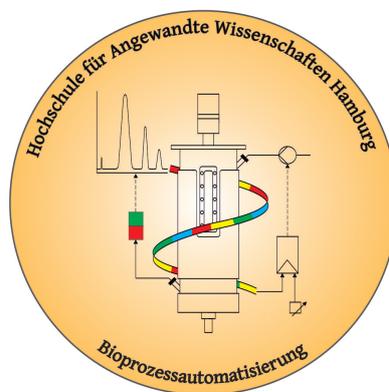

Etablierung der Berechnung von
Abgaskennwerten bei der Kultivierung von
Pichia pastoris in einem Laborfermenter



Fakultät Life Sciences
der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Abschlussarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Philipp Yuma Iff



im September 2022

Erstprüferin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen
Zweitprüfer: Prof. Dr. Christian Kaiser

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Abschlussarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben. Sowohl inhaltlich als auch wörtlich entnommene Inhalte wurden als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in dieser oder vergleichbarer Form noch keinem anderem Prüfungsgremium vorgelegen.

Datum: _____ Unterschrift: _____

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Bioprozessautomatisierung an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Bereitstellung des spannenden Themas und Begutachtung dieser Arbeit bedanken. Ebenso bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung und ständige Unterstützung während dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Kaiser möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Mohammad Javad Saeidi, der auch mal sein Wochenende mit mir im Labor verbracht hat und stets ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Für die Unterstützung bei technischen Fragen möchte ich mich herzlich bei Herrn Dipl.-Ing. Ulrich Scheffler und Herrn Dipl.-Ing. Hans-Peter Bertelsen bedanken.

Außerdem bedanke ich mich sehr bei Sophia Kaletsch und Lisa Michel für das Korrekturlesen und für hilfreiche Anregungen. Des Weiteren bedanke ich mich bei Phoebe Chan für die Unterstützung im Labor und die Bereitstellung der Kryo-Kulturen.

Abschließend danke ich bei meiner Familie und Freunden für die Unterstützung außerhalb des Labors.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Danksagungen	III
Abkürzungsverzeichnis	X
Nomenklatur	XI
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	2
3 Theoretische Grundlagen	3
3.1 Die Hefe <i>Pichia pastoris</i> BSYBG11	3
3.1.1 Der Methanol Metabolismus von <i>P. pastoris</i>	3
3.2 Das Protein eGFP	4
3.3 Gasanalyzesysteme	5
3.3.1 O ₂ -Messprinzip	6
3.3.2 CO ₂ -Messprinzip	7
3.3.3 Druck- und Feuchtigkeitsmessung	9
3.4 Prozessparameter in der Abgasanalytik	10
3.5 Kultivierungsstrategie	15
3.5.1 Batch-Phase	16
3.5.2 Fed Batch-Phase	17
3.5.3 Produktionsphase	17
4 Material und Methoden	18
4.1 Der Bioreaktor BIOSTAT [®] A	18
4.1.1 Basiseinheit (DCU)	19
4.1.2 Instrumentierung	19
4.2 Abgasanalyzesysteme	24
4.2.1 BlueInOne Cell	25
4.2.2 BlueVary	25
4.3 Softwareoberflächen	26
4.3.1 Das Prozessleitsystem MFCS/win	26

4.3.2	Das Steuerungssystem des BIOSTAT [®] A	28
4.3.3	BlueVis	28
4.4	<i>P. pastoris</i> Stamm BSYBG11	30
4.5	Vorversuch zur Bestimmung von Wachstumsparametern	30
4.6	Berechnungen zu den Kultivierungsphasen	31
4.6.1	Vorkultur	31
4.6.2	Batchkultivierung	31
4.6.3	Fed Batch-Kultivierung	33
4.6.4	Produktion	34
4.7	Offline-Analytik	34
4.7.1	Bestimmung der optischen Dichte	34
4.7.2	Bestimmung der Biotrockenmasse	35
4.7.3	Bestimmung der Fluoreszenz	36
4.8	Auswertung der Abgasanalysedaten mittels MATLAB [®]	36
5	Ergebnisse	38
5.1	Vorversuch zur Bestimmung von Wachstumsparametern	38
5.2	Fed Batch-Kultivierung	39
5.3	Auswertung der Abgasanalysedaten	41
6	Diskussion	44
6.1	Kultivierungsverlauf	44
6.2	Der Respirationsquotient	48
6.3	Vergleich der Ergebnisse aus den Systemen BlueInOne Cell und BlueVary	48
7	Zusammenfassung	51
8	Ausblick	52
9	Anhang	58
9.1	Medienzusammensetzung	58
9.2	Chemikalienliste	60
9.3	Geräteliste	61
9.4	Berechnung des Henry-Koeffizienten	63
9.5	MATLAB Skripte	64
9.5.1	Interpolieren	64
9.5.2	Berechnung der Abgaskennwerte mit MATLAB [®]	65

Abbildungsverzeichnis

3.1	Metabolisierung von Methanol im Peroxisomen von <i>P. pastoris</i> [1]. Quelle: Cornelissen, 2004 [2].	4
3.2	Struktur des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mit dem β -Fass und dem sich darin befindlichen Chromophor. Quelle: Day, 2009 [3].	5
3.3	Schematische Darstellung vom Messprinzip eines elektrochemischen Sauerstoffsensors. Quelle: In Anlehnung an Goswami un Cooper, 2011 [4].	7
3.4	Schematischer Aufbau einer Zirkoniumoxid Messzelle und das Messprinzip der Sauerstoffmessung. Quelle: BlueVary Manual, BlueSens gas sensors GmbH [5].	8
3.5	Schematischer Aufbau eines CO ₂ -Sensors und das Messprinzip der Kohlendioxidmessung. Quelle: In Anlehnung an BCP CO ₂ Manual, BlueSens gas sensors GmbH [6].	9
3.6	Makroskopische Volumenelement eines Bioreaktors. Quelle: In Anlehnung an Cornelissen, 2014 [2].	12
3.7	Der theoretische Verlauf einer mehrstufigen Hochzelldichtekultivierung. Quelle: In Anlehnung an Cornelissen, 2004 [2].	16
4.1	Der Arbeitsplatz im Labor mit dem Bioreaktor, der DCU und der Instrumentierung.	18
4.2	Das Messprinzip der Methanolsonde vereinfacht dargestellt. Ein definierter Trägerstrom fließt in die Messzelle. Die Messzelle ragt in das Medium hinein. Das Medium kommt dabei mit einer Methanol durchlässigen Membran in Kontakt, wodurch Methanol in den Trägerstrom übergehen kann. Das Methanolgehalt im Trägerstrom kann dann von einem Alkoholsensor detektiert werden. Quelle: Eigene Darstellung.	22
4.3	Die Instrumentierung zur Probenahme. Nach dem Öffnen der oberen Schlauchklemme kann mit der Laborspritze eine Probe aus dem Bioreaktor aufgezogen werden. Durch Schließen der oberen und dem Öffnen der unteren Schlauchklemme kann die Probe aus dem Röhrchen gepumpt werden.	23
4.4	Das Hauptmenü von MFCS/win Shell. Quelle: In Anlehnung an Cornelissen, 2004 [2].	27
4.5	Das Steuerungssystem vom BIOSTAT [®] A in Mozilla Firefox.	29

4.6	Die Software BlueVis von BlueSens für die Aufzeichnung der Abgasdaten.	30
5.1	Die optische Dichte in den ersten 7 Stunden einer Batch-Kultivierung. Die optische Dichte wurde bei 600 nm über eine Doppelbestimmung mit einem Photometer gemessen und gegebenenfalls mit Wasser verdünnt. Die Abbildung wurde mit Excel von Microsoft erstellt.	38
5.2	Ein Plot der durchgeführten Hochzelldichtekultivierung. Der Prozess wurde auf pH 5 und eine Temperatur von 30 °C in der Batch/Fed Batch Phase geregelt (22 °C in der Produktionsphase). F_{nG} , pO_2 , N_{St} und c_{S2L} wurden online über die Sonden ermittelt, während c_{XL} und A_P über offline Messungen bestimmt wurden. Q_{S1in} wurde nach Abschnitt 4.6.3 berechnet. Die Fluoreszenzmessung wurde mit einer Verstärkung von 50 durchgeführt. Der Plot wurde mit der Software QtiPlot von IONDEV SRL erstellt. . . .	39
5.3	Das Kulturmedium, welches in einem abgedunkelten Raum nach Beendigung des Prozesses mit UV-Licht bestrahlt wurde.	40
5.4	Dargestellt sind die O_2 - und CO_2 -Messdaten aus der Hochzelldichtekultivierung. Dabei werden die Messwerte von den Abgasanalyse-Systemen BlueInOne Cell und BlueVary der BlueSens gas sensor GmbH miteinander verglichen. Die Abbildung wurde mit MATLAB [®] erstellt.	41
5.5	Die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} und die Kohlendioxidaustragsrate Q_{CO_2} wurden aus den Abgasmessdaten von O_2 und CO_2 berechnet und graphisch dargestellt. Die Abbildung wurde mit MATLAB [®] erstellt.	42
5.6	Der Verlauf des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ während der Hochzelldichtekultivierung. Der $k_L a$ -Wert wurde mit den Messdaten der Abgasanalyse-Systeme BlueInOne Cell und BlueVary berechnet. Die Abbildung wurde mit MATLAB [®] erstellt.	42
5.7	Der Respirationsquotient RQ wurde mit den gemessenen Abgasdaten von BlueInOne Cell und BlueVary berechnet. Zur Verdeutlichung sind die RQ-Werte zu den einzelnen Prozessabschnitten mit eingezeichnet. Die Abbildung wurde mit MATLAB [®] erstellt.	43
6.1	Die CO_2 -Messwerte mit dem Fokus auf der Differenz zwischen den Messwerten vom BlueInOne Cell und dem BlueVary. Durch eine Linie wurde ein Bereich gekennzeichnet, in dem der BlueInOne Cell einen höheren CO_2 -Stoffmengenanteil misst als der BlueVary.	49

6.2 Der O₂-Anteil und die relative Luftfeuchtigkeit in den ersten zwei Stunden des Prozesses. Die Messwerte stammen vom BlueInOne Cell und BlueVary. Die Abbildung wurde mit MATLAB[®] erstellt. 50

Tabellenverzeichnis

4.1	Angenommene Werte für den Kultivierungsprozess [7].	27
5.1	Die optische Dichte der Vorkultur nach 24 Stunden. Die Messung fand als Doppelbestimmung bei 600 nm statt.	38
9.1	Zusammensetzung des Batch Mediums.	58
9.2	Zusammensetzung des Glycerin Zufüttermediums.	58
9.3	Zusammensetzung des Methanol Zufüttermediums.	59
9.4	Verwendete Chemikalien für die Herstellung der Batch Medien.	60
9.5	Verwendete Chemikalien für die Herstellung der Zufüttermedien und Kor- rekturmittel.	60
9.6	Die verwendeten Geräte für die Durchführung der Kultivierung.	61
9.7	Die verwendeten Geräte zur Bestimmung der Biotrockenmasse.	62
9.8	Die verwendeten Geräte zur Bestimmung der optischen Dichte.	62
9.9	Die verwendeten Geräte zur Bestimmung der Fluoreszenz.	62

Abkürzungsverzeichnis

<i>AOX1</i>	Alkohol-Oxidase 1
<i>AOX2</i>	Alkohol-Oxidase 2
AU	<i>absorption units</i>
BPA	Bioprozessautomatisierung
BTM	Biotrockenmasse
DCU	<i>digital control unit</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
G	<i>gas phase</i> (Gasphase)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
L	<i>liquid phase</i> (Flüssigphase)
MFC	<i>mass flow controller</i>
MFCs/win	<i>multi fermenter control system for Windows</i>
NTC	<i>negative temperature coefficient</i>
<i>P_{AOX1}</i>	Promoter des <i>AOX1</i> -Gens
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella phaffii</i>)
PFC	Perfluorcarbon
rfu	<i>relative fluorescence units</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
R ₁	Reservoir 1 mit dem Substrat Glycerin
R ₂	Reservoir 2 mit dem Substrat Methanol
S1	Substrat 1: Glycerin
S2	Substrat 2: Methanol
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser (demineralisiertes Wasser)
X	<i>cells</i> (Zellen)

Nomenklatur

A	:=	Blasenoberfläche	$[\text{m}^2]$
A_P	:=	Absorption der Produkt-Fluoreszenzmessung bei definiertem Gain	[rfu]
CER	:=	Kohlendioxidentwicklungsrate	$[\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}]$
c_{S2L}	:=	Konzentration von S2 in der Flüssigphase	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{OG}	:=	Sauerstoffkonzentration in der Gasphase	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{OL}	:=	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{OL}^*	:=	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase an der Grenzfläche	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{OL100}	:=	Sauerstoffkonzentration bei $pO_2 = 100 \%$	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{OLmax}	:=	Maximal sauerstoffgesättigte Flüssigphase	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{PL}	:=	Produktkonzentration (eGFP)	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{S10}	:=	Substratkonzentration (Glycerin) zu Beginn der Batch-Phase	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{S1L}	:=	Konzentration vom Substrat 1 (Glycerin) in der Flüssigphase	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{S2L}	:=	Konzentration vom Substrat 2 (Methanol) in der Flüssigphase	$[\text{g l}^{-1}]$
CTR	:=	Kohlendioxidtransferrate	$[\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}]$
c_{XL}	:=	Zellkonzentration	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{XL0}	:=	Zellkonzentration zu Beginn der Batch-Phase	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{XL2}	:=	Zellkonzentration zu Beginn der Fed Batch-Phase	$[\text{g l}^{-1}]$
c_{XLmax}	:=	Maximale Zellkonzentration zum Ende der Batch-Phase	$[\text{g l}^{-1}]$
F_{nAIR}	:=	Begasungsrate mit Luft	$[\text{l h}^{-1}]$
F_{nG}	:=	Gesamtbegasungsrate	$[\text{l h}^{-1}]$
F_{nGin}	:=	Zulufrate	$[\text{l h}^{-1}]$
F_{nGout}	:=	Abluftrate	$[\text{l h}^{-1}]$
F_{R1}	:=	Substratzufütterungsrate mit Substrat aus R1	$[\text{l h}^{-1}]$
F_{R12}	:=	Substratzufütterungsrate zu Beginn der Fed Batch-Phase	$[\text{l h}^{-1}]$
F_{R1w}	:=	Sollsubstratzufütterungsrate	$[\text{l h}^{-1}]$
H_{O2}	:=	Henry-Koeffizient	$[\text{Nm kg}^{-1}]$
k_L	:=	Stofftransportkoeffizient	$[\text{l h}^{-1}]$
k_{La}	:=	Volumetrischer Stofftransportkoeffizient	$[\text{l h}^{-1}]$
$K_{X/OD}$:=	Umrechnungsfaktor von der optischen Dichte zur Zellkonzentration	[-]
m_{BTM+RG}	:=	Biotrockenmasse mit der Masse vom Reaktionsgefäß	[g]
M_{CO2}	:=	Molare Masse von Kohlendioxid	$[\text{g mol}^{-1}]$
m_L	:=	Masse des Flüssigvolumens im Bioreaktor	[g]

M_{O_2}	:=	Molare Masse von Sauerstoff	[g mol ⁻¹]
m_{RG}	:=	Masse vom Reaktionsgefäß	[g]
μ	:=	Zellspezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ_1	:=	Zellspezifische Wachstumsrate auf S1	[h ⁻¹]
μ_{1max}	:=	Maximale zellspezifische Wachstumsrate aus S1	[h ⁻¹]
μ_{1w}	:=	Sollwert der Wachstumsrate auf S1	[h ⁻¹]
μ_2	:=	Zellspezifische Wachstumsrate auf S2	[h ⁻¹]
μ_{2max}	:=	Maximale zellspezifische Wachstumsrate aus S2	[h ⁻¹]
μ_{2w}	:=	Sollwert der Wachstumsrate auf S2	[h ⁻¹]
N_{St}	:=	Rührerdrehzahl	[rpm]
OD_{600}	:=	Optische Dichte	[AU]
$OD_{600,0}$:=	Optische Dichte zu Beginn der Batch-Phase	[AU]
OD_{600VK}	:=	Optische Dichte der Vorkultur	[AU]
OTR	:=	Sauerstofftransferrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
OUR	:=	Sauerstoffaufnahme	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
p_G	:=	Druck in der Gasphase	[N m ⁻²]
p_{Gcal}	:=	Druck in der Gasphase bei der Kalibrierung der pO ₂ -Sonde	[N m ⁻²]
p_{O_2}	:=	Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase	[%]
Q_{CO_2}	:=	Kohlendioxidaustragsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{CO_2in}	:=	Kohlendioxideintragsrate in den Bioreaktor	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{CO_2out}	:=	Kohlendioxidaustragsrate aus dem Bioreaktor	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{CO_2max}	:=	Maximale Kohlendioxidangebotsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{O_2}	:=	Sauerstoffeintragsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{O_2in}	:=	Sauerstoffeintragsrate in den Bioreaktor	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{O_2out}	:=	Sauerstoffaustragsrate aus dem Bioreaktor	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{O_2max}	:=	Maximale Sauerstoffangebotsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q_{S1in}	:=	Volumetrische Substratzufütterrate	[g l h ⁻¹]
$q_{S1/Xm}$:=	Zellspezifische Maintenance-Substrataufnahmerate	[h ⁻¹]
ρ_L	:=	Dichte der Flüssigphase	[g l ⁻¹]
ρ_{MeOH}	:=	Dichte von Methanol bei 22 °C	[g l ⁻¹]
RQ	:=	Respirationsquotient	[-]
t	:=	Prozesszeit	[h]
t_2	:=	Zeitpunkt vom Ende der Batch-Phase	[h]
V_L	:=	Volumen der Flüssigphase	[l]
V_{L2}	:=	Volumen der Flüssigphase zu Beginn der Fed Batch-Phase	[l]

$V_{L,VK}$:=	Vorkulturvolumen	[l]
V_{nM}	:=	Molares Volumen bei Normbedingungen	[l mol ⁻¹]
V_{Probe}	:=	Volumen der Flüssigprobe	[l]
x_{CG}	:=	Stoffmengenanteil von CO ₂ in der Abluft	[-]
x_{CGin}	:=	Stoffmengenanteil von CO ₂ in der Zuluft	[-]
x_{CO_2}	:=	Kohlendioxidanteil in der Abluft in Prozent	[%]
x_{OG}	:=	Stoffmengenanteil von O ₂ in der Abluft	[-]
x_{OGcal}	:=	Sauerstoffanteil während der Kalibrierung der pO ₂ -Sonde	[-]
x_{OGin}	:=	Stoffmengenanteil von O ₂ in der Zuluft	[-]
x_{O_2}	:=	Sauerstoffanteil in der Abluft in Prozent	[%]
x_{S_2L}	:=	Stoffmengenanteil von Methanol in der Flüssigphase	[%]
y_{X/S_1}	:=	Substratausbeutekoeffizient (Glycerin)	[-]

1 Einleitung

Das interdisziplinäre Fachgebiet der Biotechnologie gewinnt immer mehr an Bedeutung [8]. Tatsächlich wird diese Technologie seit Jahrtausenden für die Produktion und Konservierung von Lebensmitteln verwendet [9]. In der klassischen Biotechnologie nahm die Hefe dabei eine entscheidende Rolle ein. Bis heute wird der Pilz *Saccharomyces cerevisiae* für die Produktion von Brot, Bier und Wein verwendet [10]. Die zur selben Familie gehörende Hefe *Pichia pastoris* zeichnet sich durch ein zuverlässiges Expressionssystem aus und hat sich daher in der modernen Biotechnologie als Wirt für heterologe Proteinproduktion etabliert [11, 12]. Die methylotrophe Hefe eignet sich besonders für die Expression von biopharmazeutischen und industriellen Proteinen, da sie einen starken und streng regulierten Promoter besitzt und Proteinmengen von mehreren Gram pro Litern produzieren kann [12]. Voraussetzung für die Produktion dieser Proteinmengen sind entsprechend hohe Zelldichten in dem Fermentern. Proteine sind komplexe Moleküle, weshalb kleinste Veränderungen im Fertigungsverfahren einen signifikanten Einfluss auf die Eigenschaften der Produkte und der anschließenden Aufreinigung haben können [13]. Dementsprechend ist die batch-to-batch-Reproduzierbarkeit von großer Bedeutung [13]. Diese kann mitunter über die Abgasanalyse überwacht werden [14].

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Bachelorarbeit ist die Etablierung der Berechnung von Abgaskennwerten anhand einer Kultivierung von *P. pastoris* im Biostat[®] A von der Satorius Stedim Biotec GmbH. Ergänzend soll eine einfache Regelung der Methanol-Konzentration eingeführt werden. In diesem Zusammenhang werden Abgaskennwerte vorgestellt, welche wichtige Informationen über den Fermentationsprozess darlegen. Angeschlossen am Bioreaktor sind die Abgasanalysesysteme BlueInOne Cell und BlueVary der BlueSens gas sensor GmbH, wobei letzteres neu im BPA Labor etabliert werden soll. Die resultierenden Abgasdaten werden entsprechend ausgewertet und anschließend miteinander verglichen. In diesem Zusammenhang werden mehrere Hochzelldichtekultivierungen durchgeführt. Zudem wird eine Expressionsphase eingeleitet, bei der die Zellen beginnen, ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP) zu produzieren. Diese Arbeit schließt sich den Bachelorarbeiten von Christina Kirschnick (2018) und Alexander Thoma (2019) an, in denen erste Schritte für die Etablierung einer dreistufigen Fed Batch Kultivierung durchgeführt wurden [15, 7].

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Die Hefe *Pichia pastoris* BSYBG11

Pichia pastoris hat sich seit der Entdeckung von Methanol metabolisierenden Hefen vor über 50 Jahren zu einem sehr erfolgreichen Expressionssystem für heterologen Gene entwickelt [16, 17]. Dies ist unter anderem auf den stark regulierten Promotor des *AOX1* Gens und der Ähnlichkeit zur eingehend erforschten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zurückzuführen [17]. Die auch unter den Namen *Komagataella phaffii* bekannte Hefe ist aufgrund ihrer eukaryotischen Zellstruktur in der Lage, posttranslationale Modifizierungen wie Glykosylierungen und proteolytische Prozessierungen durchzuführen [18]. Damit können komplizierte Proteine exprimiert werden, welche in prokaryotischen Systemen zu inaktiven *inclusion bodies*, also Proteinaggragaten, prozessiert werden würden. Gleichzeitig ist die Produktion heterologer Proteine in *P. pastoris* günstiger, schneller und einfacher als in anderen eukaryotischen Systemen wie Insekten- oder Säugerzellkulturen [18]. Ein weiterer Vorteil von *P. pastoris* gegenüber anderen Mikroorganismen ist deren starke Präferenz für respiratorisches Wachstum [18]. Während die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch den sogenannten Crabtree-Effekt mit steigendem Angebot an Glucose ohne Sauerstoffmangel damit beginnt, vermehrt anaerobe Stoffwechselprodukte wie Ethanol zu produzieren, ist dies bei *P. pastoris* deutlich weniger der Fall. Hierdurch können hohe Zelldichten erreicht werden, ohne dass eine Substratinhibierung eintritt [19, 18].

