

## Aufgabenstellung

Formeln:

Allgemeine Wachstumsgleichung:  $X = X_0 e^{\mu_{\max} t}$

Monod-Gleichung:  $\mu = \mu_{\max} \cdot s / (K_S + s)$

Beispiel 1: Schätzen Sie ab, ob die Monod-Gleichung zur Berechnung der Fermentation von E. coli unter den vorgegebenen Bedingungen vernachlässigt werden kann?

Glucose-Anfangskonzentration = 10 g l<sup>-1</sup>

K<sub>S</sub> von E. coli für Glucose = 0,022 g l<sup>-1</sup>

μ<sub>max</sub> von E. coli für Glucose = 1,20 h<sup>-1</sup>

Anmerkungen: Die Batch-Fermentation wird üblicherweise mit der allgemeinen Wachstumsgleichung unter Verwendung von μ<sub>max</sub> berechnet. Diese berücksichtigt nicht, dass die tatsächliche Wachstumsrate μ gemäß Monod-Gleichung eine Funktion der Substratkonzentration ist.

Lösungsansatz beispielsweise: Bei welcher Substratkonzentration ist die tatsächliche Wachstumsrate μ auf 95% des Wertes von μ<sub>max</sub> abgefallen?

## Vorgaben

c <sub>so</sub>	10,0000	g/l
k <sub>S</sub>	0,022	g/l
m <sub>ymax</sub>	1,200	1/h

**Aufgabenstellung**

Ein Stamm von *Escherichia coli*, der genetisch verändert wurde, um menschliches Protein zu bilden, wird in Batch-Kultur gezüchtet. Der Fermenter, ein 100 m<sup>3</sup>-Blasensäulenreaktor, wird mit 12 kg Zellen beimpft. Die Glucosekonzentration beträgt 10 kg/m<sup>3</sup>, die maximale spezifische Wachstumsrate der Kultur ist 0,9 h<sup>-1</sup> und die Biomasseausbeute aus Glucose ist 0,575 [kg X/kg S].  
Nach welcher Zeit wird die stationäre Phase erreicht?

**Vorgaben**

VR	100000	L
cs,0	10	g/l
cx0	0,12	g/l
$\mu_{\max}$	0,9	1/h
Yx/s	0,575	g/g

### Aufgabenstellung

- a Mit welcher Menge einer Vorkultur von *E. coli* muss ich meinen Fermenter mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 9,5 l inokulieren, um nach einer vorgegebenen Fermentationsdauer von 6 h die gewünschte Menge von 80 g Trockensubstanz an *E. coli* zu erlangen? Weitere Angaben: Die maximale Wachstumsrate des eingesetzten Stamms wurde in Vorversuchen mit  $1,20 \text{ h}^{-1}$  ermittelt. Die Biomassekonzentration in der Vorkultur beträgt 2 g Trockensubstanz pro Liter.
- b Die Messung der Biomasse der Fermentation ergab 64 g Trockensubstanz an *E. coli*. Wie hoch ist die auf diese Weise experimentell ermittelte mittlere Wachstumsrate und steht sie im Einklang mit jener Wachstumsrate, die zu erwarten gewesen wäre?
- c Der zugegebene Zucker (128 g Glucose) war am Ende der Fermentation vollständig verbraucht. Wie hoch war der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S}$ ?

### Vorgaben

VR	9,5	L
t_end	6	h
cx0, inoc	2	g/l
$\mu_{\max}$	1,2	1/h
cxt	8,421	g/l

# 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 eingest. Danach wird die Flussrate auf 100 ml h<sup>-1</sup> erhöht und die Probennahme 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.

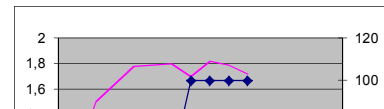
Wie hoch ist die bei dieser optimalen Verdünnungsrate erzielte Biomassekonzentration sowie Produktivität.

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]
10	60	1,1	1,02
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

Volumen V 0,975 L  
Feedkonzentration S<sub>0</sub> 5 g/L



# Erhaltungsstoffwechsel\_1

## Aufgabenstellung

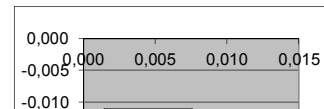
Ein Laborfermenter mit einem Arbeitsvolumen von 975 ml wird bei einer Flussrate von 5 ml h<sup>-1</sup> und einer Substratkonzentration von 5 g l<sup>-1</sup> im Feed betrieben. Es werden in regelmäßigen Zeitabständen Proben zur Bestimmung von Biomasse X und Substratkonzentration S im Fermenter gezogen bis sich ein Gleichgewicht eingest. Danach wird die Flussrate auf 10 ml h<sup>-1</sup> erhöht und die Probennahme bzw. Messung wie oben beschrieben wiederholt.

