

## Aufgabenstellung

Citronensäure (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) wird aus Glucose durch Fermentation mit *Aspergillus niger* (CH<sub>1,8</sub>O<sub>0,5</sub>N<sub>0,2</sub>) unter Belüftung hergestellt. Der pH liegt zwischen 1,8 und 2,0. Die Stickstoffquelle ist Ammonnitrat. Es wird kein Kohlendioxid gebildet. Eine typische Ausbeute unter diesen Bedingungen ist 68 g Citronensäure pro 100 g Glucose. Bestimme den entsprechenden Sauerstoffverbrauch unter der Annahme, dass nur Biomasse und Citronensäure gebildet wird!

## Vorgaben

Y <sub>p/s</sub>		0,68	[g/g]
Biomasse			
	C	1	
	H	1,8	
	N	0,2	
	O	0,5	
		4,2	
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> + O <sub>2</sub> + AmmonNitrat → C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> + CH <sub>1,8</sub> O <sub>0,5</sub> N <sub>0,2</sub>			
NH <sub>3</sub> / NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , gamma = 0			

## Berechnungen

$$M_{\text{Biomasse}} = M_{\text{C}} \cdot x_{\text{C}} + M_{\text{H}} \cdot x_{\text{H}} + M_{\text{O}} \cdot x_{\text{O}} + M_{\text{N}} \cdot x_{\text{N}}$$

M <sub>Biomasse</sub>		24,6	g/C-mol
-----------------------	--	------	---------

M <sub>Glucose</sub> = 30 g/C-mol	M <sub>Citronensäure</sub> = 32 g/C-mol
-----------------------------------	---

DoR (c-molar)

$$\text{DoR}_{\text{Glucose}} = 4 \quad \text{DoR}_{\text{Citronensäure}} = 3 \quad \text{DoR}_{\text{O}_2} = -4 \quad \text{DoR}_{\text{Biomasse}} = \text{DoRC} \cdot x_{\text{C}} + \text{DoRH} \cdot x_{\text{H}} + \text{DoRO} \cdot x_{\text{O}} + \text{DoN} \cdot x_{\text{N}}$$

4,2

$$Y_{p/s} [\text{C-mol/C-mol}] = Y_{p/s} [\text{g/g}] \cdot M_{\text{Glucose}} / M_{\text{Citronensäure}}$$

$$Y_{p/s} = 0.6375 [\text{C-mol/C-mol}]$$

Massen-Bilanz: Y<sub>x/s</sub> = 1 - Y<sub>p/s</sub>

$$Y_{x/s} = 0.3625 [\text{C-mol/C-mol}]$$

$$4 + Y_{\text{O}_2/s} \cdot (-4) = 0.6375 \cdot 3 + 0.3625 \cdot 4.2$$

$$Y_{\text{O}_2/s} =$$

$$0,14125 [\text{mol/C-mol}]$$

## Aufgabenstellung

Eine Hefe mit der Zusammensetzung C H<sub>1,6</sub> O<sub>0,5</sub> N<sub>0,2</sub> (5 % Asche) erzielt einen Umsatz von 0.6 g Biomasse/g Substrat. Es werden keine weiteren Metabolite gebildet.

Welche Wärme muss abgeführt werden, wenn in einem 15 m<sup>3</sup> Reaktor eine Kultur mit 50g/l Biomasse mit einer spezifischen Wachstumsrate von 0.1 1/h wächst, 5 kW/m<sup>3</sup> Rührarbeit dissipiert wird und Glukose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) als Substrat eingesetzt wird?

## Vorgaben

Biomasse			
	C	1	
	H	1,6	
	N	0,2	
	O	0,5	
	Y <sub>x/s</sub>	0,6	g/g
	m <sub>y</sub>	0,1	1/h
	c <sub>X</sub>	50	g/l
	Reaktorvolumen	15000	L
	spezWärme	460	kJ/molO <sub>2</sub>