3.1.1 Der Methanol Metabolismus von *P. pastoris*

Methylorophe Organismen besitzen die Fähigkeit, kohlenstoffbasierte Substrate mit nur einem Kohlenstoffatom (wie Methanol oder Methan) als Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden [20]. *P. pastoris* ist eine von etwa 30 Hefearten, welche in der Lage ist, Methanol zu verstoffwechseln [18]. Der Promoter (P_{AOX1}) des Alkohol-Oxidase-1-Gens (*AOX1*) wird, solange andere Substrate wie Glucose, Glycerin und Ethanol vorliegen, stark unterdrückt. Erst in Abwesenheit dieser Substrate wird eine Induzierung durch Methanol möglich [12]. Diese starke Regulation des Promoters bietet den Vorteil, dass die Wachstumsphase von der Produktionsphase entkoppelt werden kann. Hierdurch können die Ressourcen effizienter für das Wachstum verwendet und die Zellen weniger Stress ausgesetzt werden [12]. Somit sind in kürzerer Zeit höhere Zelldichten möglich und es

können infolgedessen größere Mengen an Proteinen produziert werden. Neben des bereits erwähnten *AOX1* Gens liegt ein zweites Gen für die Metabolisierung des Methanols vor, das *AOX2* Gen. Das *AOX1* Gen ist jedoch stärker, weshalb *AOX2* einen deutlich geringeren Anteil ausmacht. Beide exprimieren eine Alkohol-Oxidase, welche Methanol in Formaldehyd spaltet. Die Gene für *AOX1* und *AOX2* unterscheiden sich lediglich in den Randsequenzen [2]. In Abbildung 3.1 ist die Metabolisierung von Methanol und Sauerstoff zu Kohlendioxid und Wasser vereinfacht dargestellt. Dabei wird Formaldehyd durch die Formaldehyd-Dehydrogenase (*DH1*), der S-Formylglutathion-Hydrolase (*DYH*) und schlussendlich der Formiat-Dehydrogenase (*DH2*) unter Einbindung von O_2 zu CO_2 und H_2O verstoffwechselt.

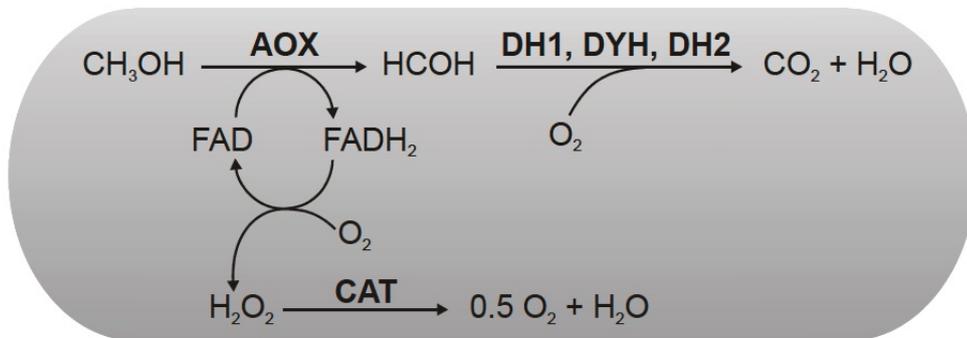


Abbildung 3.1: Metabolisierung von Methanol im Peroxisomen von *P. pastoris* [1].
Quelle: Cornelissen, 2004 [2].

3.2 Das Protein eGFP

Das Protein eGFP (*engl., enhanced Green Fluorescent Protein*) ist eine stärker fluoreszierende Variante des GFP-Wildtyps und hat sich als wichtiges Werkzeug in der Zellbiologie etabliert [21]. Der Wildtyp wurde erstmals 1961 von Osamu Shimomura aus der Quallenart *Aequorea victoria* isoliert und seitdem für die Verwendung von Echtzeitaufnahmen zellulärer Vorgänge optimiert [22, 21]. Das Protein weist bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht eine grüne Eigenfluoreszenz auf, für die weder Cofaktoren noch Substrate benötigt werden [23]. Die Fluoreszenz ist auf kovalente Umstrukturierungen benachbarter Aminosäuren zurückzuführen [23]. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, befindet sich ein farbgebendes Chromophor im Kern einer β -Fass-Struktur und wird so vor Fluoreszenzlöschung durch Wasserdipole, paramagnetischem Sauerstoff oder *cis-trans*-Isomerisierung bewahrt [23]. Die Gensequenz des Wildtyps resultiert nach ihrer Expression in fehlerhaft

prozessierten Quartärstrukturen und folglich großen Mengen an nicht korrekt gefaltetem Protein, welche keine Fluoreszenz aufweisen. Höhere Temperaturen um 37 °C verringern die Effizienz der Proteinfaltung. Dies hat zur Folge, dass in Säugetierzellen keine effektive GFP-Expression möglich ist und vermehrte Aggregatbildung auftritt. Um die Eigenschaften des Proteins zu verbessern, wurde die Gensequenz angepasst und die optimierte eGFP Variante entwickelt [23].

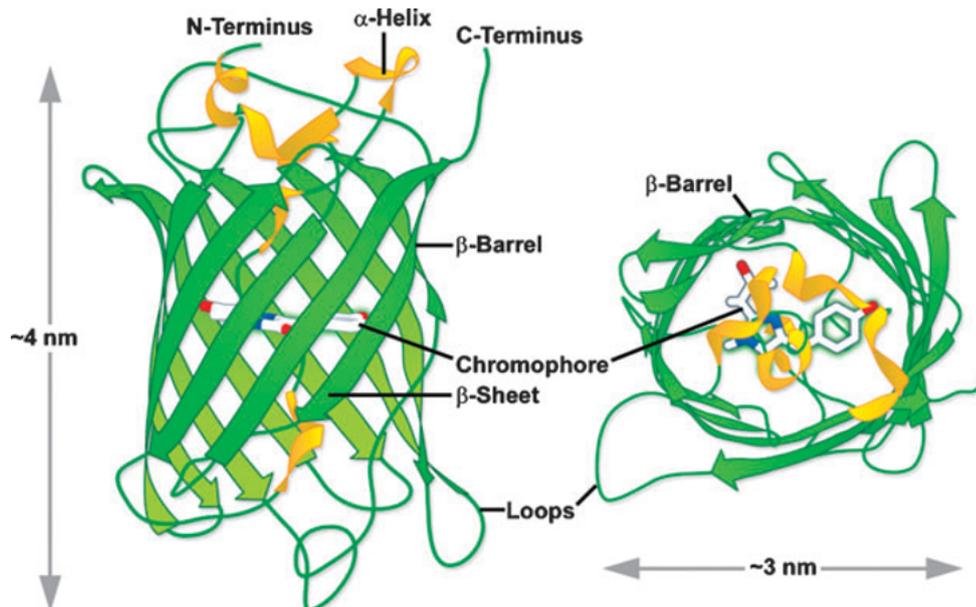


Abbildung 3.2: Struktur des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mit dem β -Fass und dem sich darin befindlichen Chromophor. Quelle: Day, 2009 [3].

3.3 Gasanalyzesysteme

Die meisten Abgasanalyzesysteme für Bioreaktoren setzen den Fokus auf die Messung des Sauerstoff- und Kohlendioxidanteils in der Abluft, da diese Daten viele wichtige Informationen über den Zustand der Kultur verraten [24]. Dennoch können weitere Abgaskomponenten wie z.B. die Anteile von Ethanol, Methanol, Wasserstoff oder Methan von Interesse sein, da diese zusätzlichen Daten für die Massenbilanz liefern können. In dieser Arbeit werden lediglich die prozentuellen Anteile von Sauerstoff und Kohlendioxid gemessen. Diese Messdaten werden durch die parallele Messung von Luftdruck und Luftfeuchtigkeit automatisch kompensiert [25].

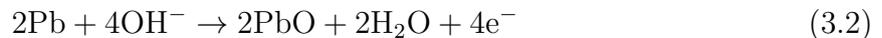
3.3.1 O₂-Messprinzip

In der Abgasanalytik von Sauerstoff in Bioprozessen sind halbleitende, elektrochemische und paramagnetische Sensoren am weitesten verbreitet [26]. In den in dieser Arbeit verwendeten Abgasanalysegeräte der BlueSens gas sensor GmbH sind lediglich elektrochemische Sensoren verbaut. Die Messung basiert dabei auf dem Prinzip einer galvanischen Zelle. Diese besteht aus einer Bleianode und einer Goldkathode, welche sich in einem schwach sauren Elektrolyten befinden [5]. In Abbildung 3.3 ist der Aufbau der Messzelle schematisch dargestellt. Sauerstoffmoleküle aus dem Abgasstrom diffundieren durch eine semipermeable PFC-Membran (häufig aus Teflon) in diese Zelle [27]. Anschließend wandert das O₂ durch den Elektrolyten und wird an der Kathode reduziert [5].

Die Reaktion an der Kathode



zeigt die Reduktion des O₂ zu Hydroxidionen. Die Reaktion an der Anode



zeigt die Oxidation von Pb unter Einbindung von Hydroxidionen. Damit ergibt sich mit



die Gesamtreaktion in der Zelle

Jedes Sauerstoffmolekül setzt zwei Elektronen frei, was zum Stromfluss zwischen den beiden Elektroden führt. Dieser ist proportional zur Sauerstoffkonzentration in der galvanischen Zelle und kann gemessen werden [5].

Eine häufig in BlueSens Abgasanalyzesystemen verbaute Alternative sind Zirkoniumoxid-Sauerstoffsensoren (Abb. 3.4). Diese bestehen aus einer Schicht des halbleitenden Oxids ZrO₂, welche auf jeweils beiden Seiten mit einem dünnen Platin-Film bedeckt ist. Diese

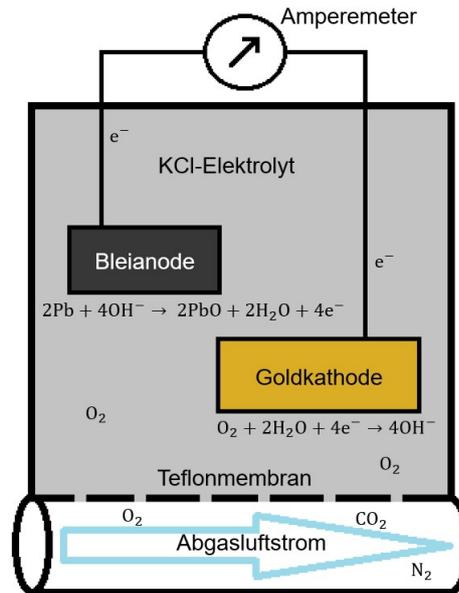


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung vom Messprinzip eines elektrochemischen Sauerstoffsensors. Quelle: In Anlehnung an Goswami un Cooper, 2011 [4].

Platin-Filme dienen als Elektroden. ZrO₂ ist in dem Fall ein fester Elektrolyt, welcher auf 700–800 °C erhitzt und dabei permeabel für Sauerstoffmoleküle wird [26]. Das O₂ wandert in hoher Geschwindigkeit aus dem Abluftstrom durch die Keramikschicht hin zum Referenzluftstrom und verringert dabei den elektrischen Widerstand des Elektrolyten. Die Abnahme des Widerstands korreliert mit der Sauerstoffkonzentration im Abluftstrom [26].

Die ZrO₂-Sauerstoffsensoren sind nicht für Fermentationen in Anwesenheit von entzündlichen Gasen oder flüchtigen organischen Verbindungen wie Methanol geeignet. Diese verbrennen beim Eintreten in die stark erhitzte Messzelle mit dem Sauerstoff, wodurch die Sauerstoffkonzentration in der Abluft künstlich gesenkt wird [27]. Zusätzlich besteht die Gefahr, dass die Messzelle dabei beschädigt wird. Da Methanol als Substrat in der Produktionsphase verwendet wird, ist dieser Typ Sensor nicht für die Fermentation von *P. pastoris* geeignet.

3.3.2 CO₂-Messprinzip

Der Treibhauseffekt beschreibt, dass Gase, welche sich aus mehr als zwei Atomen zusammensetzen, Infrarot-Strahlung oberhalb des sichtbaren Spektralbereichs absorbieren. Treibhausgase, wie CO₂, weisen ein elektrisches Dipolmoment auf und emittieren die vor-

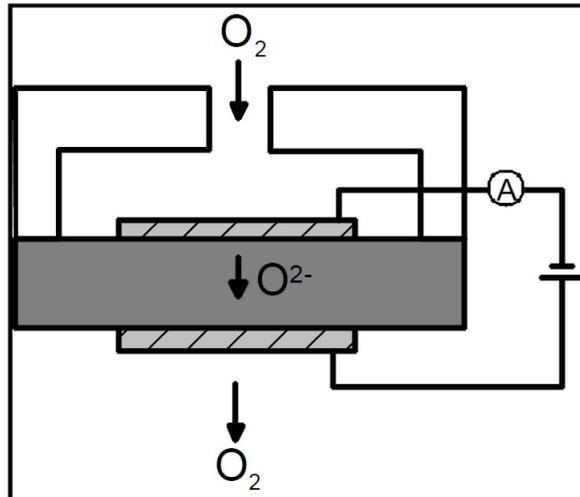


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau einer Zirkoniumoxid Messzelle und das Messprinzip der Sauerstoffmessung. Quelle: BlueVary Manual, BlueSens gas sensors GmbH [5].

her absorbierte Energie über Rotations- und Schwingungszustände [28]. Die Emission erfolgt in alle Richtungen, wodurch die Infrarotstrahlung in ursprünglicher Richtung abgeschwächt wird. Diese Eigenschaft von CO_2 findet in der Abgasanalytik Verwendung, um den Stoffmengenanteil in einem Luftstrom zu bestimmen. CO_2 hat ein Absorptionsmaximum bei $4,28 \mu\text{m}$ [4]. Wird CO_2 -haltiges Gas mit Infrarotstrahlen dieser Wellenlänge bestrahlt, ist die Absorption dem Lambert-Beerschen Gesetz zu Folge proportional zur CO_2 -Konzentration. Das geschwächte Licht wird über Fotodetektoren aufgenommen und in ein elektrisches Signal übersetzt [4]. Temperatur und schwankender Luftdruck haben einen Einfluss auf die Messung, weshalb diese Faktoren kompensiert werden müssen (siehe 3.3.3) [29]. Der Einfluss durch die Luftfeuchtigkeit muss ebenfalls kompensiert werden, da es sich bei Wasserdampf ebenfalls um ein Treibhausgas handelt und somit Infrarotstrahlen absorbiert [28, 26, 27]. Der in den Geräten von BlueSens verbaute CO_2 -Sensor bestrahlt einen gasgefüllten Messadapter mit einem Infrarot-Strahl. Abbildung 3.5 zeigt, wie die Strahlung in dem Messadapter reflektiert und von einem Fotodetektor gemessen wird [25]. Die Strahlungsquelle und der Fotodetektor sind räumlich von dem Gasadapter durch Saphirglas getrennt, welches keine Infrarot-Strahlung absorbiert. Diese Trennung verhindert die Verschmutzung von optischen Bauteilen und das Entweichen der Probe. Um die Kondensation der Abluft im Messadapter zu verhindern, wird der gesamte Sensor beheizt [25].

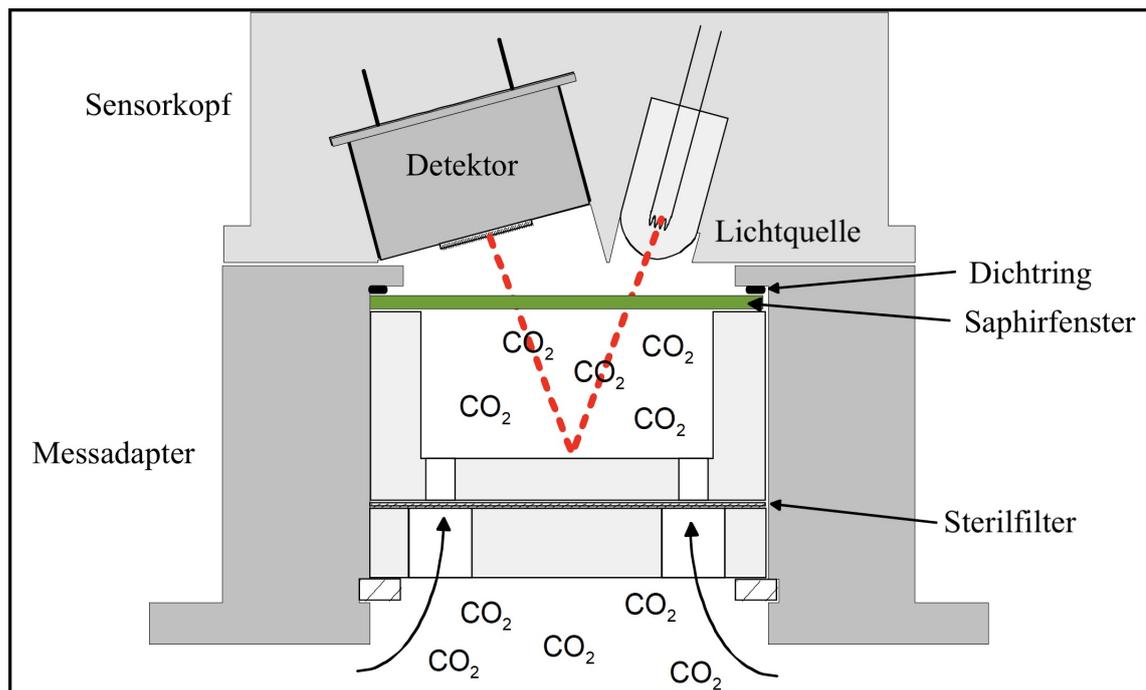


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau eines CO₂-Sensors und das Messprinzip der Kohlendioxidmessung. Quelle: In Anlehnung an BCP CO₂ Manual, BlueSens gas sensors GmbH [6].

3.3.3 Druck- und Feuchtigkeitsmessung

Druck- und Feuchtigkeitsmessungen müssen in der Gasanalytik durchgeführt werden, um Fehler in der O₂- und CO₂-Messung zu kompensieren. Der Druck wird gemessen, da plötzliche Veränderungen im Luftdruck einen Einfluss auf die Partialdrücke von p_{OL} und p_{CL} in der Flüssigphase haben. Die Stoffe können dann in die Gasphase treten, in der sie von dem Messsystem registriert werden, obwohl sich die Konzentration nicht verändert hat [27]. Die Luftfeuchtigkeitskompensation wird angewandt, da Wasser aus der Flüssigphase verdunstet und, trotz Abluftkühlung, aus dem System getragen wird. Dadurch ist der Druck in der Abluft höher als in der Zuluft, da der Partialdruck des Wasserdampfes steigt. Mit dem Steigen des Partialdrucks werden die Anteile von O₂ und CO₂ künstlich gesenkt. Um die tatsächlichen Stoffanteile von O₂ und CO₂ messen zu können, muss daher die relative Luftfeuchtigkeit gemessen und kompensiert werden.

Als Drucksensor ist in den Analysegeräten von BlueSens ein piezoresistiver Siliziumdrucksensor verbaut [25, 5]. Bei diesem Typ Sensor handelt es sich vereinfacht um eine dünne Siliziummembran, welche bei kleinsten Druckveränderungen gedehnt wird. Durch diese Dehnung verändert sich der Widerstand des piezoresistiven Drucksensors, was sich in

einer Spannungsmessung bemerkbar macht [30]. Die Luftfeuchtigkeit wird über einen kapazitiven Polymerfühler gemessen. Dieser misst die Luftfeuchtigkeit über Adsorption von Wasserdampf am Sensor, wodurch sich dessen Kapazität verändert. Die Adsorption verändert die Frequenz eines Oszillators, welches in eine Signalspannung übersetzt werden kann. Da beide Messsysteme temperaturabhängig sind, müssen die Temperatur hier ebenfalls bestimmt und die Messergebnisse kompensiert werden.

3.4 Prozessparameter in der Abgasanalytik

Die Versorgung des Bioreaktors mit O_2 spielt in der aeroben Fermentation eine entscheidende Rolle. Über die Abgasanalyse kann durch die Messung der O_2 - und CO_2 -Anteile (x_{OG} und x_{CG}) eine Bilanzierung aufgestellt werden. In Abbildung 3.6 werden relevante Parameter der Sauerstoffversorgung und der Kohlendioxidproduktion dargestellt. Die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2}

$$Q_{O_2}(t) = Q_{O_{2in}}(t) - Q_{O_{2out}}(t) = OTR(t) = OUR(t) \quad (3.4)$$

mit

Q_{O_2}	:=	Sauerstoffeintragsrate	$[g\ l^{-1}h^{-1}]$
$Q_{O_{2in}}$:=	Sauerstoffeintragsrate in den Bioreaktor	$[g\ l^{-1}h^{-1}]$
$Q_{O_{2out}}$:=	Sauerstoffaustragsrate aus dem Bioreaktor	$[g\ l^{-1}h^{-1}]$
OTR	:=	Sauerstofftransferrate	$[g\ l^{-1}h^{-1}]$
OUR	:=	Sauerstoffaufnahme	$[g\ l^{-1}h^{-1}]$

beschreibt die Menge an Sauerstoff, welche pro Zeiteinheit in das System eingetragen und verbraucht wird.

Dabei wird angenommen, dass die Differenz zwischen eingetragenen und ausgetragenen O_2 vollständig im Medium gelöst und an keiner anderen Stelle akkumuliert ist. Unter der Annahme des Fließgleichgewichts entspricht die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} der Sauerstofftransferrate OTR und der Sauerstoffaufnahme OUR durch den Organismus [2]. In dieser quasistationären Sauerstoffversorgung beschreibt die OTR die Rate, mit der Sauerstoff über die Begasungsluft ins Medium eingetragen wird und somit die Phasengrenze zwischen Gasphase und Flüssigphase überwindet. Die OUR beschreibt hingegen die Rate, mit der Sauerstoff vom Organismus aufgenommen wird.

Dem entgegen beschreibt die Kohlendioxidaustragsrate die Menge an CO_2 , welche aus dem System ausgetragen wird. CO_2 wird von den Mikroorganismen als Endprodukt des Stoffwechsels in die Flüssigphase abgegeben, welches durch die Kohlendioxidentwicklungsrate CER beschrieben wird. Die Kohlendioxidentwicklungsrate

$$\text{CER}(t) \stackrel{!}{=} \text{CTR}(t) = Q_{\text{CO}_2\text{out}}(t) - Q_{\text{CO}_2\text{in}}(t) = Q_{\text{CO}_2}(t) \quad (3.5)$$

CER	:=	Kohlendioxidentwicklungsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
CTR	:=	Kohlendioxidtransferrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q _{CO₂}	:=	Kohlendioxidaustragsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q _{CO₂in}	:=	Kohlendioxideintragsrate in den Bioreaktor	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
Q _{CO₂out}	:=	Kohlendioxidaustragsrate aus dem Bioreaktor	[g l ⁻¹ h ⁻¹]

kann jedoch nicht in jedem Fall mit der Kohlendioxidtransferrate CTR gleichgesetzt werden. Die CTR beziffert die Rate, mit der CO_2 in die Gasphase übertragen wird. Anders als O_2 liegt CO_2 , abhängig vom pH-Wert, als CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} und H_2CO_3 in der Flüssigphase vor. Bei einer Kultivierung mit $\text{pH} \leq 5$ liegt das Stoffwechselprodukt jedoch überwiegend als CO_2 vor [31]. Zu Beginn der Begasung findet eine Übertragung von CO_2 von der Gasphase in die Flüssigphase statt. Sobald die Flüssigphase mit CO_2 gesättigt ist, kann hier ebenfalls von einem Fließgleichgewicht in Richtung Gasphase ausgegangen werden. Die Kenngröße $Q_{\text{O}_2\text{max}}$

$$Q_{\text{O}_2\text{max}}(t) = \frac{F_{\text{nG}}(t) \cdot M_{\text{O}_2}}{V_{\text{nM}} \cdot V_{\text{L}}(t)}, \quad (3.6)$$

Q _{O₂max}	:=	Maximale Sauerstoffangebotsrate	[g l ⁻¹ h ⁻¹]
F _{nG}	:=	Gesamtbelegungsrate	[l h ⁻¹]
M _{O₂}	:=	Molare Masse vom Sauerstoff	[g mol ⁻¹]
V _{nM}	:=	Molares Volumen bei Normbedingungen	[l mol ⁻¹]
V _L	:=	Volumen der Flüssigphase	[l]

beschreibt die maximal mögliche Sauerstoffangebotsrate.

