



ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN

DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT

INSTITUT FÜR CHEMIE UND BIOTECHNOLOGIE ICBT

ZF Biotechnologie

Semester 1

von

Katja Mutter

Bachelorstudiengang 2020

Studienrichtung Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung.....	3
2. Produktionsverfahren	6
3. Bioreaktoren.....	12
4. Genfood	16
5. Functional Food	18
6. SingleCellProtein.....	21
7. Zelltherapeutika.....	24
8. Stammzellen	27
9. Tissue Engineering.....	30
10. Biopharmazeutische Medikamente	34
11. Grüne Medikamente	39
12. Cellular Agriculture	43
13. Algen (Phycobionta)	46
14. Bier.....	50
15. Literaturverzeichnis.....	52

1. Einführung

Definieren Sie den Begriff Biotechnologie!

- Integration von Natur- und Ingenieurwissenschaften mit dem Ziel, Organismen, Zellen, Zellteile und molekulare Analoge, für Produkte und Dienstleistungen technisch zu nutzen.

Unterscheiden Sie die klassische und moderne Biotechnologie!

klassisch	modern
Einsatz von nativen Biokatalysatoren zur Produktion von Stoffen und Erbringen von Dienstleistungen.	Verfahren die isolierte DNA in ihren Arbeitsprozess einbeziehen.
Traditionelle Biotechnologie erbringt ca. 75% des Umsatzes aller Bioprodukte (z.B. Bier).	Anwendung „neuer Verfahren“ wie Tissue Engineering, Hybridomatechnik zur Antikörperproduktion.

Erläutern Sie die Interdisziplinarität der Biotechnologie!

- In der modernen Biotechnologie werden die klassische Biotechnologie, Chemie, Medizin/Pharma und Landwirtschaft gemischt. Biotechnologie vereint die Natur- und Ingenieurwissenschaften. Deshalb muss man ein breites Wissensspektrum haben, um in der Biotechnologie arbeiten zu können.

Welche Industriebranchen sind heute durch Methoden der Biotechnologie geprägt?

- Lebensmittel-, Kosmetik-, Pharmazeutische Industrie

Was sind Biokatalysatoren und wie lassen sie sich kategorisieren?

- Sie beschleunigen Reaktionen in Körper und in biotechnologischen Verfahren.
- Lebende Mikroorganismen
- Pflanzliche und tierische Zell- und Gewebekulturen
- humane Zellen
- transgene Pflanzen und Tiere
- Enzyme

Was ist ein gVO?

- Gentechnisch veränderter Organismus

Erläutern Sie den Begriff rekombinant!

- Die neu-Kombination von Genen von bestimmten Organismen. Die DNA wird isoliert und gentechnisch verändert. (In vitro / ohne Versuchstier → Genbibliotheken)

Welche Farbbereiche der Biotechnologie kennen Sie? Ordnen Sie jedem Farbbereich 2 typische Produkte zu!

- Rote Biotechnologie (Medizinisch-pharmazeutische Biotechnologie)
 - Impfstoffe z.B. Hepatitis B
 - Zellen, Gewebe und Organe für Transplantationsmedizin
- Grüne Biotechnologie (Agrobiotechnologie)
 - Functional Food z.B. prebiotische Joghurts
 - Krankheit- und herbizidresistente Pflanzen
- Blaue Biotechnologie (Maritime Biotechnologie)
 - Natürliche Wirkstoffe aus marinen Organismen als Nahrungsergänzungsmittel oder für Kosmetikindustrie (Carotin, Makroalgen)
- Weisse/Graue Biotechnologie (Industrielle Biotechnologie & Umweltbiotechnologie)
 - Chemische Industrie & Umwelttechnologie z.B. Feinchemikalien, Bulkprodukten
 - Pharmazie z.B. Antibiotika
 - Lebensmitteltechnologie z.B. Bier, Wein, Käse, Bäckerhefe,

Nennen Sie die 4 Entwicklungsetappen der Biotechnologie und wichtige Meilensteine!

1. Unbewusste Nutzung von Mikroorganismen: Wein-, Essig-, Käseherstellung, 10'000 – 3000 v.Chr.
2. Aufdeckung des Wesens der Fermentation, Klassifizierung, Beginn Mikrobengenetik: Penicillin, Aceton, Industrialkohol, Backhefeherstellung, ca. 1880 – 1910
3. Schaffung wissenschaftlicher Grundlagen für Verfahrenstechniken: Genetischer Code entschlüsselt, Sterilfermentation, ca. 1949 - 1960
4. Gezielter Einsatz der manipulierten Zellen: Genfood, Biotherapeutika, Zelltherapeutika,

Begründen Sie, warum Biotechnologie historisch gesehen die Kunst ist, Lebensmittel herzustellen!

- Da, mit der Biotechnologie viele Produkte haltbar gemacht wurden (Fermentation) und Stoffumwandlungen erzeugt werden konnten (Käse).

Was sind mabs und wie lassen sie sich biotechnologisch herstellen?

- Moloklonale Antikörper (nur gegen ein Antigen gerichtet)
- Bestandteil des Immunsystems zur Abwehr von Infektionserregern oder körperfremdem biologischem Material. Sie werden von weissen Blutzellen hergestellt und kommen im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit der Gewebe vor. Sie erzeugen bei Kontakt mit Antigenen eine Immunantwort.
- (Polyklonale: Mischung aus verschiedenen Antikörpern, Produzenten sind Tiere)

Stellen Sie die Hauptaktivitäten in der Forschung des Institutes für Biotechnologie der ZHAW zusammen und ordnen Sie diese den Farbbereichen und entsprechenden Industriebranchen zu!

- Kultivierung von Mikroorganismen, pflanzlichen und animalen Zellen (rot und grün)
- Prozessmodellierung und Optimierung (weiss)
- Verfahrenstechnik (weiss)
- Prozess- und Anlagenentwicklung (weiss)
- Sensortechnik und Prozessanalytik (weiss)
- Umweltbiotechnologie (grün/grau)

2. Produktionsverfahren

Welche biotechnologischen Verfahren lassen sich unterscheiden und was ist ihre Charakteristik!

Produktionsverfahren : S + BK → P	Entsorgungsverfahren
Monokulturen von MO, Zellkulturen	Biokatalysator ist Mischkultur
Semikontinuierlich: Upstreaming und Downstreaming, Batch- oder Fedbatchverfahren	Kontinuierliche Verfahren
Steril	Unsteril

Was sind Emersverfahren?

- Züchtung von Biokatalysatoren auf Substratoberfläche → Petrischale mit Festmedium (Zucht von Kallus und Bakterienkolonien etc.) z.B. Essigproduktion

Was sind Submersverfahren? Was sind die Vorteile?

- Züchtung von Biokatalysatoren im Nährmedium → Schüttelkolben mit Flüssigmedium (Vermehrung von Tabakzellen etc.) z.B. Penicillin, EPO-Produktion
 - Ist moderner, aber nicht für alles möglich
- Vorteile gegenüber dem Emersverfahren:
 - Verwendung von grösserer Produktionsvolumina
 - Bessere Mechanisierung und Automatisierung des Prozessablaufes möglich
 - Möglichkeit der Realisierung kontinuierlicher Verfahren garantiert

Welche 3 Prozessmodi kennen Sie? Nennen Sie Vorteile und Nachteile.

Batch

- Klassische Kulturführung (alles wird vorgelegt, Entnahme nach einer best. Dauer)
- Geschlossenes System: Konstantes Arbeitsvolumen, Ernte bei maximaler Zellzahl oder Produktkonzentration
- Vorteile: Einfachheit und Flexibilität
- Nachteile: Geringe Raum-Zeit-Ausbeuten (jedes Mal muss man putzen, sterilisieren, kontrollieren, was sehr viel Zeit braucht), Probleme bei Prozessen mit Substrat- oder Produktinhibierung (Organismen sterben bei zu viel Zucker)

Kontinuierlich (Dauer: 4-6 Monate)

- Offenes System
- Konstantes Arbeitsvolumen

- Prozess beginnt als Batch bis gewünschte Zellkonzentration erreicht, dann Umstellung auf kontinuierlichen Medienzulauf und kontinuierliche Entnahme.
- Verfahren ohne/mit Zellzurückhaltung (wenn Biomasse nicht schnell genug nachwachsen kann, da man zu viel konzentriert, muss man Biomasse zurückführen = Perfusion)
- Vorteile: Hohe Raum-Zeit-Ausbeute, kleinere Bioreaktoren und tiefere Investitionskosten bei Verfahren mit Zellrückhaltung
- Nachteile: Höherer apparativer Aufwand, Höherer Nährmediumverbrauch, Höhere Aufarbeitungskosten, Schwierigere Zulassung, Möglicher Auswascheffekt oder Nährstofflimitation bei zu hoher oder zu tiefer Verdünnungsrate

Fed Batch (Zwischenlösung kontinuierlich und Batch)

- Häufig in Industrie angewendet
- Höhere Lebendzellichte und Produktausbeute als Batch
- Hefe kann aerob und mit Gärung leben. Wenn zu viel Zucker vorhanden ist, kommt der fermentative Stoffwechsel ins Spiel. Dann entsteht zu wenig ATP. Also darf man nicht zu viel Zucker ins Nährmedium geben. Durch Sensoren und Automatik wird dafür gesorgt, dass nicht zu viel Melasse auf einmal in den Reaktor kommt.

Warum besteht der Trend zur Fed-Batch-Kultivierung, obwohl kontinuierliche Verfahren höhere Ausbeuten liefern?

- Man braucht anfangs nur eine geringe Biomasse.
- Eventuell anfallende toxische Stoffwechselprodukte können auf einem niedrigen Niveau gehalten werden.

Welche Varianten der Fed-Batch-Kultivierung kennen Sie?

- Feeding (Arbeitsvolumen vergrößert) → klassische Variante
- Feeding und Austausch (Arbeitsvolumen konstant)
- Repeated Fed-Batch (teilweise geerntet und Medium aufgefüllt)

Welche Gleichung zeigt jedes biotech. Produktionsverfahren? Erläutern Sie die Elemente.

- Reaktionspartner + Biokatalysator = Produkt
- Biokatalysator
 - MO, Enzyme, Pflanzliche, animale und humane Zellen/Zelllinien
- Substrat = Reaktionspartner
 - Einfache Substrate(z.B. Zuckerlösungen, Nährsalze, Komplexe, Blutplasma, Blut, AS werden in Industrie verwendet wegen Zulassung)
 - Mischsubstrate und Komplexe Substrate (z.B. Molke, Melasse, (Abfallprodukte z.B. aus Zuckerindustrie), werden in Lebensmittelindustrie verwendet)

- Produkt
 - Primär- und Sekundärmetabolite
 - Primärmetabolite: Wichtig für Zellüberleben (AS, Zucker)
 - Sekundärmetabolite: Unwichtige Stoffe (meist biologische Wirkstoffe)
 - Biomasse

Erklären Sie den allgemeinen Aufbau eines biotechnologischen Produktionsverfahrens!

- Verfahrenstechnische Grundoperationen des Upstreaming (Rohstoffvorbereitung)
 - Medienherstellung + Inokulumproduktion (Zellmenge, mit denen ein Fermenter angeimpft wird) → Fermentation (Stoffe werden umgesetzt)
 - Reinigen (Sieben, Filtrieren)
 - Mischen (Lösen, Rühren, Homogenisieren, Dispergieren, Suspendieren)
 - Sterilisieren (Thermisch, mechanisch, chemisch)
- Verfahrenstechnische Grundoperationen des Downstreaming (Aufarbeitung)
 - Feststoff-Flüssigtrennung (Filtrieren, Sedimentation, Zentrifugieren)
 - Zellaufschluss (intrazelluläre Produkte)
 - Anreichern (Extrahieren, Verdampfen)
 - Reinigen (Chromatographie, Dialyse)
 - Trocknen
- Endformulierung und Abfüllung
- Kennzeichnung und Verpackung

Wieso kommt der Sterilität in modernen biotechnologischen Produktionsverfahren eine besondere Rolle zu!

- Pathogene aber auch andere MO dürfen sich in der Biomasse nicht unkontrolliert vermehren, je nachdem was hergestellt wird muss ein bestimmter Sterilitätsgrad eingehalten werden.
- Mehr als 80% aller biotechnologischen Verfahren werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Welche Arten der Sterilität werden unterschieden?

