

Automatisierung, Optimierung und Analyse
Integrierter Produktionsprozesse zur Herstellung
rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von
M.Sc. Dipl.-Ing. (FH) Kai Dennis Lögering

geboren am 04.05.1984 in Lingen

2015

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Karl-Heinz Bellgardt
Tag der Promotion: 22.06.2015

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) Hamburg im Forschungs- und Transferzentrum für Bioprozess- und Analysetechnik unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Reiner Luttmann im Rahmen des BMBF geförderten BIODKATALYSE2021 Projektes 13 durchgeführt.

Ich danke Prof. Luttmann für seine langjährige Unterstützung. Er hat vom ersten Studienprojekt, über Diplom- und Masterarbeit bis zur Promotion an mich geglaubt und mich gefördert. Ihm verdanke ich die Möglichkeit, mit höchst innovativem Equipment zu arbeiten und zu forschen.

Ich danke Prof. Dr.-Ing. Reiner Luttmann und Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Thomas Scheper und Prof. Dr.-Ing. Karl-Heinz Bellgardt vom Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover danke ich für die Übernahme der Referate.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes und dem BMBF (FKZ 0315167) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ich danke Christian Müller für die langjährige gute Zusammenarbeit, für die vielen Diskussionen, für seine Freundschaft und dafür, dass er es all die Jahre mit mir in dem kleinen Büro ausgehalten hat.

Den Laboringenieuren Hans-Peter Bertelsen und Ulrich Scheffler danke ich für ihren engagierten Support und dass sie steht's ein offenes Ohr für mich hatten.

Ich danke J-P. Voß, C. Wagenführer, D. Zahn, H. Klotz und C. Kober für ihre Beiträge zu dieser Arbeit im Rahmen von Diplomarbeiten, Masterprojekten und -arbeiten.

Meinen Kollegen Christian, Sanja, Jens, Kristof und Sven danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und den Zusammenhalt, im Labor wie in der Freizeit.

Meiner Frau Hannah danke ich für ihre Unterstützung, ihre Motivation und ihr Vertrauen in mich.

Kurzfassung

Kai Lögering

Automatisierung, Optimierung und Analyse Integrierter Produktionsprozesse zur Herstellung rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris*

Diese Arbeit beschreibt den Aufbau eines Integrierten Bioprozesses zur Herstellung rekombinanter Proteine. Es wird die Entwicklung einer geeigneten Prozessführungsstrategie, die Automatisierung einzelner Teilanlagen, die Verbindung der Teilanlagen zu einer Gesamtanlage sowie die Optimierung von Teilprozessen und deren Beobachtung dargestellt.

Die Entwicklung des biotechnologischen Prozesses beruht auf einem beispielhaft ausgewählten Enzym mit industrieller Verwendung, der Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB). Produziert wird das Enzym mit der methylo trophen Hefe *Pichia pastoris*, die das Produkt extrazellulär bereitstellt.

Die Herstellung des Enzyms erfolgt in einem sequenziell hintereinander ablaufenden zweistufigen parallelen Prozess in zwei verfahrenstechnisch miteinander verbundenen Bioreaktoren. Bei dieser Prozessführung ist die Zellvermehrung sowie die metabolische Vorbereitung auf die Enzymproduktion von der eigentlichen Produktion des Zielproduktes getrennt.

Im Anschluss an die Produktherstellung erfolgt die Aufreinigung des Enzyms beginnend mit einer Zellabtrennung über einen Tellerseparator, gefolgt von einer Mikrofiltration und abgeschlossen durch eine präparative Chromatographie über hydrophobe Interaktion.

Überwacht wird die Enzymherstellung mit zwei online an den Produktionsprozess angeschlossenen Analysensysteme zur Bestimmung der aktuell vorliegenden Enzymkonzentration und der Enzymaktivität.

Der Integrierte Bioprozess ist mit dem industriellen Prozessleitsystem SIMATIC PCS 7 automatisiert. Die Bedienung der Teilanlagen sowie die Überwachung von Prozessparametern erfolgt über eine eigens programmierte graphische Oberfläche.

Nach dem Aufbau und der Automatisierung des Integrierten Bioprozesses wurde die mikrobielle Produktion des Enzyms mit der Hefe *Pichia pastoris* bezüglich der Reaktionsbedingungen mit der Methode des Design of Experiments in zwei Stufen optimiert.

Abschließend wurde die Beobachtung und Analyse der Bioprozesse über eine multivariate Auswertung der Kultivierungsdaten zur Sicherstellung derer Reproduzierbarkeit fokussiert.

Schlagwörter: *Pichia pastoris*, CALB, Integrierter Bioprozess, sequenziell/parallele Prozessführung, SIMATIC PCS 7, Optimierung, DoE, Prozessmonitoring, MVDA

Abstract

Kai Loegering

Automation, optimization und analysis of integrated processes for the production of recombinant proteins with *Pichia pastoris*

This work describes the composition of an integrated bioprocess for the production of recombinant proteins. The development of appropriate process strategies, the automation of subsystems, the connection of subsystems to a production plant as well as the optimization of sub processes and their monitoring will be shown.

The development of the biotechnological process is based on an exemplary enzyme with industrial use, the lipase B from *Candida antarctica* (CALB). The enzyme is produced with the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, which provides the product extracellular.