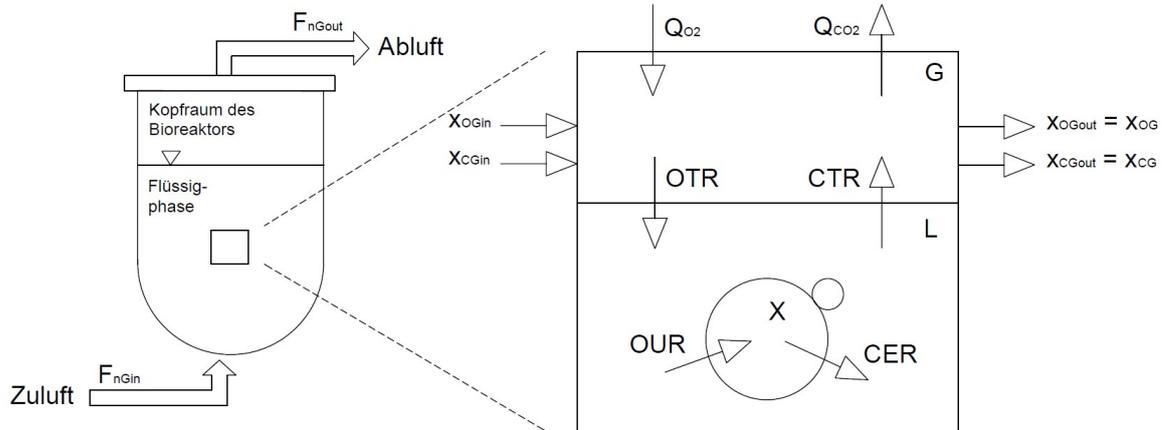


Abbildung 3.6: Makroskopische Volumenelement eines Bioreaktors. Quelle: In Anlehnung an Cornelissen, 2014 [2].

F_{nGin}	:=	Zulufrate	$[l \text{ h}^{-1}]$
F_{nGout}	:=	Ablufrate	$[l \text{ h}^{-1}]$
x_{OGin}	:=	Stoffmengenanteil von O_2 in der Zuluft	$[-]$
x_{OG}	:=	Stoffmengenanteil von O_2 in der Abluft	$[-]$
x_{CGin}	:=	Stoffmengenanteil von CO_2 in der Zuluft	$[-]$
x_{CG}	:=	Stoffmengenanteil von CO_2 in der Abluft	$[-]$

Mit Q_{O2max} und den online gemessenen Stoffmengenanteilen kann die Sauerstoffeintragsrate Q_{O2}

$$Q_{O2}(t) = Q_{O2max}(t) \cdot \frac{x_{OGin}(t) \cdot [1 - x_{CG}(t)] - x_{OG}(t) \cdot [1 - x_{CGin}(t)]}{1 - x_{OG}(t) - x_{CG}(t)} \quad (3.7)$$

bestimmt werden. Im gleichen Schema kann aus der maximal möglichen Kohlendioxidangebotsrate Q_{CO2max}

$$Q_{CO2max}(t) = \frac{F_{nG}(t) \cdot M_{CO2}}{V_{nM} \cdot V_L(t)}, \quad (3.8)$$

Q_{CO2max}	:=	Maximale Kohlendioxidangebotsrate	$[g \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}]$
M_{CO2}	:=	Molare Masse vom Kohlendioxid	$[g \text{ mol}^{-1}]$

die Kohlendioxidaustragsrate Q_{CO2}

Modell von Lewis und Whitman (1923) modelliert einen mehr-phasigen O₂-Transport. In diesem Modell wird angenommen, dass zwischen den Phasengrenzflächen von Gas und Flüssigkeit eine laminare Grenzschicht existiert und dort ein diffusiver Stofftransport stattfindet [32]. Unmittelbar an der Grenzfläche stehen der Sauerstoffpartialdruck p_{OG} in der Gasphase und die O₂-Konzentration c_{OL} im Gleichgewicht. Weiter von der Grenzfläche entfernt weichen O₂-Partialdruck und -konzentration voneinander ab. Es liegt also ein Konzentrationsgefälle vor.

Die Sauerstofftransferrate OTR, die an der Grenzschicht stattfindet, kann mit der Formel 3.13 beschrieben werden.

$$OTR(t) = k_L \cdot \frac{A}{V_L(t)} \cdot (c_{OL}^*(t) - c_{OL}(t)) \stackrel{!}{=} Q_{O_2}(t) \quad (3.13)$$

k_L	:=	Stofftransportkoeffizient	[l h ⁻¹]
A	:=	Blasenoberfläche	[m ²]
c_{OL}^*	:=	Sauerstoffkonzentration in der Gasphase neben der Grenzfläche	[g l ⁻¹]
c_{OL}	:=	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase	[g l ⁻¹]

Der Stofftransportkoeffizient k_L ist die „treibende Kraft“ hinter dem Gasaustausch zwischen Gas- und Flüssigphase. Der Quotient aus Phasengrenzfläche und Flüssigkeitsvolumen kann messtechnisch nur schwer bestimmt werden und wird aus diesem Grund unter Berücksichtigung des Gasvolumens zu a vereint [33]. Zusammengefasst mit k_L ergibt sich der volumetrische Stofftransportkoeffizient $k_L a$ [32]. Die Kenntnis dieses Koeffizienten ist wichtig, um die Effektivität der Belüftung zu identifizieren und einen Prozess mit anderen zu vergleichen. Zudem stellt der $k_L a$ einen wichtigen *scale-up*-Faktor dar [34]. Für die Bestimmung der Sauerstoffeintragsrate wird $k_L a$ in Formel 3.13 mit der Differenz zwischen der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase und der Sauerstoffkonzentration unmittelbar neben der Phasengrenzfläche multipliziert. Die Sauerstoffkonzentration kann über eine pO₂-Sonde nicht direkt gemessen werden, weshalb die Differenz über einen Umweg berechnet werden muss. Die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase an der Phasengrenze $c_{OG} = c_{OL}^*$ steht nach dem Zwei-Film-Modell im Gleichgewicht mit dem Partialdruck der Zuluft p_{OG} . Mit dem Henry-Koeffizienten für O₂ und dem Druck in der Gasphase kann die CO₂-Konzentration einer maximal gesättigten Flüssigphase (ohne Verbraucher)

$$c_{OLmax}(t) = \frac{p_G(t)}{H_{O_2}(t)} \quad (3.14)$$

c_{OLmax}	:=	Maximal sauerstoffgesättigte Flüssigphase	[g l ⁻¹]
H_{O_2}	:=	Henry-Koeffizient	[Nm kg ⁻¹]

bestimmt werden. Die Berechnung des Henry-Koeffizienten ist im Anhang in Abschnitt 9.4 beschrieben. Die Sauerstoffkonzentration c_{OL100} liegt vor, sobald die kalibrierte pO_2 -Sonde einen Wert von 100 % misst (Formel 3.15).

$$c_{OL100}(t) = \frac{p_{Gcal} \cdot x_{OGcal}}{H_{O_2}(t)} \quad (3.15)$$

c_{OL100}	:=	Sauerstoffkonzentration bei $pO_2 = 100\%$	[g l ⁻¹]
p_{Gcal}	:=	Luftdruck während der Kalibrierung der pO_2 -Sonde	[N m ⁻²]
x_{OGcal}	:=	Sauerstoffanteil während der Kalibrierung der pO_2 -Sonde	[-]

Die Differenz $c_{OL}^* - c_{OL}$ kann nun durch das Produkt aus c_{OLmax} , der Sauerstoffkonzentration in der Abluft, dem Produkt aus c_{OL100} und dem aktuellen pO_2 -Wert ersetzt werden. Zusammengefasst mit den Formeln 3.4 und 3.13 ergibt sich die Formel für k_{La} :

$$k_{La}(t) = \frac{Q_{O_2}(t) \cdot 100\%}{c_{OLmax}(t) \cdot x_{O_2}(t) - c_{OL100}(t) \cdot pO_2(t)} \quad (3.16)$$

pO_2	:=	Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase	[%]
k_{La}	:=	Volumetrischer Stofftransportkoeffizient	[h ⁻¹]
x_{O_2}	:=	Sauerstoffanteil in der Abluft in Prozent	[%]

Diese Art der Bestimmung von k_{La} wird Fließgleichgewichtsmethode genannt. Alternative Methoden zur Bestimmung von k_{La} sind unter anderem die dynamische Methode und die Sulfit-Methode [35].

3.5 Kultivierungsstrategie

In dieser Arbeit wird eine Hochzelldichtekultivierung durchgeführt, in der kontrolliert und in kürzester Zeit möglichst viel Produkt gewonnen werden soll. Der dreistufige Kultivierungsprozess ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die erste Stufe des Prozesses setzt sich aus

einer Adaptionsphase, der sogenannten Lag-Phase, und einer exponentiellen Wachstumsphase zusammen. Diese unlimitierte Wachstumsphase wird Batch-Phase genannt. In der anschließenden Fed Batch-Phase wird substratlimitiert die Zelldichte erhöht. Abschließend wird eine Produktionsphase eingeleitet, in der Methanol induziert das Produkt produziert werden soll.

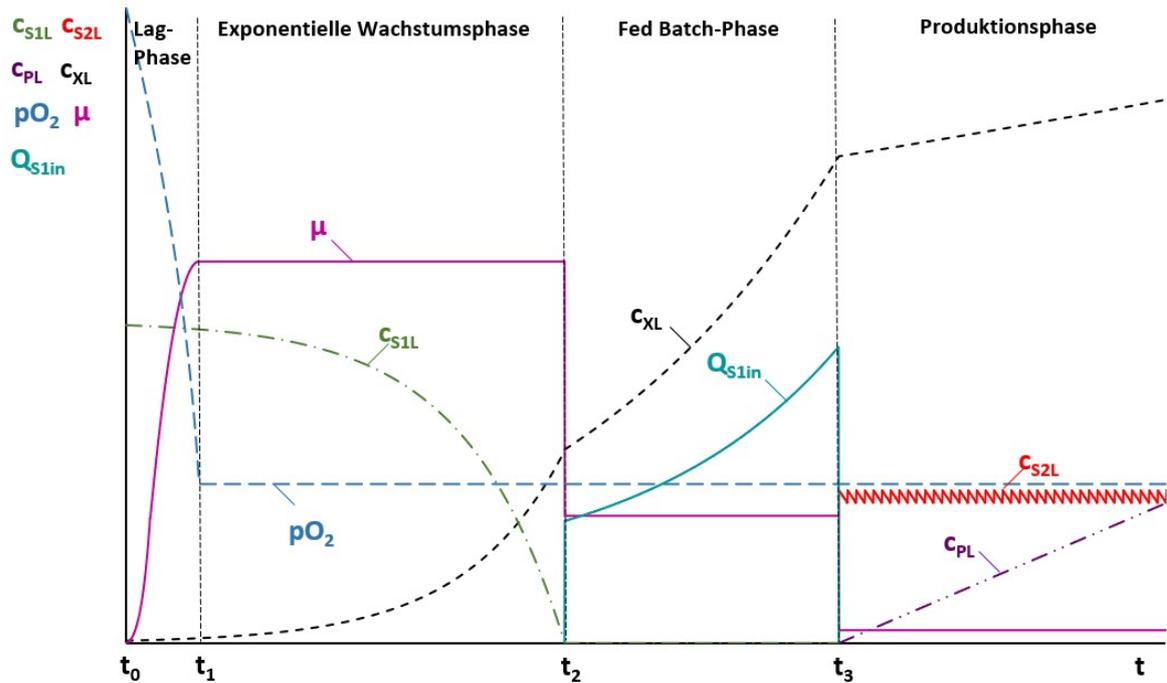


Abbildung 3.7: Der theoretische Verlauf einer mehrstufigen Hochzelldichtekultivierung. Quelle: In Anlehnung an Cornelissen, 2004 [2].

c_{S1L}	:=	Konzentration vom Substrat 1 (Glycerin) in der Flüssigphase	$[g\ l^{-1}]$
c_{S2L}	:=	Konzentration vom Substrat 2 (Methanol) in der Flüssigphase	$[g\ l^{-1}]$
c_{PL}	:=	Produktkonzentration (eGFP)	$[g\ l^{-1}]$
c_{XL}	:=	Zellkonzentration	$[g\ l^{-1}]$
μ	:=	Zellspezifische Wachstumsrate	$[h^{-1}]$
Q_{S1in}	:=	Volumetrische Substratzufütterrate von S1	$[g\ l^{-1}h^{-1}]$

3.5.1 Batch-Phase

Mit der Zugabe eines Inokulums in den Bioreaktor beginnt die Batch-Phase. Da sich die Zellen zunächst an die neuen Kultivierungsbedingungen gewöhnen müssen, beginnt

das Zellwachstum langsam mit einer Adaptionsphase. Diese kann verkürzt werden, wenn die Zellen unlimitiert wachsend aus einer Vorkultur stammen. Sobald sich die Zellen an die veränderten Wachstumsbedingungen angepasst haben, stellt sich die zellspezifische Wachstumsrate $\mu_{1\max}$ ein. Im Medium liegt eine definierte Menge an Substrat vor, während die Sauerstoffkonzentration durch die pO_2 -Regelung über die Rührerdrehzahl N_{St} konstant bei mindestens 25 % ist. Daher wachsen die Zellen unlimitiert exponentiell, solange Substrat vorliegt. Die Menge an Substrat im Medium muss begrenzt werden, da andernfalls eine Substratinhibierung eintritt, welche die Enzymaktivität beeinträchtigt [31]. Während die Zellkonzentration exponentiell zunimmt, sinkt die Substratkonzentration entsprechend exponentiell ab. Sobald das Substrat aufgebraucht ist, kommt die Zellteilung zum Erliegen. Da die respiratorische Zellatmung an diesem Punkt ausgesetzt wird, sinkt der Sauerstoffverbrauch schlagartig. Die starke Veränderung des Sauerstoffverbrauchs initialisiert die Fed Batch-Phase. Der Sauerstoffverbrauch wird über pO_2 und folglich auch über N_{St} beobachtet.

3.5.2 Fed Batch-Phase

In der halbkontinuierlichen Prozessführung der Fed Batch-Phase wird mit einem vorher definierten Zufütterungsprofil exponentiell Substrat (S1) in den Bioreaktor gegeben. Die Zellen wachsen kontrolliert mit einer Wachstumsrate von $\mu_{1w} < \mu_{1\max}$. Die Wachstumsrate wird limitiert, damit aufgrund der gestiegenen Zellkonzentration eine ausreichende Sauerstoffversorgung über Druckluft sichergestellt werden kann [2]. Das zugefütterte Substrat wird sofort von den Zellen aufgenommen und metabolisiert, weshalb die Substratkonzentration in der Flüssigphase nahe null liegt (siehe Abb. 3.7).

3.5.3 Produktionsphase

Mit dem Ende der Fed Batch-Phase wird die Produktionsphase initialisiert, in der Methanol (S2) in regelmäßigen Abständen in den Bioreaktor gegeben wird. Nachdem sich die Zellen auf das neue Substrat eingestellt haben, wachsen die Zellen mit einer Wachstumsrate $\mu_{2\max} < \mu_{1w} < \mu_{1\max}$. Da Methanol höher konzentriert zelltoxisch ist, wird die Methanolkonzentration c_{S2L} auf etwa $1,5 \text{ g l}^{-1}$ gehalten. Das Methanol wird von *P. pastoris* als Substrat für die Zellatmung und den Aufbau von Biomasse verwendet. Gleichzeitig induziert das Methanol die Proteinproduktion vom eGFP über das *AOX1*-Gen.

4 Material und Methoden

4.1 Der Bioreaktor BIOSTAT[®] A

Der Bioreaktor BIOSTAT[®] A von Satorius Stedim Biotech setzt sich aus einer Basiseinheit und einem Kulturgefäß zusammen. Das einwandige Kulturgefäß aus Borosilikatglas hat ein Gesamtvolumen von 3 Litern, wobei das Arbeitsvolumen 2 Liter beträgt. Das Glasgefäß befindet sich in einem Stativ aus Edelstahl und kann auf der Oberseite mit einem Deckel aus Edelstahl fest verschlossen werden. Auf dem Deckel befinden sich insgesamt 14 Öffnungen mit unterschiedlichen Durchmessern für die Sonden und Korrektur- bzw. Feed-Zugaben. Zuluftschlauch und Abluftkühler werden ebenfalls an diesen Öffnungen befestigt. Außerdem befinden sich auf dem Deckel Verschraubungen, damit dieser händisch mit dem Stativ verbunden werden kann. Zwei Griffe erlauben dem Anwender das Gefäß samt Stativ und Deckel zu bewegen. In der Mitte des Deckels befindet sich eine Wellendichtung mit einfacher Gleitringdichtung. An der Unterseite des Deckels ist die Rührwelle, der Begasungsring und ein Schikanekorb angebracht. An der Rührwelle sind zwei 6-Blatt-Scheibenrührer befestigt. Auf der Oberseite befindet sich ein Rührwellenlager, auf den der Motor aufgesetzt wird. Der Bioreaktor mit der Kontrolleinheit und der Instrumentierung ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

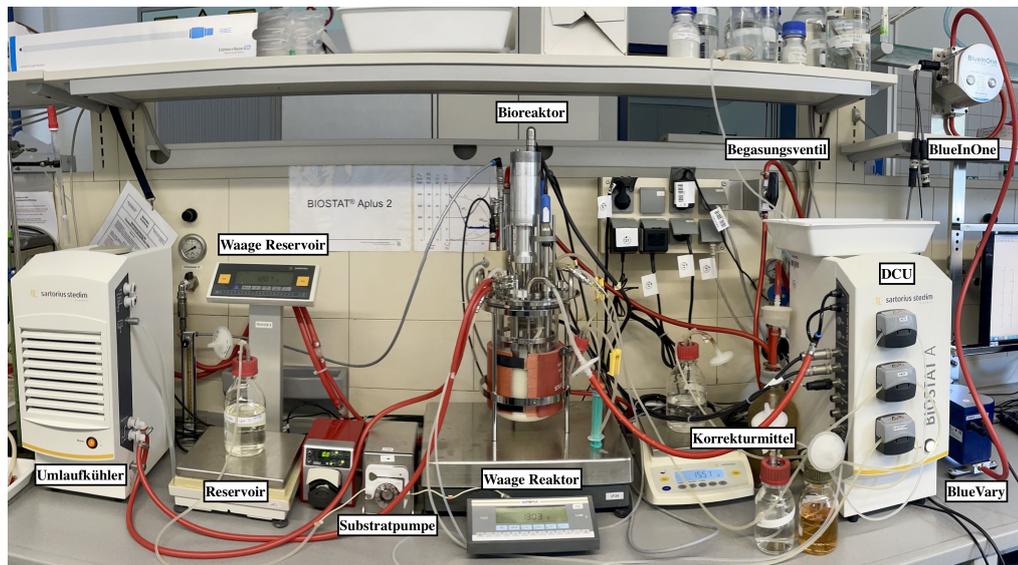


Abbildung 4.1: Der Arbeitsplatz im Labor mit dem Bioreaktor, der DCU und der Instrumentierung.

4.1.1 Basiseinheit (DCU)

Die Basiseinheit, auch DCU (*engl., digital control unit*) genannt, setzt sich aus zwei Einheiten zusammen. Die Haupteinheit, BIOSTAT[®] A genannt, ist das Kontrollsystem und für die Regelung der Prozessparameter zuständig. Daran befinden sich die Begasungsmodule und die Anschlüsse für die pO₂-, pH- und Levelsonde. Die Begasung wird im Inneren des Gerätes über MFC (*engl., mass flow controller*) geregelt. Auf der Vorderseite befinden sich Schlauchpumpen für die Korrekturmittel Säure, Base und Antischaummittel. Über den Anschluss „Heating Blanked“ kann eine Heizmanschette angeschlossen werden, welche für die Temperierung des Mediums verantwortlich ist. Die Kühlung ist hingegen durch die zweite Einheit, einen Umlaufkühler, realisiert. Dieser kühlt das Medium über einen Kühlfinger auf die geregelte Temperatur herab. Über eine Öffnung auf der Oberseite muss der Umlaufkühler regelmäßig mit VE-Wasser aufgefüllt werden, damit eine ausreichende Kühlleistung gewährleistet werden kann [36].

4.1.2 Instrumentierung

Belüftung

Die O₂-Versorgung und die Austragung von CO₂ erfolgen über die Belüftung mit Druckluft ($F_{nG} = F_{nAIR}$). Diese setzt sich zum größten Teil aus Stickstoff und O₂ zusammen, jedoch ist darin auch CO₂ enthalten. Der O₂-Anteil in der Luft liegt bei $x_{O_{AIR}} = 0,2097$ und der CO₂-Anteil bei $x_{CAIR} = 0,0004$. Diese Werte sind von BlueSens in der Software für die 1-Punkt-Kalibrierung hinterlegt [5, 25]. Die Zuluft wird in die Basiseinheit des BIOSTAT[®] A geführt und durch den MFC auf die gewünschten Begasungsrate geregelt. In dieser Arbeit wird eine Belüftungsrate von 1 vvm (Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium pro Minute) angestrebt. Bei einem ungefähren Volumen von 1,5 l nach der Fed Batch-Phase entspräche dies einer Begasungsrate von $F_{nG} = 1,5 \text{ l min}^{-1}$.

pH-Messung

Der pH-Wert wird online mit einer pH-Sonde von Endres+Hauser[®] gemessen. Der Sensor ist über einen speziellen Anschlusskopf mit der DCU verbunden, der nicht durch Feuchtigkeit oder Korrosion beeinflusst wird. Die pH-Messung basiert auf einem potentiometrischen Messprinzip [37]. Die pH-Elektrode ist aus einer Arbeits- und einer Referenzelektrode aufgebaut. Im Inneren befindet sich die Arbeitselektrode, welche mit einem Innenelek-

trolyt (KCl-Lösung, pH 7) befüllt ist. An der Unterseite befindet sich eine Glasmembran, welche mit der zu messenden Lösung in Kontakt kommt. Wasserstoffionen sammeln sich in einer sogenannten Quellschicht und bauen ein elektrisches Potential auf. Bei der Referenzelektrode handelt es sich um eine Ag/AgCl-Elektrode, welche ein konstantes Potential besitzt. Diese ummantelt die Arbeitselektrode und ist an der Unterseite durch ein Diaphragma vor der Messlösung geschützt [29]. Die gemessene Potentialdifferenz zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode wird, abhängig von der Kalibrierung, über die Nernst-Gleichung mit einem jeweiligen pH-Wert in Zusammenhang gebracht. Der Messwert muss temperaturkompensiert werden. Die Temperaturmessung erfolgt über einen in die pH-Elektrode eingebauten Temperaturfühler. Die pH-Elektrode muss vor jeder Kultivierung kalibriert und kann vollständig autoklaviert werden. Die Kalibrierung erfolgt über das Steuerungssystem (Abschn. 4.3.2).