- Absolute Sterilität (Mikrobiologie) : frei von vermehrungsfähigen Keimen
- Praktische Sterilität (Lebensmitteltechnik) : Reduzierung der Keimzahl bei Ausschluss sämtlicher pathogener Keime
- Sterilität in der Biotechnologie : Abtötung von MO auf einen wirtschaftlich vertretbaren Sterilisationsgrad

Wie wird Sterilität in biotechnologischen Verfahren erzielt? Vergleichen Sie die Verfahren!

- Feuchter & trockene Hitze für Geräte aus Metall und Glas
- Sterilfiltration für Lösungen / Flüssigkeiten
- Gammastrahlensterilisation für Einwegmaterialien
- Mikrowellensterilisation für Glasbehältnisse im Pharmabereich
- VHP-Sterilisation (H₂O₂) für Glasbehältnisse im Pharma- und Medizinbereich
für Reinräume und Bench
- Pascalieren für Lebensmittel
 - Nach der 1. Pasteurisation wartet man 24h bis die Sporen ausgekeimt haben und pasteurisiert nochmals. Beim pasteurisieren werden Keime geschädigt, aber nicht getötet. Sporen überleben dabei. Denaturierung von Proteinen bei Schonung von Vitaminen und Aromastoffen.

Unterscheiden Sie das Standard- und Overkillverfahren von der HTST-Sterilisation!

Standard- Overkillverfahren	HTST (High temperature short time)
Dampf	Dampf
121°C, 15 bis 20 min	140-160°C, Millisekunden bis 180 s
Batch z.B. Autoklav, in situ Sterilisation	kontinuierlich
Am häufigsten in BT	Wärmetauscherdurchlaufsterilisator
Aber: hohe Energieverluste, Alterung, Vitaminzerstörung, Farbveränderung,	Charakteristik: schonend, für wasserähnliche Substanzen und Flüssigkeiten

Wo / wie werden Sterilfiltrationen in biotechn. Produktionsverfahren durchgeführt?

- Tierische Zellkulturmedien: 0.1 / 0.2 µm
- Lebensmittel: 0.4 µm
- Vorteile: schonend, für wasserähnliche Substanzen, Batch und kontinuierlich realisierbar
- Nachteil: bei Medien mit Festkörpern schwierig wegen Porenverstopfung

Was ist unter in situ- und was unter ex situ Sterilisation zu verstehen?

- in situ: grosse Anlagen werden in situ (vor Ort) sterilisiert
- ex situ: Anlage muss fürs sterilisieren verschoben werden

Welche Möglichkeiten zum Nachweis der Sterilität gibt es?

Direkt	Indirekt (häufiger)
Lebendzellzahl bestimmt	Kontaminationsgrad über Infektionsindikator bestimmt
Keimidentifikation und Infektionsgrad bestimmt	
Standardmethoden: Plattenkulturverfahren, Membranfiltration, MPN-Verfahren	Schnelltestmethoden: Trübe, Geruch, pH, Leitfähigkeit, ATP-Gehalt

Wie und warum erfolgen Steriltests mit Bioindikatoren?

konventionell	mit Bioindikator
kein Universalmedium	Einsatz Sporen bildender, thermoresistenter Organismen (wenn dieses abstirbt, sind sicher auch alle anderen gestorben)
optimale Inkubationszeit unbekannt	Geobacillus stearothermophilus (Bacillus stearothermophilus)
optimale Inkubationstemperatur unbekannt	optimale Kultivierungsbedingungen sind bekannt

Erläutern Sie den Begriff Biokatalysator!

- Polymere Biomoleküle, die biochemische Reaktionen beschleunigen oder verlangsamen, indem sie die Aktivierungsenergie herab oder herauf setzen. Sie gehen selbst unverändert hervor und können somit mehrere Reaktionszyklen hintereinander katalysieren.

Erklären Sie den Begriff Scale-up!

- Massstabsvergrößerung oder Parallelisierung (Von der Kolonie zum Grossfermenter)

Mikrobielle Verfahren 1:10	Säugerzellverfahren 1:5
<ul style="list-style-type: none"> • Kolonie auf Agarplatte • Stammkultur auf Schrägagar • Schüttelkultur 300ml • Rührkultur 3 L • Vorfermentor 30 L bis 3000 L • Produktionsfermentor bis 500000 L 	<ul style="list-style-type: none"> • T-Flasche • Schüttel- oder Rührkultur • Rührkultur • Fermenter bis 25000L

Erläutern Sie die Fachtermini Labor-, Pilot- und Industriemasstab sowie Fermentation!

- Labormasstab: kann man umhertragen, bis 10L
- Pilotmasstab: 10-300L
- Industrie/Produktionsmasstab: so wie es nachher abläuft in der Industrie, ab 500 L
- Fermentation: Enzymatische Umwandlung organischer Stoffe in Säure, Gase oder Alkohol.
Bioreaktion bei der die Stoffezeugung bzw. Stoffumwandlung erfolgt.

3. Bioreaktoren

Was ist ein Bioreaktor ? Was ist ein Fermenter ? Was ist ihre Hauptaufgabe ?

- Bioreaktor: Reaktionsgefäße, in denen die Reaktionspartner mit Hilfe der Biokatalysatoren umgewandelt werden.
- Fermenter: wenn lebende, vermehrungsfähige MOs und Zellen pflanzlichen, tierischen bzw. humanen Ursprungs eingesetzt werden.
- Hauptaufgabe: die für das Wachstum der Biokatalysatoren bzw. Bildung der Bioprodukte und Stoffwechsellleistungen optimalen Umweltbedingungen zu sichern.

Wofür wird ein Bioreaktor eingesetzt?

- Lebensmittelindustrie und Chemie
 - Getreide, Obst- Gemüseverarbeitung: Festbettreaktoren, aerobe und anaerobe Reaktoren, Enzymreaktoren
 - Gärungsindustrie: aerobe und anaerobe Reaktoren (Gärreaktoren)
 - Milchverarbeitung: aerobe und anaerobe Reaktoren, Klimakammern, Reiferäume
 - Feinchemikalien: aerobe und anaerobe Reaktoren, Fest- und Wirbelbettreaktoren, Enzymreaktoren, Photobioreaktoren, offene Teiche
 - Aroma: aerobe und anaerobe Reaktoren, Fest- und Wirbelbettreaktoren, Enzymreaktoren
 - Starterkulturen: aerobe und anaerobe Reaktoren
 - Enzyme: submerse und emerse Reaktoren, aerobe und anaerobe Reaktoren, Fest- und Wirbelbettreaktoren
- Umwelt und Energie
 - Umweltbiotechnologie: aerobe und anaerobe Reaktoren, Fest- und Wirbelbettreaktoren, Membranreaktoren, Enzymreaktoren, offene Teiche
- Pharmazie und Medizin
 - Biopharmazeutika: sterile klassische und Single-Use, aerobe und anaerobe Rührreaktoren, Fest-, Wirbelbett-, Membran- und Enzymreaktoren

Welche Anforderungen stellt man an einen Bioreaktor im biopharmazeutischen Umfeld?

- Muss passende Umweltbedingungen für den Prozess bereitstellen
- Prozesskontrolle möglich
- Sterilität muss gewährleistet werden
- homogene Flüssigkeitsverteilung
- Übersichtliche Strömungsverhältnisse / keine Kurzschlusszonen (Bereiche wo Flüssigkeit gleich wieder abfließt) & Toträume (Bereiche wo nicht gemischt wird)

- optimale Mischzeitcharakteristik
- Einheitliche Energiedissipationsrate, optimale Schereffekte
- Ausreichende Turbulenz für Wärmeübertragung
- Gute Dispergierung der Luft/Gas (lösen und zu den Zellen führen)
- Vermeidung von Substratmischung
- Messbarkeit der Prozessvariablen und Schlüsselkomponenten
- Eignung für Scale-up
- Langzeitstabilität / Günstig in der Anschaffung und Wartung
- Leicht zu reinigen & Leicht zu steuern & Einfach in Wartung
- CIP (=Cleaning in Place) und SIP sollte möglich sein

Benennen Sie die 5 am häufigsten in der Biotechnologie eingesetzten Bioreaktoren und beschreiben Sie deren Arbeitsprinzip !

- Hydraulisch angetriebene Bioreaktoren (Tauchstrahlreaktor, Umlaufdüsenreaktor)
 - Durchmischung mit Düsen und Pumpen
- Mechanisch angetriebene Bioreaktoren (Rührreaktor, Schlaufenreaktor)
 - Mechanische Rührung durch Rührer
- Pneumatisch angetriebene Bioreaktoren (Blasensäule, Airliftreaktor)
 - Durch Lufteinschleusungen entstehen Umwälzungen. Gasbläschen reißen die Masse mit sich und wälzt sie um.
- Bettbioreaktoren (Festbettreaktor, Wirbelbettreaktor)
 - Zellen wachsen auf den Füllkörpern.
 - Ersterer besprüht die Zellen von oben mit Nährlösung und wirbelt sie im Kreis.
 - Zweiterer speist die Zellen durch Schüttung (Aufschüttung des eingeschleusten Gases) des Nährmediums
- Membranbioreaktor (Hohlfaserreaktor, Flachmembranreaktor)
 - Beinhaltet eine membranbasierte Trennstufe als integralen Bestandteil
 - Über eine semipermeable Membran werden Inhaltsstoffe / Zellen zurückgehalten bzw. abgetrennt.
 - Membranen können eingesetzt werden, um gezielt Stoffe zugegeben & um den Stoffaustausch zu intensivieren.
 - Biomasse wird an Membran vorbeigeführt, so können Proben entnommen werden

Welche Bioreaktoren empfehlen Sie für die Kultivierung sehr scherempfindlicher Biokatalysatoren (z.B. Säugerzellen) und warum?

- Rührer die grossflächig sind, dann kann man langsamer rühren, um Scherkräfte zu verhindern.

Wie können Bioreaktoren eingeteilt (klassifiziert) werden?

- Einteilung der Reaktoren nach Zeitverhalten
 - Nicht stationär arbeitende Reaktoren
 - diskontinuierlich betriebene Reaktoren (Chargen-, Satzbetrieb, Batch-Betrieb)
 - halbkontinuierlich betriebene Reaktoren (Semibatch-Betrieb, Fed-Batch-Betrieb)
 - kontinuierlich arbeitende Reaktoren im Anfahr- und Abfahrzustand bzw. bei Betriebsstörungen
 - Stationär arbeitende Reaktoren
 - kontinuierlich betriebene Reaktoren (Fließbetrieb)
- Betriebsweisen
 - Diskontinuierlich → Batch
 - halb- oder semikontinuierlich → fed batch / repeated fed batch
 - kontinuierlich → chemostat / perfusion
- Emerssysteme oder Submerssysteme
- Art der Belüftung (aerob, anaerob)
- Art des Energieeintrages (mechanisch, hydraulisch, pneumatisch)
- Form und Fixierung des Biokatalysators (frei, immobilisiert)
- Bauform

