

Antikörper-Produktion im Medium-Kreislauf-Fermenter (MKF) Ein neues ökonomisches Produktionssystem

Ralph Kempken, Heino Büntemeyer, Jürgen Lehmann
Universität Bielefeld, Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik

Der Perfusionsbetrieb einer kontinuierlichen Fermenteranlage für Säugetierzellen wurde zu einem Kreislaufsystem erweitert. 80 % des verbrauchten Nährmediums wurden zweimal wiederverwendet. Der MKF wurde steril und auf einfache Weise ohne ein technisches Rückhaltungssystem für hochmolekulare Substanzen betrieben. Für den kontinuierlichen Prozeß benötigte man daher nur 20 % der sonst erforderlichen Medium-Menge. In einer siebentägigen Fermentation im 2-Liter-Maßstab wurden fünf Gramm eines monoklonalen IgG 1 Antikörpers hergestellt. In dieser Zeit blieb die spezifische Produktivität konstant. Die teuren Mediumbestandteile wurden nicht erneuert, weil der Proteingehalt im System auf einem hohen Niveau blieb. Konditionierungsfaktoren, welche die Zellen selbst produzieren, und Proteine des Mediums mit katalytischer oder stimulierender Funktion wurden im System zurückgehalten. Für jeden Mediumrecycling-Schritt wurden 70 bis 80 % der Mediumkosten und Mediummenge eingespart. Lediglich die billigen Substanzen, die von den Zellen verbraucht wurden, mußten erneuert werden. Die Aufnahmeraten für Glucose und Aminosäuren wurden bestimmt und eine geeignete Supplementierungslösung für das rezirkulierte Medium entwickelt.

Produktionsprozesse mit Zellkulturen gehören zu den teuersten in der Biotechnologie. Ein Großteil der Verfahrenskosten entfällt nach wie vor auf Vorbereitung und Fermentation. Die Zellkultur-Fermentationen verlaufen relativ unökonomisch, weil ein Großteil der Medien nicht ausgenutzt und dennoch verworfen wird. Im Hinblick auf eine besonders ökonomische Nutzung der Prozeßkomponenten und eine Verringerung der Umweltbelastung ist es naheliegend, das gebrauchte Nährmedium wiederzuverwenden. Die Wiederverbenutzung eines serumhaltigen Mediums wurde von Mizrahi und

Avihoo [1] beschrieben. In diesem Artikel wird ein neuer Ansatz mit einem serumfreien Medium vorgestellt. Dieser Ansatz realisiert das Zusammenwirken der Zellrückhaltung mit der Rückgewinnung des Mediums [2].

Rückhaltung der Zellen im Fermenter

Wegen der geringen Wachstumsrate von Säugetierzellen hat es sich eingebürgert, eine Rückhaltung der Zellen vorzunehmen. Für viele Stofftrennprobleme in der Biotechnologie werden synthetische Membranen eingesetzt [3]. Sie ermöglichen eine zuverlässige Zell-

rückhaltung durch Mikrofiltration der Fermenterflüssigkeit. Für Zellkulturen wurden Systeme entwickelt, die eine Filtration des Mediums im Fermenter vornehmen. Hierfür sind Doppelmembranrührer sehr geeignet [4]. Eine hydrophilisierte Polypropylenmembran (Abb. 1) wird zur Langzeitfiltration eingesetzt [5]. Diese Art der Zellrückhaltung gestattet einen effektiven Perfusionsbetrieb in homogenen kontinuierlichen Systemen [6]. Hieraus resultiert eine reproduzierbare Kulturführung im Fließgleichgewicht [7].

Rezyklisierung des Zellkultur-Nährmediums

Aus den genannten Gründen sollte das Mediumrecycling eine vorteilhafte Ergänzung des Perfusionsbetriebes sein. Hierfür bietet sich ein Kreislauf- oder ein Bypass-System an, welches einen großen Teil des gebrauchten Mediums in den Reaktor zurückführt. Ein geringer Teil wird nach wie vor verworfen, um die Anreicherung toxischer Substanzen aus dem Stoffwechsel der Zellen zu verhindern. Die Rezyklisierung schließt also notwendigerweise einen Verdünnungsschritt und die Supplementierung der von den Zellen verbrauchten Nährstoffe ein [8]. Beispielsweise gestattet eine kontinuierliche Perfusionsführung mit angeschlossenem Ultrafiltrationsmodul die on-line Rezyklisierung der hochmolekularen Mediumbestandteile [9]. Die Aufteilung des Ablaufes in hoch- und niedermolekulare Teilströme kann vorteilhaft zu einem Gesamtkonzept mit Produkternte und Inhibitorentfernung im proteinreichen Teilstrom sowie Entgiftung und Supplementierung im proteinfreien Teilstrom erweitert werden [8].

Für die Anwendbarkeit solcher Rezyklisierungsprozesse ist wichtig, daß keine Einbußen der Produktivität sowie der Qualität, Stabilität und Reinheit des Produktes auftreten. Daher ist zu untersuchen, ob durch die Wiederbenutzung gebrauchter Medien eine Anreicherung von Substanzen stattfindet, die inhibierende oder toxische Wirkung haben. Eine Entgiftung solcher Substanzen auf der niedermolekularen Seite wurde z. B. von Rønning und Schartum [10] durch Gelfiltration sowie von unserer Arbeitsgruppe durch Membranextraktion [11] und Elektrodialyse [15] vorgenommen. Über Struktur und Funktion hochmolekularer Inhibitoren besitzen wir noch keine gesicherten Erkenntnisse.

Aus diesen Überlegungen heraus entstand der Medium-Kreislauf-Fermenter zunächst als System zur Anreicherung möglicher Inhibitoren.

Prinzip des Medium-Kreislauf-Fermenters

Beim MKF ist die Perfusionsführung zu einem geschlossenen System erweitert. Batch-Betrieb und Perfusion verlaufen