Temperaturmessung

Die Temperaturmessung erfolgt über den im pH-Sensor integrierten Temperaturfühler. Der verbaute NTC 30K-Temperatursensor ist ein Widerstandstemperatursensor mit negativem Temperaturkoeffizienten (NTC = *engl., negative temperature coefficient*). Bei einer Temperatur von 25 °C besitzt das Metalloxid im Sensor einen Widerstand von 30 kΩ. Mit steigender Temperatur sinkt dieser Widerstand, welcher messtechnisch ermittelt werden kann. Diese Art von Sensor eignet sich vorrangig für die Messung geringer Temperaturdifferenzen [38].

pO₂-Messung

Die pO₂-Messung erfolgt über den amperometrischen Sauerstoffsensormemosens Oxy-max COS22D von Endres+Hauser[®]. Dieser ist ebenfalls über einen Steckkopf mit der DCU verbunden und kommuniziert über ein digitales Signal. Die Messung des gelöstsauerstoffgehalts im Medium basiert auf dem Prinzip der Clark-Elektrode. Dabei wandert Sauerstoff durch eine gasdurchlässige Membran in den Elektrolytraum, worin sich eine Platinkathode befindet. Die Menge an diffundierendem Sauerstoff ist dabei abhängig von dem Sauerstoffpartialdruck im Medium. Der gelöste Sauerstoff wird dann an einer Platinkathode reduziert und dabei mit Wasser in Hydroxydionen umgewandelt. Der dabei entstehende Strom ist proportional zur gelöstsauerstoffkonzentration in der Elektrode und wird messtechnisch erfasst. Die Gegenelektrode ist eine Silberanode, bei der Silber zu Silberchlorid oxidiert und Elektronen abgibt. Die Silberanode dient hierbei als Referenz

[29]. Die Reaktion ist temperaturabhängig, weshalb eine Kompensation notwendig ist. Aus diesem Grund ist in dem Sensor ein NTC-Temperaturfühler verbaut [39]. Die pO₂-Sonde muss nach dem Autoklavieren an die DCU angeschlossen und für mindestens 6 Stunden polarisiert werden. Die Kalibrierung erfolgt manuell über das Steuerungssystem (Abschn. 4.3.2). Die Zwei-Punkt-Kalibrierung erfolgt über die Begasung von Stickstoff und Luft. Zunächst wird der Reaktor mit Stickstoff begast. Dabei wird das Medium auf Betriebstemperatur erwärmt und gerührt. Ist der gesamte Sauerstoff aus dem Medium verdrängt und der Messwert konstant, wird der Nullpunkt manuell gespeichert. Anschließend wird der Bioreaktor mit Luft begast und der gemessene Strom des sauerstoffgesättigten Mediums als Steigungswert gespeichert.

Methanoldmessung

Die Methanoldmessung erfolgt über eine im BPA-Labor weiterentwickelte Methanolsonde. Ein Trägerstrom - bestehend aus Druckluft - strömt durch die Sonde und füllt eine Messzelle. Wie in Abbildung 4.2 erkennbar, ist die Sonde über eine Membran in Kontakt mit dem Medium, wodurch das Methanol in die Messzelle diffundieren kann. Der Trägerstrom strömt dann mit einer konstanten Flussrate an einem Alkoholsensor vorbei. Der Alkohol verringert mit steigender Konzentration den Widerstand am Sensor. Dieser Widerstand wird über einen Spannungsabfall gemessen und im Nachhinein zu einem Widerstandswert zurückgerechnet. Über eine Kalibrierung kann dieser Widerstandswert einem prozentualen Methanolanteil in der Flüssigphase zugeordnet werden. Das Verhältnis von gemessenem Widerstand zu Methanol, bzw. Alkoholkonzentration ist bei dem verwendeten Sensor doppelt-logarithmisch. Der Sensor muss vor der Verwendung über einige Stunden auf Betriebstemperatur gebracht werden. Andere organische Dämpfe werden ebenfalls durch den verwendeten Sensor gemessen und können dadurch den Messwert für die Methanolkonzentration verfälschen. Die Methanolkonzentration wird in Vol.-% über MFCS/win dargestellt. Dieser Wert kann über

$$c_{S2L}(t) = \frac{x_{S2L}(t) \cdot \rho_{S2}}{100\%} \quad (4.1)$$

c_{S2L}	:=	Methanolkonzentration in der Flüssigphase	[g l ⁻¹]
x_{S2L}	:=	Stoffmengenanteil von Methanol in der Flüssigphase	[Vol.-%]
ρ_{S2}	:=	Dichte von Methanol bei 22 °C	[g l ⁻¹]

in g l^{-1} umgerechnet werden.

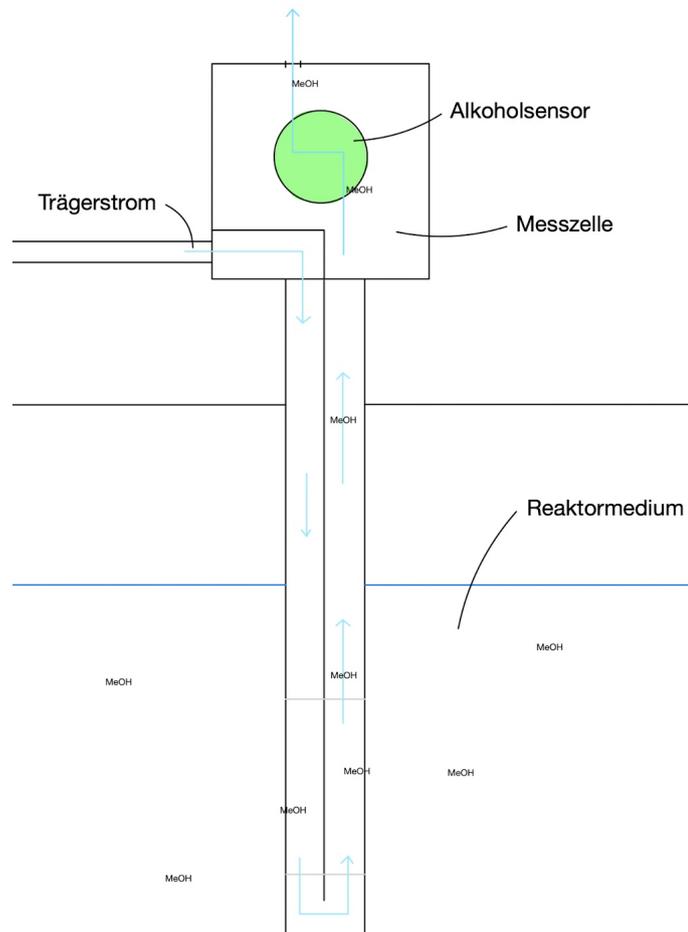


Abbildung 4.2: Das Messprinzip der Methanolsonde vereinfacht dargestellt. Ein definierter Trägerstrom fließt in die Messzelle. Die Messzelle ragt in das Medium hinein. Das Medium kommt dabei mit einer Methanol durchlässigen Membran in Kontakt, wodurch Methanol in den Trägerstrom übergehen kann. Das Methanolgehalt im Trägerstrom kann dann von einem Alkoholsensor detektiert werden. Quelle: Eigene Darstellung.

Schaumdetektion

Die Levelsonde ist an dem Reaktordeckel angebracht und signalisiert Schaumbildung im Reaktor. Der Sensor misst die Leitfähigkeit und gibt ein Signal aus, sobald er in Berührung mit Schaum kommt. Als Konsequenz wird über eine Schlauchpumpe Antischaummittel in den Bioreaktor gegeben, um das Schaumniveau zu senken.

Probenahme

Für die Bestimmung der OD, BTM und und Fluoreszenz müssen Proben entnommen werden. Die Probenahme erfolgt in regelmäßigen Abständen über ein Tauchrohr im Reaktordeckel. Die Einheit für die Probenahme besteht aus einem 15 ml Probenröhrchen, woran drei Schläuche an der oberen Öffnung angeschlossen sind. Der erste Schlauch ist mit dem Tauchrohr im Reaktor verbunden, ein weiterer über ein 0,45 µm Sterilfilter mit einer Laborspritze und der letzte entlässt die Probe in den unsterilen Raum. Für die Probenahme muss die Schlauchklemme am Reaktor geöffnet werden, während die Klemme am Auslassschlauch geschlossen bleibt. Dann wird die Laborspritze aufgezogen bis sich die gewünschte Menge an Probe in dem Probenröhrchen befindet. Anschließend wird die Schlauchklemme am Reaktorende geschlossen, wobei die zweite geöffnet wird. Dann kann die Probe über die Laborspritze aus dem Probenröhrchen gepumpt werden. Die erste Probe wird bei jeder Probennahme verworfen, um verbliebenes Medium von der vorherigen Probenahme zu entfernen. Es werden bei jeder Probennahme etwa 10 ml Probe verworfen und 5 ml in einem 15 ml Falcon Röhrchen für die nachfolgende Analytik aufgefangen.



Abbildung 4.3: Die Instrumentierung zur Probenahme. Nach dem Öffnen der oberen Schlauchklemme kann mit der Laborspritze eine Probe aus dem Bioreaktor aufgezogen werden. Durch Schließen der oberen und dem Öffnen der unteren Schlauchklemme kann die Probe aus dem Röhrchen gepumpt werden.

Korrekturmittel

Die Korrekturmittel werden über Schlauchpumpen in den Reaktor eingetragen. Die Kalibrierung der Schlauchpumpen erfolgt über das Pumpen einer definierten Menge der Flüssigkeit in einen Messkolben. Dabei wird die Zeit gemessen, anschließend die Pumprate in $l\ h^{-1}$ berechnet und in das Steuerungssystem eingetragen (Abschn. 4.3.2). Alternativ bietet die Software ein Tool für die schrittweise Kalibrierung der Pumpen an. Die verwendeten Korrekturmittel sind im Anhang aufgelistet (Tab. 9.5).

Überwachung des Volumens der Flüssigphase

Das Volumen der Flüssigphase V_L ist ein wichtiger Parameter in der Berechnung von Q_{O_2} und Q_{CO_2} (Formel 3.7 und 3.9). Das Volumen verändert sich insbesondere in der Fed Batch-Phase stetig durch das exponentielle Zugeben von Substrat und der stündlichen Probenahme. Um das Volumen zu jedem Zeitpunkt in die Berechnung einfließen zu lassen, muss es gemessen werden. Dies geschieht über die Reaktorwaage (siehe Abbildung 4.1). Um den gemessenen Wert der Waage korrekt zu tarieren, müssen die nachfolgenden Schritte befolgt werden. Zunächst werden alle Zugänge, Sensoren und der Motor an den Bioreaktor angeschlossen. Der Reaktor soll in diesem Moment theoretisch betriebsbereit sein und die Waage infolgedessen tariert. Anschließend wird das Reaktormedium über ein Trichter hinzugegeben. Der Wert, den die Waage anzeigt, wird notiert. Der Reaktor wird im nächsten Schritt für das Autoklavieren vorbereitet und schließlich autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird der Reaktor wieder für den Betrieb vorbereitet. Hat sich am Reaktorgewicht etwas verändert, kann davon ausgegangen werden, dass dies durch Verdunstung des Reaktormediums entstanden ist. Mit sterilisiertem VE-Wasser kann das vor dem Autoklavieren bestimmte Volumen wiederhergestellt werden. Die Software MFCS/win bekommt nun das Waagensignal m_L übermittelt. Dieses wird automatisch mit einer angenommenen Dichte von $\rho_L = 1000\ g\ l^{-1}$ in das Flüssigvolumen V_L umgerechnet. Da jede kleinste Bewegung der Zugänge und Schläuche am Bioreaktor langfristig das Waagensignal beeinflussen kann, sollte dies nach Möglichkeit vermieden werden.

4.2 Abgasanalyzesysteme

Die in dieser Arbeit verwendeten Abgasanalyzesysteme sind in Reihe hinter dem Abluftfilter über Schläuche angeschlossen. Der Schlauch hinter dem Filter hat einen Durchmesser von 6 mm und ist 800 mm lang. Daran ist der BlueVary an der oberen Seite verbun-

den, da sich bei diesem Eingang ein Filter befindet, welcher die Sensoren vor Partikeln schützt. Dieser ist wiederum über einen 1400 mm langen Schlauch mit dem BlueInOne Cell verbunden. Hier fließt die Abluft ebenfalls über die Oberseite in das Gerät ein. Die Sensoren sind feuchtigkeitsempfindlich. Um den Kontakt der Abgasanalyseysteme mit Flüssigkeit zu verhindern, ist in der Abluftstrecke eine SCHOTT-Flasche angeschlossen, welche bis zu 1 l Flüssigkeit aufnehmen kann. Als zusätzlicher Schutz ist vor den Sensoren ein hydrophober Filter eingebaut.

4.2.1 BlueInOne Cell

Der BlueInOne Cell ist ein Abgasanalyseystem der BlueSens gas sensor GmbH. Es kombiniert die Messung der O₂- und CO₂-Anteile in einem Luftstrom. Dabei besitzt das Gerät weitere Sensoren, je einen Temperatur-, Druck- und Luftfeuchtigkeitssensor, um Fehler in der O₂- und CO₂-Messung zu kompensieren. Nach Inbetriebnahme muss der BlueInOne Cell die Sensoren zunächst für bis zu 60 Minuten aufheizen. Das Gerät ist mit einem elektrochemischen O₂-Sensor und einem IR-CO₂-Sensor ausgestattet (Abschn. 3.3). Die 1-Punkt-Kalibrierung des Abgasanalyseystems erfolgt nach einer 30-minütigen Begasung mit Luft über das Drücken beider Knöpfe auf der Vorderseite des Geräts für 5 Sekunden. Ein grünes Licht hinter dem linken Knopf signalisiert die Betriebsbereitschaft. Der Messbereich vom BlueInOne Cell liegt bei 0-50 % für O₂ und bei 0-25 % für CO₂.

4.2.2 BlueVary

Der BlueVary ist ebenfalls eine Abgasanalyseystem der BlueSens gas sensor GmbH. Das Gerät setzt sich aus drei Kartuschen zusammen, auf die eine weitere Einheit aufgebracht wird, welche ein Display und Knöpfe für die Bedienung beinhaltet. BlueSens bietet Kartuschen für die Messung von O₂ (halbleitend und chemisch (Abschn. 3.3.1)), CO₂, Methan und Wasserstoff an. Dabei können immer zwei dieser Kartuschen angeschlossen werden, wobei der dritte Steckplatz für eine Kartusche mit Druck- und Feuchtigkeitssensor vorbehalten ist. In dieser Arbeit werden Kartuschen für die CO₂- und O₂-Messung verwendet. Der O₂-Sensor misst nach dem Prinzip der galvanischen Zelle und der CO₂-Sensor mit Infrarotlicht (siehe Abschn. 3.3.1). Das Prinzip mit den Kartuschen ist insofern sinnvoll, als dass die Kartuschen jeweils ein eigenes Ablaufdatum haben. Während der BlueInOne Cell jährlich zur Wartung eingeschickt werden muss, muss beim BlueVary die Kartusche nur ausgebaut werden und kann für Recyclingzwecke zu BlueSense zurückgeschickt werden. Dabei kann direkt eine neue Kartusche eingebaut werden, wodurch das Abgasana-

lysesystem wartungsfrei ist und so keine Ausfallzeit entsteht. Die CO₂- und O₂-Sensoren müssen nach einem Jahr Betriebszeit ausgetauscht werden, während die Kartusche mit dem Druck- und Feuchtigkeitssensor nach zwei Jahren ersetzt werden muss. Ein weiterer Vorteil des Kartuschensystems ist, dass passende Kartuschen für einen neuen Messbereich oder Analyten schnell eingebaut werden können. Das Bediendisplay des BlueVarys zeigt zu jedem Zeitpunkt die aktuellen Messwerte an. Die 1-Punkt-Kalibrierung erfolgt ebenfalls über das Display und kann nach der Eingabe eines Passworts durchgeführt werden. Nachdem der BlueVary an eine Stromquelle angeschlossen wurde, muss dieser zunächst die Sensoren aufheizen. Dies dauert bis zu 60 Minuten. Während der Aufheizphase werden keine Messdaten auf dem Display angezeigt. Nachdem die Sensoren aufgeheizt und 30 Minuten lang mit Luft durchströmt wurden, können die Sensoren kalibriert werden. Der Messbereich des Sauerstoffsensor-Kartusche liegt bei 0-50 % und der der Kohlendioxid-Kartusche bei 0-25 %.

4.3 Softwareoberflächen

4.3.1 Das Prozessleitsystem MFCS/win

Das Prozessleitsystem MFCS/win (Multi Fermentor Control System for Windows) der Satorius Stedim Biotech GmbH ist für die Datenerfassung und die Prozesssteuerung während der Fermentation verantwortlich [2]. Über die Anwendung MFCS/win Shell können *Client*-Module aufgerufen werden (Abb. 4.4). Diese *Client*-Module ermöglichen es dem Anwender, Fermentationsprozesse über Rezepte zu gestalten und durchzuführen. Über **Operator Service** können Prozesse initialisiert und gestartet werden. Außerdem kann der Status einzelner Variablen darüber aufgerufen werden. Im **Sample Data Management** können die Messwerte der OD-Bestimmung eingetragen und automatisch die jeweiligen Zellkonzentrationen berechnet werden. Im **Batch Management** werden neue Kultivierungen definiert, welche dann im **Configuration Management** einem Prozess zugeordnet und später initialisiert werden können. Das **Plotting** stellt die gespeicherten Variablen in gewünschter Kombination graphisch dar. Im **Reporting** werden die beendeten Prozesse aufgeführt und können dort aufgerufen werden.

Für diese Arbeit wurde ein neuer Prozess definiert, in dem eine neue Substratzugabschleife für die Produktionsphase eingeführt wurde. Die vorherigen Phasen wurden von den vorangegangenen Rezepten übernommen. Das Rezept beginnt mit einer **Initiation**, in der zunächst die Datenspeicherung aktiviert und anschließend Prozessparameter auf

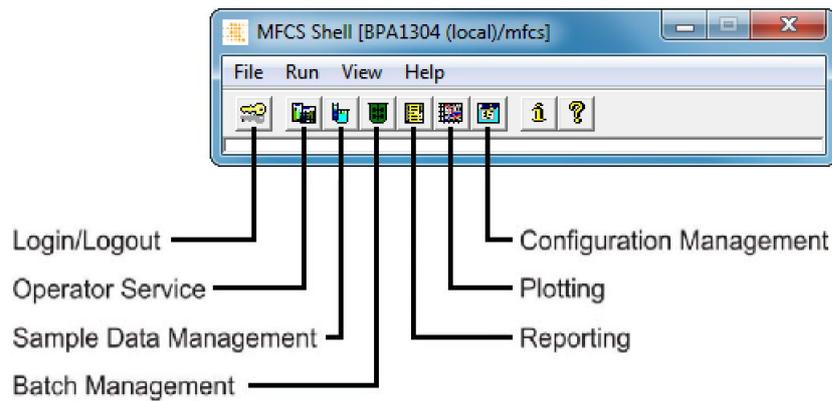


Abbildung 4.4: Das Hauptmenü von MFCS/win Shell. Quelle: In Anlehnung an Cornelissen, 2004 [2].

den jeweiligen Regelungsmodus gestellt werden. Außerdem werden dabei die Sollwerte der Variablen festgelegt. In der darauffolgenden Batch-Phase wird zunächst abgefragt, ob die pH- und die pO₂-Sonde kalibriert wurden, bevor der Anwender aufgefordert wird, das Inokulum in den Reaktor zu geben. Mit der Bestätigung dieser *Messagebox* wird die Batch-Phase eingeleitet bis das Batch-Ende detektiert wird. Der Switch im Batch-End wird aktiviert, sobald eine schlagartige Änderung im Sauerstoffpartialdruck und der Rührerdrehzahl registriert wird. Für die Detektion des Batch-Endes und die Initialisierung der Fed Batch-Phase wird eine Toolbox für MFCS/win benötigt. Die Anwendung liest die zuvor definierten Parameter für die Berechnung der Anfangssubstratpumprate F_{R12} in MFCS/win ab (siehe Tab. 4.1) und berechnet daraus den Sollwert der Pumprate (nach Formel 4.10). Das auf der Reaktorwaage angezeigte Gewicht sollte dem Gewicht der Flüssigphase entsprechen, da dieser Wert für die Berechnung von V_L verwendet wird. Die Pumprate F_{R1} wird im Laufe der Fed Batch-Phase dem Zufütterungsprofil entsprechend angepasst.

Tabelle 4.1 Angenommene Werte für den Kultivierungsprozess [7].

Parameter	Wert	Einheit
μ_w	0,1	h^{-1}
q_S/X_m	0,013	h^{-1}
$Y_{X/Sgr}$	0,6	-
C_{S1R}	150	$g\ l^{-1}$
$K_{XL/OD}$	0,6	-

Die Fed Batch-Phase und somit auch die exponentielle Zufütterung endet nach 10 Stun-

den. Darauf folgt die Produktionsphase. Zunächst fordert eine *Messagebox* den Anwender auf, das Substrat von Glycerin zu Methanol zu wechseln. Anschließend wird eine definierte Menge an Methanol in den Bioreaktor gegeben, woraufhin eine Übergangszeit von 30 Minuten eingelegt wird. In dieser Zeit nehmen die Zellen eine große Menge des neuen Substrats auf und passen ihren Stoffwechsel entsprechend an. Zusätzlich erfasst die Methanol-Sonde erstmalig Methanol im Medium, wodurch sich langsam der gemessene Widerstand verändert. Da der Sensor generell sehr träge ist, muss nach jeder Zugabe von Methanol eine Pause eingelegt werden, damit sich der Messwert anpassen kann. Aus diesem Grund muss die Regelung entsprechend langsam sein. Nach 30 Minuten und nachdem eine Konzentration von 1 g l^{-1} Methanol erstmalig unterschritten wurde, werden erneut etwa 1 g l^{-1} in den Bioreaktor gepumpt. Danach wird eine Pause von 15 Minuten eingelegt. Dieser Vorgang wird im Laufe der Produktionsphase durchgehend wiederholt. Dabei wird eine mittlere Methanolkonzentration von $1,5 \text{ g l}^{-1}$ angestrebt. Mit dem Ende der Produktionsphase beginnt die End-Phase, in der die Regelung und die Datenspeicherung beendet wird.

4.3.2 Das Steuerungssystem des BIOSTAT[®] A

Über das Steuerungssystem von BIOSTAT[®] A können die Reglerparameter direkt angesteuert werden. Dabei können die Soll-Werte verändert und die Sonden kalibriert werden. In Abbildung 4.5 ist das über eine IP-Adresse im Internet-Browser aufrufbare Interface des Steuerungssystems dargestellt.

Das System bietet die Möglichkeit die Pumprate der Korrekturmittelpumpen zu bestimmen und einzustellen. Mit der hinterlegten Pumprate kann die Software aus der Pumpdauer während des Prozesses das Pumpvolumen der einzelnen Korrekturmittel berechnen. Zusätzlich werden die pH- und pO_2 -Sonde über das Programm kalibriert. Die Kalibrierung erfolgt über den pH-Button mit Schritt-für-Schritt Anweisung. Dies gilt ebenfalls für die pO_2 -Sonden Kalibrierung. Über den Trend-Button können die Ist-Werte einiger Prozessparameter über die Zeit dargestellt werden.

4.3.3 BlueVis

Die Software BlueVis der BlueSens gas sensor GmbH erfasst alle durch die Abgasanalytoren gemessenen Daten und zeichnet sie auf. Aufgrund von Kommunikationsproblemen zwischen den Abgasanalytoren und MFCS/win können die gemessenen Daten nicht direkt im Prozessleitsystem mit allen anderen Daten zusammen aufgezeichnet werden.

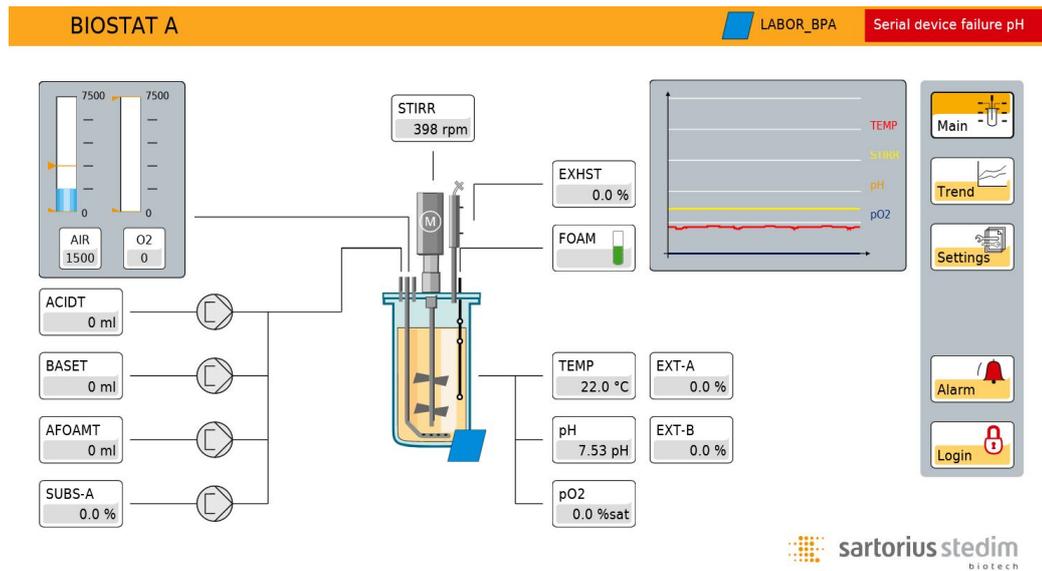


Abbildung 4.5: Das Steuerungssystem vom BIostat[®] A in Mozilla Firefox.

