

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 vernachlässigt 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
 ρ Glycerol Feed 1170 g/L gs/LS

Induktion

$c_{S,in}$ Induktion Methanol 850 g/L
 ρ Methanol Feed 820 g/L
 M_{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

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

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

μ_{\max} Batch 0,250 [h⁻¹]
 $\mu_{\text{Fedbatch}} = \mu_{\max} * 0.8$ 0,200 [h⁻¹]

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

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

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

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

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

Induktion

$\mu_{\text{Induktion}} = \mu_{\max} * 0.1$ 0,025 [h⁻¹]
 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

Aufgabenstellung

Ein Produktstrom von 500 L mit 1 g/l rekombinatem 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 Harz
Column height	20	cm
Equil	5	BV (Bettvolumen) = Column Volume
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

Equipment TAG	Quantity (1 Batch)	Material in		Process Step (occupation)
LEGEND:				
				500 L
		1 L g/l		Protein
			#CV	Chroma 1
Hold Tank 3	283 L	Equilibration Buffer	5	Product Amount 0,5000 kg
Hold Tank 3	113 L	Post Load Wash buffer	2	CV: 56,5 L
Hold Tank 4	283 L	Elution Buffer	5	Cycles: 1
Hold Tank 2	113 L	Regeneration Buffer	2	Col Diam: 60
				Col Height: 20
				Equil flow(cm/h) 200
				Equil flow(l/h): 565
				Load Elute flow(cm/h): 170
				Load Elute flow(l/h): 480
				effective binding g/l 8,84
				max. binding g/l: 15,0
				Process (h): 2,530
		cut ca 2.0 CV		113 L
		constant during scale up		Eluate
		variables during scale up		

Aufgabenstellung

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

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

Gesamtprozesszeit ist maximal 3 Stunden

Legen Sie die Membranfläche und das System aus!

Volumetrische Flussraten sowie Leitungsdurchmesser F und P

Vorgaben

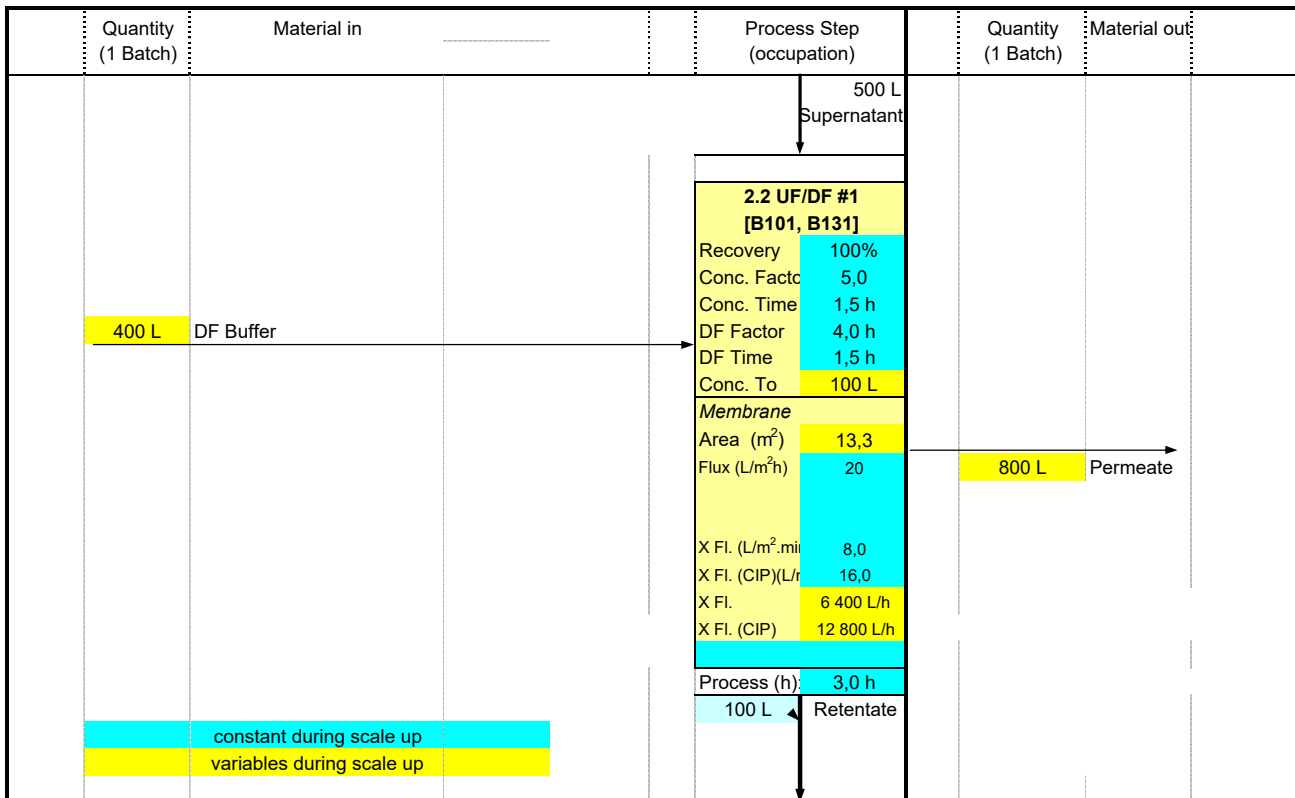
$v_{\text{pipe}} = 1.5 \text{ m/s}$

mp	Transmembranfluss	20	l/m ² /h
mf	Tangentialflussrate	8	l/m ² /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



$$\text{Flowrate} = A_{\text{membrane}} * v_{\text{feed}} = A_{\text{pipe}} * v_{\text{pipe}}$$

