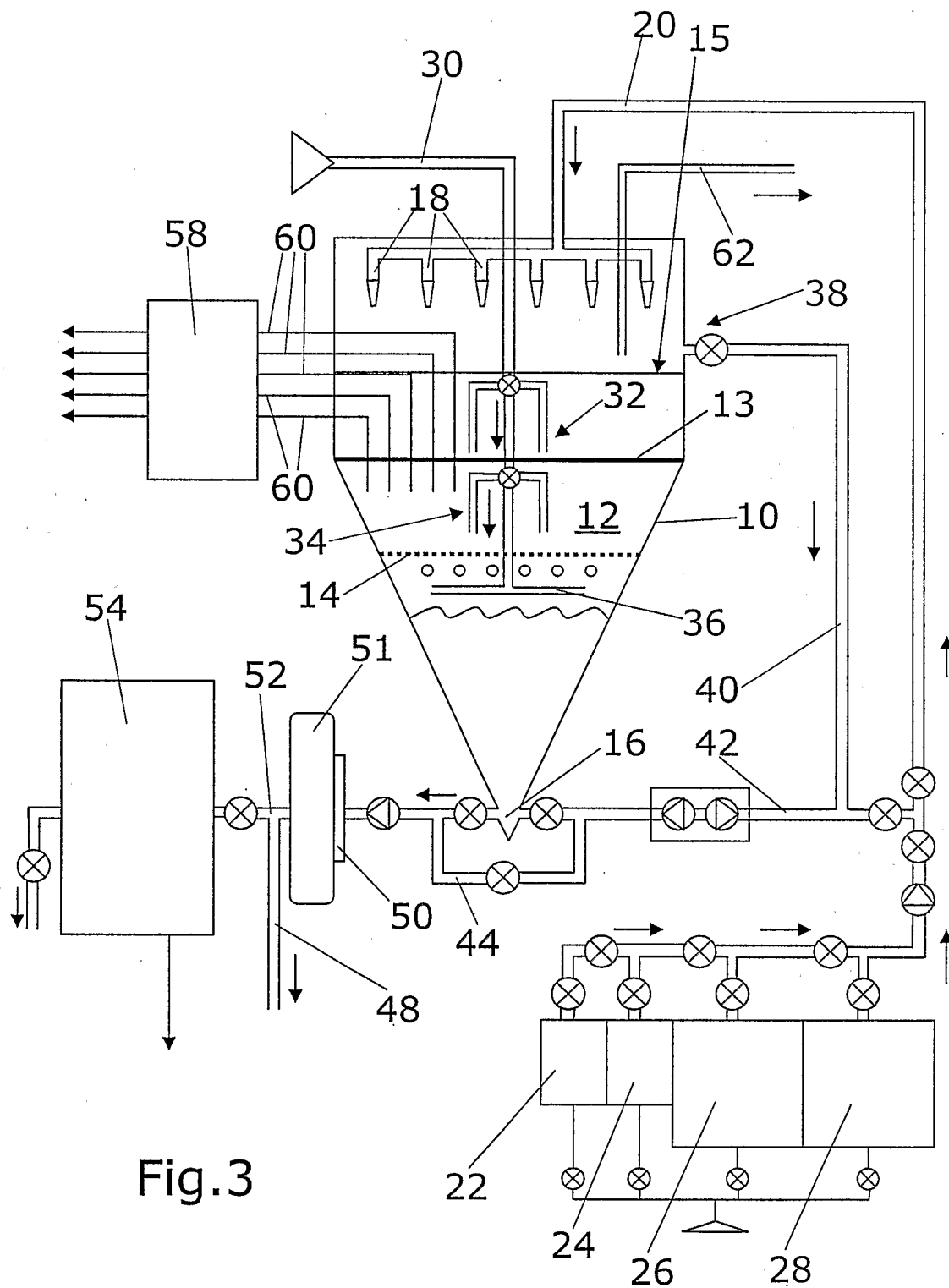


Fig.3