Aus diesem Grund ist die Berechnung der Abgasparameter entsprechend Abschnitt 3.4 derzeit während des Prozesses nicht möglich. Die gemessenen Daten werden in einem Plot visualisiert. Dabei können die Daten von mehreren Abgasanalyzesystemen parallel erfasst und im Graphen aufgetragen werden (Abb. 4.6). Neben den O₂- und CO₂-Konzentrationen werden weitere gemessene Parameter wie Temperatur, Druck und relative bzw. absolute Luftfeuchtigkeit gespeichert. Alle gemessenen Daten in einem frei wählbaren Zeitraum können dann in Form einer CSV-Datei exportiert werden. Die O₂- und CO₂-Konzentrationen werden in Prozent gespeichert. Für die Berechnung der Prozessparameter in der Abgasanalytik werden die Daten als Stoffmengenanteil benötigt. Die Umrechnung für O₂ erfolgt über

$$x_{OG}(t) = \frac{x_{O_2}(t)}{100\%} \quad (4.2)$$

und für CO₂ über

$$x_{CG}(t) = \frac{x_{CO_2}(t)}{100\%}. \quad (4.3)$$

x_{CO_2} := Kohlendioxidanteil in der Abluft in Prozent [%]

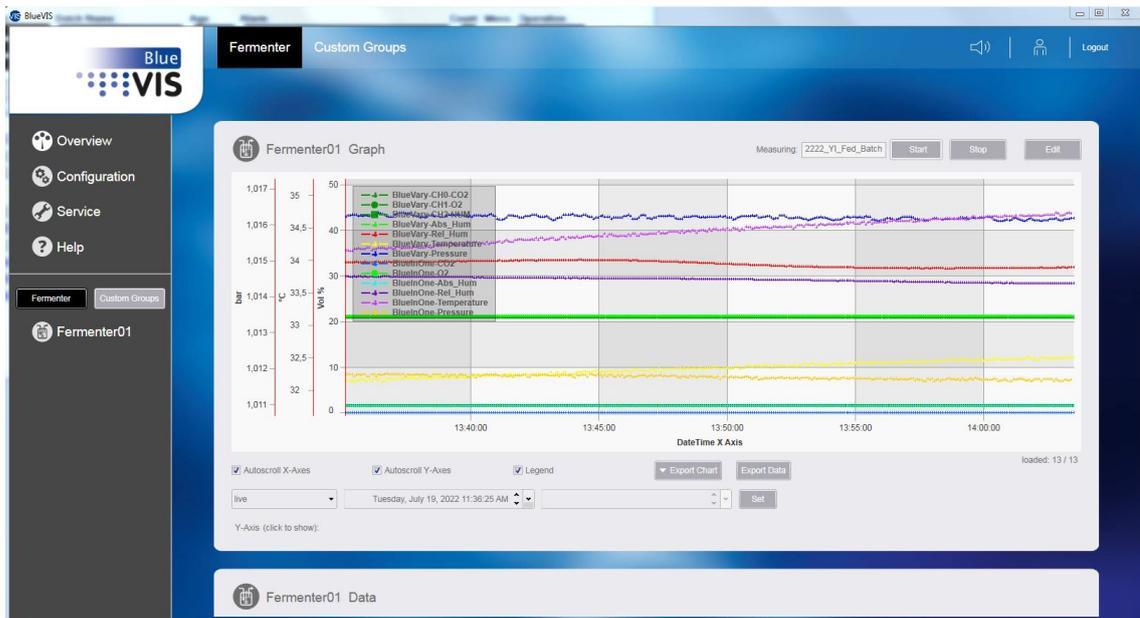


Abbildung 4.6: Die Software BlueVis von BlueSens für die Aufzeichnung der Abgasdaten.

4.4 *P. pastoris* Stamm BSYBG11

Der vorliegende *P. pastoris* BSYBG11 eGFP Stamm wurde von der AG Noll genetisch modifiziert. In den parentalen Stamm BSYBG11 wurde durch homologe Rekombination ein Gen integriert, welches für ein fluoreszierendes Protein (eGFP) codiert. Das eGFP-Gen wurde in die Primer-Region des Alkohol-Oxidase-1-Gens (*pAOX1*) eingesetzt. Die homologe Rekombination führte dazu, dass der *P. pastoris* BSYBG11 eGFP Stamm nach der Induktion mit Methanol damit beginnt, das Protein eGFP zu exprimieren [40].

4.5 Vorversuch zur Bestimmung von Wachstumsparametern

Im Rahmen eines Vorversuchs wird eine Batch-Kultivierung mit der vorliegenden *Pichia pastoris* Kultur durchgeführt. Ziel ist es, Wachstumsparameter wie die maximale zellspezifischen Wachstumsrate auf Glycerin $\mu_{1\max}$ während der Batch-Phase zu ermitteln. Zusätzlich soll ein geeignetes Kryo-Volumen zum Animpfen der Vorkultur ausgemacht werden. Die Batch-Phase findet in den Fed Batch-Kultivierungen über Nacht statt, weshalb in dieser Phase keine Proben für die Bestimmung der optischen Dichte (OD) entnommen

werden können. Um den Verlauf der Zellkonzentration in der Batch-Phase beobachten zu können, wird die Batch-Kultivierung gesondert in Form dieses Vorversuchs durchgeführt. Für die Ermittlung eines geeigneten Kryo-Volumens werden zwei Schüttelkolben mit unterschiedlichen Volumina an Kryo-Volumen angeimpft und die optische Dichte nach 24 Stunden gemessen. Je nach optischer Dichte wird das passende Inokulum im nächsten Schritt für das Animpfen der Batch-Kultur verwendet. Die Vorkultur sollte vor dem Animpfen in den Bioreaktor eine OD_{600} von 3-5 AU besitzen, da somit eine möglichst kurze Lag-Phase erwartet werden kann. Für die Durchführung des Vorversuchs werden zwei 1 l Schüttelkolben mit jeweils 100 ml Vorkulturmedium befüllt, angeimpft und in einem temperierten Schüttelinkubator bei 30 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Dann wird das Inokulum steril über eine Öffnung am Reaktordeckel in den Bioreaktor gefüllt und eine Batch-Kultivierung durchgeführt. Dabei wird möglichst stündlich eine Probe entnommen und deren OD, nach Abschnitt 4.7.2, ermittelt.

4.6 Berechnungen zu den Kultivierungsphasen

4.6.1 Vorkultur

Die Vorkultur soll für 24 Stunden im Schüttelinkubator inkubieren. Damit die gewünschte optische Dichte von 3-5 AU erreicht werden kann, muss ein geeignetes Kryo-Volumen bestimmt werden. Im Rahmen des Vorversuchs wurde ein Kryo-Volumen von 100 µl und 200 µl verwendet und nach 24 Stunden untersucht.

4.6.2 Batchkultivierung

Die Batch-Phase wird durch die Zugabe eines Inokulums initialisiert. Das Inokulum wird durch einen Schlauch direkt in das Medium geleitet. Unmittelbar nach dem Animpfen wird eine Probe entnommen und deren OD bestimmt. In dieser Arbeit wurde ein Batch-Volumen von 1,2 l gewählt. Die Medienzusammensetzung ist in Tabelle 9.1 aufgelistet. Nach einer kurzen Adaptionsphase beginnen die Zellen, sich exponentiell zu vermehren. Da keine Substrat- oder Sauerstofflimitierung vorliegt wachsen die Zellen mit der maximalen zellspezifischen Wachstumsrate nach Formel 4.4.

$$c_{XL}(t) = c_{XL0} \cdot e^{\mu_{1max} \cdot t} \quad (4.4)$$

$$c_{XL} \quad := \quad \text{Zellkonzentration zur Prozesszeit } t \quad [\text{g l}^{-1}]$$

c_{XL0}	:=	Zellkonzentration zu Beginn der Batch-Phase	[g l ⁻¹]
μ_{1max}	:=	Maximale zellspezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
t	:=	Prozesszeit	[h]

Der Formel 4.12 nach kann das exponentielle Wachstum ebenfalls über die optische Dichte OD_{600}

$$OD_{600}(t) = OD_{600,0} \cdot e^{\mu_{1max} \cdot t}, \quad (4.5)$$

OD_{600}	:=	Optische Dichte bei 600 nm	[AU]
$OD_{600,0}$:=	Optische Dichte zu Beginn der Batch-Phase	[AU]

beschrieben werden. Mit der theoretischen maximalen Zellausbeute zum Ende der Batch-Phase

$$c_{XL2} = c_{XL0} + y_{X/S1} \cdot c_{S10} \quad (4.6)$$

c_{XL2}	:=	Zellkonzentration zum Zeitpunkt t_2	[g l ⁻¹]
c_{S10}	:=	Substratkonzentration (Glycerin) zu Beginn der Batch-Phase	[g l ⁻¹]
$y_{X/S1}$:=	Substratausbeutekoeffizient (Glycerin)	[-]

und der theoretischen Startzellkonzentration

$$c_{XL0} = \frac{OD_{VK} \cdot V_{L,VK}}{V_{L0}} \cdot K_{X/OD} \quad (4.7)$$

OD_{VK}	:=	Optische Dichte der Vorkultur	[AU]
$V_{L,VK}$:=	Vorkulturvolumen	[l]
$K_{X/OD}$:=	Umrechnungsfaktor von der optischen Dichte zur Zellkonzentration	[-]

kann, unter Berücksichtigung der angenommenen maximalen zellspezifischen Wachstumsrate (Tab. 4.1) und der Lag-Phase, die Prozessdauer der Batch-Phase

$$t_2 = \ln \left(\frac{c_{XL2}}{c_{XL0}} \right) \cdot \frac{1}{\mu_{1max}} + t_1 \quad (4.8)$$

t_2 := Zeitpunkt vom Ende der Batch-Phase [h]

berechnet werden.

4.6.3 Fed Batch-Kultivierung

Mit dem Ende der Batch-Phase wird automatisch die Fed Batch-Phase eingeleitet. In der Fed Batch-Phase wird exponentiell Glycerin als Substrat in den Bioreaktor gegeben. Das Ziel ist, dass die Zellen substratlimitiert mit einer konstanten Wachstumsrate μ_{1w} wachsen. Dies ist möglich, indem die Zufüterraterate exponentiell im Fed Batch-Verlauf gesteigert wird (siehe Formel 4.9).

$$F_{R1w}(t) = F_{R12} \cdot e^{\mu_{1w}(t-t_2)} \quad (4.9)$$

F_{R1w} := Sollsubstratzufüterraterate [l h⁻¹]

F_{R12} := Substratzufüterraterate zu Beginn der Fed Batch-Phase [l h⁻¹]

Die Substratzufüterraterate zu Beginn der Fed Batch-Phase F_{R12} hängt von einigen Parametern ab (siehe Formel 4.10). F_{R12} sollte bei der verwendeten Ismatec-Pumpe mindestens 5 % der maximalen Pumprate entsprechen, da erst an diesem Punkt von einem linearen Verhältnis zwischen der Steigung von Drehzahl und Pumprate ausgegangen werden kann.

$$F_{R12} = \frac{\mu_{1w} + q_{S1/Xm} \cdot Y_{X/S1}}{Y_{X/S1} \cdot c_{SR1}} \cdot V_{L2} \cdot c_{XL2} \quad (4.10)$$

$q_{S1/Xm}$:= Zellspezifische Maintenance-Substrataufnahmerate [h⁻¹]

V_{L2} := Volumen der Flüssigphase zu Beginn der Fed Batch-Phase [l]

c_{XL2} := Zellkonzentration zu Beginn der Fed Batch-Phase [g l⁻¹]

Die Parameter aus Tabelle 4.1 werden im Batch-Rezept in MFCS/win hinterlegt und von der MFCS/win-Toolbox aufgerufen. Die Toolbox berechnet einmalig F_{R12} und daraus die prozentuale Auslastung der Schlauchpumpe. Dieser Wert wird in Form von F_{R1} mit dem steigenden Zufütterungsprofil durchgehend angepasst.

Da der Substrateintrag von dem Volumen der Flüssigphase abhängig ist, reicht die alleinige Angabe der Substratzufüterraterate für eine Vergleichbarkeit mit anderen Prozessen nicht aus. Stattdessen wird die volumetrische Substratzufüterraterate eingeführt (Formel 4.11).

$$Q_{\text{Sin}}(t) = \frac{F_{\text{R1}}(t) \cdot c_{\text{SR1}}}{V_{\text{L}}(t)} \quad (4.11)$$

F_{R1} := Substratzufüterraterate [l h⁻¹]

4.6.4 Produktion

Zu Beginn der Produktionsphase wird das Substrat von Glycerin zu Methanol getauscht. Anschließend werden etwa 6 g l⁻¹ Methanol vorgelegt und eine Regelschleife initialisiert (siehe Abschn. 4.3.1). Im Idealfall bleibt die Methnalkonzentration in der gesamten Produktionsphase im Bereich von 1-2 g l⁻¹, um die toxische Wirkung des Substrats auf die Zellen zu vermeiden. In der Produktionsphase werden regelmäßig Proben entnommen und der Überstand nach dem Zentrifugieren bei -20 °C aufbewahrt. An einem späteren Zeitpunkt wird nach Abschnitt 4.7.3 die Fluoreszenz des Überstands bei unterschiedlicher Verstärkung gemessen.

4.7 Offline-Analytik

4.7.1 Bestimmung der optischen Dichte

In regelmäßigen Zeitabständen werden während der Kultivierung Proben aus dem Reaktor entnommen (nach 4.1.2). Mit den Proben kann die OD und daraus dann die Zellkonzentration berechnet werden. Die Umrechnung der optischen Dichte in die Zellkonzentration erfolgt durch den Koeffizienten $K_{\text{X/OD}}$. Dieser Koeffizient kann mit den Daten aus der Bestimmung der Biotrockenmasse berechnet werden (Abschn. 4.7.2).

$$c_{\text{XL}}(t) = K_{\text{X/OD}} \cdot \text{OD}(t) \quad (4.12)$$

Die optische Dichte wird mithilfe eines Photometers bestimmt (Tab. 9.8). Die Messung beruht auf Lichtstreuung, welche durch die Zellen verursacht wird [41]. Die Zellen werden mit Licht einer Wellenlänge von 600 nm bestrahlt. Dabei wird das Licht von den Zellen absorbiert und dann in alle Richtungen reflektiert. Das Licht kommt abgeschwächt

bei einem Fotosensor an, woraus dann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Extinktion berechnet werden kann. Die OD sollte dabei in einem Bereich von 0,1 bis 0,6 AU (*absorbance units*) liegen, da bei höheren Zelldichten Fehler durch eine zu hohe Intensitätsschwächung entstehen. Außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen Licht reflektieren und andere Zellen dieses dann wieder auf die ursprüngliche Lichtstrecke reflektieren, sodass die Lichtschwächung nicht mehr proportional zur Zellkonzentration ist [41]. Um eine OD im geeigneten Messbereich zu erhalten, müssen die Proben im fortgeschrittenen Prozessverlauf über Verdünnungsreihen verdünnt werden. Dabei sollte das Pipettiervolumen von 100 µl nicht unterschritten werden. Die Erhebung der Daten erfolgt über eine Doppelbestimmung. Daraus wird der Mittelwert bestimmt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

4.7.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) werden einen Tag vor der ersten Probenahme Reaktionsgefäße beschriftet und offen in den Trockenschrank gestellt. Die Reaktionsgefäße verlieren dabei Restfeuchte bei etwa 100 °C. Anschließend wird der Reaktionsgefäßständer aus dem Trockenschrank geholt und die Gefäße geschlossen. Die Reaktionsgefäße sollten ab diesem Zeitpunkt noch mit Handschuhen oder einer Pinzette einzeln bewegt werden. Mit einer 1 ml Pipette werden dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben in doppelter Ausführung in die Reaktionsgefäße gefüllt und anschließend für 10 Minuten in der Zentrifuge bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand entnommen und das Pellet im Reaktionsgefäß offen in den Trockenschrank gestellt. Am nächsten Tag werden die trockenen Pellets aus dem Trockenschrank entnommen und nach einer Abkühlzeit von 20 Minuten erneut abgewogen. Von dieser Masse wird das Leergewicht des Reaktionsgefäß abgezogen und durch das Probenvolumen dividiert (Formel 4.13). Der Quotient entspricht dann der Zellkonzentration der Probe.

$$c_{XL}(t) = \frac{m_{BTM+RG}(t) - m_{RG}(t)}{V_{Probe}(t)} \quad (4.13)$$

m_{BTM+RG}	:=	Biotrockenmasse mit der Masse vom Reaktionsgefäß	[g]
m_{RG}	:=	Masse vom Reaktionsgefäß	[g]
V_{Probe}	:=	Volumen der Flüssigprobe	[l]

4.7.3 Bestimmung der Fluoreszenz

Mit dem Beginn der Produktionsphase werden die Überstände der Proben für die BTM-Messung nicht mehr verworfen, sondern in ein weiteres Reaktionsgefäß gegeben und bei -20 °C im Tiefkühlfach eingefroren. Die Überstände müssen eingefroren werden, da sonst Proteasen das Produkt zersetzen können. Für die Fluoreszenzmessung werden die Überstände wieder aufgetaut und in eine schwarze Mikrotiterplatte gegeben. Von jeder Probe werden dabei jeweils $200\text{ }\mu\text{l}$ in 3 Wells pipettiert, um eine Dreifachbestimmung durchzuführen. Zusätzlich wird als Nullwert Wasser dreifach in Wells pipettiert. Die äußersten Reihen sollten dabei ausgelassen werden. Die fertige Mikrotiterplatte wird anschließend in den Plate Reader von Tecan gestellt und das Programm am angeschlossenen Computer ausgewählt. Die Erregungswellenlänge liegt bei 488 nm und die Emissionswellenlänge bei 507 nm . Die Messung wird bei einer definierten Verstärkung von 20, 40 und 50 durchgeführt, um eine prozessübergreifende Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

4.8 Auswertung der Abgasanalysedaten mittels MATLAB[®]

Aufgrund von Problemen der Kommunikation zwischen den Softwareprogrammen BlueVis und MFCS/win können die Prozessparameter der Abgasanalytik nicht in Echtzeit berechnet, sondern müssen nach Beendigung des Prozesses über MATLAB[®] ausgewertet werden. Für die Berechnung der Parameter werden zudem Daten wie der Sauerstoffpartialdruck benötigt (siehe Formel 3.13). Diese Daten wurden von MFCS/win jedoch zu anderen Zeitpunkten erhoben als BlueVis die Abluft gemessen hat. Damit eine Berechnung der Abgaskennwerte möglich ist, muss zu jedem Zeitpunkt von jeder Variable ein Wert vorliegen. Um dies zu ermöglichen, werden die Daten von MFCS/win vorher an die Messfrequenz der Abgasmessung angepasst. Dafür wird die Interpolationsfunktion von MATLAB[®] verwendet. Nach der Interpolation wird eine Matrix mit allen Parametern gefüllt und automatisch als TXT-Datei gespeichert. Das Skript für die Interpolation ist im Anhang beigefügt (Abschn. 9.5.1). Bei der Interpolation werden einige Werte als *NaN* (= *Not a Number*) gespeichert. Diese werden in dem Skript automatisch durch den letzten *Number*-Wert ersetzt. In einem weiteren MATLAB[®]-Skript (Abschn. 9.5.2) sind die Formeln für die Berechnung der Parameter der Abgasanalytik hinterlegt. In dem Skript wird die vorher erstellte TXT-Datei mit den interpolierten Daten ausgelesen und als Matrix gespeichert. Die Spalten werden dann den Variablen zugeordnet. Mit diesen Variablen

können anschließend die Prozessparameter der Abgasanalytik aus Abschnitt 3.4 berechnet werden. Diese Daten werden im Anschluss graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuch zur Bestimmung von Wachstumsparametern

Die optische Dichte der Vorkultur nach 24 Stunden ist in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1 Die optische Dichte der Vorkultur nach 24 Stunden. Die Messung fand als Doppelbestimmung bei 600 nm statt.

Kryo-Volumen	OD ₆₀₀ (n = 1) in AU	OD ₆₀₀ (n = 2) in AU	Mittelwert in AU
100 µl	1,54	1,51	1,53
200 µl	3,30	3,36	3,33

Im Laufe der Batch-Kultivierung wurden stündlich Proben entnommen und deren OD bestimmt. Die jeweiligen Mittelwerte der über eine Doppelbestimmung gemessenen OD₆₀₀-Werte sind in Abbildung 5.1 graphisch dargestellt.

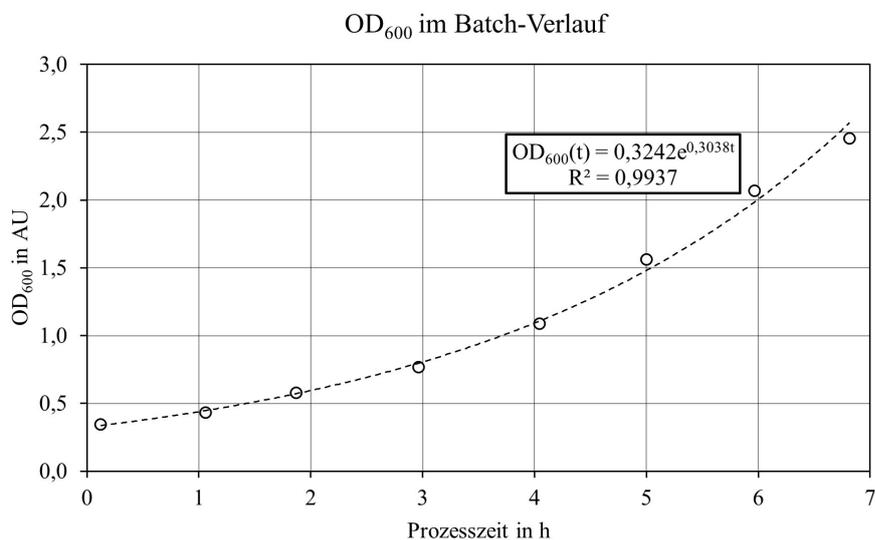


Abbildung 5.1: Die optische Dichte in den ersten 7 Stunden einer Batch-Kultivierung. Die optische Dichte wurde bei 600 nm über eine Doppelbestimmung mit einem Photometer gemessen und gegebenenfalls mit Wasser verdünnt. Die Abbildung wurde mit Excel von Microsoft erstellt.

Während der Batch-Kultivierung wachsen die Zellen exponentiell. Daher kann aus der mit eingezeichneten Regressionsgleichung die maximale zellspezifische Wachstumsrate $\mu_{1\max}$ abgelesen werden. Wie in Formel 4.5 zu sehen ist, entspricht der Faktor vor der Zeit t im Exponenten $\mu_{1\max}$. Dieser liegt somit in dieser Batch-Kultivierung bei $0,304 \text{ h}^{-1}$.