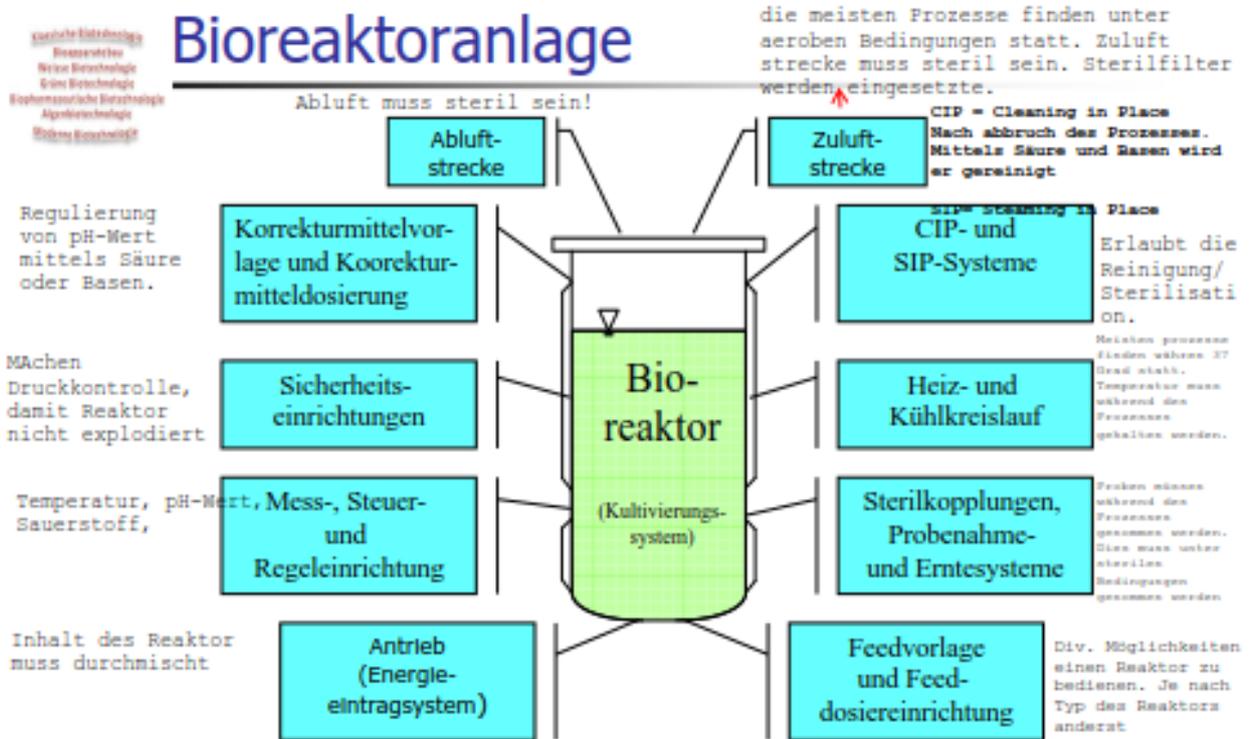
Was ist der Unterschied zwischen einem klassischen Bioreaktor und einem Single-Use-Bioreaktor?

Klassisch	Single-Use
Glasreaktoren / Edelstahlreaktoren Durch CIP & Sterilisation gereinigt	Neuartige Einwegsysteme aus Plastik Vorteile: Keine Gefahr der Kreuzkontamination & kann nach Gebrauch sofort mit einem neuen Bag wiederverwendet werden Nachteil: Bags sind sehr teuer

Für welche Aufgaben sind Rührreaktoren besonders geeignet? Begründen Sie Ihre Entscheidung?

- Für Submersverfahren, für relativ grosse Mengen, die gut durchmischt werden müssen.
- Für Biokatalysatoren die viel Sauerstoff brauchen z.B. E.coli.
- In der Pharmazie & Medizin am häufigsten Rührreaktoren z.B. für Insulinherstellung
- Sehr hoher Reinheitsstandard wird vorausgesetzt. Alle Betriebsparameter des Reaktors müssen in engen Grenzen gehalten werden.

Skizzieren Sie einen Rührreaktor mit seiner Instrumentierung. Benennen Sie die Hauptelemente und ihre Funktion sowie die essentiellen Mess- und Regelgrößen!



Standardausrüstung

- Temperatur
- Rührer-, Kipp- oder Schüttelgeschwindigkeit
- pH-Wert
- Gelöst-Gas-Konzentration (pO₂) Gasmischung
- Gasdurchflussrate
- Druck
- Antischaum / Niveau
- Kesselgewicht
- Dosiermenge (Substrat-, Antischaum-, Säure- und Laugenmenge)

Erweiterte Regelgrößen

- Leistungsaufnahme
- Abgasanalyse
- Gewicht der Ernte und Korrekturvorgängen
- Biomasse-, Substrat-, Produkt- und Nährsalzkonzentrationen (c_X, c_S, c_P, Nährsalze)
- Metaboliten (z.B. Laktat, Ammonium, Glutamat)
- Dichte, Trübung, Oberflächenspannung, Viskosität, Redoxpotential, Leitfähigkeit

4. Genfood

Welche Organismen können unter die GVO fallen?

- «Gentechnisch veränderte Organismen sind Organismen, deren Erbgut so verändert worden ist, wie es unter natürlichen Bedingungen, beispielsweise durch Kreuzung, nicht vorkommt.»
- Zum Beispiel:
 - GV Pflanzen
 - GV Tiere
 - GV Mikroorganismen

Nennen Sie 5 Beispiele für „Genfood“.

- Pflanzen: Anti-Matsch Tomate, Golden Rice, Mais, Soja, Raps, Baumwolle
- Tiere: fettarmes Schwein, schnellwachsender Lachs, massgeschneiderte Milch der Kuh,
- MO: Bierhefe zur Verkürzung der Lagerzeit, Backhefe zu grösserem Brotvolumen,

Erklären Sie, weshalb in der Lebensmittelindustrie gentechnisch hergestellte Enzyme zum Einsatz kommen! Nennen Sie 3 Beispiele!

- Anreicherung von gesundheitsfördernden Stoffen, Allergenfreiheit, Umwelttoleranz, Resistenz gegen Schädlinge oder Herbizide....
- Labenzym Chymosin «Maxiren» : zum Ausfällen des Milcheiweisses bei Käse-Herstellung
- Labenzym Chymosin «Chy-Max» : zum Ausfällen des Milcheiweisses bei Käse-Herstellung
- Amylase Novamyl 10000 BG : Alterungsprozess der Backerzeugnisse wird verlangsamt

Was ist bei der Zulassung eines Produktes aus GVO als Lebensmittel in der Schweiz zu beachten?

- Das BAG erteilt die Bewilligung nur, wenn nach dem Stand der Wissenschaft eine Gefährdung von Gesundheit und Umwelt ausgeschlossen werden kann.
- Die Bewilligung ist auf zehn Jahre befristet. Sie kann auch widerrufen werden

Beschreiben Sie die genetische Veränderung und den Nutzen des Bt-Mais.

- Um die Pflanzen gegen den Schädling Maiszünsler resistent zu machen, wurde biol. Schädlingsbekämpfungsmittel aus anderen Organismen isoliert und in die Maiszelle eingefügt, mit dem Ziel, die Bekämpfung von Schadinsekten zu verbessern sowie bei herbizidresistenten Mais oder herbizidtoleranten Mais die Unkrautkontrolle zu erleichtern.
- Erste in grossen Mengen angebaute GV Pflanze, die in ihrem Erbgut ein eingeschleustes Bakterium (*Bacillus thuringiensis*) besitzt und dadurch ein Protein bildet, das den Schädling tötet.

Was bedeutet es, wenn eine Pflanze „Roundup Ready“ ist.

- Transgene Nutzpflanze mit Glyphosphat-Resistenz → Das Unkraut stirbt ab, die Wirtspflanze bleibt jedoch weiterhin bestehen!

Was ist der „Goldene Reis“ und wie lässt sich seine Entwicklung in die Biotechnologie einordnen? Begründen Sie Ihre Entscheidung.

- Trocken-, Insekten-, Herbizidresistenz, ...
- Nahrungspflanze (Reis) mit erhöhter Konzentration des Sekundärstoffs β -Carotin. Ist gentechnisch verändert. β -Carotin im Endosperm wird im Körper zu Vitamin A umgewandelt. Mit dem Ziel das eine Tagesration den Tagesbedarf an Provitamin A deckt. → Für Entwicklungsländer zur Behandlung des Vitamin A-Mangels.
- Juli 2009 ETHZ stellt GVO-Reis mit erhöhtem Eisenanteil vor. Speicherung erfolgt nun im Korn, nicht in der Hülle, die bei geschältem Reis entfernt wird. Zulassungs-Anfrage in der Schweiz wurde nicht gestellt.

5. Functional Food

Erklären Sie den Begriff Functional Food! Nennen Sie Beispiele!

- „Functional Food sind Lebensmittel mit einem spezifischen Zusatznutzen, der über den ernährungsphysiologischen Nutzen der darin enthaltenen Nährstoffe hinausgeht.“
- Zum Beispiel:
 - Prebiotische Joghurts
 - Joghurtdrink wie Actimel
 - Fitnessrigel
 - Fitness Cornflakes
 - Schokoladenpulver wie Ovomaltine

Wie sind die gesetzlichen Regelungen für Functional Food/Speziallebensmittel?

- Juli 2007: Health-Claims-Verordnung der EU
 - Nährwert- und gesundheitsbezogene Aussagen über Lebensmittel müssen wahr und belegbar sein
- Bei funktionellen Lebensmitteln sollte es sich ausschliesslich um übliche Lebensmittel als Bestandteil der täglichen Mahlzeiten handeln, nicht zum Beispiel um Nahrungsergänzungsmittel.
- Funktionelle Lebensmittel sollten eine Modifikation gegenüber einem herkömmlichen Lebensmittel aufweisen, die auch im Endprodukt identifizierbar ist.
- Die Modifikation muss einen für den Verbraucher konkreten nachweislichen Nutzen über die übliche (basale) Nährstoffversorgung hinaus bieten.
- Klare Trennung zwischen Lebens- und Heilmittel → Keine Anpreisung auf Behandlung oder Heilung einer Krankheit erlaubt.
- Im schweizerischen Lebensmittelrecht ist Functional Food nicht definiert. Die Nahrungsmittel fallen unter Speziallebensmittel. Diese sind laut Verordnung sind laut Verordnung des EDI über Lebensmittel für Personen mit besonderem Ernährungsbedarf definiert.

Nennen Sie Gründe aus denen Functional Food hergestellt wird.

- Säuglingsanfangsnahrung;
- Folgenahrung;
- Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder;
- Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke;
- Lebensmittel für eine gewichtskontrollierende Ernährung;
- Lebensmittel für Sportlerinnen und Sportler.

Nennen Sie biotechnologischen Verfahren über die Functional Food hergestellt wird.

- Biotechnologische Herstellung von Lebensmittelzusatzstoffen (Antioxidantien, Fettsäuren) durch
 - enzymatische oder fermentative Verfahren
 - Herstellung mit Algenkulturen oder pflanzlichen Zellkulturen
 - Herstellung mit GVOs
- Enzymatische Veränderung von Bestandteilen von Lebensmitteln
- Herstellung von probiotischen Lebensmitteln v.a. fermentierte Milchprodukte
- Züchtung von Nutzpflanzen mit erhöhten Gehalten an Sekundärstoffen

Kann Functional Food ohne GVO hergestellt werden?

- Ja: Enzymatische oder fermentative Veränderung von Bestandteilen von Lebensmitteln, Herstellung mit Algen- oder pflanzlichen Zellkulturen. Züchtung von Nutzpflanzen mit erhöhten Gehalt an Sekundärstoffen, Herstellung von probiotischen Lebensmittel v.a. fermentierte Milchprodukte, Entfernung ungewollter Substanzen

Kann Functional Food mit GVO hergestellt werden?

- Ja: GVO Pflanzen mit verändertem: Fettsäuremuster, erhöhtem Vitamin E-Gehalt, erhöhtem Gehalt an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen.
GVO probiotische MOs mit verbesserter Ansiedlungsfähigkeit im Darm, erhöhter Magensäureresistenz

Erläutern Sie den Unterschied zwischen Pro- und Prebiotika und Synbiotika.

Probiotika	Prebiotika
lebende Mikroorganismen, die sich nach oraler Aufnahme längere Zeit im Intestinaltrakt ansiedeln können und eine positive Wirkung auf die Gesundheit des Menschen ausüben	nicht-verdauliche Lebensmittelbestandteile, die die Gesundheit verbessern, indem sie die Darmflora durch die selektive Stimulation gewisser probiotisch aktiver Bakterien günstig beeinflussen
Synbiotika: Mischung von Pro- und Prebiotika	

Nennen Sie wichtige Eigenschaften von probiotischen Keimen.

- Technologische Eigenschaften
 - Hohe Produktivität während der Fermentation
 - Phagenresistenz
 - Fähigkeit dem Produkt während und nach der Fermentation die gewünschten Geschmackseigenschaften und Aromaprofile zu verleihen
 - Erhalt eines guten Säureprofils während der Lagerung
 - Fähigkeit, Verarbeitung und Lagerung in hohen Keimzahlen zu überleben und dabei die probiotischen Eigenschaften beizubehalten
 - Stabilität nach Gefriertrocknung oder anderen Trocknungsmethoden
- Klinische Eigenschaften
 - Resistenz gegenüber Säure und Galle
 - Anheftungsfähigkeit in menschlichen Darmzellen
 - Produktion antimikrobieller Substanzen
- Sicherheit
 - Sicher für menschlichen Verzehr
 - Herkunft aus dem menschlichen Körper
 - Korrekte Stamm-Identifizierung

Wie werden probiotische Keime gewonnen?

