

## Beispiel 1: Monod 1

### 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
μ <sub>max</sub>	1.200	1/h

## Beispiel 2: Kinetik 1

### 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 h<sup>-1</sup> 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<sub>X/S</sub>?

### Vorgaben

V <sub>R</sub>	9.5	L
t <sub>end</sub>	6	h
c <sub>x0</sub> , inoc	2	g/l
μ <sub>max</sub>	1.2	1/h
c <sub>xt</sub>	8.421	g/l

## Beispiel 3: Kinetik 2

### 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
$Y_{x/s}$	0.575	g/g

**Beispiel 4: 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 hat. 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

**Beispiel 5: 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 eingestellt hat.

Danach wird die Flussrate auf 10 ml h<sup>-1</sup> erhöht und die Probennahme bzw. Messung 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	
Feedkonzentration	S <sub>0</sub>	5	

## Beispiel 6: Stöchiometrie 1

### 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 <sub>Biomasse</sub>	25	g/L
Biomasse		
	C	1
	H	1.83
	N	0.25
	O	0.55

## Beispiel 7: Stöchiometrie 2

### 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 von 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
------------------	-----	-----

## Beispiel 8: Stöchiometrie 3

### 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.

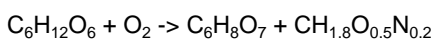
Die Stickstoffquelle ist Ammonnitrat. Es wird kein Kohlendioxid gebildet.

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



## Beispiel 9: Stöchiometrie 4

### Aufgabenstellung

Zellen von *Candida utilis* setzen während des Wachstums Glucose zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O um.

Die Zusammensetzung der Zellen ist CH<sub>1,84</sub>O<sub>0,55</sub>N<sub>0,2</sub> (zusätzlich: 10% Aschegehalt).

Die Ausbeute an Biomasse bezogen auf Substrat ist 0,5 g/g. Ammoniak wird als Stickstoffquelle eingesetzt.

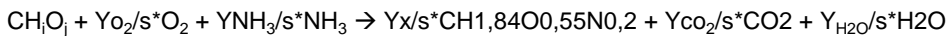
Wie groß ist der Stickstoffbedarf bezogen auf das eingesetzte Substrat?

*C. utilis* kann auch mit Ethanol als Substrat wachsen, wobei Zellen derselben Zusammensetzung entstehen.

Wie groß ist die maximal mögliche Biomasseausbeute aus Ethanol im Vergleich zum Wachstum auf Glucose?

### Vorgaben

Y <sub>x/s</sub>	0.5	[g/g]
Biomasse		
	C	1
	H	1.84
	N	0.2
	O	0.55



## Beispiel 10: Stöchiometrie 5

### Aufgabenstellung

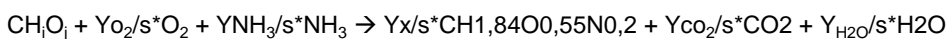
*Klebsiella aerogenes* wird unter aeroben Bedingungen auf Glycerin gezüchtet mit Ammoniak aus N-Quelle.

Die Biomasse [CH<sub>1,75</sub>O<sub>0,43</sub>N<sub>0,22</sub>] enthält 8% Asche. 0,40 g Biomasse werden aus jedem g verwertetem Glycerin gebildet und es werden keine zusätzlichen Produkte (außer Wasser und Kohlendioxid) gebildet.

Wie groß ist der Sauerstoffbedarf der Zellen in Gewichtsverhältnis (Y<sub>O<sub>2</sub>/X</sub>)?

### Vorgaben

Y <sub>x/s</sub>	0.4	[g/g]
Biomasse		
	C	1
	H	1.84
	N	0.2
	O	0.55



## Beispiel 11: Stöchiometrie 5

### 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 (μ, x<sub>0</sub>, Y<sub>x/s</sub>, V<sub>0</sub>, S<sub>0</sub>)

### Vorgaben

$$\dot{V}_{In} c_{i,In} - \dot{V}_{Out} c_{i,out} + V_R r_i - V_R r_{ph-trans} = V_R \frac{dx_i}{dt} + c_i \frac{dV_R}{dt}$$

## Beispiel 12: Infektion 1

### Aufgabenstellung

Eine Fermentation mit Bakterien hat nach Inokulation einer Zelldichte von  $10^5$  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

cX0,A	1.00E+05
cXt,A	1.00E+09
$\mu_B = x \cdot \mu_A$	
x1	0.5
x2	1.1
x3	2.5
cX0,B	1

## Beispiel 13: Wärmeentwicklung 1

### 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>

## Beispiel 14: Chromatographie 1

### 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

### UF 1

### Aufgabenstellung

Ein Produktstrom 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 initiiell vorhanden Puffersystem enthalten .

Gesamtprozesszeit ist maximal 3 Stunden

Legen Sie die Membranfläche aus!

### Vorgaben

Transmembranfluss	20	l/m2/h
-------------------	----	--------

### Berechnungen

DF Faktor	Volumen	% Puffer
	100	100
1		50
2		25
3		12.5
4		6.25
Gesamtpermeat		800.00

UF und DF jeweils 1.5 Stunden

## Beispiel 15: Induktionsprozess 1

### Aufgabenstellung

Skizzieren Sie einen kompletten Prozess für rekombinante Proteinproduktion mit der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* (CH1.8O0.5N0.2) 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 Batch-Wachstumsrate 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		
<b>Generell</b>		
Biomasse	$\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$	
$Y_{x/s}$	0.5	g/g
<b>BATCH</b>		
$V_{R0}$	2	L
Inolukum $c_{x0}$	0.5	g/L
$c_x$ Batchende	10	g/L
Dauer Batch	12	h
<b>Fedbatch</b>		
$c_{S,in}$ Fedbatch Glycerol	500	g/L
$\rho$ Glycerol Feed	1170	g/L
<b>Induktion</b>		
$c_{S,in}$ 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
<b>Produktivität Gesamtprozess</b>		
Arbeitstage pro Jahr	250	d
Produktionsfermenter	1000	L
Protein	5	g/L

## Beispiel 16: Integrated Process

### Aufgabenstellung

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

### 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 1 vvd

Bestimmen Sie auch die benötigten Medien und Puffer Mengen

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
Fermentation	volumetric Expression	1	mg/l/day
	growth period	15	days
	production period	#BEZUG!	days
	Dilution Rate	1	vvd
UF	UF Concentration	5	fold
	Membrane Flux	15	l/m2/h
	Process Time	5	h
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	Permeate Flux	100	ml/m2/h
	Process Time	5	h
All DSP			
	Recovery DSP Step	0.9	
	Recovery	0.531441	fraction