5.2 Fed Batch-Kultivierung

In Abbildung 5.2 ist ein Plot mit den Prozessdaten einer Fed Batch-Kultivierung dargestellt. Anhand dieses Prozesses wird beispielhaft die Berechnung der Abgaskennwerte mit MATLAB[®] vorgestellt.

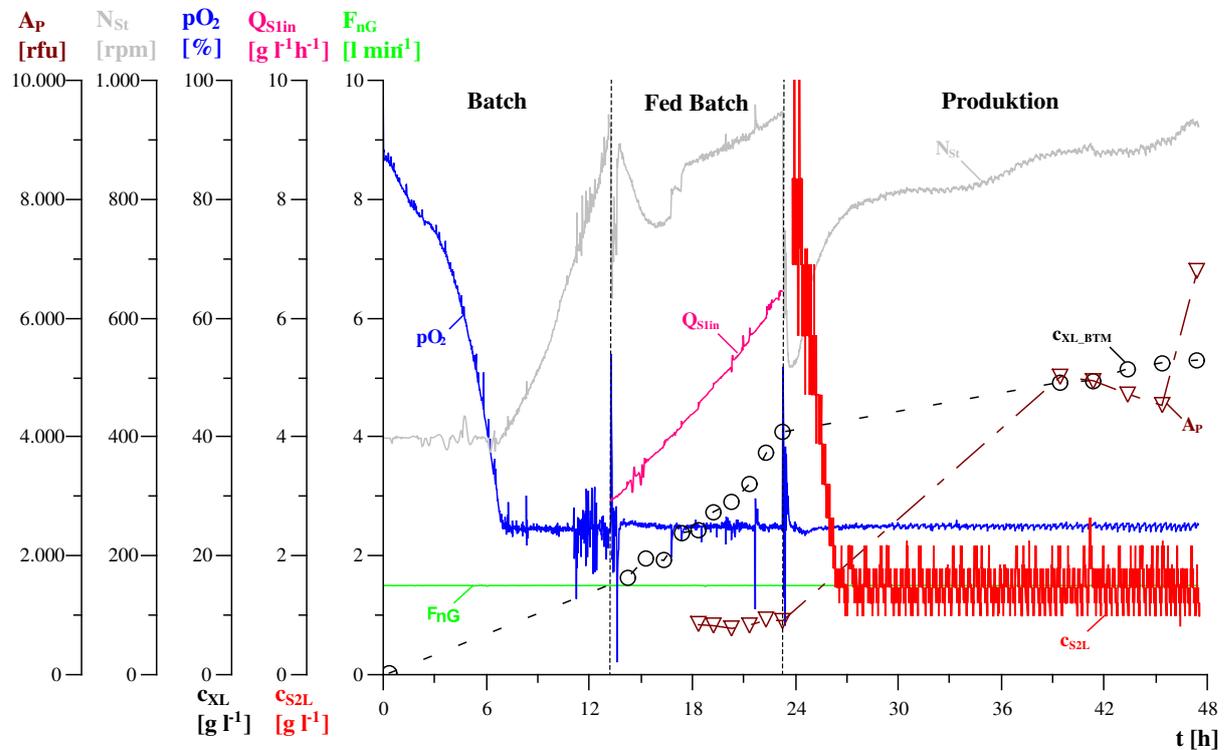


Abbildung 5.2: Ein Plot der durchgeführten Hochzelldichtekultivierung. Der Prozess wurde auf pH 5 und eine Temperatur von 30 °C in der Batch/Fed Batch Phase geregelt (22 °C in der Produktionsphase). F_{nG} , pO_2 , N_{St} und c_{S2L} wurden online über die Sonden ermittelt, während c_{XL} und A_p über offline Messungen bestimmt wurden. Q_{Stin} wurde nach Abschnitt 4.6.3 berechnet. Die Fluoreszenzmessung wurde mit einer Verstärkung von 50 durchgeführt. Der Plot wurde mit der Software QtiPlot von IONDEV SRL erstellt.

Die Abbildung 5.3 zeigt eine Aufnahme des Kulturmediums unmittelbar nach Beendigung des Prozesses. Das Medium wird mit UV-Licht bestrahlt.

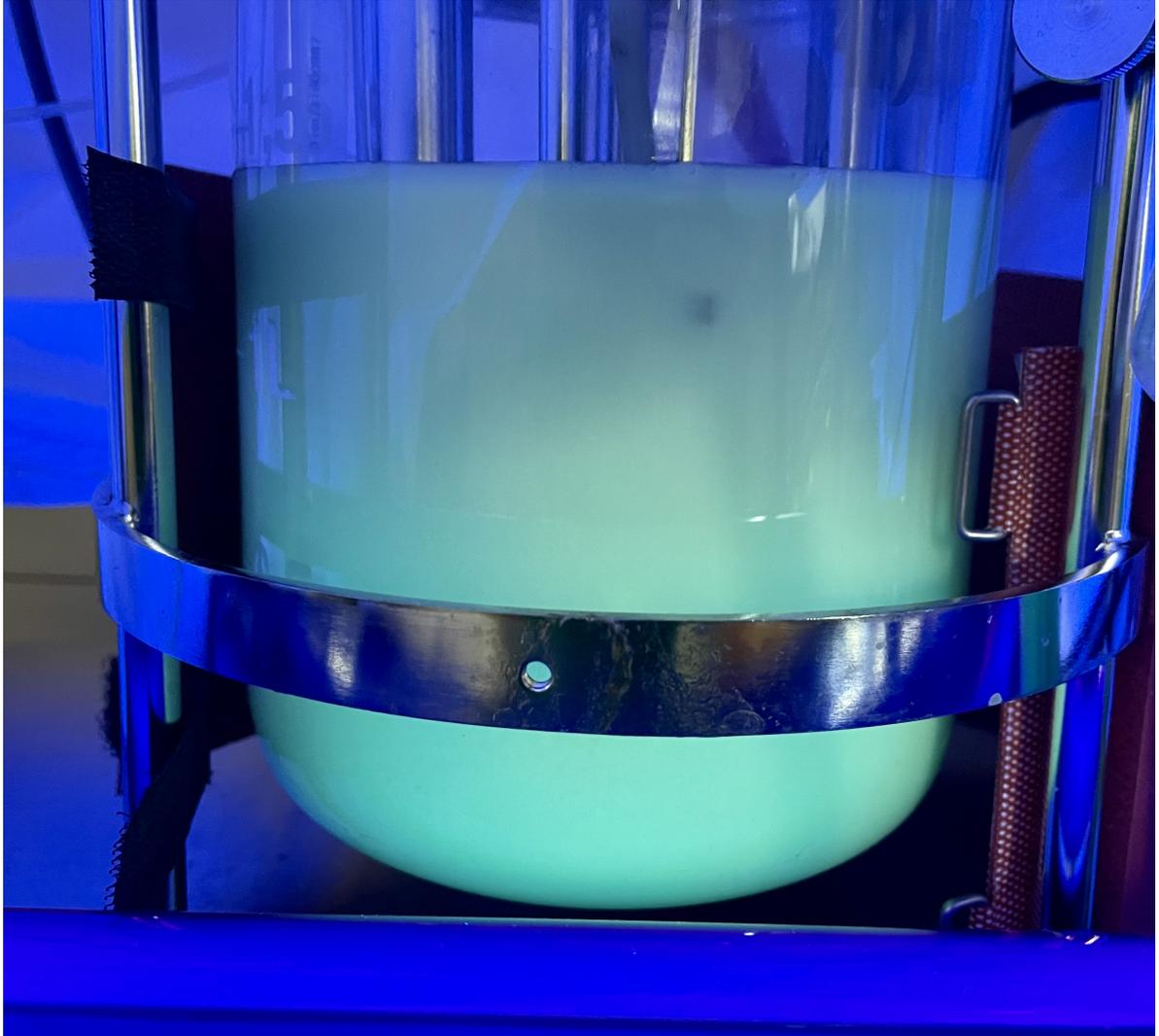


Abbildung 5.3: Das Kulturmedium, welches in einem abgedunkelten Raum nach Beendigung des Prozesses mit UV-Licht bestrahlt wurde.

5.3 Auswertung der Abgasanalysedaten

In Abbildung 5.4 sind die Rohdaten von den O₂- und CO₂-Messungen vom BlueInOne und BlueVary über die gesamte Prozesszeit dargestellt.

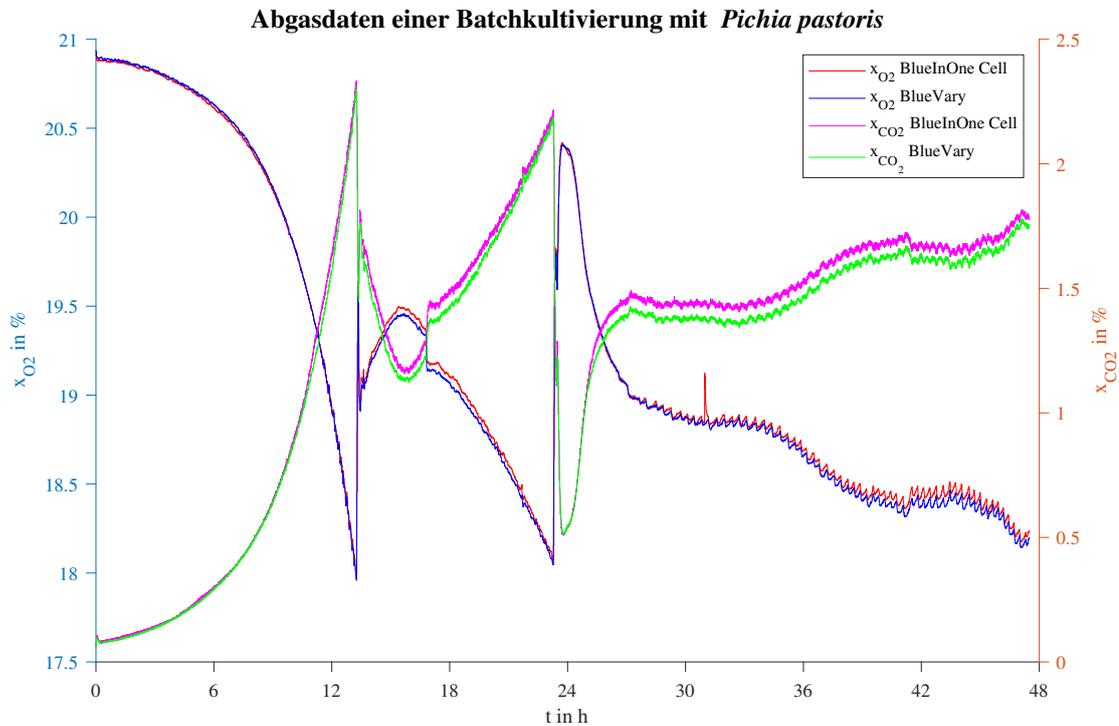


Abbildung 5.4: Dargestellt sind die O₂- und CO₂-Messdaten aus der Hochzelldichtekultivierung. Dabei werden die Messwerte von den Abgasanalyse-Systemen BlueInOne Cell und BlueVary der BlueSens gas sensor GmbH miteinander verglichen. Die Abbildung wurde mit MATLAB[®] erstellt.

Aus diesen Rohdaten wurden die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} und die Kohlendioxidaus-tragsrate Q_{CO_2} über MATLAB[®] berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 5.5). Mit Q_{O_2} und Q_{CO_2} konnten im nächsten Schritt der volumetrische Stoffübergangskoeffizient k_{La} (Abb. 5.6) und der Respirationsquotient RQ (Abb. 5.7) zu jedem Zeitpunkt während der Kultivierung berechnet und graphisch dargestellt werden.

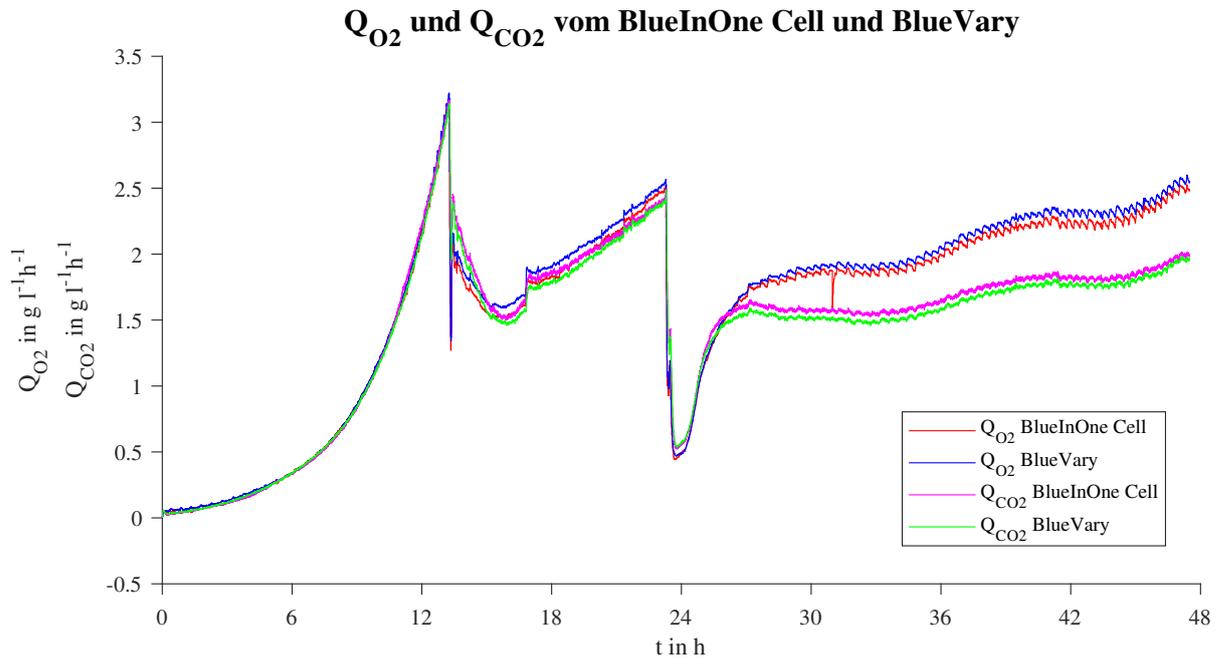


Abbildung 5.5: Die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} und die Kohlendioxidaustragsrate Q_{CO_2} wurden aus den Abgasmessdaten von O_2 und CO_2 berechnet und graphisch dargestellt. Die Abbildung wurde mit MATLAB[®] erstellt.

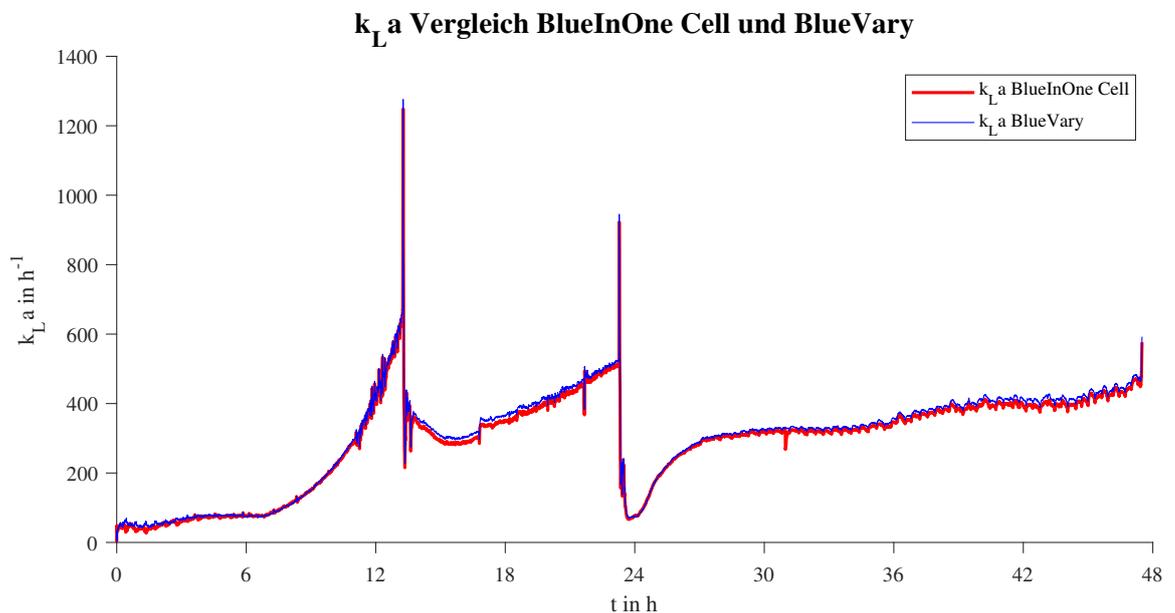


Abbildung 5.6: Der Verlauf des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ während der Hochzelldichtekultivierung. Der $k_L a$ -Wert wurde mit den Messdaten der Abgasanalyseysteme BlueInOne Cell und BlueVary berechnet. Die Abbildung wurde mit MATLAB[®] erstellt.

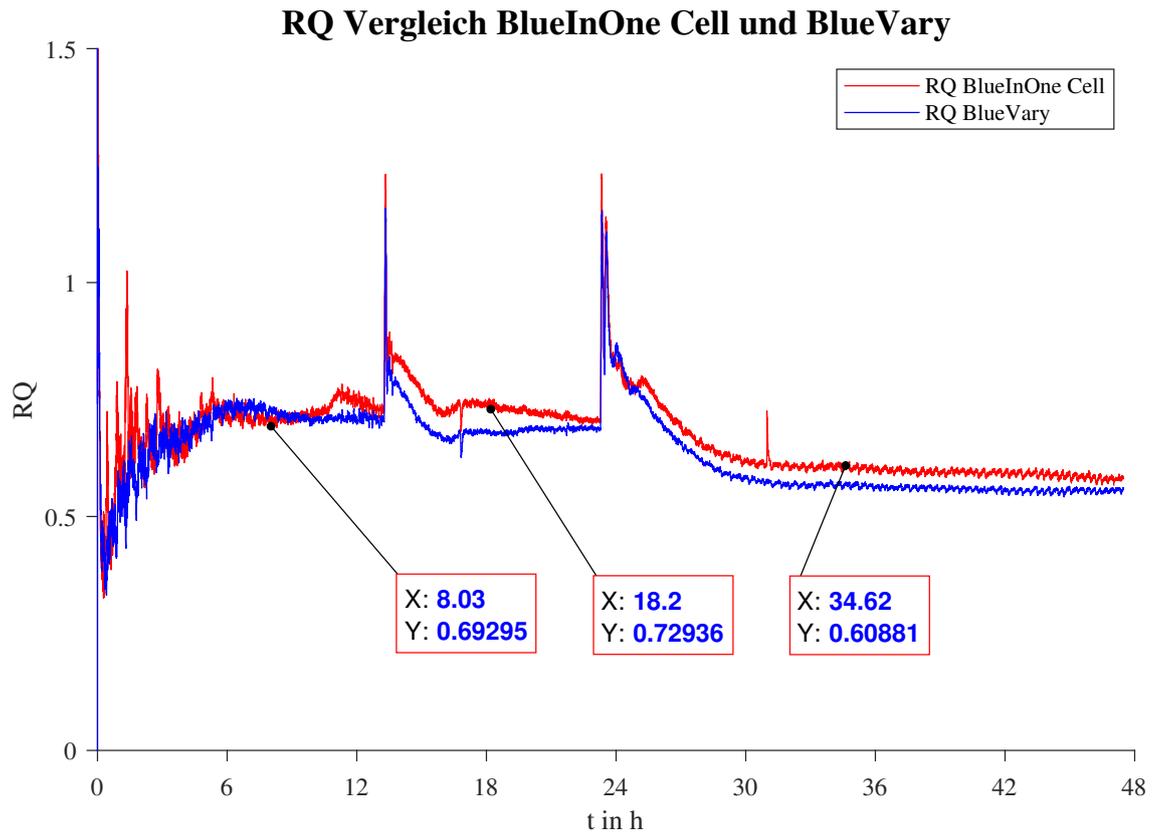


Abbildung 5.7: Der Respirationsquotient RQ wurde mit den gemessenen Abgasdaten von BlueInOne Cell und BlueVary berechnet. Zur Verdeutlichung sind die RQ-Werte zu den einzelnen Prozessabschnitten mit eingezeichnet. Die Abbildung wurde mit MATLAB[®] erstellt.

6 Diskussion

6.1 Kultivierungsverlauf

Vorversuch

Der Vorversuch ergab eine optische Dichte von 1,53 AU bei 100 μl Kryo-Volumen und 3,33 AU bei 200 μl Kryo-Volumen. Demnach würde sich ein Kryo-Volumen von 200 μl eher eignen, um in den gewünschten Bereich von 3-5 AU zu gelangen. In den darauffolgenden Fed Batch-Kultivierungen hat sich jedoch erwiesen, dass sich ein Kryo-Volumen von 150 μl eher eignet, um nach 24 Stunden die gewünschte OD zu erreichen.

In Abbildung 5.1 ist das exponentielle Wachstum der Zellen in der Batch-Kultivierung erkennbar. Eine Lag-Phase ist nicht eindeutig zu erkennen, da sich die Zellzahl bereits nach einer Stunde erhöht hat. Diese sind mit einer maximalen zellspezifische Wachstumsrate von $0,304\text{ h}^{-1}$ gewachsen. Diese maximale zellspezifische Wachstumsrate ist höher als die von vergleichbaren *P. pastoris*-Stämmen [42].

Batch-Phase

In der Abbildung 5.2 sind einige Prozessparameter graphisch dargestellt. Der O_2 -Partialdruck p_{O_2} sinkt nach dem Animpfen ab und erreicht nach etwa 7 Stunden 25 %. Mit dem erstmaligen Erreichen einer O_2 -Sättigung von 25 % wird automatisch die Regelung der Rührerdrehzahl aktiviert. Es ist zu erkennen, dass die Rührerdrehzahl anschließend exponentiell ansteigt. Da der O_2 -Verbrauch der Zellen proportional zur Zellzahl ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellkonzentration entsprechend exponentiell ansteigt. Der vollständige exponentielle Verlauf kann anhand der CO_2 -Produktion beobachtet werden, welcher unmittelbar mit dem O_2 -Verbrauch zusammenhängt. Im hier angenommenen Fließgleichgewicht wird das produzierte CO_2 an die Gasbläschen in der Flüssigphase abgegeben, welche anschließend in den Reaktorraum hinaufsteigen. Dann wird das CO_2 über die Abluft von den Abgasanalyzesystemen detektiert. Der in diesem Prozess gemessene Stoffanteil von CO_2 und O_2 ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die O_2 -Konzentration antiparallel zur CO_2 -Konzentration bewegt. Aus diesen Abgasdaten wurde die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} und Q_{CO_2} berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 dargestellt. In der Batch-Phase, während des exponentiellen Wachstums, sind

Q_{O_2} und Q_{CO_2} nahezu identisch. Hierbei muss bedacht werden, dass die molare Masse von CO_2 M_{CO_2} höher ist als M_{O_2} . Folglich werden mehr O_2 -Moleküle eingetragen, als CO_2 -Moleküle ausgetragen. Innerhalb der ersten 7 Stunden ist beim k_{La} hingegen kein exponentieller Anstieg zu beobachten (Abb. 5.6). Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Verfügungsstellung vom O_2 nichts verändert wurde. Mit der Aktivierung der Rührerregelung beginnt der k_{La} -Wert exponentiell zu steigen.

Nach etwa 10 Stunden ist ein Rauschen in den Messwerten des Sauerstoffpartialdrucks zu erkennen (Abb. 5.2). Dies ist auf Schaumbildung zurückzuführen, welche durch den oberen 6-Blatt Scheibenrührer verursacht wird. Dieser Schaum kommt mit dem p_{O_2} -Sensor in Berührung und erzeugt dadurch Störungen in der Messung. Dieses Rauschen ist ebenfalls in den Messwerten der Rührerdrehzahl zu erkennen. Die Regelung versucht den Anstieg und das Sinken des Sauerstoffpartialdrucks mit der Rührerdrehzahl zu kompensieren. Aufgrund der Trägheit des Systems führt die Regelung jedoch nur dazu, dass der Sauerstoffpartialdruck weiter oszilliert. In diesem Punkt zeigt sich ein Vorteil der Abgasmessung gegenüber der alleinigen Messung des Sauerstoffpartialdrucks, da diese Art von Störung in den Abgasanalyse-Systemen nicht vorkommen kann. Ungestört von den Regelungsproblemen konnte mit den Abgassensoren das Wachstumsverhalten festgehalten werden.