- Der Keim «Lactobacillus» wurde 1985 aus einem gesunden Menschen isoliert
- In-vitro wurde die Widerstandsfähigkeit nachgewiesen
- Danach wurde die Haftfähigkeit an der Darmwand bewiesen
- Als alle diese Punkte stimmten wurden das Bakterium kolonisiert

***Herstellung Prebiotika**

- Extraktion aus Pflanzen
 - Inulin aus Chicorée
- Enzymatische Synthese aus Zuckermolekülen
 - Fructooligosaccharide
- Enzymatischer Abbau von Polysacchariden
 - Fructooligosaccharide
- Fermentative Herstellung mit genetisch modifizierten Bakterienstämmen
 - humane Oligosaccharide

6. SingleCellProtein

Was ist SCP?

- Mikrobielle Biomasse wird als Einzeller-Protein (Single Cell Protein = SCP) bezeichnet.
- Biotechnologische Verfahren zur Herstellung mikrobieller Biomasse gehören zu den bekanntesten und wichtigsten Bioprozessen.
- Eine biotechnologische Alternative zur Erzeugung von Proteinen, Aminosäuren und anderen Feinchemikalien
- Beispiele: Backhefe, Futterhefe, Quorn

Welche Produktionsorganismen und Substrate zu seiner Herstellung kennen Sie?

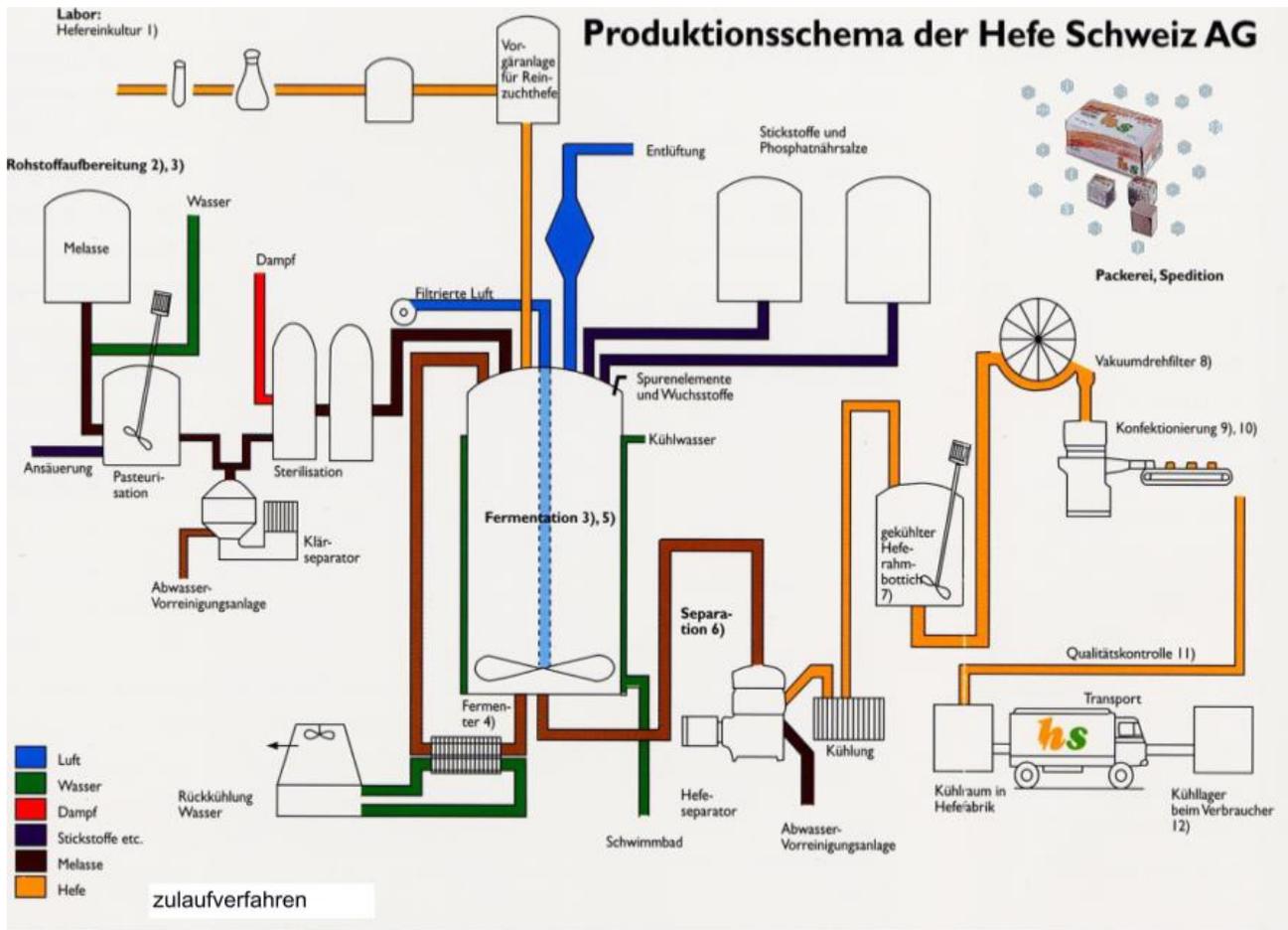
- Produktionsorganismen: Algen, Bakterien, Hefen, Schimmelpilze
- Substrate:
 - Kohlenstoffquellen
 - Nachwachsende Rohstoffe:
 - Melasse, Sulfitablauge, Molke, Stärke, Cellulose (Stroh, Holz)
 - Rohstoffe aus fossilen Rohstoffen:
 - Methan, Methanol, n-Alkane
 - Stickstoffquellen und Mineralstoffe
 - Sauerstoff
 - CO₂ und Licht für Algen

Welche Vorteile und Nachteile gibt es bei der Nutzung von SCP für die menschliche Ernährung?

- Vorteile:
 - Die Produktion von Single Cell Protein kann mit organischem Material belastete Abwässer reinigen und hat damit einen positiven Einfluss auf die Umwelt.
 - Das enorme Wachstumspotential und die Verwendung von „Abfällen“ als Substrat können einen Beitrag zur Nachhaltigkeit, der Verbesserung der CO₂-Bilanz und der Welternährung darstellen
 - Gesundheitsbewusster (weniger Fett, cholesterinarm, hochwertiges Eiweiss)
- Nachteile:
 - Schnell wachsende Mikroorganismen zeichnen sich in der Regel durch hohe Konzentrationen an Nukleinsäuren (RNA) aus. Für die menschliche Ernährung muss der Gehalte gesenkt werden. Sonst kann Gicht ausgelöst werden.

Wie wird Backhefe/Futterhefe aus Melasse hergestellt?

- Backhefe



- Futterhefe
 - Sulfitablauge (Sulfitablauge, die bei der Zellstoffherstellung nach dem Sulfitverfahren anfallende Lauge.) wird gestrippt:
 - Die Begriffe „Sprühbelüftung“ und „Strippen“ werden oft synonym verwendet, jedoch beschreibt das Strippen das Entfernen von Schadstoffen aus einem Prozessfluss mithilfe eines Gases wie Stickstoff.
 - Danach kommen unter stetigem rühren Nährsalze, Lauge und Säure dazu und wird gekühlt. Zum Nährmedium kommt Hefe dazu und Antischaummittel.
 - Danach wird sie separiert, eingedampft und getrocknet. Es entsteht Futterhefe.

Welche Potentiale liegen in der SCP-Produktion?

- Medizin, Ernährung, Landwirtschaft, Bekämpfung des Welthungers, vermindern von belasteten Abwässer und Umwelt, Pharma-Vorprodukte, Chemie, Tenside, Emulgatoren.

Was ist Quorn?

- Eine Art Gemüsekuchen bestehend aus hauptsächlich dem Pilzeiweiss Mykoprotein gewonnen aus *Fusarium venenatum*.
- liefert Eiweiss und enthält alle essentiellen Aminosäuren.
- enthält wenig Fett → wenig Kalorien
- enthält viel Ballaststoffe und kein Cholesterin
- DNA/RNA Gehalt ist reduziert
- Eignen sich zum Braten, Dünsten, Kochen, Grillieren und Backen.

Wie wird Quorn grosstechnisch produziert?

- Steriles kontinuierliches Verfahren über 5 Wochen in 45 m hohen Schlauchreaktoren
- Medium aus Glucose und Kalium, Magnesium, Phosphat, Spurenelementen
- pH-Wert, Temperatur, Substratkonzentration, O₂-Konzentration geregelt

7. Zelltherapeutika

Was ist ein ATMP? Nenne Beispiele

- Advanced Therapy Medicinal Product
- zur Heilung oder Verhütung von Krankheiten beim Menschen
- zur Wiederherstellung, Korrektur oder Beeinflussung der Funktionen durch eine pharmakologische, immunologische oder metabolische Wirkung
- Wird unterteilt in:
 - Gentherapeutika
 - Wirkstoff enthält/ist eine rekombinante Nukleinsäure
 - wird verwendet um Nukleinsäuresequenzen zu regulieren, zu reparieren, zu ersetzen, hinzuzufügen oder zu entfernen
 - Wirkung muss mit der dieser Nukleinsäuresequenz zusammenhängen
 - z.B. bei Ischämie der unteren Extremitäten, Behandlung von Lymphödemen nach Brustkrebsbehandlung oder Morbus Parkinson
 - Somatische Zelltherapeutika
 - aus substanzuell* bearbeiteten Zellen
 - Physiologische Funktionen und strukturelle Eigenschaften wurden für klinische Verwendung abgeändert (non-homologous use)
 - Verwendung zur Behandlung, Vorbeugung oder Diagnose von Krankheiten
 - Pharmakologische, immunologische oder metabolische Wirkung muss den Zellen oder Geweben zugeschrieben werden können
 - z.B. Leberzelltherapie, Therapie von Ovarialkarzinomen, Diabetes
 - Biotechnologisch bearbeitete Gewebeprodukte
 - aus biotechnologisch bearbeiteten Zellen oder Geweben
 - Kann zur Regeneration, Wiederherstellung oder dem Ersatz von menschlichem Gewebe eingesetzt werden
 - Substanzuelle Bearbeitungsverfahren
 - Veränderung des Gewebes
 - Kultivierung / Expansion
 - Genetische Modifizierung
 - z.B. Hautersatz, Behandlung nach linksventrikulären Myokardinfarkt, Knorpel-Transplantate
 - Kombinierte ATMPs → Kombination aus mehreren einzelnen ATMPs
 - Z.B. Behandlung bei akuter chronischer Hepatitis, Reparatur symptomatischer Knorpeldefekte in Gelenken

Herstellung eines Zelltherapeutikums

- Isolation und Anreicherung der Zielzellen aus dem Gewebe
- Manipulation
- Etablierung der Master- und Arbeitszellbank (Kryopreservierung)
- Expansionsverfahren mit angemessener Passagenzahl (-> genetisches Alter und therapeutisches Potential) mit geeignetem Kultivierungsmedium (-> Nachahmung der physiologischen Bedingungen)
- Patient bekommt Therapie

Autolog vs. Allogen

Autolog	Allogen
Fokus auf Zellen aus dem Blut	
Speziell für einen bestimmten Menschen angepasst	Für eine Allgemeinheit
<ul style="list-style-type: none"> - Need Arises - Harvest Tissue - Process Cells - Implant 	<ul style="list-style-type: none"> - Need Arises - Retrive Product from Storage - Implant
<ul style="list-style-type: none"> - T-Zellen - Dendritische Zellen - Natürliche Killerzellen - Hämatopoetische Stammzellen 	<ul style="list-style-type: none"> - Embryonale Stammzellen - Mesenchymale Stammzellen

Was für Zellen gibt es?