The production of the enzyme takes place in a sequential series-connected two step process in two procedural connected bioreactors. With this process the cell growth and metabolic adaption for enzyme secretion is divided from the enzyme production.

The purification process starts after the enzyme production beginning with a cell separation with a disc clarifier, followed by a micro filtration and finished by a preparative chromatography using the hydrophobic interaction principle.

The enzyme production is monitored with two at-line connected analytical systems for the determination of the actual enzyme concentration and the enzyme activity in the supernatant of the production bioreactor.

The integrated bioprocess is automated with the industrial process control system SIMATIC PCS 7. The operation of subsystems as well as the monitoring of process parameters is carried out by an individual programmed graphical human machine interface.

After the installation and the automation of the integrated bioprocess the microbial production of the enzyme with the yeast *Pichia pastoris* was optimized regarding the reaction conditions in a two step procedure with the method of Design of Experiments.

Finally a monitoring and analysis of the bioprocess was performed with a multi variate data analysis of cultivation data for the evaluation of the process reproducibility.

Keywords: *Pichia pastoris*, CALB, integrated bioprocess, sequential/parallel process, SIMATIC PCS 7, optimization, DoE, process monitoring, MVDA

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Zielsetzung.....	3
3	Hostsystem und Zielprodukt.....	4
3.1	Das Hostsystem <i>Pichia pastoris</i>	4
3.2	Das Zielprodukt CALB.....	6
3.3	Klassischer Herstellungsprozess rekombinanter Proteine mit <i>P. pastoris</i>	8
4	Aufbau eines Integrierten Bioprozesses.....	12
4.1	Konzeption einer industriekompatiblen Scale-down Produktionsanlage.....	12
4.1.1	Unit Operations des Gesamtprozesses.....	12
4.1.2	Integration der verfahrenstechnischen Einheiten.....	13
4.1.3	Hierarchische Automatisierungsstruktur.....	15
4.1.4	Ansicht der Scale-down Produktionsanlage.....	16
4.2	Beschreibung der Anlagenkomponenten.....	16
4.2.1	Der Zellanzuchtreaktor BIOSTAT [®] ED10.....	16
4.2.2	Der Produktionsreaktor BIOSTAT [®] C30.....	18
4.2.3	Der Separator SC1.....	20
4.2.4	Die Mikrofiltrationsanlage Sartoc [®] Slice.....	21
4.2.5	Das Chromatographiesystem ÄKTApurifier 100.....	22
4.3	Atline-Produktanalytik.....	23
4.3.1	Atline-Messung der Enzymaktivität.....	23
4.3.2	HPLC-Einsatz zur Produktmessung.....	26
4.3.3	Einbindung der Analysengeräte.....	28
4.4	Offline-Analytik.....	29
5	Entwicklung sequenzieller Prozessführungsstrategien.....	32
5.1	Stand der Wissenschaft.....	32
5.2	Betrachtung der zweiphasigen Kultivierungsstrategie.....	33
5.3	Der zweistufige Kultivierungsprozess.....	35
5.3.1	Die sequenziell/parallele Produktionsidee.....	35
5.3.2	Konzepte der Zellanzucht.....	36

5.3.3	Die sequenziell/parallele zweistufige Enzymproduktion.....	44
5.4	Die konsekutiven Aufarbeitungsschritte.....	46
6	Automatisierung des sequenziell/parallelen Prozesses.....	48
6.1	Aufbau des SIMATIC PCS 7 Systems	48
6.2	Automatisierungseinheiten und deren Verbindung.....	49
6.3	Programmierung des Automatisierungssystems.....	51
6.3.1	Das Engineering-Tool SIMATIC Manager	51
6.3.2	Continuous Function Chart	53
6.3.3	Batch-Identifikation	55
6.3.4	Datenaustausch mit dem Separator	55
6.4	Programmierung des Visualisierungssystems.....	56
6.4.1	Das Engineering-Tool WinCC Explorer.....	56
6.4.2	Anlagenbild Rohrleitungsfließbild.....	56
6.4.3	Anlagenbild Produktionsreaktor BIOSTAT® C30.....	57
6.4.4	Anlagenbild Separator SC1	58
6.4.5	Anlagenbild Mikrofiltrationsanlage Sartocoon® Slice.....	59
6.4.6	Globales Skript zur Datenübertragung.....	60
6.5	Automatisierungsablauf.....	61
6.6	Prozessleitsoftware MFCS/win	67
6.6.1	Automatisierung des Zellanzuchtprozesses	68
6.6.2	Automatisierung des Produktionsprozesses.....	69
7	Ermittlung reaktorspezifischer und reaktionskinetischer Daten.....	71
7.1	Reaktorspezifische Daten	71
7.1.1	Trübungsanpassung.....	71
7.1.2	Abgasbilanzierung.....	72
7.1.3	Scale-up-Kriterium.....	74
7.2	Reaktionskinetische Daten	78
7.2.1	Dreiphasenmodell.....	78
7.2.2	Ermittlung zellspezifischer Reaktionsraten.....	79
7.2.3	Untersuchung des Zellanzuchtprozesses.....	82
7.2.4	Untersuchung des Produktionsprozesses	84