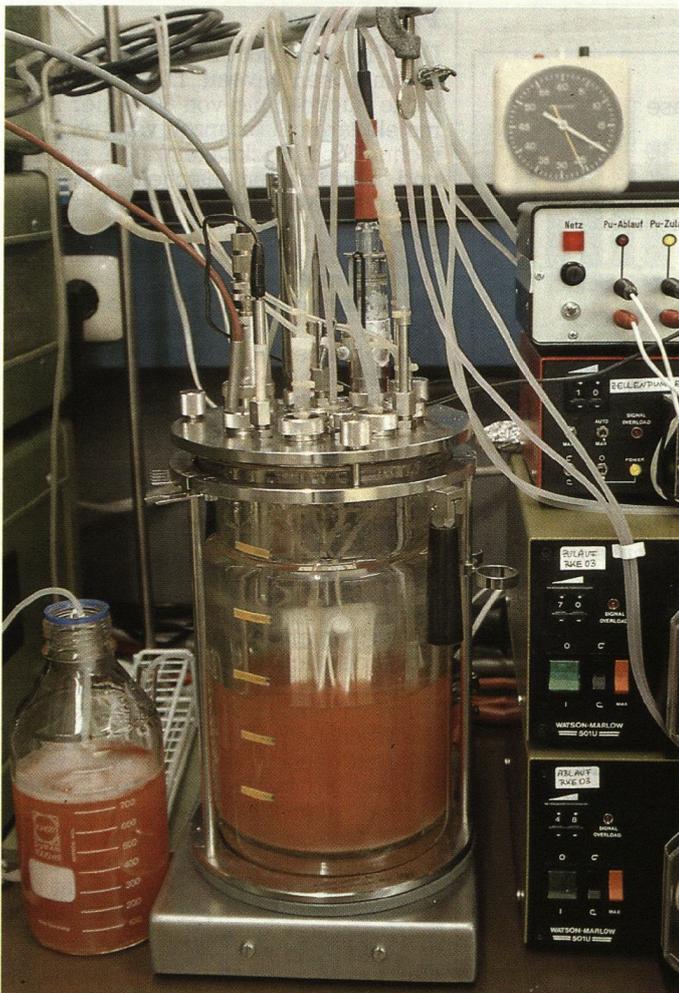


Abb. 1: Zellkulturfermenter Biostat BF (Fa. B. Braun Diessel Biotech GmbH, Melsungen). Der Fermenter ist auf dieser Abbildung nur zur Hälfte befüllt, um den Doppelmembranrührer sichtbar zu machen. Beide Membranen sind Polypropylen-Hohlfäden mit 0,3 µm Porengröße (Fa. Enka AG, Wuppertal)

zunächst genau wie beim klassischen Perfusionsbetrieb (Abb. 2a). Dabei werden ca. 80 % der Durchflußmenge zellfrei als Ablauf der Perfusion gewonnen und ca. 20 % als zellhaltiger Ablauf (Ernte). Wenn die Zulaufflasche leer ist (Abb. 2b), wird üblicherweise das Produkt aus zellhaltigem und zellfreiem Ablauf geerntet und der nächste Perfusionsschritt vollständig mit neuem Medium begonnen. Beim MKF wird stattdessen der gesamte zellfreie Ablauf wiederverwendet. Beim Fermenter mit Doppelmembranrührer muß hierfür nur die Laufrichtung der Perfusionspumpen umgekehrt werden (Abb. 2b und Abb. 2c). Somit werden 80 % des Mediums wiederbenutzt.

Das Produkt wird kontinuierlich im zellhaltigen Ablauf geerntet. Der Erntestrom, ca. 20 % der Durchflußrate, soll gleichzeitig ein stabiles Fließgleichgewicht für die Kultur schaffen und die Anreicherung inhibierender Substan-

Abb. 2 (a-e): Betriebsweise des MKF
a): Zustand zu Beginn der Perfusionsphase
b): Zustand gegen Ende der Perfusionsphase
c): Zustand zu Beginn der 1. Recyclingphase
d): Zustand gegen Ende der 1. Recyclingphase
e): Zustand zu Beginn der 2. Recyclingphase

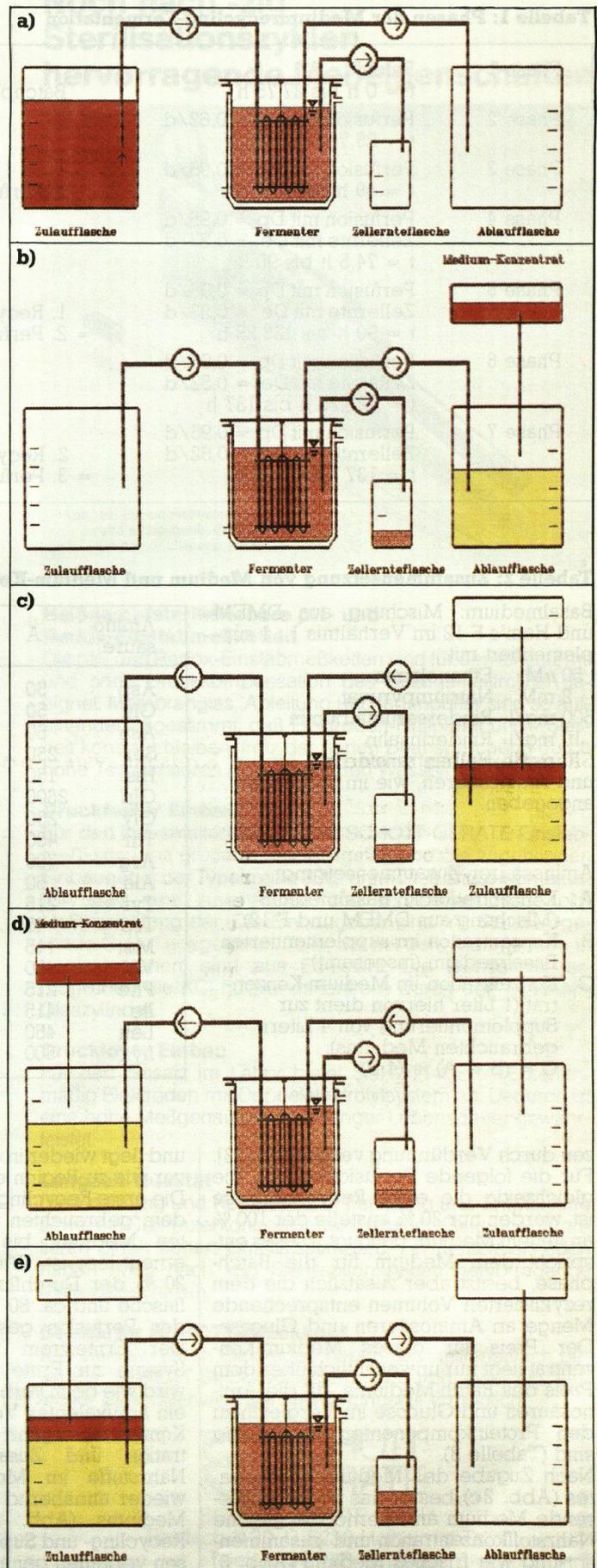


Tabelle 1: Phasen der Mediumrecycling-Fermentation

Phase 1	Batch t = 0 h bis 27,75 h	Batchphase
Phase 2	Perfusion mit Dp = 0,62/d t = 25,75 h bis 49 h	
Phase 3	Perfusion mit Dp = 0,95/d t = 49 h bis 74,5 h	1. Perfusionsphase
Phase 4	Perfusion mit Dp = 0,95/d Zellernte mit De = 0,23/d t = 74,5 h bis 90 h	
Phase 5	Perfusion mit Dp = 0,95/d Zellernte mit De = 0,23/d t = 90 h bis 123,25 h	1. Recyclingphase = 2. Perfusionsphase
Phase 6	Perfusion mit Dp = 0,95/d Zellernte mit De = 0,52/d t = 123,25 h bis 137 h	
Phase 7	Perfusion mit Dp = 0,95/d Zellernte mit De = 0,52/d t = 137 h bis 175 h	2. Recyclingphase = 3. Perfusionsphase

Tabelle 2: Zusammensetzung von Medium und Medium-Konzentrat

Basalmedium: Mischung aus DMEM und Ham's F 12 im Verhältnis 1 : 1 supplementiert mit:

- 50 µM Ethanolamin
 - 2 mM Natriumpyruvat
 - 500 mg/l Rinderserumalbumin
 - 10 mg/l Rinderinsulin
 - 10 mg/l Humantransferrin
- und Aminosäuren, wie im folgenden angegeben.