## Berechnungen

$M_{\text{Biomasse}} = M_C \cdot x_C + M_H \cdot x_H + M_O \cdot x_O + M_N \cdot x_N$			
	M <sub>biomasse</sub>	25,684211	g/C-mol
	DoR Biomasse	4,00	-
DoR Glukose			
	DoR Glukose	6,000	-
M Glukose			
	M Glukose	30,00	g/C-mol
	Y <sub>x/s</sub>	0,70	C-mol/C-mol
C-Bilanz	Y <sub>Co2</sub> = 1 - Y <sub>x/s</sub>	0,30	C-mol/C-mol
DoR Bilanz			
	DoRS-4*Yo <sub>2s</sub> = DoRX*Y <sub>x/s</sub>		
	Yo <sub>2s</sub> = (DoRS-DoRX*Y <sub>x/s</sub> )/4		
		0,799	C-mol/C-mol
Biomasse Aktivität			
		rx = m <sub>y</sub> * c <sub>X</sub>	<b>5,00</b> g/l/h
Substrate	r <sub>S</sub> = rx / Y <sub>x/s</sub>	8,3333333	g/l/h
	r <sub>s</sub>	0,2777778	C-mol/l/h
OUR	rO <sub>2</sub> = Yo <sub>2s</sub> * r <sub>S</sub>	0,2219945	molO <sub>2</sub> /l/h
	q = rO <sub>2</sub> * spezWärme	102,11749	kJ/l/h
	Q = VR*q/3600s/h + W agitator	<b>500,5</b>	<b>kW</b>

# Produktivität\_1

## Aufgabenstellung

Ein Laborfermenter mit einem Arbeitsvolumen von 975 ml wird bei einer Flussrate von 60 ml h<sup>-1</sup> und einer Substratkonzentration von 5 g l<sup>-1</sup> im Feed betrieben. Es werden in regelmäßigen Zeitabständen Proben zur Bestimmung von Biomasse X und Substratkonzentration S im Fermenter gezogen bis sich ein Gleichgewicht eingestellt. Danach wird die Flussrate auf 100 ml h<sup>-1</sup> erhöht und die Probenahme bzw. Messung wie oben beschrieben wiederholt.

Berechnen Sie die maximale Wachstumsrate sowie die Monod-Konstante des Organismus.

Bei welcher Verdünnungsrate müssten Sie den Fermenter für diesen Organismus betreiben, damit die Produktivität bezüglich Biomasse optimal ist.

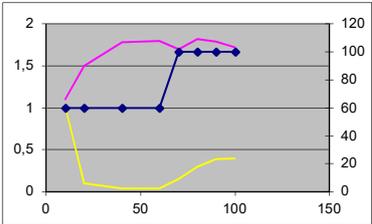
Wie hoch ist die bei dieser optimalen Verdünnungsrate erzielte Biomassekonzentration sowie Produktivität.

Berechnen Sie abschließend jene Verdünnungsrate, deren Überschreitung die Auswaschung des Fermenters zur Folge hätte.

Vorgaben	Zeit [h]	Feedrate F [ml h <sup>-1</sup> ]	Biomassekonzentration x [g/l]	Substratkonzentration S [g/l]	Volumen V	Feedkonzentration S <sub>0</sub>
	10	60	1,1	1,02	0,975 L	5 g/L
	20	60	1,5	0,1		
	40	60	1,78	0,041		
	60	60	1,8	0,042		
	70	100	1,7	0,15		
	80	100	1,82	0,301		
	90	100	1,79	0,39		
	100	100	1,72	0,397		

$$D_{opt} = \mu_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}}\right)$$

Bezeichnung	Kürzel	Formel	F = 60ml/h	F = 100ml/h
Verdünnungsrate	D	D = F/V	0,062	0,103
Wachstumsrate	μ	D = μ	0,062	0,103
Linearisierung Monod-Kinetik		Lineweaver-Burk		
		y = k*x+d		



Zeit [h]	Feedrate F [ml h <sup>-1</sup> ]	Biomassekonzentration X [g l <sup>-1</sup> ]	Substratkonzentration S [g l <sup>-1</sup> ]	1/S	μ [h <sup>-1</sup> ]	1/μ
40	60	1,78	0,041	24,390	0,062	16,25
60	60	1,8	0,042	23,810	0,062	16,25
90	100	1,79	0,39	2,564	0,103	9,75
100	100	1,72	0,397	2,519	0,103	9,75