8	Optimierung der Enzymproduktion	86
8.1	Einleitung.....	86
8.2	Screening	90
8.3	Optimierung.....	100
9	Prozessmonitoring.....	106
9.1	Einleitung.....	106
9.2	Untersuchung der zyklischen Zellanzucht.....	108
9.3	Untersuchung der zyklischen Produktion.....	120
10	Zusammenfassung	126
11	Anhang	127
11.1	Verwendete Medien	127
11.2	Reagenzien der Analytik.....	128
12	Literatur.....	129

Nomenklatur

Symbole

$C_{P_{lactM}}$: = volumetrische Enzymaktivität	[$U l^{-1}$]
c_{IK}	: = Gelöstkonzentration der Komponente I im Teilsystem K	[$g l^{-1}$]
\dot{c}_{IK}	: = Konzentrationsänderung der Komponente I im Teilsystem K	[$g l^{-1} h^{-1}$]
$c_{P_{1M}}$: = CALB Konzentration im zellfreien Medium	[$g l^{-1}$]
$c_{S_{1M}}$: = Glycerolkonzentration im zellfreien Medium	[$g l^{-1}$]
$c_{S_{2M}}$: = Methanolkonzentration im zellfreien Medium	[$g l^{-1}$]
$c_{S_{iRj}}$: = Konzentration von Substrat i in der Vorlage j	[$g l^{-1}$]
c_{XL}	: = Zelldichte in der Flüssigphase	[$g l^{-1}$]
E_K	: = Trübung im Teilsystem K	[AU]
F_{in}	: = Gesamteingangsvolumenstrom	[$l h^{-1}$]
F_K	: = Förderrate (Volumenstrom) aus dem/in das Teilsystem K	[$l h^{-1}$]
F_{nG}	: = Gesamtbegasungsrate unter Normbedingungen	[$l h^{-1}$]
F_{ni}	: = Begasungsrate der Komponente I unter Normbedingungen	[$l h^{-1}$]
F_{out}	: = Gesamtausgangsvolumenstrom	[$l h^{-1}$]
F_{Ri}	: = Zufütterrata aus dem Reservoir i	[$l h^{-1}$]
$F_{Ri_{max}}$: = maximale Zufütterrata aus dem Reservoir i	[$l h^{-1}$]
$F_{Ri_{rel}}$: = relative Zufütterrata aus dem Reservoir i	[%]
H_{O_2}	: = Henrykoeffizient für O_2	[$N m k g^{-1}$]
$k_L a$: = volumetrischer O_2 -Stoffübergangskoeffizient	[h^{-1}]
M_I	: = Molmasse der Komponente I	[$g mol^{-1}$]
m_{IK}	: = Masse der Komponente I im Teilsystem K	[g]
\dot{m}_{IK}	: = Massenänderung der Komponente I im Teilsystem K	[$g h^{-1}$]
\dot{m}_{IT}	: = Massentransfer der Komponente I	[$g h^{-1}$]
m_K	: = Masse des Teilsystems K	[g]
m_{XL}	: = Zellmasse in der Flüssigphase	[g]
N_{St}	: = Rührerdrehzahl	[min^{-1}]
OD	: = Optische Dichte	[-]
OTR	: = volumetrische O_2 -Transferrate	[$g l^{-1} h^{-1}$]
OUR	: = volumetrische O_2 -Aufnahmerate	[$g l^{-1} h^{-1}$]
PRD	: = mittlere Produktivität	[$g l^{-1} h^{-1}$]
p_G	: = Absolutdruck in der Gasphase	[bar]
p_{IK}	: = Partialdruck der Komponente I im Teilsystem K	[bar]
p_{O_2}	: = relativer Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase	[%]
Q_I	: = volumetrische Angebots- oder Austragsrate der Komponente I	[$g l^{-1} h^{-1}$]
$Q_{P_{lact/X}}$: = zellspezifische Produktaktivitätsbildungsrate von CALB	[$g g^{-1} h^{-1}$]
$q_{I/X}$: = zellspezifische Reaktionsrate der Komponente I	[$g g^{-1} h^{-1}$]
$q_{I/X_{max}}$: = maximale zellspezifische Reaktionsrate der Komponente I	[$g g^{-1} h^{-1}$]