-4/5-

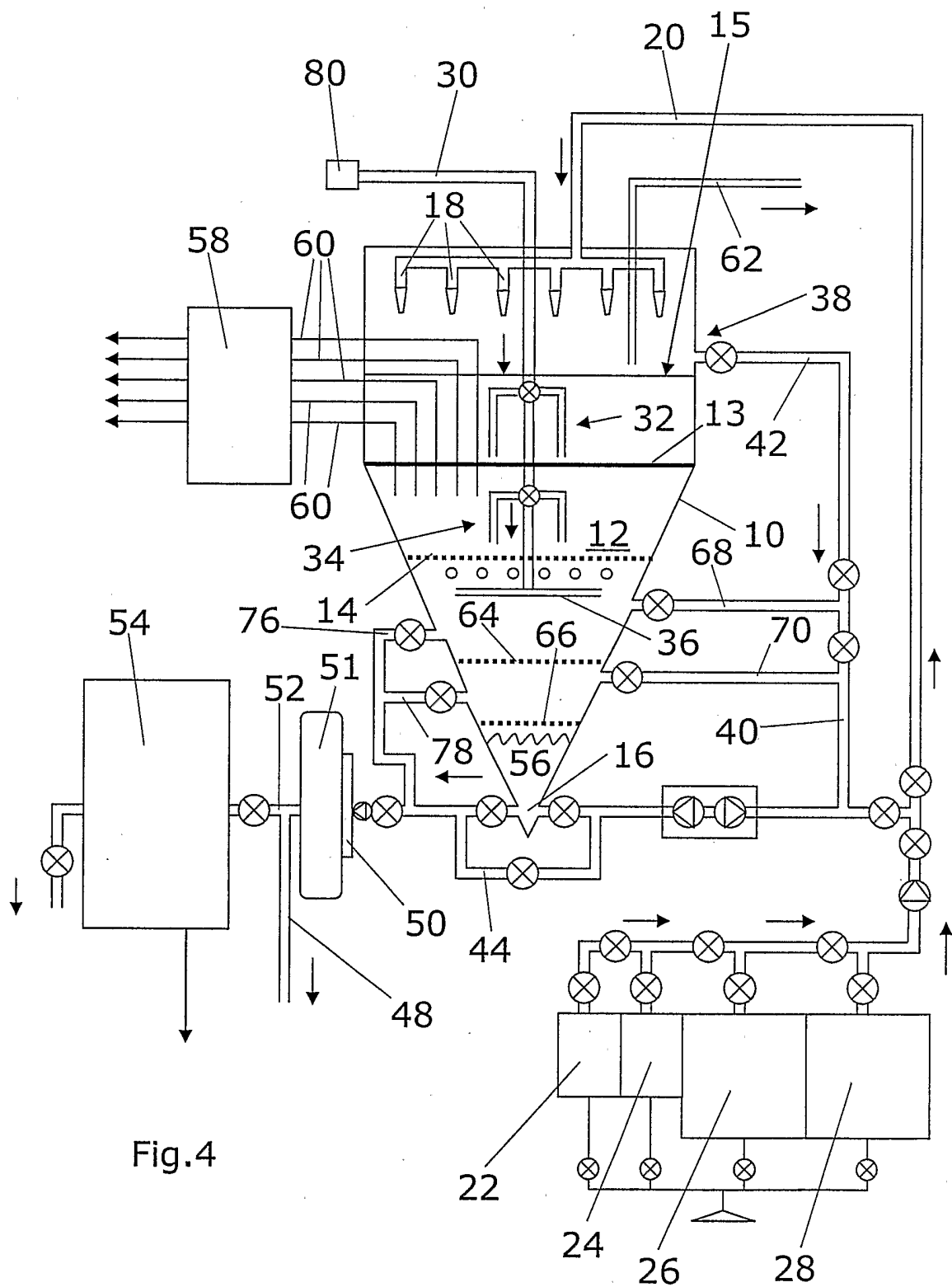