Berechnen Sie die spezifische Substratverbrauchsrate für den Erhaltungsstoffwechsel  
Berechnen Sie den wahren Ausbeutekoeffizienten

## Vorgaben

Zeit [h]	Feedrate F [ml h <sup>-1</sup> ]	Biomassekonzentration x [g/l]	Substratkonzentration S [g/l]
10	5	1,1	0,43
20	5	1,3	0,15
40	5	1,44	0,11
60	5	1,42	0,13
70	10	1,54	0,129
80	10	1,61	0,133
90	10	1,65	0,15
100	10	1,66	0,16

Volumen V 0,975 L  
Feedkonzentration S<sub>0</sub> 5 g/L



**Aufgabenstellung**

Der Bakterienstamm *Pseudomonas* 5401 wird für die Herstellung von Einzellerprotein verwendet.

Die Zusammensetzung der Zellen ist C H<sub>1,83</sub> O<sub>0,55</sub> N<sub>0,25</sub>.

Wenn die Zellkonzentration zu Versuchsende 25 g/l beträgt, welche minimale Konzentration an Ammonsulfat muss vorliegen, wenn Ammonsulfat die einzige Stickstoffquelle ist?

**Vorgaben**

$C_{\text{Biomasse}}$		25	g/L
Biomasse			
	C	1	
	H	1,83	
	N	0,25	
	O	0,55	

## Aufgabenstellung

Eine Hefe mit der Zusammensetzung C H<sub>1,8</sub> O<sub>0,5</sub> N<sub>0,2</sub> (5 % Asche) erzielt einen Umsatz  $\mu$  0.5 g Biomasse/g Substrat. Es werden keine weiteren Metabolite gebildet.

Welcher RQ stellt sich ein, wenn als Substrat Glycerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) eingesetzt wird?

Wo liegt der RQ bei Glukose?

## Vorgaben

Biomasse

C	1	
H	1,8	
N	0,2	
O	0,5	
Y <sub>x/s</sub>	0,5	g/g

## 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.

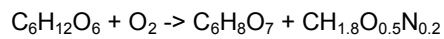
Eine typische Ausbeute unter diesen Bedingungen ist 68 g Citronensäure pro 100 g Glucose.

Bestimme den entsprechenden Sauerstoffverbrauch unter der Annahme,

dass nur Biomasse und Citronensäure gebildet wird!

## Vorgaben

Yp/s		0,68	[g/g]
Biomasse			
	C	1	
	H	1,8	
	N	0,2	
	O	0,5	
		4,2	





### 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 ( $\mu$ ,  $x_0$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $V_0$ ,  $S_0$ )

### Vorgaben

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

**Aufgabenstellung**

Eine Fermentation mit Bakterien hat nach Inokulation einer Zelldichte von  $10^8$  Zellen/ml und wird mit einer Zelldichte von  $10^9$  Zellen/ml beendet. Wie hoch ist der Anteil an Infektionskeimen oder Mutanten zu Züchtungsende, wenn das Inokulum einen Infektionskeim/ml enthält und sich dieser (a) 0,5 x; (b) 1,1 x; (c) 2 x so schnell vermehrt wie das Bakterium.

**Vorgaben**

$c_{X0,A}$	1,00E+05
$c_{Xt,A}$	1,00E+09
$\mu_B = x \cdot \mu_A$	
x1	0,5
x2	1,1
x3	2
$c_{X0,B}$	1

## Aufgabenstellung

Eine Hefe mit der Zusammensetzung  $C H_{1,6} O_{0,5} N_{0,2}$  (5 % Asche) erzielt einen Umsatz  $\mu$  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 ( $C_6H_{12}O_6$ ) als Substrat eingesetzt wird?