Aminosäuren-Zusammensetzung:

- A: Konzentration im Basalmedium (Mischung aus DMEM und F 12)
- B: Konzentration im supplementierten Basalmedium (insgesamt)
- C: Konzentration im Medium-Konzentrat (1 Liter hiervon dient zur Supplementierung von 4 Litern gebrauchten Mediums);
C = (B - A) + (4 B)

Aminosäure	A	B	C
Asp	50	100	450 µM
Glu	50	150	700 µM
Asn	50	150	700 µM
Ser	250	500	2250 µM
His	150	300	1350 µM
Gln	2500	6500	30000 µM
Gly	250	500	2250 µM
Thr	450	1350	6300 µM
Arg	700	1400	6300 µM
Ala	50	50	250 µM
Tyr	215	430	1935 µM
Trp	45	90	405 µM
Met	115	345	1610 µM
Val	450	900	4050 µM
Phe	215	430	1935 µM
Ile	415	830	3735 µM
Leu	450	1350	6300 µM
Lys	500	1000	4500 µM

zen durch Verdünnung verhindern [12]. Für die folgende Perfusionsphase, die gleichzeitig die erste Recyclingphase ist, werden nur 20 % anstelle der 100 % an neuem Medium benötigt. Dieses entspricht dem Medium für die Batchphase, besitzt aber zusätzlich die dem rezyklierten Volumen entsprechende Menge an Aminosäuren und Glucose. Der Preis für dieses Medium-Konzentrat liegt nur unwesentlich über dem Preis des Batch-Mediums, da die Aminosäuren und Glucose im Vergleich zu den Proteinkomponenten sehr billig sind (Tabelle 3).

Nach Zugabe des Medium-Konzentrates (Abb. 2c) besitzt das zu rezyklisierende Medium annähernd die gleiche Nährstoffkonzentration und -zusammensetzung wie frisches Medium (Abb. 3)

und liegt wieder in der gleichen Menge vor wie zu Beginn der Perfusion.

Die erste Recyclingphase geschieht mit dem gebrauchten und supplementierten Medium, bis die Zulaufflasche erneut leer ist. Wiederum werden ca. 20 % der Durchflußrate in der Ernteflasche und ca. 80 % zellfrei im Ablauf der Perfusion gesammelt (Abb. 2d). Der Erntestrom verläßt dann das System zur Ernte des Produktes und wird wie beim vorherigen Zyklus durch ein äquivalentes Volumen an Medium-Konzentrat ergänzt (Abb. 2e). Konzentration und Zusammensetzung der Nährstoffe im Medium entsprechen wieder annähernd denen des frischen Mediums (Abb. 3). Die folgenden Recycling- und Supplementierungsphasen verlaufen genau wie die erste.

Proteingehalt

Der Proteingehalt im System bleibt auf einem hohen Niveau. Die äußerst einfache Rückhaltung von 80 % der hochmolekularen Substanzen wird ohne ein technisches Rückhaltesystem erreicht und gehört zu den entscheidenden Vorteilen des MKF. Der Prozeß bleibt unkompliziert, und die Kosten für das Rückhaltesystem entfallen. Konditionierungsfaktoren, die von den Zellen selbst gebildet werden, verbleiben im System. 80 % der Proteine des Mediums bleiben ebenfalls im System und müssen daher nicht erneut zugeführt werden. Die Protein-Komponenten haben größtenteils katalytische oder stimulierende Bedeutung und machen den überwiegenden Teil der Mediumkosten aus. Daher ist ihre Retention im System besonders lohnend.

Produktgehalt

Die Verweilzeit des Produktes im System nimmt durch die MKF-Betriebsweise deutlich zu. Wenn es nirgendwo anhaftet, verbleibt es etwa fünfmal so lange im System wie beim klassischen Perfusionsbetrieb. Das Produkt darf währenddessen nicht degenerieren. Bei der im folgenden beschriebenen Fermentation blieb die mit Sandwich-ELISA gemessene spezifische Produktivität während der kontinuierlichen Phase konstant. Aktivität, Stabilität und Reinheit des Produktes sollten ebenfalls analysiert werden.

Inhibitoren

Bei der verlängerten Verweilzeit interessiert auch, ob die von den Zellen ausgeschiedenen Stoffe sich über die Verträglichkeitsgrenze hinaus anreichern. Der Erntestrom zum Austrag inhibierender oder toxischer Substanzen muß ausreichend groß sein. Anderenfalls sind Einbußen bei Zellwachstum und Produktivität zu erwarten. Durch entsprechende Wahl der Ernterate kann der MKF daher entweder zur Anreicherung und Entdeckung von Inhibitoren oder zur Verdünnung von Inhibitoren und Entgiftung betrieben werden.

Eine Entfernung toxischer Substanzen, z.B. Lactat [15] oder Ammonium [11, 18], wird beim MKF nicht vorgenommen. Im Betrieb sollte sich daher der Gesamteffekt inhibierender und toxischer Substanzen zeigen, falls diese in wirksamer Konzentration produziert werden.

Nährstoffbedürfnisse

Im Gegensatz zu anderen Systemen beschränkt sich die Supplementierung auf die tatsächlich von den Zellen verbrauchten niedermolekularen Nährstoffe. Zudem muß soviel Kompletmedium zugegeben werden, wie das System durch die zellhaltige Ernte verläßt [12]. Die Basis hierfür ist die Analytik der meisten Medienbestandteile. Abb. 5 zeigt HPLC-Systeme zur quantitativen