- Dendritische Zellen
 - Zellen des Immunsystems welche sich aus Monozyten oder aus Vorläufern der B- und T-Zellen entwickeln
 - Zellen differenzieren und reifen in vitro (-> keine Expansion)
 - Therapeutisch relevante Zelldosen 1 x 10⁷ Zellen/ Dose (-> genügend Zellen isolierbar)
 - Isolation von CD14+ Monozyten aus dem Blut
 - Differenzierung mit IL-4 und GM-CSF in unreife dendritische Zellen
 - Aktivierung der Zellen mit «maturation chocktails» nach Antigenbeladung (MHC)
 - Beladene Antigene dienen der Aktivierung der T-Zellen in vivo

- T-Zellen = Gedächtniszellen
 - Natürliche Zellen des Immunsystems (memory effect)
 - CD4 Helfer, CD8 Killer und regulatorische T-Zellen (TREGs)
 - Besitzen Antigen-spezifische Rezeptoren welche modifiziert werden können
 - CAR T-Zellen – chimeric antigen receptor T-Zellen
- Natürliche Killerzellen (NK Zellen)
 - Attraktiver Zelltyp für eine autologe Zelltherapie
 - Erkennung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen (-> Apoptose)
 - Besitzen keine antigen-spezifische Rezeptoren (-> angeborenes Immunsystem)
 - NK Zellen können aus dem peripheren Blut isoliert werden
 - In vitro Expansion durch geeignete Kombination aus Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Medium
- Hämatopoetische Stammzellen
 - Isolation aus dem Knochenmark oder der Nabelschnur
 - Vorläuferzellen aller Blutzellen (-> enormes therapeutisches Potential)
 - Reparatur von beschädigtem Gewebe, Expression defekter Gene durch Modifikation, ...
 - In vitro Expansion schwierig da Differenzierung auftritt sobald Zellteilung einsetzt
 - Verhinderung der Differenzierung durch verschiedene Faktoren

8. Stammzellen

Was sind Stammzellen?

- Stammzellen erneuern sich selbst, indem sie identische Tochter- oder Vorläuferzellen hervorbringen die die Fähigkeit zur Differenzierung in funktionelle Zellen besitzen.
- Charakteristik:
 - Undifferenziert am Anfang der Entwicklung
 - Selbstreplikation und –erneuerung über lange Kultivierungsperioden
 - Hohes Proliferationspotential
 - Häufig Wechsel zwischen symmetrischer (nicht differenzierter) und asymmetrischer (differenzierter) Zellteilung
 - Hohes Differenzierungspotential

Welche Stammzelltypen sind Ihnen bekannt?

- Embryonale Stammzellen
 - Pluripotent → Können sich in über 210 Zelltypen entwickeln
 - Unbegrenzt Wachstum im Vergleich zu adulten Stammzellen
 - Können im Labor über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden und deshalb genügend Zellen für eine Therapie liefern
 - Möglichkeiten der Gewinnung: Blastozysten, Föten, therapeutisches Klonen
 - Zulassungspflichtige Gewinnung, Einfuhr und Forschung ist schwierig
- Adulte Stammzellen : Multipotent → Gewebespezifische Zelltypen
- Induzierte pluripotente Stammzellen
- Unterscheiden sich in Abhängigkeit ihrer Isolierung, Propagation & Differenzierungsfähigkeit

Mit welchen Methoden können embryonale Stammzellen gewonnen/erzeugt werden?

- Gewinnung aus Blastozysten und Föten
 - Ein befruchtetes Ei (Zygote) wird zerstört. Dann werden die Stammzellen aus dem inneren weitergezüchtet. Differenzierung der Stammzellen in verschiedene Zelltypen (Blutzellen, Nervenzellen oder Muskelzellen).
- Gewinnung durch therapeutisches Klonen
 - Embryonale Stammzellen wurden hergestellt durch entfernen der männlichen und weiblichen Chromosomen aus einer befruchteten Eizelle und ersetzen durch den Kern aus einer adulten Zelle.

Wieso existieren ethische Bedenken gegenüber Stammzelltherapien?

- Ethische Probleme wegen Zerstörung von Embryonen

Begründen Sie das Interesse der Wissenschaftler an den embryonalen Stammzellen!

- Mit ihrer Hilfe lassen sich grundlegende Mechanismen der normalen und pathologischen Differenzierung menschlicher Zellen und Gewebe studieren.

Darf man in der Schweiz mit Stammzellen arbeiten?

- Unter bestimmten Bedingungen ist es zulässig aus überzähligen menschlichen Embryonen Stammzellen zu gewinnen, um mit ihnen zu forschen. Darüber hinaus dürfen embryonale Stammzelllinien zu Forschungszwecken aus dem Ausland importiert werden.
- Erzeugung von Stammzellen zu reinen Forschungszwecken sind verboten.
- Meldepflicht beim BAFU

Was sind adulte Stammzellen

- Aus ausgewachsenen Individuen ohne gesundheitliche Beeinträchtigung
- Organspezifisch mit begrenzter Teilungs- und Differenzierungsfähigkeit
- Vorkommen: Knochenmark, peripheres Blut, Gehirn, Rückenmark, Zahnwurzel, Haut, Skelettmuskel, Darm, Cornea, Retina, Leber, Pankreas, Fettgewebe
- Zum Teil schwer gewinnbar und zerstreut
- Alternative zu embryonalen Stammzellen
- Unterteilt in:
 - Hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark
 - am besten untersucht
 - klinischer Einsatz zur Regeneration von Komponenten des Blut
 - Mesenchymale Stammzellen
 - Gewonnen aus Blut, Plazenta, Adipose Gewebe, Knochenmark
 - Fähigkeit, an plastischen Wachstumsoberflächen zu haften
 - Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten
 - Hervorragendes Sicherheitsprofil (bis heute keine nennenswerten Gefahren)
 - Immunsuppressiv, immunregulierend, migrierend und trophisch Eigenschaften
 - Stammzellen aus Nabelschnurblut und -gewebe
 - Hohes Differenzierungspotential
 - Immunologisch kompatibel bei Eigenvermehrung (keine Immunreaktion)
 - Längere Lebensdauer als Knochenmarkszellen
 - Selten kontaminiert (Viren/Bakterien) → innerlich steril
 - Einfach und risikolos in hoher Frequenz (ca. 1 Zelle aus 300) zu gewinnen
 - Sichere Aufbewahrung möglich → Einfrieren → Lange Verwendung
 - Verwendung für Geschwister möglich → genetische Ähnlichkeit
 - Abnahme ethisch unproblematisch (ESCs)

Was sind induziert pluripotente Stammzellen und wie werden sie erzeugt?

- Alternative zu embryonalen Stammzellen
- Umprogrammierung von adulten Zellen (multipotent) zu pluripotenten Stammzellen
 - Ziel: «embryonic stem cell-like state»
 - Einfügen von 4 Faktoren ins Genom unter Verwendung von Retroviren (nicht sicher → biosafety)
 - „induced pluripotent stem cells (iPSs)“
- Nicht-viraler Ansatz (neue Methode)
 - Noch in der Entwicklung
 - veränderte Gene werden wieder entfernt
 - reduziert Krebsrisiko

Erklären Sie die Begriffe Klon und Klonieren.

- Klon → griechisch = „Spross“
- Klonen → Erzeugen von genetisch identischen Zellen oder ganzen Organismen
- Klonieren → Erzeugen von Zellen, die gentechnisch verändertes Erbgut enthalten

Erklären Sie den Unterschied zwischen therapeutischem und reproduktivem Klonen.

- Reproduktives Klonen Ziel: Mensch Nukleustransfer
 - Embryo durch Leihmutter ausgetragen
 - in meisten Ländern verboten → erlaubt in: Grossbritannien, Niederlande, Kalifornien
 - Nachteil:
 - Gesundheitsschäden der geklonten Individuen (Herz- und Kreislaufstörungen, Krebs, übermässiges Wachstum im Mutterleib, rätselhafte Alterserscheinungen)
 - Geringe Erfolgsaussichten bedingen hunderte Einzelbefruchtungen
 - Hohe Anzahl abgestorbener Embryonen und Totgeburten
 - Genomisches Imprinting
 - Telomere
- Therapeutisches Klonen Ziel: Organe, Gewebereparatur
→ Tissue Engineering

9. Tissue Engineering

Was ist Tissue Engineering?

- Technische Herstellung von Zellen, Geweben bis zu Organen und Körperteilen.
- Regeneration bzw. Rekonstruktion fehlender oder geschädigter Gewebe- und Organstrukturen
- Zellen stammen aus geschädigter Gewebe- bzw. Organstruktur oder Zellen sind aus einem anderen Gewebe und z.T. differenziert: Stammzellen
- Dem Patienten werden Zellen entnommen → Kultivierung im Labor → wieder eingesetzt oder
- Zellen oder Zellkomplexe werden direkt in Körper implantiert, der den Bioreaktor darstellt
- Anwendungen:
 - Überbrückung von Organausfällen mit extrakorporalen Organoiden (z.B. künstliche Leber), die mit Leberzellen von Schweinen besiedelt sind (schon erfolgreich)
 - „Organ-on-a-Chip/Human-on-a Chip“ zur Erstellung personenspezifischer Therapien bei verschiedenen Erkrankungen (wird noch erforscht)
Menschliche Funktionen sind auf diesem Chip gespeichert. Krebstherapien werden damit ausprobiert.

Welche Vorteile und welche Probleme sind für das Tissue Engineering charakteristisch?

- Vorteile:
 - Unabhängigkeit von Spenderorganen
 - Immunologische Akzeptanz der TE-Produkte beim Einsatz autologer Zellen
 - Minimierung des Infektionsrisikos
 - Entfall einer lebenslangen, medikamentösen Behandlung mit Immunpräparaten
 - Verfügbarkeit von «Mini-Organen» für die medizinische sowie pharmazeutische Forschung (Medikamententests) und Kosmetikindustrie (Wirkstofftests) → Reduzierung und Ersatz von Tierversuchen
- Nachteile:
 - Viele humane Zelltypen nur in begrenzter Menge isolierbar
 - Schwierige in vitro Kultivierung
 - Veränderung der Zellqualität mit steigender Passagenzahl
 - Adhärentes Wachstum
 - Hohe Empfindlichkeit gegenüber Scherstress
 - Komplexe Kulturmedien, die in vivo Bedingungen simulieren, notwendig
 - Sehr kostenintensiv
 - GMP-Bedingungen zwingend, gutes Personal und Material erforderlich

Auf welchen 3 Strategien basiert das Tissue Engineering ?

- Zelltherapie (Injektion / Infusion von den vermehrten Zellen)
 - Transplantation von Stammzellen aus Knochenmark oder Blut zur Therapie bei Leukämie oder nach Chemotherapie
 - Hautzellen werden direkt mit Fibrin (Klebstoff) in die Wunde gegeben (Haut aus der Tube)
- Geschlossenes System ausserhalb des Körpers, das mit Zellen des Patienten besiedelt wird
 - Auf Hohlfaserkartuschen werden Zellen vermehrt → Apparatur wird an den Blutkreislauf des Patienten angeschlossen
 - Künstliche Leber → um die Hohlfasern vermehren sich die Zellen. Patienten werden mehrere Wochen an diese Geräte angeschlossen. Das Gerät übernimmt die Aufgabe der Leber
- Komplette Gewebe/Organe
 - Nicht nur einzelne Zellen oder Zellverbände werden produziert, sondern komplette Gewebe und Organe

Was sind die Voraussetzungen ?

- Vitale Zellen
- Geeignetes Kultivierungsmedium mit Wachstumsfaktoren (Zell-zu-Zell-Kontakt/ Zellkommunikation)
- Geeignetes Kultivierungssystem / Bioreaktor → muss Wachstum und Differenzierung unterstützen
 - Physikalische Stimulation wie Pulsation
 - Mechanischer Stress wie Zug oder Druck genutzt
- Scaffold oder Matrix → 3D- (Bioreaktor: grösserer Massstab mithilfe Microcarrier) vs. 2D-Kultivierung (Platte: kleiner Massstab)
 - Scaffolds lösen sich nach einer bestimmten Zeit auf und sind Biokompatibel
 - Ermöglichung homogene 3D-Verteilung der Zellen
 - Ausreichende Formstabilität und Formbarkeit
 - Natürliche oder künstliche Stützgewebe
 - Membranen oder Vliese
 - Gelartige Biomaterialien
 - Grobmaschige Netze oder Schwämme
 - Synthetische Kunststoffe (PTFE)
 - Biologisch abbaubare Metalle
 - Spezifische Anforderungen in Abhängigkeit von Gewebetyp und Transplantationsort

Welche grundlegenden Zielsetzungen sind generell zu garantieren?