q_{I/X_m}	: = Maintenanceanteil der zellspez. Aufnahme­rate der Komponente I	$[\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$q_{X/X}$: = zellspezifische Wachstumsrate	$[\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$\bar{q}_{X/X}$: = mittlere zellspezifische Wachstumsrate	$[\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}]$
$q_{X/X_{gr}}$: = Zuwachsanteil der zellspezifischen Wachstumsrate	$[\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}]$
q_{X/X_m}	: = Maintenanceanteil der zellspezifische Wachstumsrate	$[\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}]$
RQ	: = molarer Respirationsquotient	$[-]$
V_K	: = Volumen des Teilsystems K	$[l]$
V_{nM}	: = Molvolumen unter Normbedingungen	$[\text{lmol}^{-1}]$
x_{CO_2}	: = Messwert des CO_2 -Stoffmengenanteils im Abgas	$[\%]$
x_{IG}	: = Stoffmengenanteil der Komponente I in der Gasphase	$[-]$
x_{IGin}	: = Eingangsstoffmengenanteil der Komponente I in die Gasphase	$[-]$
x_{IGout}	: = Ausgangsstoffmengenanteil der Komponente I aus der Gasphase	$[-]$
x_{O_2}	: = Messwert des O_2 -Stoffmengenanteils im Abgas	$[\%]$
$y_{I/J}$: = stöchiometrisches Verhältnis (Reaktion von Komponente J zu I)	$[\text{gg}^{-1}]$
y_{P_i/S_i}	: = Produkt i/Substrat j Ausbeutekoeffizient	$[\text{gg}^{-1}]$
$y_{P_I/X}$: = CALB/Zellmassen Ausbeutekoeffizient	$[\text{gg}^{-1}]$
$y_{X/O}$: = Zellmassen/Sauerstoff Ausbeutekoeffizient	$[\text{gg}^{-1}]$
y_{X/S_i}	: = Zellmassen/Substrat i Ausbeutekoeffizient	$[\text{gg}^{-1}]$
$y_{X/Sigr}$: = Zellmassen/Substrat i Zuwachsausbeutekoeffizient	$[\text{gg}^{-1}]$
$\alpha_{Z/X}$: = Biofeucht/Biotrockenmasseverhältnis	$[\text{gg}^{-1}]$
μ	: = zellspezifische Wachstumsrate	$[\text{h}^{-1}]$
μ_{\max}	: = maximale zellspezifische Wachstumsrate	$[\text{h}^{-1}]$
ρ_I	: = Dichte der Komponente I	$[\text{gl}^{-1}]$
ρ_K	: = Dichte des Teilsystems K	$[\text{gl}^{-1}]$
ϑ_K	: = Temperatur des Teilsystems K	$[\text{°C}]$

Indices

1	: = Teilanlage 1: Zellanzuchtreaktor
2	: = Teilanlage 2: Produktionsreaktor
A	: = Analyse
AF	: = Antischaum (antifoam)
AIR	: = Luft (air)
C, CO_2	: = Kohlenstoffdioxid
cal	: = Kalibrierbedingungen
DJ	: = Doppelmantel (double jacket)
feed	: = Zufuhr zur Mikrofiltration
G	: = Gasphase, gesamt
gr	: = Wachstumsanteil (growth)
H	: = Ernte (harvest)

i	:= Zahlenindex
I	:= Komponente (P_i , S_i , X o. ä.)
in	:= am Eingang des Reaktors
K	:= Teilsystem
L	:= Reaktionsraum, Flüssigphase (liquid)
M	:= Medienphase
m	:= Maintenanceanteil
max	:= maximal
N ₂	:= molekularer Stickstoff
n	:= Normbedingungen
O, O ₂	:= Sauerstoff
out	:= am Ausgang des Reaktors
P ₁	:= CALB (Produkt 1)
P	:= Purification
per	:= Permeat der Mikrofiltration
R ₁	:= Glycerolvorlage
R ₂	:= Methanolvorlage
rel	:= relativ
ret	:= Retentat der Mikrofiltration
S ₁	:= Glycerol (Substrat 1)
S ₂	:= Methanol (Substrat 2)
S	:= Probenahme (sample)
sep	:= Separation
T	:= Transfer
T ₁	:= Titration 1 (Säure)
T ₂	:= Titration 2 (Lauge)
tot	:= total
turb	:= Trübung (turbidity)
w	:= Sollwert
X	:= Biotrockenmasse
Z	:= Biofeuchtmasse
0	:= zum Animpfzeitpunkt
.	:= erste zeitliche Ableitung

1 Einleitung

Das Bestreben zur Verbesserung von technologischen Prozessen existierte bereits vor der Industrialisierung. Insbesondere biotechnologische Prozesse, wie die Herstellung von Brot mit Hilfe einer Hefe- oder Milchsäuregärung [Heiss et al., 2007], wurden schon seit vielen tausend Jahren stetig verbessert. Dabei war die Beobachtung des Prozesses, die Einhaltung der Prozessbedingungen sowie eine Beurteilung des Ergebnisses die Grundlage einer Prozessoptimierung [Shen et al., 2014; MacGregor et al., 2012].

In der heutigen Zeit sind biotechnologische Prozesse in der Pharma-, Lebensmittel- oder technischen Industrie gut charakterisiert, werden aber nicht unbedingt optimal betrieben [Prehn, 2013]. Die Optimierung eines Prozesses kann dabei an verschiedenen Stellen ansetzen [Kleppmann, 2013].

Eine Möglichkeit der Prozessoptimierung erfolgt auf der biologischen Ebene. Dazu wird entweder der Organismus gentechnisch manipuliert [Huijuan et al., 2006] oder einzelne Prozessbedingungen (z. B. Temperatur) werden hinsichtlich einer hohen Produktbildungsrate ausgerichtet. Für eine derartige Ausrichtung ist wiederum eine Beschreibung des Organismus hinsichtlich der variierten Bedingungen notwendig, die mit einfachen mathematischen Modellen erfolgen kann [Eriksson et al., 2008; Lin et al., 2007].