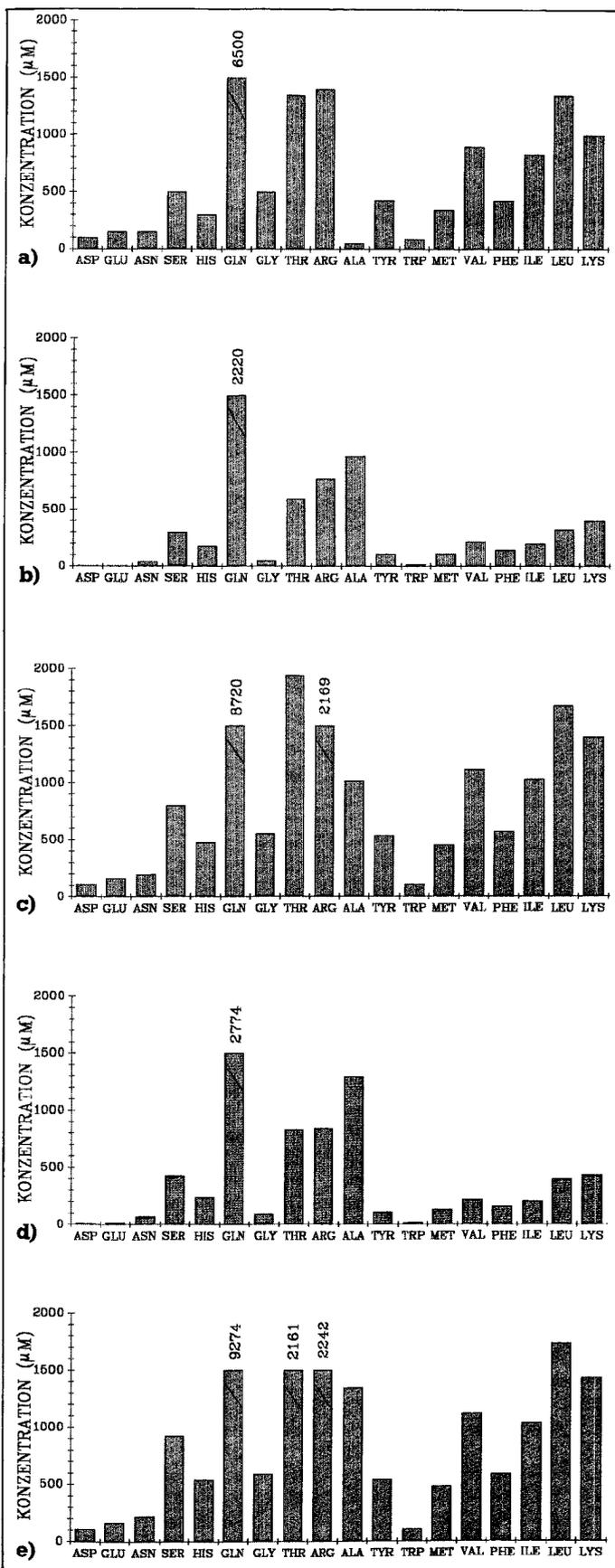


Abb. 3 (a-e): Muster der Aminosäure-Konzentrationen der Mediumrecycling-Fermentation zum Zeitpunkt von Abb. 2a, 2b, 2c, 2d, 2e

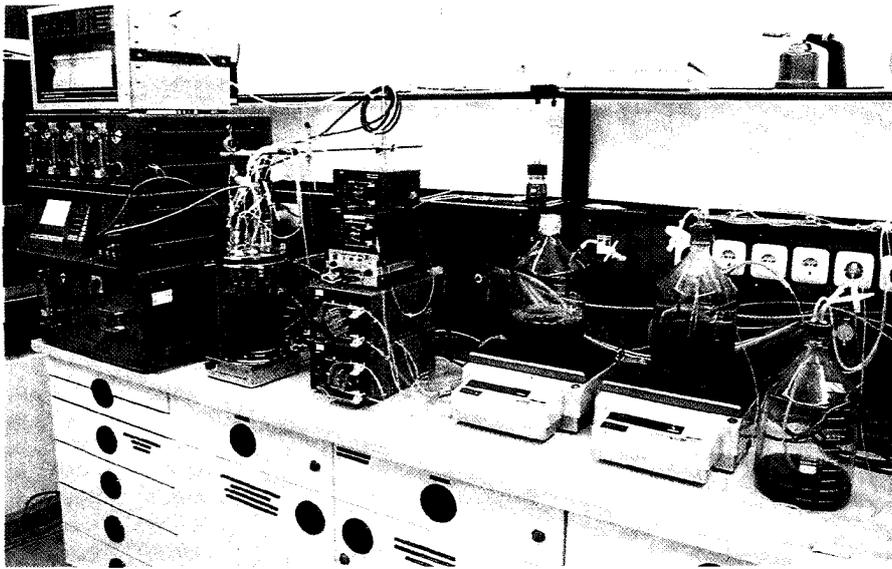


Abb. 4: Medium-Kreislauf-Fermenter im Betrieb. Von links nach rechts: Meß- und Regelsystem mit Gasmischstation und Schreiber, Fermenter, Pumpen und Perfusionssteuerung, Zulaufflasche auf Waage, Abflussflasche der Perfusion (zellfrei) auf Waage, Zellabflussflasche

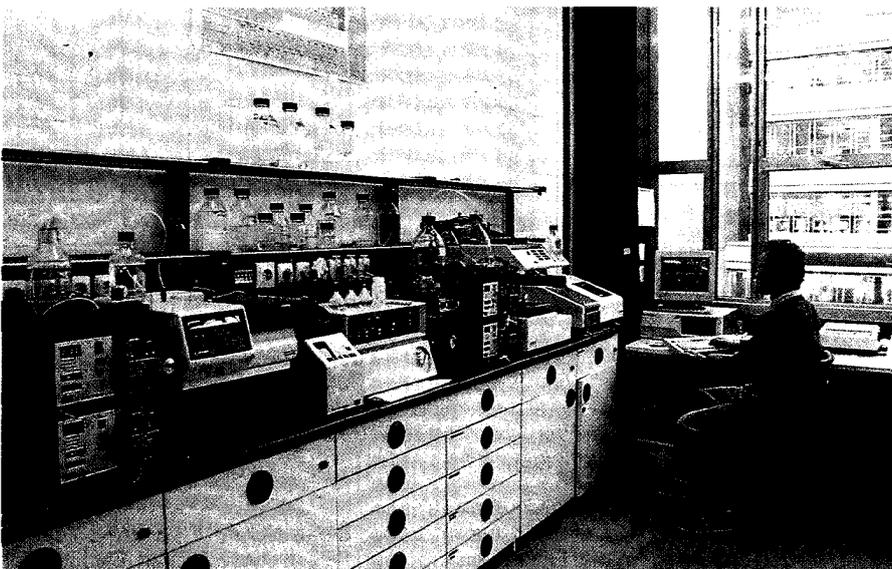


Abb. 5: HPLC-Systeme zur quantitativen automatischen Analyse anorganischer Ionen, organischer Säuren und Aminosäuren

automatischen Analyse anorganischer Ionen, organischer Säuren und Aminosäuren. Aus den Analysedaten läßt sich eine Supplementierungsmixtur berechnen, die als standardisiertes Mediumkonzentrat für die untersuchte Zelllinie dient.

Ersparnisse durch eine MKF-Fermentation

Mit der geschilderten Kreislauf-Betriebsweise lassen sich während der kontinuierlichen Phase ca. 80 % der Mediumkosten und Mediummenge ein-

sparen. Da die Bereitung neuer Medien reduziert wird, können Zeit und Kosten beim Ansetzen, Sterilfiltrieren und Sterilitäten eingespart werden. Zusätzlich sinken die Kosten für die Inaktivierung gebrauchter Medien, die durch das neue Gentechnikrecht [13] zwingend vorgeschrieben ist. Die Inaktivierung geschieht vorzugsweise durch Hitzesterilisation [14] und verursacht hohe Energiekosten.

Das gesamte MKF-System wird steril betrieben. Zusätzliche Sterilfiltrations-schritte in Verbindung mit der Rezykli-sierung fallen nicht an. Der MKF-Prozeß

bleibt besonders unkompliziert und preiswert, weil die hochmolekularen Substanzen ohne Rückhaltesystem wiederbenutzt werden und weil die Entgiftung möglicher Inhibitoren durch Verdünnung geschieht. Es ist zu erwarten, daß sich besonders bei großvolumigen Produktionsprozessen die Verfahrenskosten senken.

Fermentation mit dem MKF

Die Leistungsfähigkeit der Perfusionsführung mit Mediumrecycling und Inhibitorentfernung durch Verdünnung wird anhand experimenteller Ergebnisse gezeigt. Im folgenden werden daher die ersten Resultate mit dem MKF-System vorgestellt.