- Hohe Zell- und Gewebedichten
- Zell- und Gewebespezifische Differenzierung (bei Stammzellen)
- Aufrechterhaltung der Funktionalität über Wochen und Monate
- 3 aufeinander folgende Kultivierungsschritte
 - In Kultur bringen und Zellvermehrung (2D = planare Kultivierung)
 - Adhäsion an den Scaffold → 3D → Zellen haften an Gewebeträger an/überwachsen diesen → Dies gibt die 3D Struktur!
 - Zell- und gewebetypische Differenzierung

Nennen Sie 3 wichtige Meilensteine aus der Entwicklung des Tissue Engineering .

- 1900 Ljuggren kultiviert erstmals humane Haut
- 1975 Rheinwald und Green kultivieren Hautzellen als „sheets“
- 1997 Brüder Vacanti haben menschliche Chondrozyten in Form eines Ohrs gebracht und Maus unter die Haut transplantiert

Beschreiben Sie 3 aktuelle Applikationen!

- Zweischichtige Haut (Epidermis und Dermis) im Labor produziert
 - Behandlung kleinflächiger Verbrennungen und von Wunden
 - Grund: Starke Vermehrungsfähigkeit der Hautzellen im Labor
 - Aber: Mehrere Wochen bis genügend Material, um gesamten Körper abzudecken → Behandlung akuter, schwerer Verbrennungen nicht möglich
- Herstellung von Knorpelgewebe für Sportverletzungen sowie degenerative Erkrankungen (z.B. Gelenkarthrose) und Wiederherstellungschirurgie (z.B. Ohr- und Nasendefekt)
- Züchtung von Knochenzellen, Knochen- und Bandscheibentransplantaten für die Orthopädie und Kiefer- (z.B. neue Kiefersubstanz) sowie Gesichtschirurgie

Begründen Sie, weshalb Stammzellen heute im Fokus der Gewebeingenieure stehen!

- Stammzellen sind allgemeine Körperzellen, welche noch nicht ausdifferenziert sind und eine Teilungs- und Entwicklungsfähigkeit haben
- Mit Stammzellen können gewünschte Gewebe kultiviert werden.

Was bedeutet „autolog“ und was „allogen“?

- Allogen (Körperfremde Zellen werden verwendet → kostengünstiger)
- Autolog (Körpereigene Zellen werden verwendet → sehr teuer)

Was ist der Unterschied zwischen Gentherapie und Tissue Engineering?

- Gentherapien
 - Ziel: krankheitsverursachende Gendefekte sollen durch Einschleusen genetischen Materials in Körperzellen behoben werden können
 - Ex vivo (ausserhalb des Körpers)
Entnommene Zellen werden **gentechnisch verändert**, im Labor vermehrt und danach dem Patienten zugegeben.
 - In vivo (im Körper)
Geeigneter Vektor (z.B. Virus) transportiert genetisches Material direkt zum Zielort
- Beim TE werden Zellen entnommen, kultiviert und wieder eingepflanzt (**Gene unverändert**)

Wer sind die Pioniere des Tissue Engineering?

- Idee von Gebrüder Vacanti 1997 als sie ein Ohr einer Maus unter die Haut transplantiert haben
- In vitro Zucht von Ersatzknorpel für Ohrmuscheldefekt → Uni Freiburg + Berlin
- Mass nehmen am Ohr
- Knorpelentnahme aus Rippe
- Isolierung und Vermehrung der Zellen (ca. 6 Tage)
- Knorpelzellen und produzierter Klebstoff aus einer Plasmaspende werden vermengt und in Ohr aus Silikon gefüllt und kultiviert bis zur Verfestigung
- Rohling wird weitere 7 bis 14 d in Perfusionscontainer kultiviert
- Implantation

Die Bedeutung des Bioprintings für die Entwicklung des Tissue Engineering. Was ist schon möglich? Wohin geht die Entwicklung?

- Ziel: Später soll die Technik es ermöglichen, ganze Organe, oder sogar synthetische Lebewesen herzustellen. Bioprinter könnten in der Medizin (spezifische Organe), in der synthetischen Biologie (künstliche Lebensformen) und in der Lebensmittelindustrie (künstliches Fleisch) zum Einsatz kommen.
- Das **Bioprinting** bezeichnet das 3D-Drucken mit organischen Substanzen. Das Bioprinting wird in der Forschung erprobt und ermöglicht das Drucken von lebendigen Zellen im Schichtaufbauverfahren (additive Fertigung)
- Bei einem **3D-Biodrucker** handelt es sich um einen 3D-Drucker zum Erstellen (Drucken) von menschlichem oder tierischem Gewebe (z.B. Haut oder Zellen). Mit Hilfe der Gewinnung von Stammzellen ermöglichen Biodrucker die Gewinnung von Organen. Die Technologie der 3D-Biodrucker befinden sich noch am Anfang der Forschung

Was ist EPO, wie wirkt es und wie lässt es sich grosstechnisch herstellen?

- Was ist es :
 - Erythropoietin → Glykoprotein (aus Eiweiss und Zuckergruppen) aus 166 Aminosäuren und 4 Zuckerresten
 - Erstes Therapeutikum mit Säugerzellen hergestellt:
- Wirkung:
 - Stimulierung der Erythrozyten-Bildung und des Sauerstofftransports im Blut → Patienten fühlen sich nicht mehr schwach und müde (Vermehrung rote Blutkörperchen)
- Anwendung:
 - Knochenmarktransplantationen, Anämie, Chemotherapien, HIV-Infektionen
 - Leider auch als Doping benutzt → schwer erkennbar und kann tödlich sein
- Herstellung: 1977 aus Urin gewonnen, 1984 genetische Synthese in E. coli
 - Isolierung des EPO-Proteins aus menschlichem Urin und Ableitung der DNA-Sequenzen
 - Identifizierung des EPO-Genfragments
 - Identifizierung von Körperzellen, die EPO-Boten-RNA erzeugen, Umschreibung in DNA (reverse Transkription), Einbau in Bakterienplasmid und Vermehrung
 - Überführung des Plasmids in kultivierte CHO-Zellen, Amplifikation (Genvervielfachung)
 - Ergebnis: Ausgangszellen für Produktionsstamm, die Basis für die Masterzellbank/Workingzellbank in Flüssigstickstoff (-196°C) sind
 - **Upstreaming** (Roche Penzberg)
 - Medienherstellung und Sterilfiltration
 - Inokulumanzucht in T- und Spinnerflaschen unter Einsatz von CO₂ Inkubatoren (37 °C, 5-7 % CO₂)
 - Massenvermehrung in Kleinf fermentern (Rührreaktoren)
 - Fermentation: Fed Batch, Rührreaktor (12 m³), Temperatur: 37 °C, pH: 7-7.2 (Regulierung mit CO₂ und Natronlauge), Fermentationszeit: 21 d
 - **Downstreaming und Konfektionierung: 80% der Projektkosten**
 - Trennung Biokatalysator und Kulturbrühe durch Filtration (momentan enthält die Kulturbrühe Zellen, EOP, Nebenprodukte)
 - Chromatographische Reinigung → Reinprodukt EPO
 - Chemische, biochemische und immunologische Charakterisierung des Endproduktes
 - Herstellung der Injektionslösung

- **Allgemein:**
 - Alle Biopharmazeutikaproduktionen lassen sich auf die allgemeine Grundstruktur biotechnologischer Produktionsverfahren mit dem Upstreaming und Downstreaming zurückführen. *Siehe Produktionsverfahren*
 - Der Aufwand für das Verfahren wird durch den eingesetzten Biokatalysator (Produktionsorganismus) bestimmt.
 - Von der Entwicklung bis zur Zulassung eines Biopharmazeutikums geht es 10 Jahre.

Was ist ein Vakzin? Welche wesentlichen Unterschiede bestehen zu einem Antikörper ?

- Vakzin = Impfstoff (aktive Immunisierung) → für gesunde Menschen (darf weniger Nebenwirkungen verursachen)
 - Antigene Stoffe mit der Fähigkeit, eine spezifische, aktive Immunantwort gegen das infizierende Antigen oder das von ihm gebildete Toxin oder Antigen zu induzieren
 - Werden oral verabreicht oder injiziert
 - Nach Impfung soll Immunsystem den Impfstoff als Antigen erkennen und Herstellung von Antikörpern sowie B-Zellen (Gedächtniszellen) einleiten → Immunisierung → keine sofortige Immunität
 - Human- und Veterinärimpfstoffe (innerhalb eines Jahres entwickelt)
- Antikörper (passive Immunisierung) → für kranke Menschen
 - Antikörper (Immunoglobuline) humaner oder tierischer Herkunft verabreicht.
 - sofortiger Infektionsschutz
 - teurer

Nennen Sie 5 Meilensteine aus der Geschichte der Vakzinentwicklung!

- 1796: erster Impfstoff vom englischen Arzt Edward Jenner
 - Entnahm Flüssigkeit aus Pusteln einer Frau mit aktiver Kuhpockeninfektion und ritzte mit darin getränkter Nadel die Haut von Freiwilligen ein → Ausrottung der Variolaviren
- 1977: letzter Pockenkranker der Welt aus Krankenhaus entlassen
 - Heute: nur noch 2 WHO-Laboratorien (USA, Russland) in der Welt sind im Besitz von Pockenviren
 - Wegen Angst vor Biowaffenangriffen aber Impfstoff weltweit weiter gelagert
- 1881: Louis Pasteur zeigt Wirksamkeit einer Schutzimpfung von Schafen gegen Milzbrand
- 1885: Erste Tollwutimpfung durch Louis Pasteur durch gealtertes Hasen-Rückenmark
- 1843-1910: Robert Koch bewies als erster, dass Cholera, Milzbrand, Tuberkulose und Pest durch Bakterien verursacht wird
- 1961: Einführung der ersten Schluckimpfung gegen Kinderlähmung

Welche Impfstoffarten kennen Sie?

- Abgeschwächte (attenuierte) Impfstoffe
 - Starke Immunantwort
 - Immer Restrisiko, dass Inaktivierung nicht ausreichend
 - z.B. MMR-Vakzin und Windpockenimpfstoff
- Inaktivierte Impfstoffe (Totimpfstoffe)
 - Inaktivierte, komplette Erreger wie Viren und Bakterien
 - Schwächere Immunantwort als attenuierte Impfstoffe → mehrmalige Verabreichung notwendig
 - Inaktivierung durch chem. Behandlung oder physikalisch durch Hitze / Bestrahlung
 - z.B. Impfstoffe gegen Cholera, Typhus und Polio
- Untereinheiten-Impfstoffe (Subunit-Impfstoffe)
 - Haben sich aus attenuierten und inaktivierten Impfstoffen entwickelt
 - Enthalten nur Teile von Krankheitserregern wie definierte Proteine oder komplexe Lipide aus der Hülle des Erregers
 - Es wurden schon vor Aufkommen der rekombinanten DNA-Technik Untereinheitenimpfstoffe aus Bakterien hergestellt
 - Bakterien in Flüssigkultur vermehrt → Proteine sekretiert und gesammelt → Versetzung mit Adjuvanzen (Stoffe, die Immunreaktion weiter steigern)
 - Vorteil: Virus ist vermehrungsfähig ohne Schaden des Wirts
 - Erstes rekombinantes Produkt: Impfstoff gegen Hepatitis B

Zeigen Sie am Beispiel der Influenzaimpfstoffproduktion 3 Herstellungsmöglichkeiten auf!