Steigung	K <sub>s</sub> /μ <sub>max</sub>	0,301
Achsabschnitt	1/μ <sub>max</sub>	8,985
	μ <sub>max</sub>	0,111 [h <sup>-1</sup> ]
	K <sub>s</sub>	0,034 [g/L]

Berechnung der optimalen Verdünnungsrate

**D<sub>opt</sub>** = 0,102 [h<sup>-1</sup>]

Biomasse (wie bei D = 0.103) = 1,72 g/L  
**Produktivität P = D\*x** = 0,176 g/h/L

Berechnung der kritischen Verdünnungsrate

**D<sub>crit</sub>** = 0,111 [h<sup>-1</sup>]

## Aufgabenstellung

Stellen Sie die Stoffbilanz für den Substratzulauf im Zulaufverfahren auf, und begründen Sie jeden Term!

Die Kultur ist aerob, Temperatur und pH kontrolliert

Leiten Sie Gleichung für den initiellen Feed im Zulaufverfahren ab ( $\mu$ ,  $c_{x0}$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $V_{R0}$ ,  $c_{s,in}$ )

Nehmen Sie an, dass die Wachstumsrate konstant ist.

## Vorgaben

$$\dot{V}_{In} c_{i,In} - \dot{V}_{Out} c_{i,out} + V_R r_i = V_R \frac{\partial c_i}{\partial t} + c_i \frac{\partial V_R}{\partial t}$$

## Berechnungen

$$\dot{V}_{Out} c_{i,out} = 0$$

kein Ablauf!

$$\dot{V}_{In} c_{s,In} + V_R r_s = V_R \frac{\partial c_s}{\partial t} + c_s \frac{\partial V_R}{\partial t}$$

Stoffbilanz Fedbatch

$$\frac{\partial V_R}{\partial t} = \dot{V}(t) = \dot{V}_{In}$$

Gesamte Massenbilanz

Volumensänderung = Zulauf

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} \equiv 0$$

Monod  $\mu = \text{konstant}$

Substrat im Feed limitierende Komponente

$$\dot{V}_{In} c_{s,In} + V_R r_s - \dot{V}_{In} c_s = 0$$

$$\frac{\dot{V}_{In}}{V_R} (c_{s,In} - c_s) + r_s = 0$$

$$r_s = - \frac{\mu c_x}{Y_{x/s}}$$

$$\frac{V \cdot \dot{V}_{in}}{V_R} (c_{s, in} - c_s) = \frac{\mu c_x}{Y_{x/s}}$$

$$c_s \ll c_{s, in}$$

Substratkonzentration im Reaktor viel kleiner als Substratkonzentration im Feed

$$\dot{V}_0 = \frac{\mu c_{x0} V_{R0}}{c_{s, in} Y_{x/s}}$$

initielle Feedrate

## Aufgabenstellung

Skizzieren Sie einen kompletten Prozess für rekombinante Proteinproduktion mit der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* (CH1.800.5N0.2) in einem Laborfermenter mit 5L Arbeitsvolumen. Der Batch dauert 12 Stunden und es entstehen 10g/L Biomasse. Die Kultur ist rein oxidativ, es entstehen keine Metabolite. Anschließend folgt ein Fedbatch mit Glycerol und eine Induktionsphase mit Methanol, in der rekombinantes Protein produziert wird.

- Berechnen Sie die Wachstumsrate im Batch.
- Legen Sie einen Fedbatch mit einer Wachstumsrate von 80% der Wachstumsrate im Batch aus. Berechnen Sie dafür die initiale Feedrate. Wie lange dauert der Fedbatch wenn 500g Biomasse produziert werden sollen?
- Berechnen Sie einen konstanten Feed für 10% der maximalen Wachstumsrate in der Induktionsphase. Da Methanol die rekombinante Proteinproduktion induziert wird keine Biomasse mehr gebildet. Welcher maximale OTR/OUR stellt sich in der Induktionsphase ein, wenn die Produktbildung ernachlässigt wird? Wie lange dauert die Induktionsphase wenn 20g Protein produziert werden sollen?
- Was ist die Gesamtprozessdauer? Wieviel Protein kann in einem Produktionsreaktor von 1000L pro Jahr produziert werden, wenn zwischen den Prozessen 1 Tag für Reinigung und 1 Tag für die Vorbereitung der Sterilisation ansteht?