Nach etwa 13,5 Stunden wurde das Batch-Ende erkannt. Zu diesem Zeitpunkt war das vorgelegte Substrat (Glycerin) verbraucht und ein Großteil der Zellen konnte die Atmung nicht mehr fortführen. Dies führte dazu, dass die Sauerstoffaufnahme-Rate OUR abnahm. Die Sauerstofftransfer-Rate OTR und entsprechend auch die Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} sind davon betroffen und sinken mit dem fehlenden Verbraucher ebenfalls ab (siehe Abb. 3.6). Mit der fehlenden Kohlenstoffquelle sinkt die Kohlenstoffentwicklungsrate CER und damit die Kohlenstoffaustragsrate Q_{CO_2} .

Die graphische Auftragung des volumetrischen Stofftransportkoeffizienten k_{La} zeigt am Batch-Ende einen großen Sprung (Abb. 5.6). Dabei handelt es sich um einen Fehler verursacht durch die Interpolation. Die Messfrequenz des Sauerstoffpartialdrucks war an dieser Stelle höher als die der Abgasanalyse-Systeme. Da auf die Zeitleiste von x_{O_2} und x_{CO_2} interpoliert wurde, konnte der Anstieg vom Sauerstoffpartialdruck p_{O_2} nicht vollständig in der Matrix dargestellt werden. Während der Q_{O_2} -Wert in der durch MATLAB[®] gebildeten Matrix noch unverändert bleibt, steigt der p_{O_2} -Wert an diesem Punkt von 30 % auf 54 %. In der Formel 3.16 für k_{La} ist zu sehen, dass ein steigender p_{O_2} -Wert, solange die anderen Parameter gleich bleiben, zu einem höheren k_{La} -Wert führt.

Fed Batch-Phase

Zu Beginn der Fed Batch-Phase wurde manuell Antischaummittel in den Reaktor gegeben, um den gebildeten Schaum zu entfernen und die pO_2 -Messung wieder ohne Störungen durchführen zu können. Die Zugabe von Antischaummittel verringert für einen Moment die Sauerstofflöslichkeit, was sich in der pO_2 -Messung bemerkbar macht (Abb. 5.2). Mit dem Beginn der Fed Batch-Phase wurde exponentiell Glycerin in den Reaktor gegeben. In Abbildung 5.5 wird jedoch deutlich, dass der Sauerstoffeintrag und somit auch die Stoffwechselaktivität in den ersten 3 Stunden der Fed Batch-Phase zunächst sinkt. Dann wurde ein lokales Minimum erreicht und die Sauerstoffeintragsrate fing wieder an zu steigen.

Kurz darauf ist ein Sprung in den Ein- und Austragsraten zu erkennen. Dieser ist in Abbildung 5.2 in dem Verlauf der Rührerdrehzahl N_{St} besonders stark zu erkennen. Die Ursache des Sprungs in Q_{O_2} und Q_{CO_2} könnte in der pO_2 -Messung liegen. Durch die Zugabe einer größeren Menge an Korrekturmittel könnte der Sauerstoffpartialdruck abgesunken sein (erkennbar in Abb. 5.2). Aufgrund der Regelung durch den Rührer wurde dann automatisch der gesunkene Sauerstoffpartialdruck kompensiert. Der pO_2 -Sollwert wurde wieder erreicht, jedoch führte die kurzzeitig erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit zu einer erhöhten Zellaktivität. Durch die Verstoffwechslung des O_2 durch die Zellen wurde er aus der Flüssigphase entfernt und der pO_2 musste nicht mehr durch eine Senkung der Rührerdrehzahl kompensiert werden.

Anschließend nahm die Sauerstoffeintragsrate und der Kohlendioxidaustrag exponentiell mit der eingestellten Zufütterrata F_{R1} zu. Zehn Stunden nach Beginn der Fed Batch-Phase wurde diese beendet und das Reservoir von R1 zu R2 gewechselt. Am Ende der Fed Batch-Phase ist im Verlauf des $k_L a$ -Wertes erneut ein Ansteigen des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten zu beobachten. Dies liegt in diesem Fall ebenfalls an der Interpolation.

Produktionsphase

Nachdem der Sauerstoffverbrauch durch das Fehlen von Glycerin abgesunken ist, haben die Zellen ihren Stoffwechsel auf das neue Substrat angepasst und der Sauerstoffverbrauch nahm wieder zu (siehe Abb. 5.5). Die in dieser Arbeit eingeführte un stetige Regelung mit nur einem Ausgangswert griff erstmalig nach etwa 27 Stunden ein. Vor der Anwesenheit von Methanol hat die Methanolsonde außerhalb des Kalibrierbereichs ein willkürliches Signal gemessen. Mit der Zugabe des Methanols am Anfang der Produktionsphase hat

sich das gemessene Signal in Richtung des Kalibrierbereichs bewegt und hat den Schwellenwert von 1 g l^{-1} unterschritten (siehe Abb. 5.2). In dem Plot mit der Konzentration an Methanol wird deutlich, dass das Signal nicht fein aufgelöst werden konnte, sondern immer zwischen festen Werten sprang. Trotz diesem Umstand und der Trägheit der Sonde konnte in der gesamten Produktionsphase die Zellaktivität und somit auch eine gewisse Methanol-Konzentration gehalten werden. Andernfalls würde die Aktivität bei einer zu niedrigen, aber auch einer zu hohen Methnalkonzentration beeinträchtigt werden. Die Aktivität wird in diesem Fall an dem Eintrag von Sauerstoff und Austrag von CO_2 festgemacht.

In Abbildung 5.5 wird, nach dem erneuten Anstieg des Sauerstoffeintrags, eine Differenz zwischen der Sauerstoffeintragsrate und Kohlendioxideintragsrate deutlich. Während sich eine Differenz zwischen Q_{O_2} und Q_{CO_2} in der Fed Batch-Phase nur erahnen lässt, ist in der Produktionsphase eine höhere Sauerstoffeintragsrate als Kohlendioxidaustragsrate eindeutig zu erkennen. Dies liegt vor allem daran, dass O_2 neben der Bindung vom Kohlenstoff für die Neutralisation von Wasserstoffperoxid verwendet wird (siehe Abb. 3.1).

Die Kurven von Q_{O_2} und Q_{CO_2} zeigen während der Produktionsphase ein Sägezahnmuster auf. Dieses Muster ist der periodischen Zugabe von Methanol zuzuschreiben. Obwohl die Methankonzentration in der Theorie konstant bei $1\text{-}2 \text{ g l}^{-1}$ gehalten wird, ist der Kurvenverlauf nicht wie erwartet exponentiell ansteigend, sondern bleibt periodisch nahezu konstant oder steigt linear an.

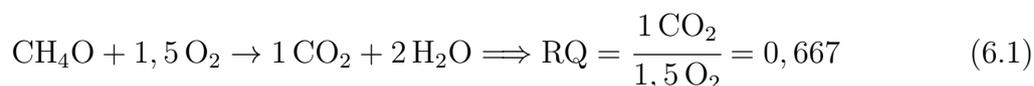
In Abbildung 5.3 ist zu sehen, wie das von *P. pastoris* gebildete eGFP in Anwesenheit von UV-Licht grün aufleuchtet. Dies deutet darauf hin, dass das gewünschte Protein erfolgreich exprimiert wurde. In Abbildung 5.2 sind die Werte der Fluoreszenzmessung dargestellt. Wie auch schon in den vorherigen Bachelorarbeiten beobachtet wurde, kann bereits vor der Induktion von Methanol Fluoreszenz detektiert werden [7, 15]. Aufgrund der supprimierenden Wirkung von Glycerin auf das *AOX1*-Gen sollte dies jedoch nicht der Fall sein. Als Ursache für die vorzeitige Exprimierung wird eine Autoinduktion vermutet [15]. In der Produktionsphase nimmt die Fluoreszenz zunächst im Vergleich zur Fed Batch-Phase zu. Im weiteren Verlauf sinkt die gemessene Fluoreszenz jedoch entgegen den Erwartungen ab und springt in der letzten Messung erneut nach oben. Gemessen wurden $200 \mu\text{l}$ Überstand bei einer Verstärkung von 50.

6.2 Der Respirationsquotient

Aus dem Quotienten der Kohlendioxidaustragsrate Q_{CO_2} und der Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} , unter Berücksichtigung der molaren Massen von O_2 und CO_2 , wird der Respirationsquotient RQ berechnet. Der Verlauf von RQ dieser Kultivierung ist in Abbildung 5.7 dargestellt.

Zu Beginn der Batch-Phase steigt der RQ-Wert zunächst an, oszilliert jedoch dabei sehr stark. Nach etwa 6 Stunden pendelt sich der Respirationsquotient bei ca. 0,72 ein. Der theoretische Respirationsquotient von Glycerin liegt bei 0,857 (Formel 3.12). Es liegt somit eine Differenz von etwa 16 %, zwischen dem theoretischen und tatsächlichen RQ vor.

In der Produktionsphase wird Methanol als Substrat verwendet. Der Respirationsquotient von Methanol wird in Formel 6.1 berechnet.



Der gemessene Respirationsquotient liegt bei etwa 0,60 und ist somit ebenfalls niedriger als der theoretische RQ-Wert. Die Differenz beträgt hierbei 10 %.

Trotz der Differenzen zwischen den theoretischen und gemessenen Respirationsquotienten konnte aufgezeigt werden, dass das Verändern des Substrats, und somit auch des Stoffwechselwegs, einen Einfluss auf das Verhältnis von Q_{O_2} zu Q_{CO_2} hat.

6.3 Vergleich der Ergebnisse aus den Systemen

BlueInOne Cell und BlueVary

In diesem Experiment wurden die Abgasanalyzesysteme BlueInOne Cell und BlueVary, mit einem kurzen Zeitverzug, nacheinander mit denselben Soll-Werten kalibriert. Es wurde erwartet, dass die gemessenen Daten exakt miteinander übereinstimmen, da die Systeme in Reihe geschaltet sind und sich an denselben Messmethoden bedienen. Dies ist jedoch nicht gänzlich der Fall. Auffällig ist, dass der BlueInOne Cell ab einer CO_2 -Konzentration von etwa 1 % damit beginnt einen höheren Wert zu messen als der BlueVary. Dies wird in Abbildung 6.1 mit einer eingezeichneten Linie verdeutlicht. Die Messdifferenz liegt teilweise bei $\Delta x_{\text{CO}_2} = 0,05\%$ und ist somit höher als die Konzentration, bei der kalibriert wurde.

Die Abluft fließt durch einen 1,5 Meter langen Schlauch vom Bioreaktor bis zum BlueVary und anschließend über einen 1,4 Meter langen Schlauch bis zum BlueInOne Cell.

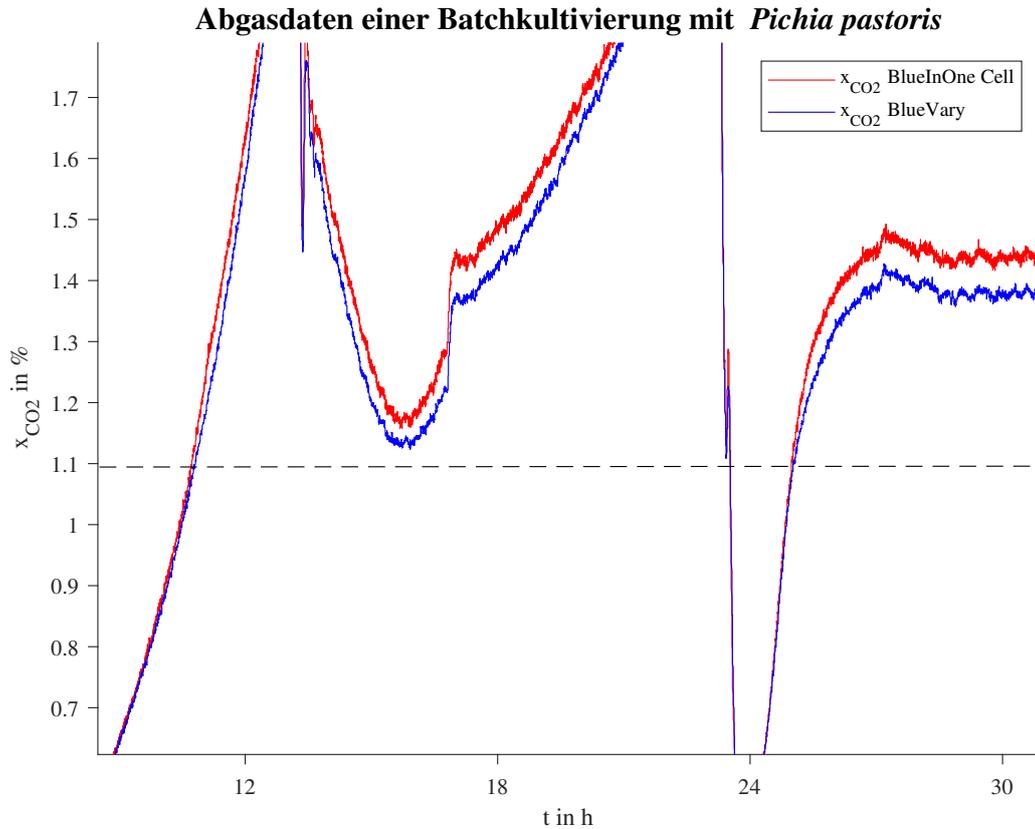


Abbildung 6.1: Die CO_2 -Messwerte mit dem Fokus auf der Differenz zwischen den Messwerten vom BlueInOne Cell und dem BlueVary. Durch eine Linie wurde ein Bereich gekennzeichnet, in dem der BlueInOne Cell einen höheren CO_2 -Stoffmengenanteil misst als der BlueVary.

Durch diese Strecke kommt es zu einem Zeitverzug zwischen der aktuellen Gasphase im Reaktor, der Messung im BlueVary und der Messung im BlueInOne Cell. Der Zeitverzug beträgt mit der Zuluft von $1,5 \text{ l min}^{-1}$ und einem Schlauchdurchmesser von 6 mm, 1,7 Sekunden (Bioreaktor \rightarrow BlueVary) und 1,6 Sekunden (BlueVary \rightarrow BlueInOne Cell). Die Messfrequenz liegt jedoch bei 5 Sekunden, weshalb dieser Zeitverzug keinen signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse haben sollte.

Die Abbildung 6.2 zeigt ein Muster, welches den O_2 -Anteil und die relative Luftfeuchtigkeit zu Beginn des Prozesses zeigt. Dabei fällt auf, dass die O_2 -Anteilsmesswerte der beiden Sensoren sich antiparallel zueinander bewegen. Zusätzlich steigt der gemessene O_2 -Anteil des BlueVarys mit in der gleichen Frequenz wie die relative Luftfeuchtigkeit. Ein möglicher Grund für den antiparallelen Verlauf der O_2 -Anteile könnte sein, dass der

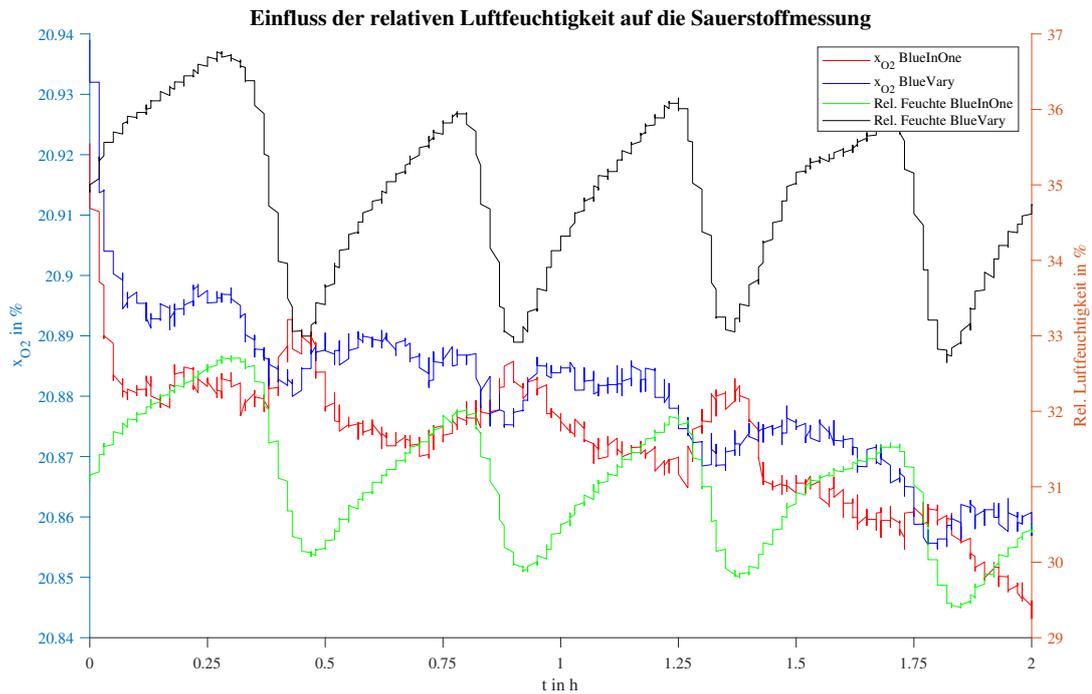


Abbildung 6.2: Der O_2 -Anteil und die relative Luftfeuchtigkeit in den ersten zwei Stunden des Prozesses. Die Messwerte stammen vom BlueInOne Cell und BlueVary. Die Abbildung wurde mit MATLAB[®] erstellt.

BlueVary, welcher vor dem BlueInOne Cell angeschlossen ist, über die galvanische Zelle O_2 -Moleküle verbraucht und dies messtechnisch in den Messdaten vom BlueInOne Cell sichtbar wird. Im welchen Umfang Sauerstoff bei dieser Reaktion verbraucht wird ist jedoch nicht bekannt, da BlueSens zufolge Faktoren wie innere Widerstände einen Einfluss auf die Messung haben können [43].

7 Zusammenfassung

Im Zuge der Etablierung der Berechnung von Abgaskennwerten bei der Kultivierung von *P. pastoris* in einem Laborfermenter wurde in dieser Arbeit beispielhaft eine Fed Batch-Kultivierung durchgeführt. Ein Vorversuch lieferte zusätzliche Informationen über das Wachstumsverhalten der Zellen in der Batch-Phase. Die maximale zellspezifische Wachstumsrate μ_{\max} von $0,3 \text{ h}^{-1}$ entsprach dem vorher angenommenen Wert. Die Vorkultur ist in diesem Versuch hingegen langsamer gewachsen als in späteren Durchgängen, weshalb das Kryo-Volumen in der Fed Batch-Kultivierung auf $150 \text{ }\mu\text{l}$ verringert wurde. Die Fed Batch-Kultivierung konnte ohne Ausfälle von Sensoren vollständig durchgeführt werden und zeigt überwiegend den erwarteten Verlauf von Abbildung 3.7. Die Höhe des oberen 6-Blatt-Scheibenrührers könnte optimiert werden, da es während der Batch-Phase zur Schaumbildung kam. Unerwartete Ergebnisse lagen bei der Fluoreszenzmessung vor, da der letzte Messwert einen starken Zuwachs der Fluoreszenz aufzeigt. Die in dieser Arbeit neu eingeführte Regelung der Methanol-Konzentration in der Produktionsphase funktionierte wie geplant. Die Methanol-Konzentration konnte, wie in Abbildung 5.2 zu sehen ist, konstant auf $1\text{-}2 \text{ g l}^{-1}$ gehalten werden.

Die Berechnung der Abgaskennwerte konnte mit der Software MATLAB[®] problemlos durchgeführt werden. Mithilfe der Interpolation konnten alle gemessenen Daten, die in die Berechnung mit einfließen, in das korrekte Format einer Matrix gebracht werden. So konnten gemessene Parameter wie die Temperatur ϑ_L , und das Volumen der Flüssigphase V_L direkt in Berechnung der Abgaskennwerte mit einbezogen werden.

8 Ausblick

Für die zukünftigen Prozesse sollte eine Kommunikation zwischen den Softwaresystemen MFCS/win und BlueVis aufgebaut werden, damit die hier vorgestellten Abgaskennwerte während des Prozesses berechnet werden können und so online das Stoffwechselverhalten der Zellen beobachtet werden kann. Zudem könnten die beiden Abgasanalysensysteme vertauscht werden, um den Einfluss der Reihenfolge auf die Messergebnisse bewerten zu können. Im normalen Betrieb sollte eins der Geräte ausreichend sein, da sie vergleichbare Ergebnisse liefern.

Der obere 6-Blatt-Scheibenrührer sollte in folgenden Kultivierungen auf eine Höhe eingestellt werden, auf der keine Schaumbildung erzeugt wird, um Probleme mit der pO_2 -Regelung zu vermeiden. Die neu eingeführte Regelung wurde anhand einer noch nicht vollständig eingearbeiteten Methanol-Sonde durchgeführt. Diese sollte zunächst etabliert werden, um sicher gehen zu können, dass die gemessene Konzentration der tatsächlichen Methanol-Konzentration entspricht.