Eine weitere Möglichkeit stellt die Prozessoptimierung auf der technischen Ebene dar. Eine Beobachtung des Prozesses mit Sonden und Messgeräten ermöglicht die exakte Einhaltung von Prozessbedingungen, um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten [Martens et al., 2011]. Dabei kommen meistens physikalische (z. B. Temperatur) und chemische (z. B. pH-Wert), aber auch kinetische (z. B. Produktaktivität) Messungen zum Einsatz. [Valero, 2013; Cereghino et al., 2002]

Die Automatisierung eines Prozesses bietet die Möglichkeit, aufwendige Kultivierungsstrategien zu realisieren. Zudem werden Bedienfehler und Abweichungen aufgrund von manuellen Arbeiten verringert und somit die Reproduzierbarkeit erhöht [Fricke et al., 2013; Hamaker et al., 2011]. Eine intensive Beobachtung zusammen mit einer vollständigen Automatisierung eines Prozesses verringert somit die Anzahl an Prozessausfällen und trägt zu einer Erhöhung der Ausbeute bei.

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Produktivität einer Produktionsanlage ist die Umstellung der Fahrweise vom Batchbetrieb auf eine kontinuierliche Herstellung [Eiden et al., 1993]. Dabei kann eine räumliche Trennung von Produktionsschritten notwendig sein [Modigell et al., 2007]. Auch semi-kontinuierliche bzw. sequentielle Fahrweisen steigern die Produktivität [Su et al., 2011; Anastassiadis et al., 2006]. Allgemein werden bei (semi-)kontinuierlichen Produktionsstrategien die Kosten zur Vorbereitung und Reinigung der Anlagen gespart und zusätzlich die Auslastung der Produktweiterverarbeitung verbessert. [Hertwig et al., 2007; Teng et al., 2014; Tiana et al., 2010]

Außerdem kann durch die Identifizierung von systematischen Zusammenhängen zwischen Prozessvariablen über eine multivariate Auswertung der Kultivierungsdaten eine Analyse einzelner Prozessabschnitte erfolgen. Diese kann wiederum verwendet werden, um eine Kultivierung zu charakterisieren und auf ihre Reproduzierbarkeit hin zu untersuchen. [Shlens, 2009; Eriksson et al., 2006; Wold et al., 2001]

Diese vielfältigen Möglichkeiten, einen biotechnologischen Prozess zu verbessern, zu optimieren oder effizienter auszulegen, werden in dieser Arbeit behandelt.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist im Allgemeinen die Verbesserung von Produktionsprozessen zur Herstellung rekombinanter Proteine. Dies erfolgt am Beispiel der Herstellung einer Lipase mit der Hefe *Pichia pastoris*. Die Durchführung der Arbeiten fanden im Rahmen des Projektes „Entwicklung vollautomatischer Integrierter Bioprozesse in einer industriekompatiblen Pilotanlage zur Herstellung heterologer Enzyme mit Hefen“ statt, welches vom BMBF gefördert und vom Cluster BIOKATALYSE2021 verwaltet wurde.

Die Verbesserung bzw. Optimierung eines Produktionsprozesses bedeutet nicht nur am Ende eine höhere Proteinkonzentration zu erhalten. Optimierung bedeutet ebenfalls die Realisierung von kürzeren Produktionszeiten, weniger Ausfälle der Anlage, einen geringeren Personalbedarf, eine höhere Reproduzierbarkeit und eine bessere Prozessbeobachtung.

Der erste Schritt zur Umsetzung dieser Ziele sollte die Verbindung von Produktionsanlagen und mehreren Downstreamoperationen sein, um einen Integrierten Bioprozess aufzubauen. Dabei lag der Fokus auf dem Aufbau einer Pilotanlage, die in ihrer Größe und Automatisierung industriekompatibel ist. Zwei Bioreaktoren, ein Tellerseparator, eine Mikrofiltrationsanlage sowie ein Chromatographiesystem waren miteinander zu verbinden.

Eine mehrstufige Kultivierungsstrategie sollte entwickelt werden, um zeit- und kostengünstig rekombinante Proteine herstellen zu können. Verschiedene Ansätze dazu waren zu untersuchen. Eine möglichst kontinuierliche und voll automatische Betriebsführung sollte realisiert werden, bei der ein Eingriff in die Prozessführung bzw. eine Aktion maximal einmal täglich notwendig ist.

Für die Automatisierung sollte die vorhandene Prozessleitsoftware MFCS/win von Sartorius Stedim Biotech um das industrielle Prozessleitsystem SIMATIC PCS 7 der Firma Siemens erweitert werden. Alle Komponenten des Integrierten Bioprozesses sollten in dieses Prozessleitsystem eingebunden werden, damit ein Automatisierungssystem mit zentraler Programmierung und einheitlicher Datenbasis zur Verfügung steht. Schließlich soll mit PCS 7 der Gesamtprozess beobachtet und gesteuert werden.

Nach Abschluss der Entwicklung der Prozessführung und deren Automatisierung sollte der Prozess durch die Optimierung von Produktionsparametern weiter verbessert werden. Drei Prozessparameter waren mit der Methode der Statistischen Versuchsplanung (DoE) zu variieren und über eine Regressionsanalyse deren optimale Werte zu ermitteln.