Der verwendete Fermenter war ein Biostat BF (Fa. B. Braun Diessel Biotech GmbH, Melsungen) mit Doppelmembranrührer (Abb. 1). Auf dem Rührermodul waren 3,30 m Perfusionsmembran und 5,30 m Begasungsmembran aufgewickelt. In der Peripherie wurden das Meß- und Regelsystem DCU (Fa. B. Braun Diessel) und eine Perfusionssteuerung mit Rückspülung der Perfusionsmembran gemäß [16] und [6] eingesetzt. Abb. 4 zeigt das gesamte Fermentersystem. Das Reaktorvolumen betrug 2,0 Liter, die Drehzahl des Doppelmembranrührers 30 rpm. Die Zellen wurden bei 37 °C, pH 7,10 und 40 % Luftsättigung kultiviert.

Die fermentierte Zelllinie war ein Maus-Ratte Hybridom (ATCC HB 58), das einen monoklonalen Ratten-Antikörper des Typs IgG 1 gegen die leichte Kette von Maus-Antikörpern produzierte. Täglich wurden zwei bis drei Proben aus dem Fermenter genommen und wie folgt analysiert: Die Zellzahl wurde mikroskopisch mittels Trypanblau-Aus-schlußfärbung bestimmt, Glucose und Lactat mit dem YSI 2000 Analyzer (Fa. Yellow Springs Instruments, Ohio), Ammonium mittels ionenselektiver Elektrode mit pH/ION Meter pMX 2000 (Fa. WTW GmbH, Weilheim), die Aminosäuren mit dem RP-HPLC System 400 (Fa. Kontron GmbH, Eching) mit Vor-säulen-Derivatisierung (OPA-Methode) [7] und Antikörper mit einem kineti-schen Sandwich-ELISA-Test und dem EL 311 Autoreader (Fa. Tecnomara GmbH, Fernwald).

Das verwendete Medium bestand aus einer 1 : 1 Mischung von DMEM und Ham's F 12, ergänzt durch 50 µM Ethanolamin, 2 mM Natriumpyruvat, 500 mg/l BSA, 10 mg/l Humantransferrin und 10 mg/l Rinderinsulin. Es enthielt zusätzlich folgende Aminosäure-Konzentrationen: Asp 50 µM, Glu 100 µM, Asn 100 µM, Ser 250 µM, His 150 µM, Gln 4 µM, Gly 250 µM, Thr 900 µM, Arg 700 µM, Tyr 215 µM, Trp 45 µM, Met 230 µM, Val 450 µM, Phe 215 µM, Ile 415 µM, Leu 900 µM und Lys 500 µM.

Dieses Medium wurde für die Batch-phase und für die erste Perfusions-phase eingesetzt. Zu Beginn der Re-

cycling-Phasen ($t = 90$ h und $t = 137$ h) wurde der aus dem System entnommene zellenhaltige Ablauf (Ernte) ebenfalls durch dieses Medium (ohne BSA) ersetzt, welches aber die dem Perfusionsstrom entsprechende Menge an Glucose und Aminosäuren zusätzlich enthielt (Tabelle 2).

Zur Berechnung der spezifischen Produktivität wurde die Fermentation in sieben Phasen eingeteilt (Tabelle 1). Phase 4 und 6 entstanden, als die Zellernte gegen Ende der 1. Perfusionsphase begann bzw. gegen Ende der 1. Recyclingphase erhöht wurde.

An die Kurven für Zellwachstum (Abb. 6) und Antikörperkonzentration (Abb. 8) wurden mathematische Funktionen angepaßt. Mit den Funktionswerten bzw. der 1. Ableitung und den Gleichungen für die zellspezifischen Parameter [17] wurden die spezifischen Produktivitäten für das Gesamt-System sowie für seine Teilströme errechnet.

Ergebnisse

Abb. 6 zeigt die Wachstumskurve der Mediumrecycling-Fermentation. Durch die Inokulierung mit Zellsuspension aus einem anderen Fermenter starteten Zellwachstum und Produktbildung (Abb. 8) bei relativ hohen Konzentrationen und ohne lag-Phase. Während der Batchphase war das Wachstum praktisch unlimitiert (Abb. 6, 7). Eine Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 1,05/d$ bzw. Verdoppelungszeit von 15,8 h blieb etwa bis zum Beginn der Phase 3 bestehen. Danach wurde das Zellwachstum durch zahlreiche Komponenten limitiert (Abb. 7) und ging bei ca. 7 Mio. lebenden Zellen je ml in ein Fließgleichgewicht über. Dieses Gleichgewicht blieb auch während des Recyclings (Phase 5) erhalten. In Phase 6 wurde die Ernterate unter dem Eindruck der akkumulierenden toten Zellen deutlich erhöht. In der Folgezeit wurde eine Abnahme der Lebendzellzahl im Fermenter beobachtet.

Die Konzentrationen der Metabolite Glucose, Lactat und Ammonium sind in Abb. 7 dargestellt. Die Aufnahme rate für Glucose in der Batchphase betrug 1,20 g je Tag und 1 Mrd. Zellen und die Produktionsraten für Lactat, Ammonium und Alanin 0,93 g bzw. 17,2 mg bzw. 35,0 μmol je Tag und 1 Mrd. Zellen. Glucose befand sich während der ersten Perfusionsphase im Minimum. Im Verlauf der beiden Recyclingphasen nahm die Glucosekonzentration im Fermenter wieder zu. Die Zunahme war etwa doppelt so groß, als aufgrund der stärkeren Supplementierung im Zulauf vorgelegt wurde (vergleiche Datenreihe „Glucose“ mit „Glucose im Zulauf“ in Abb. 7). Ähnliches geschah mit vielen der Aminosäuren. Ihre Aufnahme raten sind in Tabelle 4 aufgelistet. Während der kontinuierlichen Kultivierung blieben die Konzentrationen der möglichen Inhibitoren Lactat, Ammonium und Alanin auf

einem konstanten Niveau (Abb. 7). Ihre Akkumulation wurde durch die gewählte Verdünnungsrate vermieden. Weder Lactat ($\leq 2,0$ g/l) noch Ammonium (≤ 82 mg/l) erreichten Konzentrationen, die nach unseren Erfahrungen schädigenden Einfluß haben. Vermutlich traf dies auch auf Alanin zu (≤ 2 mM).

Abb. 8 beschreibt die Produktkonzentrationen im Fermenter und in den Perfusionsflaschen p1 und p2. Der Antikörpertiter im Fermenter stieg im Laufe des Perfusionsbetriebes (Phase 2 bis 4) auf ca. 850 mg/l an. Zugleich wurden ca. 260 mg/l in der Ablaufflasche der Perfusion gesammelt (siehe Datenreihe „Antikörper-Konzentration in Flasche p2“ in Abb. 8). In Phase 4 wurde die Durchflußrate durch Einschalten der Zellernte erhöht. In der Folgezeit stieg die Produktkonzentration im Fermenter nicht weiter und nahm Werte um 600 bis 700 mg/l an (Abb. 8). Währenddessen wurde das perfundierte Medium mit 260 mg/l Produkt wiederverwendet. Im Laufe des 1. Recyclings (Phase 5 und 6) wurde der Produktgehalt im perfundierten Medium auf 450 mg/l gesteigert (siehe Datenreihe „Antikörper-Konzentration in Flasche p1“). In Phase 6 wurde die Zellernterate mehr als verdoppelt. Beim 2. Recycling (Phase 7) blieben die Produktkonzentrationen in Fermenter und Perfusionsflasche konstant (Abb. 8). Daher wurde weiteres Produkt nur über den zellhaltigen Ablauf gewonnen.