- Traditionell
 - Ablauf
 - Lebend-Influenzaviren in embryonierte Hühnereier injiziert
 - Bebrütung → Impfviren replizieren (48-72 h)
 - Eier geöffnet und virushaltige Flüssigkeit entnommen
 - Infektiöse Viren inaktiviert und Vielzahl von Reinigungs- sowie Konzentrierungsschritten unterzogen
 - Charakteristik
 - **Arbeits- und zeitintensiv** (ca. 9 Monate bis zur Produktion)
 - **An Verfügbarkeit** von Millionen Hühnereiern **gebunden** (1 Hühnerei liefert 1 Impfdosis)
 - Spuren von Hühnereiweiss können enthalten sein → **Gefahr für Allergiker**

- Alternative 1: anhand Beispiel Optaflu von Novartis-Behring
 - Hundenierenzellen (MDCK) als Wirtszellen für Virus
 - Zucht der Impfviren in Edelstahlbioreaktoren
 - Produktionszeitverkürzung um ca. 2 Monate
 - Wirtsorganismus steht jeder Zeit zur Verfügung (in Stickstoff bei -196 °C gelagert)
 - Impfstoff ist **verträglicher**
 - Kein Zusatz von Antibiotika und Konservierungsstoffen
 - Keine Spuren von Hühnereiweiss enthalten → auch für Allergiker geeignet
- Alternative 2
 - Kultivierung von Insektenzellen in Verbindung mit genetisch veränderten BEVS
 - Zellen (Sf-9) einer Mottenart (Nachtfalter) eingesetzt
 - Lassen sich **einfacher kultivieren** als Säugerzellen
 - **Lassen sich leicht** mit BEVS (Bakoloviren) **infizieren**
 - Hersteller: Redbiotec
 - Virusgenom verändert → Influenza-VLPs werden nach Zellinfektion produziert
 - VLPs aus Proteinen, die einen Virus simulieren
 - **nicht infektiös**
 - **stärkerer und längerer Impfschutz**
 - Liefern das Produkt **schneller** als Säugerzellen

Trends der Impfstoffentwicklung

- Trend zu Einwegreaktoren
 - Für Zellproduktion, Virusvermehrung, VLP-Produktion
 - Sterilisation / Reinigung entfallen
- Trend: mRNA Impfstoff
 - mRNA wird gelesen und in ein Protein umgeschrieben, dann wird die AS transportiert, die Membran des Virus wird nachgebildet, die Antikörper können sich dann gegen den Erreger wehren.
 - weniger Nebenwirkungen als Virus-Impfung
- der ideale Impfstoff
 - 100% effizient und billig
 - Lebenslanger Schutz nach einmaliger Gabe
 - Keine Nebenwirkungen
 - Lagerstabil
 - Einfach zu verabreichen (oral)
 - Unbegrenzt herstellbar

11. Grüne Medikamente

Was ist unter dem Begriff „molekulares Farming“ zu verstehen?

- Engl.: Molecular oder gene farming
- Transgene - Tiere und Pharma-Pflanzen übernehmen die Produktion von Proteinen
- Im Falle von Pflanzen auch: plant molecular farming oder phytomanufacturing
 - PMPs (plant made pharmaceuticals)
 - PPIs (plant derived products of interest)
 - PMIPs (plant made industrial products)
- Dabei wird ein zusätzliches Gen, welches zuvor aus der Erbsubstanz einer anderen Spezies isoliert wurde, in das Erbgut des Tieres/ der Pflanze integriert → Transformation
- Ergebnis ist ein gvO, der beim Wachstum neue Eiweissstoffe produziert
- Die Eiweissstoffe müssen nur noch „gepflückt“ werden und bei Bedarf isoliert und weiterverarbeitet werden → Downstreaming

Nennen Sie 10 Wirtspflanzen, die für die Herstellung von PMPs eingesetzt werden!

- Kleine Verdopplungszahl ist ausschlaggebend!!
- Tabak: hohe Erträge, Aufreinigung notwendig wegen Nikotin
- Alfalfa: hohe Erträge, enthält Oxalsäure(giftig), geringe Proteinstabilität
- Mais, Reis: Hohe Erträge, leicht transformierbar, Proteinstabilität bei Lagerung,
- Weizen, Gerste: niedrige Erträge, komplizierte Genmanipulation
- Soja: Hohe Biomasseerträge, niedriger Expressionslevel
- Bohnen: Hoher Proteingehalt, niedriger Expressionslevel
- Kartoffel, Karotte: Direkt konsumierbar & stabile Proteinlagerung, Kartoffeln müssen gekocht werden
- Tomate: Direkt konsumierbar, aber Kühlung nach Ernte
- Salat: Geeignet für Produktion von essbaren Impfstoffen, geringe Proteinstabilität im Erntegut
- Ölpflanzen, Raps: Niedrige Erträge
- Lemna (Wasserlinse, Entengrütze) = Wasserpflanze
 - Hohe Wachstumsrate, leicht genetisch manipulierbar, Proteinsekretion bei hohem Expressionsniveau, sehr billige Produktion
- Physcomitrella (Lebermoose)
 - Billige Produktion
 - Photoautotrophes Wachstum bei geringer Lichtintensität
 - Einfaches Medium
 - Einfache Produktion → Breiter Temperatur- und pH-Bereich
 - Up-scale-bare Technologie

Warum kann der Einsatz transgener Pflanzen und ihrer PCTCs für die Herstellung rekombinanter Proteine von Vorteil sein?

- Hohe Qualität der hergestellten Proteine
- Hohe Umweltverträglichkeit
- Hohe Sicherheit → Pflanzenkrankheiten können den Menschen nicht befallen
- Kostengünstige Herstellung → Günstige Nährmedien

Zählen Sie 4 kommerzielle Produkte auf, die mit „molecular farming“ produziert werden und beschreiben Sie ihren Einsatz!

- Avidin aus Mais: in der Diagnostik und zur Reinigung von Proteinen
- Aprotinin (Proteaseinhibitor) aus Mais oder je nach Firma aus Tabak: Zellkulturreagens und Blutungshemmer
- Trypsin (Protease) aus Mais: Wundbehandlung und Zellkulturreagens → Trypsin braucht es damit die Zellen vom Boden der T-Flaschen gelöst werden können
- Lactoferrin und Lysozym aus Reis: Laborchemikalie

Welche zwei prinzipiellen Vorgehensweisen beim „molecular farming“ gibt es? Erläutern Sie die Hauptarbeitsschritte!

Feldanbau	Gewächshaus & PCTCs
<ul style="list-style-type: none"> • offenes System, Problem GMP, gleichbleibende Produktquantität und Qualität, ethische Bedenken • Scale-up einfach, Vermehrung einfach, Produktivität hoch, Zulassung schwieriger (Zentren: USA, Kanada, Frankreich, Niederlande, Grossbritannien) 	<ul style="list-style-type: none"> • Scale-up und Produktionskosten höher • Geschlossene, kontrollierbare Bedingungen, billige Aufarbeitung bei extrazellulärer Produktbildung, Vermehrung einfach, Produktivität hoch, Produktqualität und –homogenität hoch
<ul style="list-style-type: none"> • Regenerierte Transgene Pflanze wächst in Petrischale • Nun kommt diese in ein Gewächshaus oder in den Feldbau → Ernte, wenn reif • Direkter Verzehr oder Aufarbeitung und dann Konfektionierung 	
Geschlossenes System → Pflanzenzellkulturen	
<ul style="list-style-type: none"> • Suspensionskultur im Schüttelkolben • Suspensionskultur im Bioreaktor • Ernte • Aufarbeitung und Konfektionierung 	

Wieso ist die geschlossene Produktion für die Herstellung pharmazeutischer Produkte der offenen vorzuziehen?

- kontrollierbare Bedingungen
- Vermehrung ist einfach und die Produktivität hoch
- Produktequalität und –homogenität ist hoch
- Bei einem offenen System ist es schwierig die GMP einzuhalten, zudem kommen ethische Bedenken dazu.

Nennen Sie drei wichtige Meilensteine der PMP-Produktion!

- 2002 Kreuzkontamination: Gentechnisch veränderter Mais wurde im Sojalager gefunden. → Entstanden neue Vorschriften:
 - Indoor-Anbau
- 1997 Impfbanane gegen Durchfall (Impfgemüse-obst)
 - Klinische Studien gegen Durchfall, Hepatitis, Malaria, Masern, Influenza
- 2006 Erster Veterinärimpfstoff aus Pflanzenzellen zugelassen
 - entscheidet sich gegen Vermarktung des Produktes

Warum haben viele Forscher die Arbeit an „Impfobst und Impfgemüse“ aufgegeben?

- Problem: keine genaue Dosierung garantierbar

Warum setzen einige der PMP-Entwickler aktuell auf Suspensionskulturen und Bioreaktoren? Welche Titer werden heute erreicht und welche werden angestrebt?

- Suspensionskulturen sind einfacher zu kultivieren als in einem Gewächshaus, ist aber deutlich teurer
- Freisetzung der transgenen Pflanzen in der EU ist schwer zu realisieren → Man kriegt kaum/nur schwierig eine Genehmigung dafür.
- Die Titer sind aktuell mg/L → Konzentration der Substanzen sind sehr niedrig
- Angestrebt werden g/L

Begründen Sie das grosse Interesse an oralen „grünen“ Impfstoffen.

- Diese ist frei von tierischen Bestandteilen
- Nadelfreie Gabe + kein Fachwissen für Anwendung → für Entwicklungsländer geeignet
- Mobilisieren lokale Immunantworten an Schleimhäuten und eliminieren Krankheitserreger an Eintrittspforte

Recherchieren Sie weitere mit transgenen Pflanzen produzierten PMPs und ihre Applikationen. Wofür sind Erdbeeren (Früchte) von Interesse?

- Erdbeeren haben neu etwas drin, dass diese süsser schmecken und weniger schnell weich/matschig werden.

Wie sollen mit Algen zukünftig PMPs hergestellt werden? Welche Produkte sind dabei von besonderem Interesse?

- Auch transgene Algen und deren Zellkulturen eignen sich für die Herstellung rekombinanter Proteine.
- Im Bioreaktor (hohe Wachstumsraten, leicht genetisch manipulierbar, Proteinsekretion bei hohem Expressionsniveau, sehr billige Produktion)
- grosses Potential

12. Cellular Agriculture

Wie lässt sich Cellular Agriculture definieren?

Herstellung landwirtschaftlicher Produkte mit Zellkulturen

- Azelluläre (keine Zellen enthaltende) Produkte
 - Bestehen aus organischen Molekülen wie Fetten und Proteinen
 - In der Regel mit Mikroorganismen (GMO) hergestellt
 - Streng genommen ist tierisches Insulin das erste Produkt
- Zelluläre Produkte
 - Bestehen aus lebenden oder ehemals lebenden Zellen
 - Mit tierischen oder pflanzlichen Zellkulturen (nicht GM) hergestellt
 - Basieren auf den Erfolgen der Zellkulturtechnik und des Tissue Engineering

Was sind die Gründe für die zahlreichen Aktivitäten im Bereich Cellular Agriculture?

- Weltbevölkerung wächst
- Landwirtschaftliche Nutzflächen nehmen ab
- Ertragsausfall durch Krankheiten und Seuchen
- Ein Lösungsansatz: Tier- und pflanzenfreie Produktionen in Bioreaktoren
 - Keine Antibiotika
 - Keine synthetischen Hormone
 - Unabhängigkeit von Standort, Klima, Wetter, Frassfeinden
 - Keine Herbizide und Pestizide

Was sind Vor- und Nachteile der Cellular Agriculture?

- Vorteile
 - Ethisch unbedenklich und nachhaltig
 - Umweltschonend (Wasser, Rohstoffe, Abgasbelastung)
 - Hohe Sicherheit (Produkt und Beschäftigte) und gleichbleibende Produktqualität
 - «Tailored Products» durch Stoffwechselbeeinflussung und Entfernung von Innereien, Haaren sowie Knochen entfällt
- Nachteile
 - Hohe Produktionskosten
 - Teilweise schwierigere Vermarktung beim Einsatz von GM
 - Produktionsorganismen

Nenne Sie 4 Typen von Produktionsorganismen, die eingesetzt werden.

- GMO (genetisch Veränderte Bakterien), GM Hefen/ Pilze/ MO, Tier-/ Pflanzenzellen, Transgene Pflanzen und Mikroalgen.

Nennen Sie 8 Produktbeispiele und erläutern Sie kurz das Potential ihrer alternativen Produktion.