Abschließend sollte durch die Verwendung von multivariater Datenverarbeitung auf Kultivierungsdaten eine Prozessbeobachtung vorbereitet und eine Methode zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit gefunden werden.

3 Hostsystem und Zielprodukt

3.1 Das Hostsystem *Pichia pastoris*

Als Hostsystem wurde in dieser Arbeit die Hefe *Pichia pastoris* eingesetzt. Sie wächst als Einzeller in weißen bis cremefarbenen Kolonien und gehört zu der Pilzgruppe der Ascomyceten. Als Substrate können Glucose und Glycerol verwendet werden. Zusätzlich ist die fakultativ methylotrophe Hefe in der Lage, Methanol als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen.

Pichia pastoris wurde seit den 1970er Jahren von der Phillips Petroleum Company (Bartlesville, OK, USA) zur Produktion von Einzellerprotein (engl. single cell protein) für die Verwendung als protein- und vitaminreiches Tierfutter eingesetzt [Cregg, 2007]. Die Fähigkeit der Verstoffwechselung von Methanol machte den Prozess lukrativ, da Methanol kostengünstig aus Synthesegas (Gemisch aus Kohlenstoffmonoxid und Wasserstoff) hergestellt werden konnte [Olah et al., 2009].

Aufgrund der Ölkrise 1973 stiegen die Kosten für Methanol und der Prozess wurde unwirtschaftlich. Zur gleichen Zeit fiel der Preis für Sojabohnen, die als Ersatzquelle für Tierfutter dienten. In den frühen 1980er Jahren schloss Phillips Petroleum daraufhin einen Vertrag mit dem Salk Institute Biotechnology, Inc. (La Jolla, CA, USA), das *P. pastoris* zu einem heterologen Genexpressionssystem entwickelte. Im Jahr 1993 verkaufte Phillips Petroleum das Patent für das *P. pastoris* Expressionssystem schließlich an Research Corporation Technologies (Tucson, AZ, USA). [Cregg, 2007]

Als Vorteile dieses Expressionssystems sind die kostengünstige Medienzusammensetzung (Salzlösung/Biotin/Spurenelementen), eine hohe Affinität gegenüber Methanol, eine hohe genetische Stabilität, eine geringe Hyperglycosylierung sowie ein hohes Expressionspotential zu erwähnen [Cereghino et al., 2000].

Pichia pastoris bietet sich zur Produktion heterologer, rekombinanter und aktiver Proteine an, da sie als Eukaryot die Fähigkeit besitzt, ihre Produkte zu sekretieren und posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung, Disulfidbrückenbildung) vorzunehmen. Bakterien sind zu dieser Art der Modifizierung nicht in der Lage und scheiden somit als Produzenten komplexer Proteine aus [Cereghino et al., 2000; Li et al., 2007]. Bis zum Jahr 2008 wurden bereits über 600 Proteine vom menschlichen EPO bis zu Spinnenseidenproteinen mit diesem System exprimiert [Zhang et al., 2009].

Bei der Herstellung rekombinanter Proteine mit *P. pastoris* wird Glycerol zur Zellanzucht und zum Erreichen hoher Zelldichten herangezogen. Die Glycerolaufnahme wird bei Hefen, nachgewiesen bei der Familie *Saccharomyces cerevisiae* [Holst et al., 2000], wahrscheinlich durch die beiden homologen Proteine GUP₁ und GUP₂ vermittelt, die ebenfalls in *P. pastoris* zu finden sind [Küberl et al., 2011]. Von beiden Proteinen wird vermutet, dass sie eine Reihe von

transmembranen Segmenten kontrollieren. Da Glycerol in den nachfolgenden Kultivierungen als erstes Substrat angeboten wird, erhält es in dieser Arbeit den Index S1 (Substrat 1).

In späteren Phasen des Prozesses wird durch die Zugabe von Methanol (Substrat 2 – S2) die Produktbildung induziert. Der erste Schritt im Methanolstoffwechsel umfasst die Oxidation von Methanol zu Formaldehyd [Egli et al., 1980]. Hierbei wird als Katabolit cytotoxisches Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet, weshalb diese Reaktion separiert vom Cytosol in Peroxisomen stattfindet. Das Enzym Katalase zersetzt das H_2O_2 zu Sauerstoff und Wasser. Im nächsten Oxidationsschritt wird das gebildete Formaldehyd zu Formiat und schließlich weiter zu Kohlenstoffdioxid umgewandelt.

Für die Verstoffwechselung von Methanol besitzt die Hefe *Pichia pastoris* zwei Gene für Alkoholoxidasen (AOX). Beide Gene (AOX₁ und AOX₂) kodieren für zwei nahezu identische Proteine. Beide Enzyme katalysieren die Umsetzung von Methanol zu Formaldehyd, wobei AOX₁ die weitaus bedeutendere Rolle zufällt [Cregg et al., 1989]. Beide AOX Gene werden durch Methanol im Medium induziert, das an den jeweiligen AOX Promotor P_{AOX1} bzw. P_{AOX2} bindet.

Der starke AOX₁ Promotor wird für die Produktexpression genutzt, indem die Gensequenz des Zielproteins hinter diesem eingebracht wird. Er ist der meistgenutzte Promotor für Proteinexpressionen hoher Ausbeuten in Hefen [Pfeffer, 2008].