Die Berechnungen der zellspezifischen Parameter ergaben, daß die zellspezifische Produktivität im Laufe der Fermentation gleichblieb (Tabelle 5). Die Rezyklisierung des Mediums wirkte sich also nicht nachteilig auf die Produktbildung aus. Die volumetrische Produktivität sank in der 2. Recyclingphase, in der auch die Lebendzellzahl im Fermenter abnahm (vergleiche Tabelle 5 mit Abb. 6). Die volumetrische Produktivität sank offenbar nicht wegen der Recycling-Maßnahmen, sondern weil die Zahl der produzierenden Zellen im Fermenter wegen der erhöhten Zellernterate geringer wurde. Wahrscheinlich trat eine Inhibition des Zellwachstums auf, denn die spezifische Wachstumsrate betrug in der Batchphase $\mu = 1,05/d$. Im Laufe des 2. Recyclings nahm die Zellzahl bei einer Zellernterate von $\mu = 0,52/d$ ab, obwohl sich die von uns analysierten Substrate (Glucose, Aminosäuren außer Cystein und Prolin) zu dieser Zeit nicht mehr im Minimum befanden.

Abb. 9 zeigt die Summe der produzierten Antikörper-Menge in der gesamten Anlage (Fermenter, Ernteflasche, Perfusionsflaschen). Während der Phasen 1 bis 4 (Batch und Perfusion mit frischem Medium) wurden 2997 mg Produkt in 90 Stunden gebildet. In den Phasen 5 bis 6 (1. Recycling) waren es 1349 mg in 47 Stunden und in Phase 7 (2. Recycling) 681 mg in 38 Stunden. Die

Tabelle 3: Kosten für Medium und Medium-Konzentrat

Substanz	Medium	Medium-Konzentrat
Rinderserumalbumin	0,17 DM	0 DM
Ölsäure	0 DM	0 DM
Rinderinsulin	6,20 DM	6,20 DM
Humantransferrin	2,58 DM	2,58 DM
FeCl ₃	0 DM	0 DM
Basalmedium	1,40 DM	1,40 DM
NaHCO ₃	0,089 DM	0,089 DM
Ethanolamin	0 DM	0 DM
Natriumpyruvat	0,12 DM	0,12 DM
Glutamin	0,20 DM	0,74 DM
Glucose	0 DM	0,14 DM
Reinstwasser	0,16 DM	0,16 DM
Aminosäuren (außer Glutamin):		
Asp	0,085 Pfg.	0,43 Pfg.
Glu	0,088 Pfg.	0,44 Pfg.
Asn	1,80 Pfg.	9,01 Pfg.
Ser	3,20 Pfg.	15,98 Pfg.
His	1,80 Pfg.	8,99 Pfg.
Gly	0,11 Pfg.	0,55 Pfg.
Thr	5,71 Pfg.	28,57 Pfg.
Arg	2,60 Pfg.	12,99 Pfg.
Tyr	1,34 Pfg.	6,70 Pfg.
Trp	0,68 Pfg.	3,40 Pfg.
Met	0,96 Pfg.	4,80 Pfg.
Val	1,65 Pfg.	8,23 Pfg.
Phe	1,03 Pfg.	5,15 Pfg.
Ile	5,12 Pfg.	25,60 Pfg.
Leu	2,83 Pfg.	14,17 Pfg.
Lys	0,88 Pfg.	4,39 Pfg.
Summe	11,22 DM je Liter	12,93 DM je Liter

Tabelle 5: Spezifische (q) und volumetrische (Q) Produktivität während der sieben Phasen der Mediumrecycling-Fermentation

Phase	1	2	3	4	5	6	7
q (mg je Tag und 1 Mrd. Zellen)	121	127	113	147	144	n.b.	144
Q (mg je Tag und 1 Liter)	103	375	690	1024	1040	n.b.	630

Produktion von 33 mg/h vor dem Mediumrecycling blieb also während des 1. Recyclings mit 29 mg/h etwa auf gleichem Niveau und sank beim 2. Recycling auf 18 mg/h.

Die aufgewendeten Medienkosten sind ebenfalls in Abb. 9 verzeichnet. Für 1 DM wurden vor dem Recycling 43,6 mg Antikörper produziert, beim 1. Recycling 67,7 mg und beim 2. Recycling 40,1 mg. Gemessen an den eingesetzten Medienkosten wurde beim 1. Recycling die 1,5fache und beim 2. Recycling die gleiche Produktmenge erzeugt wie bei der Perfusion mit frischem Medium.

Durch die Verwendung des rezyklisierten anstelle des frischen Nährmediums sanken die Medienkosten für das 1. Recycling von 56,10 DM auf 12,93 DM (Ein-

sparung von 77 %) und für das 2. Recycling von 56,10 DM auf 16,81 DM (Einsparung von 70 %). Bezogen auf die gesamte Fermentation wurden 43 % der Medienkosten eingespart (Abb. 10). Zusätzlich sank die Abwassermenge, die vor ihrer Einleitung in das Abwasser inaktiviert werden muß, für den 1. Recyclingschritt um 80 % und für den 2. Recyclingschritt um 74 %. Bezogen auf die gesamte Fermentation sank der Abwasserverbrauch um 45 % (Abb. 10).

Diskussion

Mediumrecycling ist in einfachster Form durchführbar, wie die vorgestellte Fermentation zeigt. Mit der Wahl geeigneter Flußraten für Perfusion und Zellablauf kann auf technische Systeme zur Proteinrückhaltung und Inhibitor-

Tabelle 4: Zellspezifische Aminosäure- und Glucose-Aufnahmeraten während der Batchphase der Mediumrecycling-Fermentation

Aminosäuren	Rate in μmol je Tag und 1 Mrd. Zellen
Asp	42,2
Glu	21,6
Asn	29,8
Ser	70,7
His	91,0
Gln	3650
Gly	18,3
Thr	183,6
Arg	184,0
Tyr	135,8
Trp	25,8
Met	72,8
Val	183,5
Phe	78,8
Ile	180,0
Leu	291,0
Lys	259,0

Alanin wurde produziert, Cystein und Prolin nicht gemessen.

Glucose 1,20 g je Tag und 1 Mrd. Zellen

entfernung verzichtet werden. Die Rezyklisierung erbringt deutliche Einsparungen bei den Medienkosten und eine erhebliche Reduzierung der Abwassermenge. Der MKF benutzt die klassische Perfusionsführung und benötigt etwa den gleichen Aufwand für Anlagenbau und Betrieb wie diese. Er erlaubt eine homogene Kulturführung im Fließgleichgewicht mit besonders ökonomischer Ausnutzung des Zellkulturmediums.

Wie oft ist das Medium wiederverwendbar? Allgemein kann die Rezirkulierung des perfundierten Mediums so lange wiederholt werden, bis nachteilige Effekte für Zellwachstum oder Produktivität auftreten. Falls dies geschieht, sollte das rezirkulierte Medium dem System entnommen und durch neues Medium ersetzt werden. Die Recyclingprozedur beginnt dann von neuem.