- Casein (Milchprotein)
 - Firma Perfect Day → genetisch modifizierte Hefe statt Kuh
 - Bedarf in LMI sowie Pharmaindustrie
- Gelatine
 - Kollagenproteine: geschmacks- und farblos
 - Herstellung aus Bindegeweben von Tieren
 - Vegane Alternativen
 - Agar, Pektin, Stärke (aber: chemische und mechanische Eigenschaften nicht vergleichbar)
 - Haupteinsatzgebiete: LMI, Pharma- und Kosmetikindustrie
 - Lösung: Mikrobielle Fermentation (Geltor)
- Vanillin
 - Hauptaromastoff der Gewürzvanille (sehr teuer)
 - Bedarf im Tonnenmassstab: LMI und Kosmetikindustrie
 - Alternativen
 - 99%: Chemische Synthesen (Petrochemikalien und Lignin), aber Qualität mit natürlichem nicht vergleichbar
 - Biotechnologie: Biotransformationen mit GM Hefen und Bakterien, z.B. r-Vanillin-Glucosid-Produktion von Evolva (r für rekombinant)
- Diverse Aroma-, Süß- und Kosmetikwirkstoffe
 - Ginkgo BioWorks (Boston)
 - GM Mikroorganismen
 - «Lab grown marijuana» (Koop. mit Bayer): CBD, THC, THCV
- Omega-3-Fettsäuren
 - Wichtig für Ernährung von Menschen und Tieren
 - Herstellung aus Fischen und Krebstieren (Mehl und Öl)
 - Alternativen
 - Transgene Pflanzen Verfahren mit Mikroalgen (Veramaris): EPA, DHA
 - Internationale Forschung: Einsatz genetisch veränderter Hefen
- Leder
 - Umsatz der Lederindustrie nimmt jährlich zu

- Ca. 60% der verkauften Artikel sind Schuhe
- Alternative: Modern Meadow
 - Nutley, New Jersey –
- Tierisches Kollagen aus GM Hefen, dass zu Bioleder weiterverarbeitet
- Fermentationsprozess von 2 Wochen
- Keine Haare, Fett und Fleisch wie bei traditioneller Lederherstellung
- Kommerzielles Produkt: Bioleder «Zoa»
- Abnehmer: Hersteller von Bekleidung, Taschen etc.
- Textilien aus synthetischem Spinnenseidenprotein
- GMO Hefen
 - Spiber (Japan): Q/QMONO
 - Erstes Produkt: Moon Parka (Kooperation mit North Face)
 - Ende 2016 in New York erstmals verkauft
 - 2018 Prototypen neuer Skibekleidung von Goldwin entwickelt
 - Bolt Threads (Californien): Microsilk
 - Stellt Microsilk fibers her (Argiopebruehnicci)
 - Erste Produkte 2018: Seidenkrawatte (314 Dollar), Hut (198 Dollar)
 - Partnerschaft mit Stella McCartney
- Artificial Meat z.B. The Impossible Cheesburger
 - Fleischersatz und Fleisch im industriellen Massstab herstellen
 - Gründe
 - Massentierhaltung wegen zunehmender Nachfrage
 - Umweltbeeinträchtigung (Wasser, Treibgas)
 - Verunreinigung mit Fäkalkeimen (Salmonellen, Campylobacter)
 - 2 unterschiedliche Ansätze
 - Fleisch aus pflanzlichen Zutaten mit reproduziertem Geschmack von Fleisch (aber ohne Tierbestandteile)
 - Stammzellen von Rindern, Schweinen oder Geflügel bzw. Fisch (in vitro Fleisch, Tissue Engineering) = Clean Meat

Wie sehen Sie die Situation in der Schweiz im Bereich Cellular Agriculture?

- Die Bewilligung ist auf Grund der gesetzlichen Lage sehr schwierig und viele Anwendungen sogar verboten. Die Ablehnung kommt auch von Seite der Bauern, da die Cellular Agriculture in die Landwirtschaft eingreifen würde.
- In der Schweiz wird bereits "Cellular Agriculture" betrieben.

13. Algen (Phycobionta)

Wo lassen sich Algen einordnen? Nennen Sie 5 Algenabteilungen!

Abteilung	Klasse	Reich	Beispiele
Cyanophyta (Blaualgen)	Cyanophyceae	Monera	Spirulina, Chlorella
Phaeophyta (Braunalgen)	Phaeophyceae	Protista	
Rhodophyta (Rotalgen)	Rhodophyceae	Protista	
Chlorophyta (Grünalgen)	Chlorophyceae	Protista	
Bacillariophyceae (Kieselalgen)		Protista	

Unterscheiden Sie Mikro- und Makroalgen!

Mikroalgen	Makroalgen
<ul style="list-style-type: none"> • Mikroskopisch klein • Algenfäden und Einzelzellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Sind vom blossen Auge sichtbar • Können bis zu einer Länge von 50 m heranwachsen • Kommen im Küstenbereich bis 200 m Meerestiefe vor • Haben grosses Potential → Grosse Mengen können gut angepflanzt werden und gut aus dem Meer eingesammelt werden!
<ul style="list-style-type: none"> • Grünalgen • Rotalgen • Goldalgen • Kieselalgen • Dinoflagellaten • Blaualgen 	<ul style="list-style-type: none"> • Rotalgen • Braunalgen • Grünalgen
<ul style="list-style-type: none"> • Seen und Teiche • Offene Tanks und Beckenanlagen • Spezielle Photoreaktoren 	<ul style="list-style-type: none"> • Küstenbasierende Algenfarmen • Landbasierte Beckenanlagen • Spezielle Photoreaktoren • Zell- und Gewebekulturreaktoren

Beschreiben Sie die Rahmenbedingungen für die Algenkultivierung!

- Licht als Energiequelle
- CO₂ (hohe pCO₂) Toleranz → viel CO₂ wird benötigt
- Nährsalze
- Temperaturtoleranz
- pH (geringe pH-Toleranz)
- Gase (NO_x SO_x-Tolerant)
- Hohe Wachstumsgeschwindigkeit bei hoher Zelldichte

5 Problemstellungen, die sich bei der Algenkultivierung ergeben!

- Effektiver Lichteintrag → an sonnigen/warmen Orten der Welt einfach, aber in CH schwierig
 - Die Algenzellen absorbieren Licht sehr effektiv. Bereits bei relativ geringen Zelldichten wird die gesamte Strahlung innerhalb einiger Millimeter in der Algensuspension vollständig absorbiert → untere Algenschichten bekommen kein Licht ab.
 - Lösungsansätze:
 - Photobioreaktoren mit geringen Schichtdicken
 - gerichteter Transport der Algenzellen zum Licht
 - Spezielle Beleuchtung: Lichtblitze, innere Beleuchtung, LED-Systeme
- Symbiose von Organismen (z.B. Cyanobakterien und Algen)
- Natürliche offene Systeme (nicht GMP)
- Definierte, nachverfolgbare und aseptische Kultivierungsbedingungen für pharmazeutische Applikationen
- Scale-up

Anforderungen an einen Bioreaktor für Algen*

- Verfahrenstechnik
 - Effiziente Lichtversorgung aller Zellen
 - Gute, homogene Durchmischung
 - Geringer Scherstress
 - Einfache Temperatur- und pH-Kontrolle
 - Effizienter Gasaustausch
- Wirtschaftlichkeit
 - Hohe Volumenproduktivität
 - Hohe Zellkonzentration
 - Grosses Reaktorvolumen
 - Niedrige Investitions- und Wartungskosten
 - Hohe Zuverlässigkeit

Welche Bioreaktoren wurden in den letzten Jahren für Algenkultivierungen entwickelt und eingesetzt?

- Blasensäule
- Airlift-Schlaufenprinzip (Flat-Panel)
- LED-Rührkessel
- LED-Flachbett
- Taumelreaktor mit Lichtleiter → nur für Proben mit geringer Lichtmenge geeignet
- Plattenreaktor (Photobioreaktoren)
- Röhrenreaktor (Photobioreaktoren)

Was sind die Haupteinsatzgebiete von Algeninhaltsstoffen?

- Lebensmittelindustrie:
 - zum Eindicken von Speiseeis, Marmelade, Schlagsahne, Pudding, Suppen und Saucen
 - Backwaren, Teigwaren, Joghurt, Dressing, Trunkmasse oder Nahrungsmittelzusatz
- Kosmetikindustrie:
 - in Salben, Lotionen, Zahnpasta, Medikamentenkapseln, Lippenstifte (Astaxanthin)
- Pharma/Medizin:
 - Klebstoff zur Wundheilung in Zahnmedizin und Chirurgie
 - Wirkstoffe
- Nährmedien für Mikro- und Zellbiologie:
 - Agar aus Rotalgen

Arten der Algenkultivierung*

- Fotobioreaktoren im Freiland
- Produktionsanlage in Klötze. Bioreaktoren in Gewächshäusern, Hallen
- Becken im freien
- Im See → Ernte mit Algen-Ernteboot
- Geschlossene Systeme für marine Grossalgen im Meer (ähnlich Fischzucht)
- DF-Algenreaktor

14. Bier

Beweisen Sie die Aussage, dass Bierbereitung „Klassische Biotechnologie“ ist!

- Bier ist ein alkoholisches und kohlenensäurehaltiges Getränk, das aus mit Hefe vergorener Würze gewonnen wird und wo Doldenhopfen oder Hopfenprodukte zugegeben werden. Die Würze ist aus stärke- oder zuckerhaltigen Rohstoffen und aus Trinkwasser hergestellt. Es ist ausserdem ein sehr altes Getränk → lässt sich auf ca. 7000 bis 5000 vor Chr. datieren.
- Die Zutaten für die Bierherstellung sind rein natürlich: Hopfen, Gerste, Hefe und Wasser. Die Getreide werden unter künstlich geschaffenen und gesteuerten Umweltbedingungen gekeimt. Dieser Vorgang ist eine Mälzereitechnologie (Enzymproduktion), das ein typisches Beispiel einer Feststofffermentation ist.
- Beim Prozess der Bierbereitung werden die typischen biotechnologischen Prozessschritte und Arbeitsschritte durchlaufen:
 - Upstream
 - Substratbereitung: Herstellung der Würze
 - Maischen: Enzymreaktion
 - Maischekochen: Sterilisationsprozess
 - Hefeanzucht: Inokulumproduktion=Animpfgut (Fermentation)
 - Gärung und Reifung: Fermentation, Gärbottich/Gärtanks → Bioreaktoren
 - Downstream
 - Bierfiltration
 - Bierstabilisierung
 - Endformulierung und Abfüllung

Was versteht man unter einer Feststofffermentation?

- Feste Körper sind im Vergleich zu Bioreaktorfermentation viel höher vorhanden und der Wasseranteil ist sehr klein. → Bsp. Bier: Stärke und Eiweissstoffe werden mit dem Malzschrot (Feststoff) beim Maischen enzymatisch abgebaut.

Welche Enzymreaktionen werden bewusst während des Maischeprozesses ausgenutzt?

- Fixierung des Enzympotentials, Stoffumwandlungen, Farb- und Aromabildungen im Getreidekeimling durch Trocknung zur Haltbarmachung.

Ziel beim Maischen → Abbau- und Lösungsvorgänge

- Stärkeabbau
- Abbau von Eiweissstoffen
- Umwandlung von Feststoffen
- Weiterer Abbau- und Lösungsvorgänge

Wichtige Enzyme beim Maischen:

- α -Amylase
 - Zufällige Abspaltung von Oligosacchariden bis auf die Stufe von Maltose
 - Optimale Bedingungen bei 72-76°C und pH von 5.3-5.8
- β -Amylase
 - Abspaltung von Maltose vom nichtreduzierenden Kettenden her
 - Optimale Bedingungen bei 60-65°C und pH von 4.6
- Glucoamylase
 - Abspaltung von Glucose vom nichtreduzierenden Kettenden her
- Proetinase
 - Proteinabbau
 - Optimale Bedingungen bei 55-65°C und pH von 4.6

Was für Organismen werden zur Bierbereitung verwendet?

- Obergärige Hefe
 - *Saccharomyces cerevisiae*
- Untergärige Hefe
 - *Saccharomyces uvarum*
 - *Saccharomyces carlsbergensis*

15. Literaturverzeichnis

Eibl, R. (2020). *Einführung in die Biotechnologie*. Wädenswil.