Fig.4

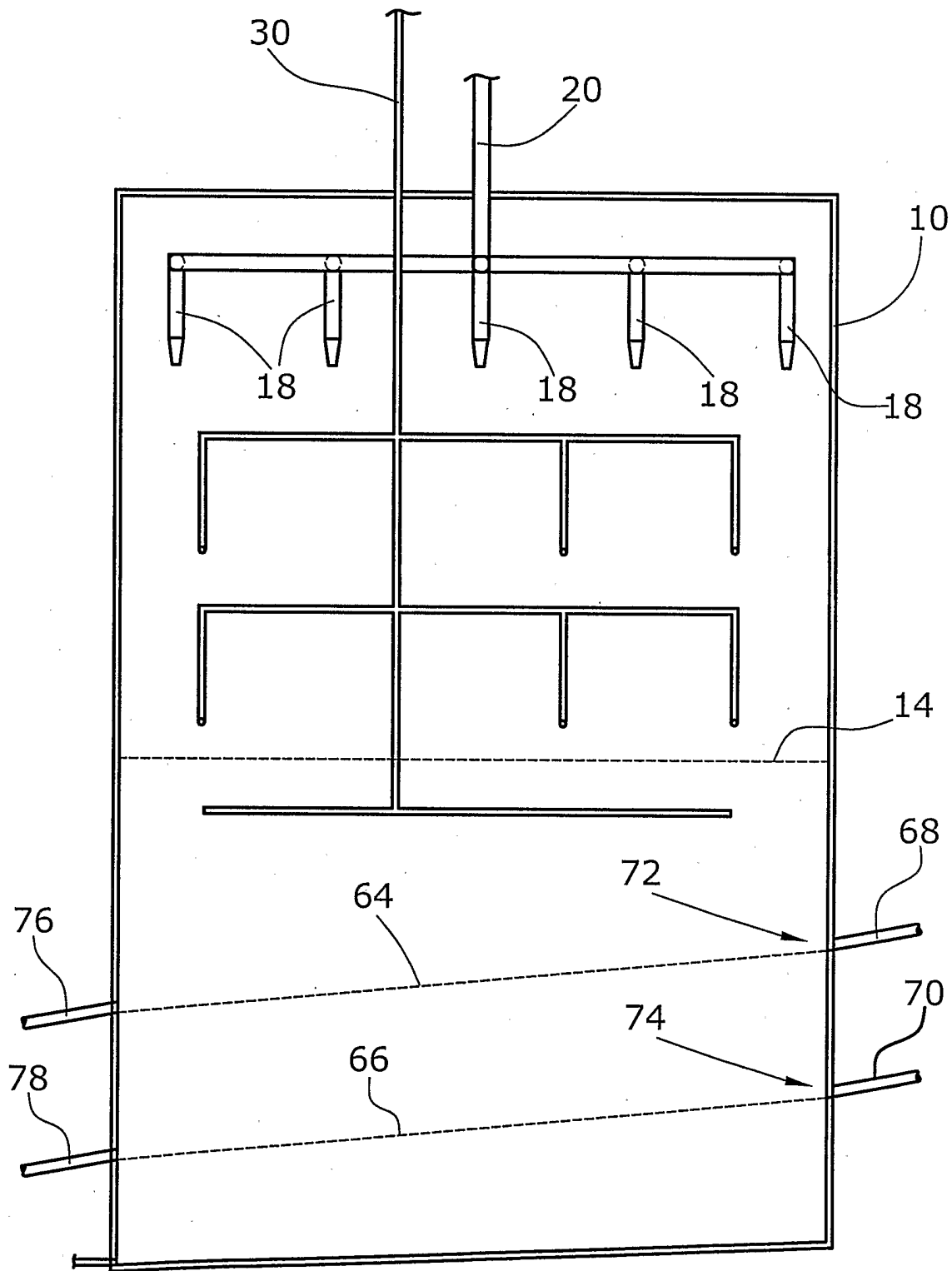


Fig.5