Im Falle der vorgestellten Fermentation kann eine einmalige Wiederverwendung des gebrauchten Nährmediums empfohlen werden. Für die betrachtete Zelllinie waren die spezifische und volumetrische Produktivität sowie das Zellwachstum in der 1. Recyclingphase vergleichbar mit der vorherigen Perfusionsphase mit neuem Medium. Im Verlauf der 2. Recyclingphase nahm die volumetrische Produktivität trotz gleichbleibender zellspezifischer Produktivität ab. Dies kann auf die abnehmende Lebendzellzahl im Reaktor oder auf Degradation des Produktes zurückgeführt werden. Eine Degradation des Produktes sollte durch Kühlung der pe-

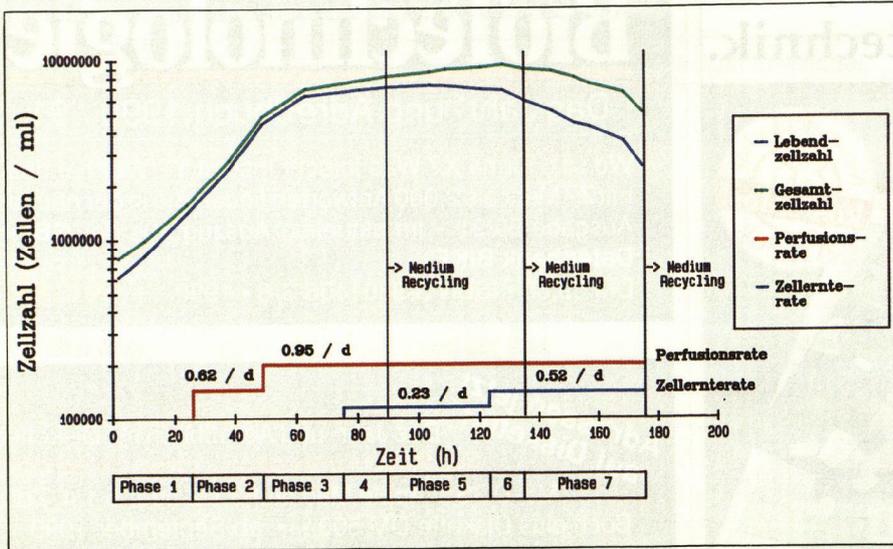


Abb. 6: Wachstumskurve

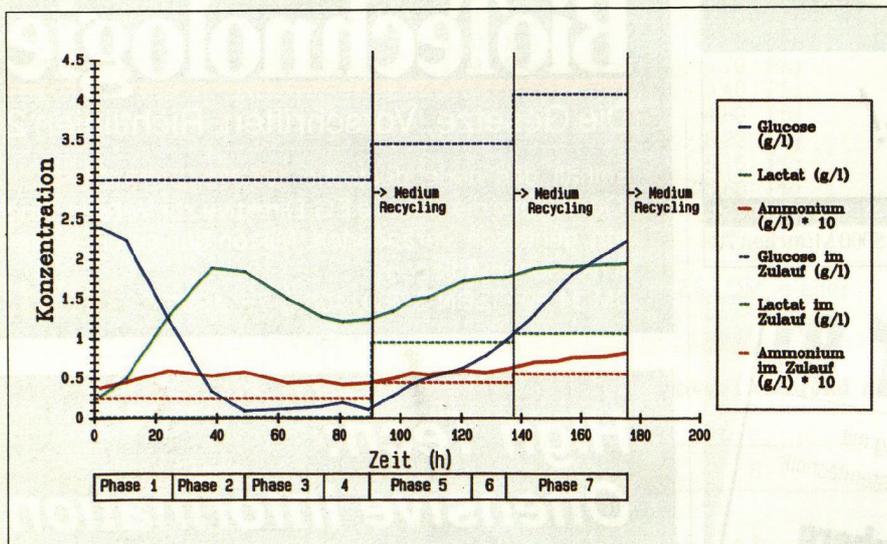


Abb. 7: Glucose, Lactat, Ammonium

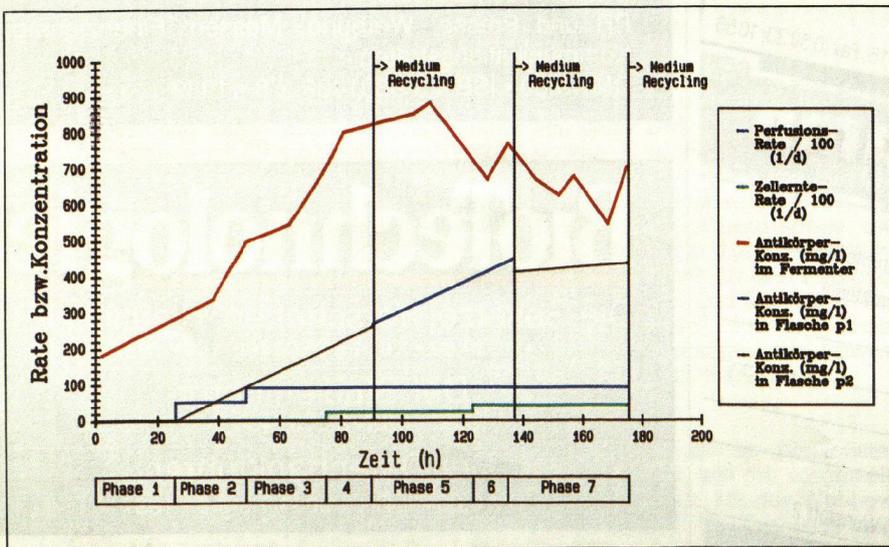


Abb. 8: Produkt-Konzentrationen

riperen Gefäße vermieden werden. Die Abnahme der Zellen wurde durch die in dieser Phase zu sehr gesteigerte Ernterate hervorgerufen oder durch fehlende Entgiftung toxischer Substanzen im Medium. Durch einen Zyklus mit abwechselndem Mediumrecycling und Mediumwechsel sollte die vorgestellte Fermentation auch im Langzeit-Einsatz betreibbar sein.

Weitere Arbeiten werden eine solche Langzeit-Anwendung untersuchen. Zudem sollen mit einer Variante des MKF eventuelle inhibierende Substanzen besonders schnell erfaßt werden. Hierzu wird der zellfreie Ablauf der Perfusion sofort wieder in der Zulaufflasche gesammelt. Simultan zum zellhaltigen Ablauf wird ständig die gleiche Menge an Medium-Konzentrat in die Zulaufflasche gepumpt. In diesem besonders dynamischen Kreislaufsystem würden schädliche Effekte unmittelbar auf die Zellkultur wirken.

Solche Effekte wurden bezüglich der spezifischen Produktivität auch in der 2. Recyclingphase der vorgestellten Fermentation nicht beobachtet. Durch Beibehalten der ursprünglichen Ernterate hätte es hier wahrscheinlich auch keinen Rückgang der Lebendzellzahl und der volumetrischen Produktivität gegeben. Mizrahi und Avihoo [1] fanden, ähnlich wie bei der vorliegenden Untersuchung, daß das Medium einmal wiederbenutzt werden konnte und erst beim 2. Recycling Einbußen im Zellwachstum auftraten. Bereits bei einmaliger Wiederverwendung des Mediums ist eine deutliche Reduzierung der Produktionskosten zu erwarten.