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm X-33 (Invitrogen, Cat. No. C180-00) ist vom Genotyp ein Wildstamm [Invitrogen]. Dieser verfügt über beide AOX Gene, besitzt somit eine hohe Alkoholoxidase-Aktivität, was sich in einem guten Wachstum auf Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zeigt. Stämme, die beide Gene besitzen, werden als Mut⁺-Phänotypen bezeichnet (Methanol utilization positive). In Abhängigkeit von der Transformationstechnik kann es zum Verlust der AOX₁ Gensequenz kommen, was sich negativ auf die Methanolaufnahme und somit auf das Wachstum auswirkt. Dies wird durch die Bezeichnung Mut^S (Methanol utilization slow) dargestellt.

Das mit *Pichia pastoris* zu exprimierende Protein für die Entwicklung des Integrierten Bioprozesses ist das technische Enzym CALB (*Candida antarctica* Lipase B).

Das Genfragment, welches die Sequenz für die Lipase B aus *Candida antarctica* codiert, wurde in den Expressionsvektor pPicZαA (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert (siehe Abb. 3.1). Da *P. pastoris* kein eigenes stabiles, episomales Plasmid besitzt, wird zur Expression eines Fremdgens ein sich direkt ins Genom integrierender Vektor eingesetzt. Bei dem Vektor für das vorliegende Hefe-System handelt es sich um einen so genannten „shuttle“-Vektor [Cregg, 2007].

Zur späteren Selektion der rekombinanten *P. pastoris* Zellen enthält der Vektor ein Zeocin™ Resistenzgen. Des Weiteren enthält der Vektor, neben unterschiedlichen Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen, den AOX₁ Promotor und den α-Faktor, eine Signalsequenz aus *S. cerevisiae* zur Sekretion des Fremdproteins [Invitrogen].

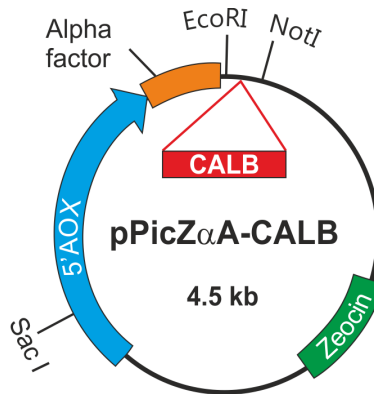


Abb. 3.1: pPicZ α A Vektor mit CALB Gensequenz, ZeocinTM-Resistenzgen und α -Faktor
 Das Lipase B Gen wurde mittels PCR mit DyNAzymeTM EXT DNA Polymerase (Finnzymes, Heidelberg) und mit Restriktionsschnittstellen für EcoRI und NotI versehenen Primern amplifiziert. Das PCR Produkt wurde in den Vektor pPicZ α A kloniert und das Konstrukt in *Escherichia coli* – DH5 α TM Zellen (Clontech, Heidelberg) transformiert. Nach erneuter Amplifikation in *E. coli* wurde der Vektor in *Pichia pastoris* X-33 transformiert [Pfeffer, 2008]. Die Selektion der rekombinanten Zellen erfolgte schließlich über die ZeocinTM-Resistenz.

Das Gesamtexpressionssystem *Pichia pastoris* X-33 pPicZ α A CALB (Mut⁺) resultiert aus dem oben beschriebenen Stamm, welcher den mit dem α -Faktor und dem Fremdprotein versehenen Vektor enthält.

3.2 Das Zielprodukt CALB

Lipasen (E.C. 3.1.1.3) gehören zu der Enzymklasse der Hydrolasen (E.C. 3.X.X.X) als Vertreter der Carboxylester Hydrolasen (E.C. 3.1.1.X). Sie lassen sich in Säugerzellen, Hefen, Bakterien und sogar Archaea finden und sind Mitglied der α/β -Hydrolase Familie.

Heutzutage gibt es ein großes Anwendungsgebiet für Lipasen in der Industrie [Andualema et al., 2012]. Sie werden unter anderem in der Verarbeitung von Lebensmitteln [Gupta et al., 2003], als Detergenzien [Ito et al., 2001; Hasan et al., 2010], in der Papierherstellung [Jaeger, 1998], in der Textilverarbeitung [Rowe, 1999], in der Kosmetikindustrie [Maugard et al., 2002], bei der Produktion von Biodiesel [Vicente et al., 2004; Hasan et al., 2006] oder Plastik [Takamoto et al., 2001] sowie bei der Entsorgung von schädlichen Industrieabfällen [Masse et al., 2001] eingesetzt.

Besonders in der organischen Synthesechemie spielen Lipasen eine große Rolle [Kapoor et al., 2012], da auf hohe Drücke und hohe Temperaturen wie bei den sonst üblichen chemischen Synthesen verzichtet werden kann. Zudem werden Lösungsmittel vermieden und müssen somit im Anschluss an eine Synthese nicht wieder entfernt werden. Lipasen sind ökologisch unbedenklich und wieder verwendbar. Sie haben eine hohe Lagerstabilität, sind Cofaktor unabhängig und zeichnen sich durch eine hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität gegenüber unterschiedlichsten Substraten aus [Kapoor et al., 2012]. Durch die Verwendung von

Lipasen aus extremophilen Organismen wird es ermöglicht, diese auch bei ungünstigen Prozessbedingungen einzusetzen [Takamoto et al., 2001; Rusnak, 2004]. Darüber hinaus können Lipasen in Lösung oder immobilisiert eingesetzt werden. Die Immobilisierung kann an ein Trägermaterial oder an dem exprimierenden Organismus selbst erfolgen [Su et al., 2010].