Literaturverzeichnis

- [1] JAHIC, M. ; ROTTICCI-MULDER, J.C. ; MARTINELLE, Mats ; HULT, Karl ; ENFORS, Sven-Olof: Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 24 (2002), 03, S. 385–393. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-001-0274-5>. – DOI 10.1007/s00449-001-0274-5
- [2] CORNELISSEN, Gesine: *Integrierte Bioprozessentwicklung zur Herstellung pharmakologisch wirksamer Proteine mit Pichia pastoris*, Universität Hannover Fachbereich Chemie, Diss., 2004
- [3] DAY, Richard ; DAVIDSON, Michael: The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. In: *Chemical Society Reviews* 38 (2009), 8, Nr. 10, S. 2887. <http://dx.doi.org/10.1039/b901966a>. – DOI 10.1039/b901966a
- [4] GOSWAMI, Amit ; COOPER, Robin: Measurement of gases (O₂, CO₂, N₂, N₂O and volatile agents). In: *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 12 (2011), Nr. 12, 568-573. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2011.09.008>. – DOI 10.1016/j.mpaic.2011.09.008. – ISSN 1472-0299. – Thoracic Anaesthesia / Physics
- [5] BLUESENS GAS SENSOR GMBH (Hrsg.): *BlueVary Manua*. BlueSens gas sensor GmbH, https://www.bluesens.com/fileadmin/user_upload/downloads-products/BlueVary/BlueVary_man.pdf
- [6] BLUESENS GAS SENSOR GMBH (Hrsg.): *BCP CO2 Manual*. Blue-sens gas sensor GmbH, https://www.bluesens.com/fileadmin/user_upload/downloads-products/BCP-CO2/BCP-CO2-Manual-de-en.pdf
- [7] THOMA, Alexander: Untersuchung und Automatisierung der Expressionsphase einer dreistufigen Fed Batch Kultivierung von *Pichia pastoris* zur Herstellung von eGFP. (2019). <https://reposit.haw-hamburg.de/handle/20.500.12738/9077>
- [8] KLAUS BUCHHOLZ, John C.: *Eine kleine Geschichte der Biotechnologie - Von Bier und Wein zu Penicillin, Insulin und RNA-Impfstoffen*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 2022. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-63988-7>. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-63988-7>

- [9] DEMAÏN, Arnold L.: Microbial biotechnology. In: *Trends in Biotechnology* 18 (2000), Nr. 1, 26-31. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01400-6](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01400-6). – DOI [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01400-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01400-6). – ISSN 0167-7799
- [10] LEGRAS, Jean-Luc ; MERDINOGLU, Didier ; CORNUET, Jean-Marie ; KARST, Francis: Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. In: *Molecular Ecology* 16 (2007), Nr. 10, S. 2091–2102. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>. – DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- [11] LUMBSCH, T ; HUHDORF, S: USA: The Field Museum, Department of Botany. In: *Myconet. Chicago* 13 (2007), 12, S. 1–58
- [12] AHMAD, M ; HIRZ, M ; PICHLER, H ; SCHWAB, H: Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 98 (2014), 4, Nr. 12, S. 5301–5317. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5.Epub>. – DOI 10.1007/s00253-014-5732-5.Epub
- [13] JENZSCH, Marco ; GNÖTH, Stefan ; KLEINSCHMIDT, Martin ; SIMUTIS, Rimvydas ; LÜBBERT, Andreas: Improving the batch-to-batch reproducibility in microbial cultures during recombinant protein production by guiding the process along a predefined total biomass profile. In: *Bioprocess and Biosystems Engineering* 29 (2006), 9, Nr. 5-6, S. 315–321. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-006-0080-1>. – DOI 10.1007/s00449-006-0080-1
- [14] GUSTAVSSON, Robert ; LUKASSER, Cornelia ; MANDENIUS, Carl-Fredrik: Control of specific carbon dioxide production in a fed-batch culture producing recombinant protein using a soft sensor. In: *Journal of Biotechnology* 200 (2015), 3, S. 44–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.030>. – DOI 10.1016/j.jbiotec.2015.02.030
- [15] KIRSCHNICK, Christina: *Etablierung einer Kultivierung von Pichia pastoris im Laborfermenter zur Expression von eGFP*. 2018
- [16] OGATA, Koichi ; NISHIKAWA, Hideo ; OHSUGI, Masahiro: A Yeast Capable of Utilizing Methanol. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 33 (1969), 10, Nr. 10, S. 1519–1520. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1969.10859497>. – DOI 10.1080/00021369.1969.10859497

- [17] In: HIGGINS, David ; CREGG, James: *Introduction to Pichia pastoris*. Bd. 103. Humana Press, 1998, S. 1–16
- [18] CREGG, James ; CEREGHINO, Joan ; SHI, Jianying ; HIGGINS, David: Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. In: *Molecular Biotechnology* 16 (2000), Nr. 1, S. 23–52. <http://dx.doi.org/10.1385/mb:16:1:23>. – DOI 10.1385/mb:16:1:23
- [19] KNÖPFEL, Hans-Peter: *Zum Crabtree-Effekt bei Saccharomyces cerevisiae und Candida tropicalis*. ETH Zurich, 1972
- [20] CHISTOSERDOVA, Ludmila ; KALYUZHAYNA, Marina ; LIDSTROM, Mary: The Expanding World of Methylophilic Metabolism. In: *Annual Review of Microbiology* 63 (2009), 10, Nr. 1, S. 477–499. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073600>. – DOI 10.1146/annurev.micro.091208.073600
- [21] ZHANG, Jin ; CAMPBELL, Robert ; TING, Alice ; TSIEN, Roger: Creating new fluorescent probes for cell biology. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (2002), 12, Nr. 12, S. 906–918. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm976>. – DOI 10.1038/nrm976
- [22] SHIMOMURA, O: The discovery of aequorin and green fluorescent protein. In: *Journal of Microscopy* 217 (2005), 1, Nr. 1, S. 3–15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-2720.2005.01441.x>. – DOI 10.1111/j.0022-2720.2005.01441.x
- [23] ARPINO, James A. J. ; RIZKALLAH, Pierre J. ; JONES, D. D.: Crystal Structure of Enhanced Green Fluorescent Protein to 1.35 [®] Å Resolution Reveals Alternative Conformations for Glu222. In: *PLOS ONE* 7 (2012), 10, Nr. 10, S. 1–8. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047132>. – DOI 10.1371/journal.pone.0047132
- [24] ZHAO, Liang ; FU, Hsu-Yuan ; ZHOU, Weichang ; HU, Wei-Shou: Advances in process monitoring tools for cell culture bioprocesses. In: *Engineering in Life Sciences* 15 (2015), Nr. 5, S. 459–468. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1002/elsc.201500006>. – DOI <https://doi.org/10.1002/elsc.201500006>
- [25] BLUESENS GAS SENSOR GMBH (Hrsg.): *BlueInOne Cell Manual*. BlueSens gas sensor GmbH, https://www.bluesens.com/fileadmin/user_upload/downloads-products/BlueInOne/BlueInOne-Cell-Manual-de-en.pdf
- [26] PHILIPP BIECHELE, Dörte Solle Thomas Scheper Kenneth R. Christoph Busse B. Christoph Busse: Sensor systems for bioprocess monitoring. In: *Engineering in*

- Life Sciences* 15 (2015), Nr. 5, S. 469–488. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201500014>. – DOI 10.1002/elsc.201500014
- [27] LIGHTON, John R. B.: *Measuring Metabolic Rates*. Oxford University Press, Inc., 2008. <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195310610.001.0001>. <http://dx.doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195310610.001.0001>
- [28] BAKAN, Stephan ; RASCHKE, Ehrhard: Der natürliche Treibhauseffekt. In: *Promet* 28 (2002), Nr. Numerische Klimamodelle-Was können sie, wo müssen sie verbessert werden? Teil I: Das Klimasystem der Erde, S. 85–94
- [29] *Kapitel* Bioprozessanalytik und-steuerung. In: HITZMANN, Bernd ; SCHEPER, Thomas: *Bioprosesstechnik*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 2018. – ISBN 978–3–662–54041–1, S. 261 – 298
- [30] SINGH, R. ; NGO, Low L. ; SENG, Ho S. ; MOK, F.N.C.: A silicon piezoresistive pressure sensor. In: *Proceedings First IEEE International Workshop on Electronic Design, Test and Applications '2002*, 2002, S. 181–184
- [31] JAMES ALLEN BAILEY, Jay Bailey David F. Ollis David F.. O. James Edwin Bailey B. James Edwin Bailey: *Biochemical Engineering Fundamentals*. Bd. 2, illustriert, Neuauflage. McGraw-Hill, 1986. – ISBN 0070032122, 9780070032125
- [32] *Kapitel* Prozessmodelle. In: TAKORS, Ralf ; WEUSTER-BOTZ, Dirk: *Bioprosesstechnik*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 2018. – ISBN 978–3–662–54041–1, S. 71 – 105
- [33] KAISER, Christian: *Fermentations- und Bioreaktortechnik Skript: Wärme und Stofftransport*. 2020
- [34] MOUTAFCHIEVA, D ; POPOVA, D ; DIMITROVA, M ; TCHAUSHEV, S: Experimental determination of the volumetric mass transfer coefficient. In: *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* 48 (2013), Nr. 4, S. 351–356
- [35] *Kapitel* Transportvorgänge in Biosuspensionen. In: CHMIEL, Horst ; WALITZA, Eckehard: *Bioprosesstechnik*. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 2018. – ISBN 978–3–662–54041–1, S. 131 – 157
- [36] SATORIUS STEDIM BIOTECH BMBH (Hrsg.): *Biostat® A-MO (mikrobielle Fermentation) BB-8822000*. Satorius Stedim Biotech BmbH

- [37] ENDRESS+HAUSER (Hrsg.): *Technische Information Memosens CPS171D*. Endress+Hauser, https://bdih-prod-assetcentralapi-assetcentral-rest-srv.cfapps.eu10.hana.ondemand.com/files/DLA/005056A500261ED895F057F40F43096D/TI01254CDE_0218.pdf
- [38] PARTHIER, Rainer: *Messtechnik*. 8. Springer Vieweg Wiesbaden, 2016. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-658-13598-0>. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-658-13598-0>. – ISBN 978-3-658-13597-3
- [39] ENDRESS+HAUSER (Hrsg.): *Technische Information Oxymax COS22D/COS22*. Endress+Hauser, https://bdih-prod-assetcentralapi-assetcentral-rest-srv.cfapps.eu10.hana.ondemand.com/files/DLA/EE0EF01400391ED5AE86CBF10D5AB238/TI00446CDE_0415.pdf
- [40] NOLL, Prof. Dr. S.: *Pichia pastoris BSYBG11 eGFP - Abgabeprotokoll zu Laborstämmen*. April 2021
- [41] *Kapitel Mikrobielles Wachstum*. In: MICHAEL T. MADIGAN, David A. Stahl David P. C. John M. Martinko M. John M. Martinko: *Mikrobiologie Kompakt*. PEARSON, S. 204 – 205
- [42] LOOSER, V ; BRUHLMANN, B ; BUMBAK, F ; STENGER, C ; COSTA, M ; CAMATTARI, A ; FOTIADIS, D ; KOVAR, K: Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. In: *Biotechnology Advances* 33 (2015), 5, Nr. 6, S. 1177–1193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>. – DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.05.008
- [43] *Kontaktformular der BlueSens Webseite*. <https://www.bluesens.com/company/contact/BlueVary/question>. Version: September 2022

9 Anhang

9.1 Medienzusammensetzung

Tabelle 9.1 Zusammensetzung des Batch Mediums.

Chemikalie	Konzentration in g l^{-1}
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	25,00
KH_2PO_4	25,70
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,00
K_2SO_4	8,60
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,40
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	16,40
$\text{Na}_3 - \text{Citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,81

Thermolabile Stocklösung	Konzentration in ml l^{-1}
Biotin	8,00
PTM4	4,00

Tabelle 9.2 Zusammensetzung des Glycerin
Zufüttermediums.

Chemikalie	Konzentration in g l^{-1}
Glycerin	150

Thermolabile Stocklösung	Konzentration in ml l^{-1}
Biotin	10,00
PTM4	10,00

Tabelle 9.3 Zusammensetzung des Methanol
Zufüttermediums.

Chemikalie	Konzentration in g l^{-1}
Methanol	790

Thermolabile Stocklösung	Konzentration in ml l^{-1}
Biotin	8,00
PTM4	4,00

9.2 Chemikalienliste

Tabelle 9.4 Verwendete Chemikalien für die Herstellung der Batch Medien.

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
$C_3H_8O_3$ 99, 5%	Roth	3783.5
KH_2PO_4	Roth	3904.1
$(NH_4)_2SO_4$	Roth	3746.3
K_2SO_4	Roth	P022.3
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	Roth	0256.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Roth	P027.1
$Na_3 - Citrate \cdot 2H_2O$	Sigma Aldrich	1.064.481.000

Tabelle 9.5 Verwendete Chemikalien für die Herstellung der Zufüttermedien und Korrekturmittel.

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
$C_3H_8O_3$ 99, 5%	Roth	3783.5
CH_3OH	Roth	4627.3
H_3PO_4 85%	Roth	6366.1
NH_3 25%	CHEMSOLUTE	2672.5000
J673	Struktol	5188770

9.3 Geräteliste

Tabelle 9.6 Die verwendeten Geräte für die Durchführung der Kultivierung.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Bioreaktor	Sartorius Stedim Biotec GmbH	BIOSTAT [®] A
pH-Sonde	Endres+Hauser AG	Memosens CPS171D
pO ₂ -Sonde	Endres+Hauser AG	Memosens Oxymax H COS22D
Niveausonde	Sartorius Stedim Biotec GmbH	-
Abgassensor 1	BlueSens gas sensor GmbH	BlueInOne Cell
Abgassensor 2	BlueSens gas sensor GmbH	BlueVary
Schlauchpumpe	Ismatec SA.	ISM796
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	CP2202 S
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	CP6201
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	ED420S
Waage	Sartorius Stedim Biotec GmbH	FB12 CCE-S
Analysenwaage KERN	KERN & SOHN GmbH	ABJ-NM/ABS-N
Analysenwaage PAG	OERLIKON	240-9063 PRECISA 300M
Magnetrührer	Janke und Kunkel KG IKA Werk	IKA-COMBIMAG REO/RCO
pH-Meter	METTLER TOLEDO	FiveEasy
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments	HERA Safe
Autoklav	Systemex GmbH	VX-150
Schüttelinkubator	Gesellschaft für Labortechnik mbH	3032

Tabelle 9.7 Die verwendeten Geräte zur Bestimmung der Biotrockenmasse.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Zentrifuge	Eppendorf SE	Centrifuge 5417R
Trockenschrank	Köttermann GmbH	2711
Analysenwaage KERN	KERN & SOHN GmbH	ABJ-NM/ABS-N

Tabelle 9.8 Die verwendeten Geräte zur Bestimmung der optischen Dichte.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Photometer	Thermo Scientific	Genesys20
Vortexer	IKA Works Inc.	MS2 Minishaker

Tabelle 9.9 Die verwendeten Geräte zur Bestimmung der Fluoreszenz.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Mikrotiterplatten- Reader	TECAN Trading AG	GENios

9.4 Berechnung des Henry-Koeffizienten

Der Henry-Koeffizient beschreibt den Gleichgewichtspartialdruck in der Gasphase und ist temperaturabhängig [32]. Nach dem Bunsenschen Gesetz kann der Henry-Koeffizient H_{O_2} für Sauerstoff nach der Formel 9.1 berechnet werden. H_{nO_2} entspricht unter Normalbedingungen $1,448 \cdot 10^6 \text{ Nm kg}^{-1}$.

$$H_{O_2}(t) = \frac{H_{nO_2}}{1 + \sum_{i=1}^4 K_{iO_2} \cdot \vartheta_L^i(t)} \quad (9.1)$$

$H_{O_2}(t)$:	Henry-Koeffizient für Sauerstoff	[Nm kg ⁻¹]
H_{nO_2} :	Theoretischer Henry-Koeffizient für O ₂ bei 0 °C	[Nm kg ⁻¹]
K_{iO_2} :	Konstante nach dem Bunsenschen Gesetz	[°C ⁻ⁱ]
$\vartheta_L^i(t)$:	Temperatur in der Flüssigphase	[°C]

Mit den vier Konstanten:

$$\begin{aligned} K_{1O_2} &= -2,723 \cdot 10^{-2} \text{ °C}^{-1} \\ K_{2O_2} &= 5,627 \cdot 10^{-4} \text{ °C}^{-2} \\ K_{3O_2} &= -6,597 \cdot 10^{-6} \text{ °C}^{-3} \\ K_{4O_2} &= 3,283 \cdot 10^{-8} \text{ °C}^{-4} \end{aligned}$$

9.5 MATLAB Skripte

9.5.1 Interpolieren

Listing 9.1: Das MATLAB[®] -Skript für die Interpolation der Daten aus MFCS/win.

```

1 clear all, clc
2
3 % Abgasdaten und die Zeitachse auslesen
4 M1 = dlmread('Offgas.txt', '\t', 1, 0);
5
6 M2 = [M1(:,1) M1(:,2) M1(:,3) M1(:,4) M1(:,5)];
7
8 % Die Zeitachse auf die die Daten interpoliert werden sollen definieren
9 t = M2(:,1);
10
11 % Namen der Variablen
12 data = ["FnG", "pH", "TL", "NSt", "pO2_aeration", "VL"];
13
14 % Daten auslesen, interpolieren und in der erstellten Matrix speichern
15 for i = 1:length(data)
16     r = dlmread(data(i)+".txt", "\t", 1, 0); % r = read
17     ts = r(:,1); % ts = time split
18     ys = r(:,2); % ys = value split
19     [ts, uni] = unique(ts);
20     y = interp1(ts, ys(uni), t);
21     p = isnan(y); % Prueft, ob an dem Index ein NaN-Wert vorliegt
22     for k = (1:length(y))
23         if p(k,1) == 1
24             % In der Wachstumsphase werden andere Soll-Werte benoetigt, als in der Produktionsphase
25                 if k/length(y) <= 0.5
26                     y(k,1) = ys(1,1);
27                 else
28                     y(k,1) = ys(length(ys),1);
29                 end
30             end
31         end
32         ipdata(:,i) = y;
33     end
34
35 % Alle interpolierten Daten in einer Matrix
36 MT(:,1:5) = M2;
37 MT(:,6:(5+size(ipdata,2))) = ipdata;
38
39 % TXT-Datei erstellen
40 T = table(MT(:,1), MT(:,2), MT(:,3), MT(:,4), MT(:,5), MT(:,6), MT(:,7), MT(:,8), ...
41     MT(:,9), MT(:,10), MT(:,11), 'VariableNames', ...
42     { 't [h]', 'xCO2 BlueVary [%]', 'xO2 BlueVary [%]', ...
43     'xCO2 BlueInOne [%]', 'xO2 BlueInOne [%]', ...
44     'FnG [l/h]', 'pH [-]', 'TL [°C]', ...
45     'NSt [-]', 'pO2 [%]', 'VL [l]'});
46 % Daten in eine TXT-Datei uebertragen

```

```
47 writetable(T, 'Interp_Data.txt', 'Delimiter', '\t')
```

9.5.2 Berechnung der Abgaskennwerte mit MATLAB®

Listing 9.2: Das MATLAB® -Skript für die Berechnung der Abgaskennwerte.

```
1 % Berechnung der Abgaskennwerte einer Fed Batch-Kultivierung
2 % Datum der Kultivierung: 29.07.2022 – 01.08.2022
3 % Philipp Yuma Iff
4 % BIO = BlueInOne Cell
5 % BV = BlueVary
6
7 clear, clc
8
9 M1 = dlmread('Interp_Data.txt', '\t', 1, 0);
10
11 M2 = [M1(:,1) M1(:,2) M1(:,3) M1(:,4) M1(:,5), M1(:,6), ...
12       M1(:,7), M1(:,8), M1(:,9), M1(:,10), M1(:,11)];
13
14 t           = M1(:,1);      % [h]
15 xCO2_BV    = M2(:,2);      % [%]
16 xO2_BV     = M2(:,3);      % [%]
17 xCO2_BIO   = M2(:,4);      % [%]
18 xO2_BIO    = M2(:,5);      % [%]
19 FnG        = M2(:,6);      % [l/h]
20 TL         = M2(:,8);      % [Grad C]
21 NSt        = M2(:,9);      % [-]
22 pO2        = M2(:,10);     % [%]
23 VL         = M2(:,11);     % [l]
24
25 % Definition der Parameter
26 xOGin_BV   = max(xO2_BV)./100; % [-]
27 xOGcal_BV  = xOGin_BV;       % [-]
28 xOAIR_BV   = xOGin_BV;       % [-]
29 xOGin_BIO  = max(xO2_BIO)./100; % [-]
30 xOGcal_BIO = xOGin_BIO;      % [-]
31 xOAIR_BIO  = xOGin_BIO;      % [-]
32 xCGin_BV   = min(xCO2_BV)./100; % [-]
33 xCGin_BIO  = min(xCO2_BIO)./100; % [-]
34 pE = 1.01325 * 100000;      % [N/m^2] Normaldruck
35 pG = 1.01325 * 100000;      % [N/m^2] Druck in der Gasphase
36 pGcal = pG;                 % [N/m^2]
37 FnG = FnG.*60;              % [l/min]
38
39 VnM = 22.414;                % [l/mol] Molvolumen
40 M02 = 32;                    % [g/mol] Molare Masse O2
41 MC02 = 44;                   % [g/mol] Molare Masse CO2
42 rho = 0.99565;               % [g/l] Wasserdichte bei 30 ÅrC
43
44 HnO2 = 1.448*10^6;           % [Nm/kg] Henry-Koeffizient bei 0 ÅrC
45 % Konstanten des Bunsenschen Gesetz
```

```

46 K102 = -2.723*10^-2;% [Grad C^-1]
47 K202 = 5.627*10^-4; % [Grad C^-2]
48 K302 = -6.597*10^-6;% [Grad C^-3]
49 K402 = 3.283*10^-8; % [Grad C^-4]
50
51 % Berechnung des Henry-Koeffizienten bei 30 Grad C
52 H02 = (Hn02) ./ (1+(K102.*TL.^1)+(K202.*TL.^2)+(K302.*TL.^3)+(K402.*TL.^4));
53
54 % Berechnung der Abgaskennwerte von BV und BIO
55 xO2_BV = xO2_BV ./ 100;
56 xO2_BIO = xO2_BIO ./ 100;
57 xCG_BV = xCO2_BV./100;
58 xCG_BIO = xCO2_BIO./100;
59
60 % Zeitvektor in der Result-Matrix
61 R(:,1) = t;
62
63 % Maximal mögliche Sauerstoffeintragsrate
64 % Q02max(t) = (FnG(t) .* M02) ./ (VnM .* VL(t));
65 Q02max = (FnG .* M02) ./ (VnM .* VL);
66 R(:,2) = Q02max;
67
68 % QC02max(t) = (FnG(t)*MC02) ./ (VnM*VL(t))
69 QC02max = (FnG .* MC02) ./ (VnM .* VL);
70 R(:,3) = QC02max;
71
72 % c0Lmax = pG / H02
73 c0Lmax = (pG) ./ H02;
74
75 % c0L100(t) = (pGcal * x0Gcal) / H02(t)
76 c0L100_BV = (pGcal .* x0Gcal_BV) ./ H02;
77 c0L100_BIO = (pGcal .* x0Gcal_BIO) ./ H02;
78
79 %BlueVary
80 % Q02(t) = Q02max * (x0Gin(t)*[1-xCG(t)]-x0G(t)*[1-xCGin(t)])/(1-x0G(t)-xCG(t))
81 Q02_BV = Q02max.*(x0Gin_BV.*(1-xCG_BV)-x0G_BV.*(1-xCGin_BV))./(1-x0G_BV-xCG_BV);
82 R(:,4) = Q02_BV;
83 % QC02(t) = QC02max * (-xCGin(t)*[1-x0G(t)]+xCG(t)*[1-x0Gin(t)])/(1-x0G(t)-xCG(t))
84 QC02_BV = QC02max.*(-xCGin_BV.*(1-x0G_BV)+xCG_BV.*(1-x0Gin_BV))./(1-x0G_BV-xCG_BV);
85 R(:,5) = QC02_BV;
86 % RQ(t) = (QC02(t) * M02) / (Q02(t) * MC02)
87 RQ_BV = (QC02_BV .* M02) ./ (Q02_BV .* MC02);
88 R(:,6) = RQ_BV;
89 % kLa=(Q02*100)/(c0Lmax(t) * x02(t) - c0L100(t) * p02(t))
90 kLa_BV = (Q02_BV * 100) ./ (c0Lmax .* x02_BV - c0L100_BV .* p02);
91 R(:,7) = kLa_BV;
92
93 % BlueInOne
94 % Q02(t) = Q02max * (x0Gin(t)*[1-xCG(t)]-x0G(t)*[1-xCGin(t)])/(1-x0G(t)-xCG(t))
95 Q02_BIO = Q02max.*(x0Gin_BIO.*(1-xCG_BIO)-x0G_BIO.*(1-xCGin_BIO))./(1-x0G_BIO-xCG_BIO);
96 R(:,8) = Q02_BIO;
97 % QC02(t) = QC02max * (-xCGin(t)*[1-x0G(t)]+xCG(t)*[1-x0Gin(t)])/(1-x0G(t)-xCG(t))
98 QC02_BIO = QC02max.*(-xCGin_BIO.*(1-x0G_BIO)+xCG_BIO.*(1-x0Gin_BIO))./(1-x0G_BIO-xCG_BIO);

```

```
99 R(:,9) = QC02_BIO;
100 % RQ(t) = (QC02(t) * M02) / (Q02(t) * MC02)
101 RQ_BIO = (QC02_BIO .* M02) ./ (Q02_BIO .* MC02);
102 R(:,10) = RQ_BIO;
103 % kLa = (Q02*100)/(c0Lmax(t) * x02(t) - c0L100(t) * p02(t))
104 kLa_BIO = (Q02_BIO * 100) ./ (c0Lmax .* x02_BIO - c0L100_BIO .* p02);
105 R(:,11) = kLa_BIO;
```