## Vorgaben

Biomasse

C	1	
H	1,6	
N	0,2	
O	0,5	
$Y_{x/s}$	0,6	g/g
$\mu_y$	0,1	1/h
c <sub>X</sub>	50	g/l
Reaktorvolumen	15000	L
spezWärme	460	kJ/molO <sub>2</sub>

## Aufgabenstellung

Ein Produktstrom von 500 L mit 1 g/l rekombinantem Protein muss innerhalb 3 Stunden (Gesamtprozesszeit) von Proteasen mittels IonExchange Chromatography getrennt werden. Legen Sie das Chromatographie System und Säule aus!

Hinweis: Die Säulendurchmesser sind wie folgt gestaffelt: 30/40/45/50/60/80/100 cm

## Vorgaben

Max. Binding capacity	15	g/l
Column height	20	cm
Equil	5	BV
Wash 1	2	BV
Wash 4 = regenerate	2	BV
Elution	5	BV
Elution Cut fraction	2,0	BV
Load / Elute Velocity	100	cm/h
Equil Wash / Regenerate Velocity	200	cm/h

## Aufgabenstellung

Ein Produktstrom von 500 L mit 1 g/l rekombinatem Protein muss 5 fach konzentriert und für die nächste Chromatographie umgepuffert werden.

Die Umpufferung darf maximal 7% vom initiiell vorhandenen Puffersystem enthalten .

Gesamtprozesszeit ist maximal 3 Stunden

Legen Sie die Membranfläche und das System aus!

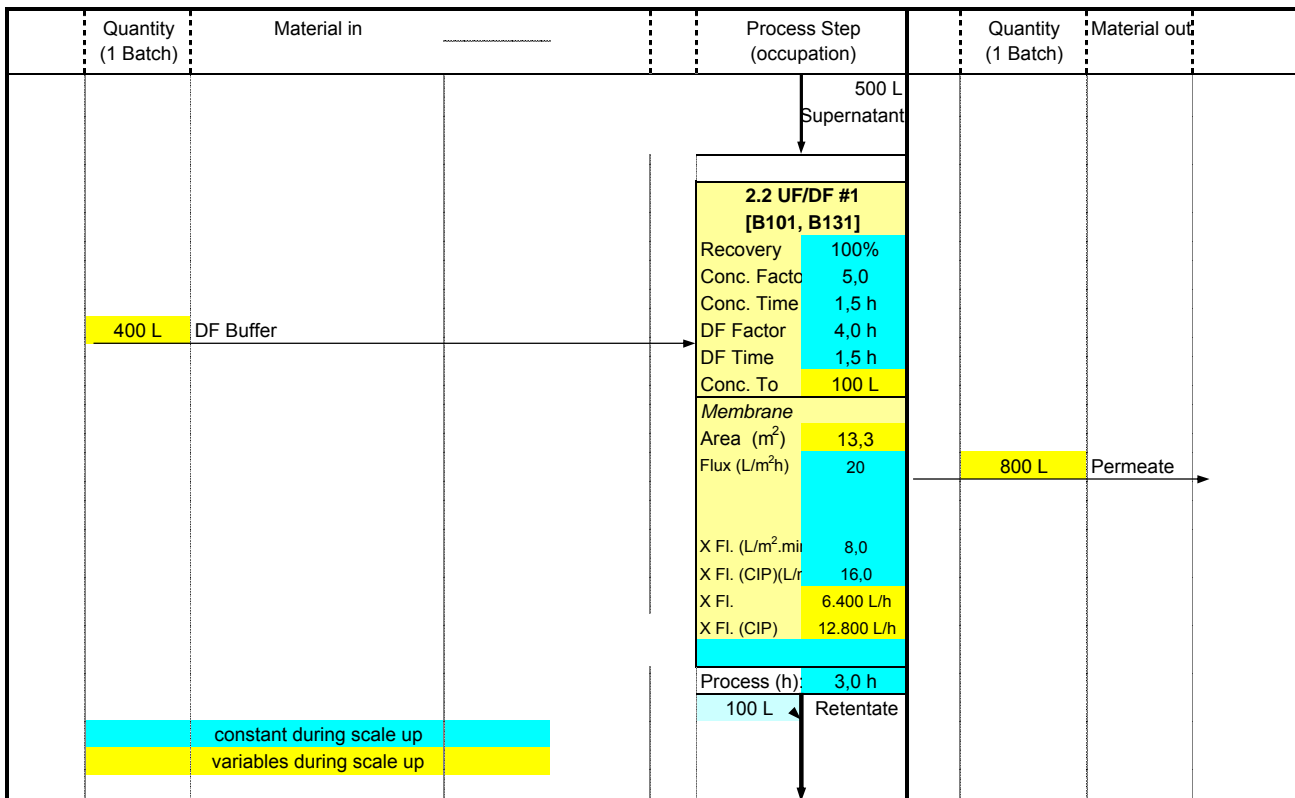
### Vorgaben

Transmembranfluss	20	l/m <sup>2</sup> /h
Tangentialflussrate	8	l/m <sup>2</sup> /min