Danksagung

Diese Arbeit wurde mit Sachkosten-Beteiligung der Fa. B. Braun Diessel Biotech GmbH und des BMFT-Projektes „Entwicklung eines Verfahrens und einer Anlage für die Rezyklisierung von Nährmedien tierischer Zellkulturen“ (Förderkennzeichen 0319346A) gefördert.

Literatur

[1] Mizrahi, A., Avihoo, A.: Growth Medium Utilization and its Re-use for Animal Cell Cultures. Journal of Biological Standardization 5 (1977), 31-37
 [2] Kempken, R., Büntemeyer, H., Lehmann, J.: Medium-Kreislauf-Fermenter minimiert Kosten und Abwasser. Poster No. 161, 9. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Ost-Berlin, 30. 1. bis 1. 2. 1991
 [3] Chmiel, H., Strathmann, H.: Membranen in der Verfahrenstechnik. Chem.-Ing.-Tech. 57 (1985), Nr. 7, 581-596
 [4] Büntemeyer, H., Bödeker, B. G. D., Lehmann, J.: Membrane-stirrer-reactor for Bubble Free Aeration and Perfusion. In: Modern Approaches to Animal Cell Techno-

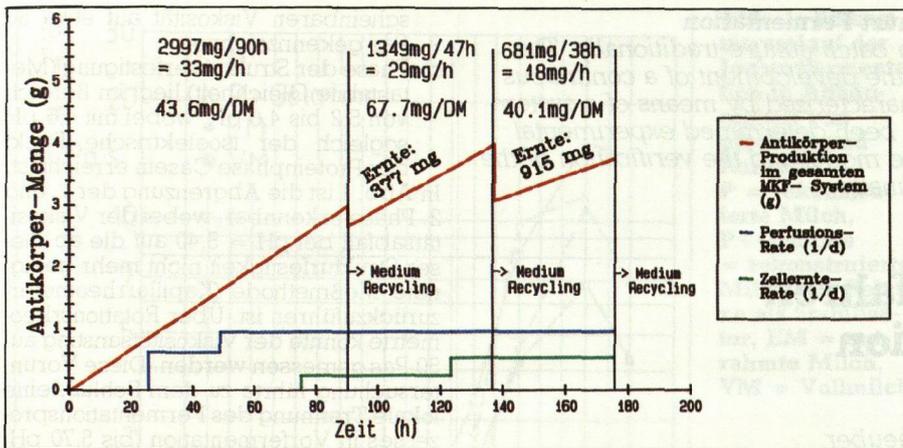


Abb. 9: Produkt-Konzentration im gesamten MKF-System

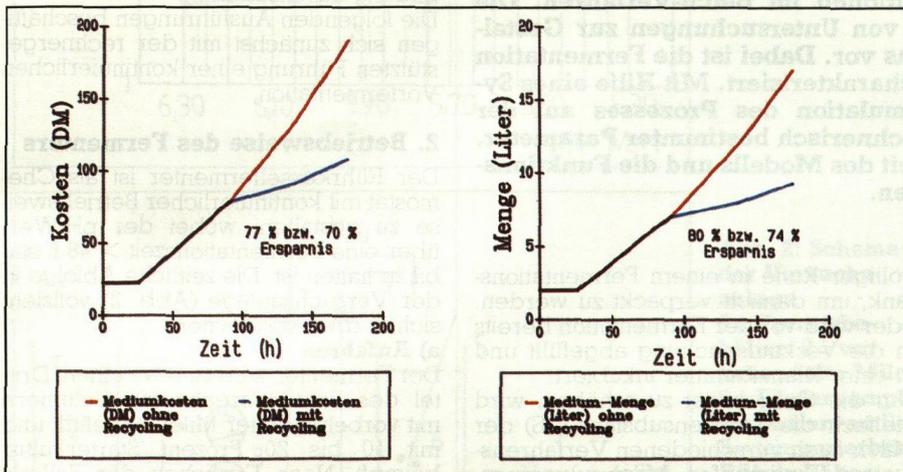


Abb. 10: Wirtschaftlichkeit des MKF
Mediumkosten (links), Medium-Menge (rechts)

logy, Eds. R. E. Spier and J. B. Griffiths, Butterworth, London 1987, 411–419

[5] Lehmann, J., Vorlop, J., Büntemeyer, H.: Bubble-free Reactors and Their Development for Continuous Culture with Cell Recycle. In: Animal Cell Biotechnology, Eds. R. E. Spier and J. B. Griffiths, Academic Press, London 1988, Vol. 3, 221–237

[6] Büntemeyer, H., Bödeker, B. G. D., Lehmann, J.: Ein Zellkulturfermenter mit integriertem Membransystem für die homogene Kulturführung. Chem.-Ing.-Tech. 62 (1990), Nr. 5, 393–395

[7] Büntemeyer, H., Lütkemeyer, D., Lehmann, J.: Optimization of Serum-free Fermentation Processes for Antibody Production. Cytotechnology, in press

[8] Lehmann, J., Kempken, R., Lütkemeyer, D., Büntemeyer, H.: Economic Aspects of Medium Recycling. In: Proceedings of the 2nd JACCT Meeting, Tsukuba, Japan, November 1989

[9] Büntemeyer, H.: Dissertation, Universität Hannover, 1988

[10] Rønning, O. W., Scharf, M.: Removal of Inhibitory Factors from Hybridoma Cell Cultures by Gel Filtration. Lecture at 11th May, 10th ESACT Meeting, Avignon, 7th to 11th May 1990

[11] Lütkemeyer, D., Heidemann, R., Maurer, U., Büntemeyer, H., Lehmann, J.: Mediumzyklisierung mit Ammoniumentgif-

tung im 20 l Perfluorfermenter. Poster No. 68, 9. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen, Ost-Berlin, 30. 1. bis 1. 2. 1991

[12] Kempken, R., Büntemeyer, H., Lehmann, J.: The Medium Cycle Fermentor: a New Approach for Medium Recycling and Reduction of Fermentation Process Costs. Proceedings of the German-Japanese Workshop on Animal Cell Culture Technology, Hamburg-Harburg, 5th–6th November 1990, in press

[13] Hasskarl, H.: Gentechnikrecht: Textsammlung (Gentechnikgesetz und Rechtsverordnungen). Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 1990

[14] ebenda, S. 110, S. 148, S. 154

[15] Kempken, R., Büntemeyer, H., Lehmann, J.: Cell Culture Medium Detoxification by Electrodialysis. Poster No. 11 at 12th July, 5th European Congress on Biotechnology, Copenhagen, 9th–13th July 1990

[16] Lehmann, J.: Zellkultur-Reaktortechnik für tierische und pflanzliche Zellen. Firmenschrift No. 115.1.86 der Diessel GmbH & Co., Hildesheim, 1986, S. 9

[17] Pirt, S. J. (1985): Principles of Microbe and Cell Cultivation, pp 209–222, Blackwell Scientific Publications

[18] Newland, M., Greenfield, P. F., Reid, S.: Hybridoma Growth Limitations: The Roles of Energy Metabolism and Ammonia Production. Cytotechnology 3: 215–229, 1990