	Feed	Permeate	
flowrate	6 400	267	l/h
flowrate	0,0036	0,0001	m ³ /s
velocity	1,5000	1,5000	m/s
section	0,0024	0,00005	m ²
pipe dia	54,9368	7,9294	mm

Aufgabenstellung

Legen Sie die Reaktorgeometrie für einen 10L Reaktor fest
Führen Sie einen Scale-up auf 800L und auf 10m³ durch, halten sie dabei die Rührerspitzengechwindigkeit konstant

Vorgaben

Rührerdrehzahl	1000rpm	1000 rpm		
wässriges Medium				
dynamische Viskosität Wasser	η	0,001 Pa*s = kg/m/s		
Dichte Wasser	ρ	1000 kg/m ³		
Newtonzahl	Np	5 -		
Aspect ratio	a	0,3333 d_R/h_R	h_R/d_R	3
Durchmesser Rührer	d_i	0,3 d/d_R		

Rektorgeometrie

Bezeichnung	Kürzel	Formel	10L Laborreaktor	Einheit
Volumen Reaktor	V	$V = (d_R/2)^2 \pi h_R$	0,01	m ³
Innen-Durchmesser Reaktor	d_R	$d_R = (4 \cdot a \cdot V / (3 \cdot \pi))^{1/3}$	0,1619	m
Höhe Reaktor	h_R	$h_R = d_R \cdot 3$	0,4857	m
Durchmesser Rührer	d_i		0,049	m
Rührerdrehzahl	n		16,6667	rps
Rührerdrehzahl	n	$n [\text{min}^{-1}] / 60 \cdot n [\text{s}^{-1}]$	1000	rpm
Rührerleistung	P	$P = \rho \cdot N_e \cdot n^3 \cdot d_i^5$	6,2580	Watt
Spez. Rührerleistung	P/V	P/V	625,8025	Watt/m ³

Spitzengeschwindigkeit	v	$v = d_i \cdot \pi \cdot n$	2,5432	m/s
Reynoldszahl	Re	$Re = n \cdot d_i^2 \cdot \rho / \eta$	39320,3313	-
log Reynoldszahl	$Re \log$	$\log(Re)$	4,5946	-

Scale Up I

Bezeichnung	Kürzel	Formel	800L Pilotreaktor	10m ³ Produktionsreaktor	Einheit
Volumen Reaktor	V	$V = (d/2)^2 \pi h_R$	0,8	10	m ³
Innen-Durchmesser Reaktor	d_R	$h_R = d_R \cdot 3; d_R = (4 \cdot V / (3 \cdot \pi))^{1/3}$	0,6976	1,6191	m
Höhe Reaktor	h_R	$h_R = d_R \cdot 3$	2,0929	4,8572	m
Durchmesser Rührer	d_i	$V \sim d_i^3; d_{i2} = (V_2/V_1)^{1/3} \cdot d_{i1}$	0,2093	0,485718013	m
Rührerdrehzahl	n_2	$n_2 = v_1 / \pi / d_{i2}$	3,8680	1,6667	rps
Rührerdrehzahl	n	$n [\text{min}^{-1}] / 60 \cdot n [\text{s}^{-1}]$	232,0794	100	rpm

Scale Up II

Bezeichnung	Kürzel	Formel	800L Pilotreaktor	10m ³ Produktionsreaktor
Rührerleistung	P	$P = \rho \cdot N_e \cdot n^3 \cdot d_i^5$	116,1887	625,8025
Spez. Rührerleistung	P/V	P/V	145,2359	62,5803

Spitzengeschwindigkeit	v	$v = d_i \cdot \pi \cdot n$	2,5432	2,5432	m/s
Reynoldszahl	Re	$Re = n \cdot d_i^2 \cdot \rho / \eta$	169426,1715	393203,3129	-
log Reynoldszahl	$Re \log$		5,2290	5,5946	-

Zusammenfassung - Faktor

Bezeichnung	Kürzel	Formel	10L Laborreaktor	800L Pilotreaktor	10m ³ Produktionsreaktor
Volumen Reaktor	V	$V = (d/2)^2 \pi h_R$	1	80,0000	1000
Innen-Durchmesser Reaktor	d_R	$h_R = d_R \cdot 3; d_R = (4 \cdot V / (3 \cdot \pi))^{1/3}$	1	4,3089	10
Höhe Reaktor	h_R	$h_R = d_R \cdot 3$	1	4,3089	10
Durchmesser Rührer	d_i	$V \sim d_i^3; d_{i2} = (V_2/V_1)^{1/3} \cdot d_{i1}$	1	4,3089	10
Rührerdrehzahl	n				
Rührerdrehzahl	n	$n [\text{min}^{-1}] / 60 \cdot n [\text{s}^{-1}]$	1	0,2321	0,1
Rührerleistung	P	$P = \rho \cdot N_e \cdot n^3 \cdot d_i^5$	1	18,5664	100
Spez. Rührerleistung	P/V	P/V	1	0,2321	0,1
Spitzengeschwindigkeit	v	$v = d_i \cdot \pi \cdot n$	1	1	1
Reynoldszahl	Re	$Re = n \cdot d_i^2 \cdot \rho / \eta$	1	4,3089	10

Scale up Proportionalität

Bezeichnung	Proportionalität
Spitzengeschwindigkeit	$v \sim N \cdot d_i$
Volumen	$V \sim d_i^3$
Leistung	$P \sim n^3 \cdot d_i^5$
Umwälzkapazität Rührer	$F \sim n \cdot d_i^3$
Spez. Rührerleistung	$P/V \sim n^3 \cdot d_i^2$
Spez. Umwälzkapazität Rührer	$F/V \sim n$
Reynoldszahl	$Re \sim n \cdot d_i^2$