### Berechnungen

DF Faktor	Volumen	% Puffer
		100
1		50
2		25
3		12,5
4		6,25
Gesamtpermeat		800,00 L

UF und DF jeweils 1.5 Stunden



## Aufgabenstellung

Skizzieren Sie einen kompletten Prozess für rekombinante Proteinproduktion mit der methylo trophen 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 rekombinates Protein produziert wird.

- Berechnen Sie die Wachstumsrate im Batch.
- Legen Sie einen Fedbatch mit einer Wachstumsrate von 80% der Wachstumsrate im Fedbatch 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 OTR/OUR stellt sich in der Induktionsphase ein? Wie lange dauert die Induktionsphase wenn 5g/l 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

#### BATCH

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

#### Fedbatch

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

#### Induktion

$c_{S,in}$  Induktion Methanol 850 g/L  
 $\rho$  Methanol Feed 820 g/L  
 $M_{\text{Methanol}}$  32 g/c-mol  
 Produktivität Proteinproduktion 0,01 g/g/h

#### Produktivität Gesamtprozess

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

## Aufgabenstellung

Legen Sie die Reaktorgeometrie für einen 10L Reaktor fest  
Führen Sie einen Scale-up auf 800L und auf 10m<sup>3</sup> durch, halten sie dabei die Rührerspitzengewindigkeit konstant

### Vorgaben

Rührerdrehzahl	1000rpm	1000 rpm
wässriges Medium		
dynamische Viskosität Wasser	$\eta$	0,001 Pa*s = kg/m/s
Dichte Wasser	$\rho$	1000 kg/m <sup>3</sup>
Newtonzahl	Ne	5 -
Aspect ratio	a	0,3333 d <sub>R</sub> /h <sub>R</sub>
Durchmesser Rührer	d <sub>i</sub>	0,3 d <sub>R</sub>

## Aufgabenstellung

Interferon wird mit Säugetierzellen im Perfusions-Modus und nachgeschaltet UF / Chroma / UF / Chroma / Virus Filtration / UF Schritten hergestellt  
Legen Sie den Gesamtprozess aus, wenn 10 Millionen Spritzen mit 20 µg Wirkstoff/Spritze pro Jahr den Markt erreichen sollen!

### Vorgaben

Inokulummenge 10%

Gehen Sie von 3 stets produzierenden Bioreaktoren aus

Jeder Schritt des Downstreamprozesses wird mit einer Effizienz von 90% gefahren

Ernten und prozessieren Sie die Perfusion sequentiell von verschiedenen Reaktoren jeweils nach 2 Tagen, Perfusionsrate 1vvd

Bestimmen Sie auch die benötigten Medien und Puffer Mengen

Process Step No.	Process Area		Product 1	Unit
	Production Scenario	dose / syringe	20	µg
		syringes	10.000.000	syringes
		Campaign Duration	200	days
		Batch Success Rate	0,9	fraction
1	Fermentation	volumetric Expression per day	1	mg/l/day
		growth period	15	days
		production period	45	days
		Dilution Rate	1	vvd
2	UF	UF Concentration	5	fold
		Membrane Flux	15	l/m <sup>2</sup> /h
		Process Time	5	h
4	Chroma	Binding capacity	1	g/l
		Column height	20	cm
		Equil	2	BV
		Wash 1	2	BV
		Wash 2	5	BV
		Wash 3	5	BV
		Wash 4 = regenerate	2	BV
		Elution	5	BV
		Elution Cut fraction	2,0	BV
	Virus filtration	Permeat Flux	100	ml/m <sup>2</sup> /h
		Process Time	5	h
5	All DSP	Recovery DSP Steps	0,9	
		Recovery	0,531441	fraction

		g/year	200	g
		Bulk per year	418,2	g
		Final Product per day	1000	mg
		Expression per day	2091	mg/day
1	Fermentation	Reactor Working volume	700	L
		Reactor productivity	700	mg/day/reactor
		Minimum Number of producing react	3	
		Culture Time	60	
		Total Number of Production Reactors	4	