## Vorgaben

### Generell

Biomasse  $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$   
 $Y_{x/s}$  0,5 g/g gx/gS

### BATCH

$V_{R0}$  2 L  
 Inokulum  $c_{x0}$  0,5 g/L  
 $c_x$  Batchende 10 g/L  
 Dauer Batch 12 h

### Fedbatch

$c_{S,in}$  Fedbatch Glycerol 500 g/L gs/LRVol  
 $\rho$  Glycerol Feed 1170 g/L gs/LS

### Induktion

$c_{S,in}$  Induktion Methanol 850 g/L  
 $\rho$  Methanol Feed 820 g/L  
 $M_{\text{Methanol}}$  32 g/c-mol  
 Produktivität Proteinproduktion 0,001 g/g/h

### Produktivität Gesamtprozess

Arbeitstage pro Jahr 250 d  
 Produktionsfermenter 1000 L  
 Protein 5 g/L

## Batch

$$c_x = c_{x0} e^{\mu t}$$

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{c_x}{c_{x0}}\right)}{t}$$

$\mu_{\max}$  Batch 0,250 [h<sup>-1</sup>]  
 $\mu_{\text{Fedbatch}} = \mu_{\max} * 0.8$  0,200 [h<sup>-1</sup>]

$$\frac{F_0}{\rho} = \dot{V}_0 = \frac{\mu x_0 V_{R0}}{c_{S,in} Y_{x/s}}$$

## Fedbatch

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

$$t = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{\mu}$$

$F_0$  18,7 g/h

$$\frac{\partial V_R}{\partial t} = \dot{V} = \frac{\dot{V}_0 e^{\mu t}}{\rho}$$

$X_0$  aus Batch 20 g  
 $X$  Ende Fedbatch 520 g  
 Dauer 16,3137 h

$$V_R - V_{R0} = \frac{\dot{V}_0}{\rho \mu} (e^{\mu t} - 1)$$

$V_R - V_{R0}$  2 L  
 $V_R$  4 L  
 $c_x$  130,00 g/L

$$-V_{\dot{S}} = -R_S = \dot{V}_{In} c_{i,In}$$

**Induktion**  
 $\mu_{\text{Induktion}} = \mu_{\max} * 0.1$  0,025 [h<sup>-1</sup>]  
 $F_0$  25,047 g/h

$R_S$  25,96 g/h 6,490753 g/l/h  
 $R_S$  0,81 c-mol/h

DoR-Bilanz  
 DoRMethanol 6

$$OUR = \frac{Y_{O2/S} R_S}{V_R} * 1000$$

$$\text{DoR}_{\text{Biomasse}} = (\text{DoRC} \cdot x_{\text{C}} + \text{DoRH} \cdot x_{\text{H}} + \text{DoRO} \cdot x_{\text{O}} + \text{DoRN} \cdot x_{\text{N}})$$

$$\text{DoR}_{\text{Biomasse}} = 4,2$$

$$M_{\text{Biomasse}} = M_{\text{C}} \cdot x_{\text{C}} + M_{\text{H}} \cdot x_{\text{H}} + M_{\text{O}} \cdot x_{\text{O}} + M_{\text{N}} \cdot x_{\text{N}}$$

$$M_{\text{Biomasse}} = 24,6 \text{ g/c-mol}$$

$$Y_{\text{x/s}} = 0 \text{ c-mol/c-mol}$$

$$\text{DoRS} - 4 \cdot Y_{\text{o2s}} = \text{DoRX} \cdot Y_{\text{x/s}}$$

$$Y_{\text{o2s}} = (\text{DoRS} - \text{DoRX} \cdot Y_{\text{x/s}}) / 4 = 1,5 \text{ c-mol/c-mol}$$

$$\text{OUR/OTR} = 304,2541 \text{ mmol/L/h}$$

Protein	20 g
Proteinproduktion	20000 gh
Dauer Induktion	38,46 h
Gesamtdauer Kultur	66,78 h
Dauer Vorbereitung+Sterilsation	24 h
Dauer Reinigung	24 h
Gesamtdauer Prozess	115 h
Arbeitsstunden pro Jahr	6000 h
Proteinproduktion pro Lauf	5000 g
Proteinproduktion pro Jahr	261 kg