Der Ursprungsorganismus der in dieser Arbeit verwendeten Lipase B (CALB) ist die zu den Ascomyceten gehörende Hefe *Candida antarctica*. Diese wurde in einem heißen unterirdischen See, dem Vandasee, in der Antarktis entdeckt. Die 33 kDa große und aus 317 Aminosäuren bestehende Lipase ist mittlerweile eine der meist genutzten Biokatalysatoren in der Industrie [Anderson et al., 1998]. Sie ist sehr substratspezifisch und wird von Forschergruppen in aller Welt durch gerichtete Evolution auf immer neue Substrate spezialisiert [Zhang et al., 2003; Qian et al., 2005].

Zudem wird daran gearbeitet, durch ein Entfernen oder Austauschen einzelner Aminosäuren die Aktivität besonders bei extremen Bedingungen weiter zu erhöhen. Die Lipase B ist über einen weiten Temperaturbereich aktiv und hat ein pH Optimum von 6. Als Enzym mit α/β -Hydrolasefaltung besitzt CALB im Enzymkern sieben parallele β -Stränge, die von zehn α -Helices und zwei kleinen β -Strängen umgeben sind. Eine dreidimensionale Darstellung des Enzyms ist in Abb. 3.2 gezeigt.

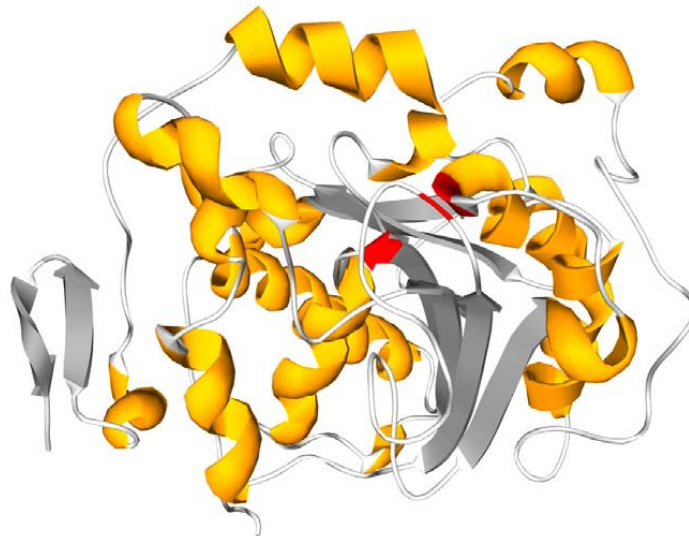


Abb. 3.2: Darstellung der Proteinstruktur von CALB, α -helicale Strukturen sind orange, β -Stränge sind grau dargestellt. Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot hervorgehoben [Rusnak, 2004]

Die für Lipasen übliche Substratbindungsstelle mit dem Pentapeptid Gly/Ala-X-Ser-X-Gly liegt bei CALB mit der Sequenz Thr-Trp-Ser-Gln-Gly verändert vor. Dies verursacht einen weniger stark gebogenen *nucleophile elbow*, ein scharfer Knick in der Faltstruktur zur Positionierung des Substrats. Die katalytische Triade, mit der das Substrat am aktiven Zentrum umgesetzt wird, besteht aus den Aminosäuren Ser105, Asp187 und His224 [Rusnak, 2004].

Lipasen besitzen im Allgemeinen eine Teilstruktur (meist eine Helix), die wie ein Deckel über dem aktiven Zentrum sitzt. Somit kann die Lipase in zwei Konformationen unterteilt werden, die offene und die geschlossene Konformation. Ist die Substratkonzentration niedrig, liegt die

geschlossene Konformation vor. Erst bei einer hinreichend großen Substratkonzentration von wasserunlöslichen Fetten mit einer resultierenden Micellenbildung entfernt sich der beschriebene Deckel vom aktiven Zentrum. Lipasen mit einem Deckel besitzen demnach bei niedrigen Substratkonzentrationen oder wasserlöslichen Fetten eine geringe Aktivität [Pfeffer, 2008].

Bei der Lipase CALB fehlt dieser Deckel, sodass keine Grenzflächenaktivierung stattfinden muss. Allerdings bilden zwei Helices von CALB ein Strukturelement, welches direkt über der Substratbindetasche positioniert ist und somit den Raum zur Bindung des Substrats erheblich einengt [Rusnak, 2004].

3.3 Klassischer Herstellungsprozess rekombinanter Proteine mit *P. pastoris*

Zur Herstellung von rekombinanten Proteinen mit *Pichia pastoris* wird eine Kultivierung in drei Phasen unterteilt [Cereghino et al., 2002]. Der Verlauf einer dreiphasigen Kultivierung mit *Pichia pastoris* ist in Abb. 3.3 dargestellt.

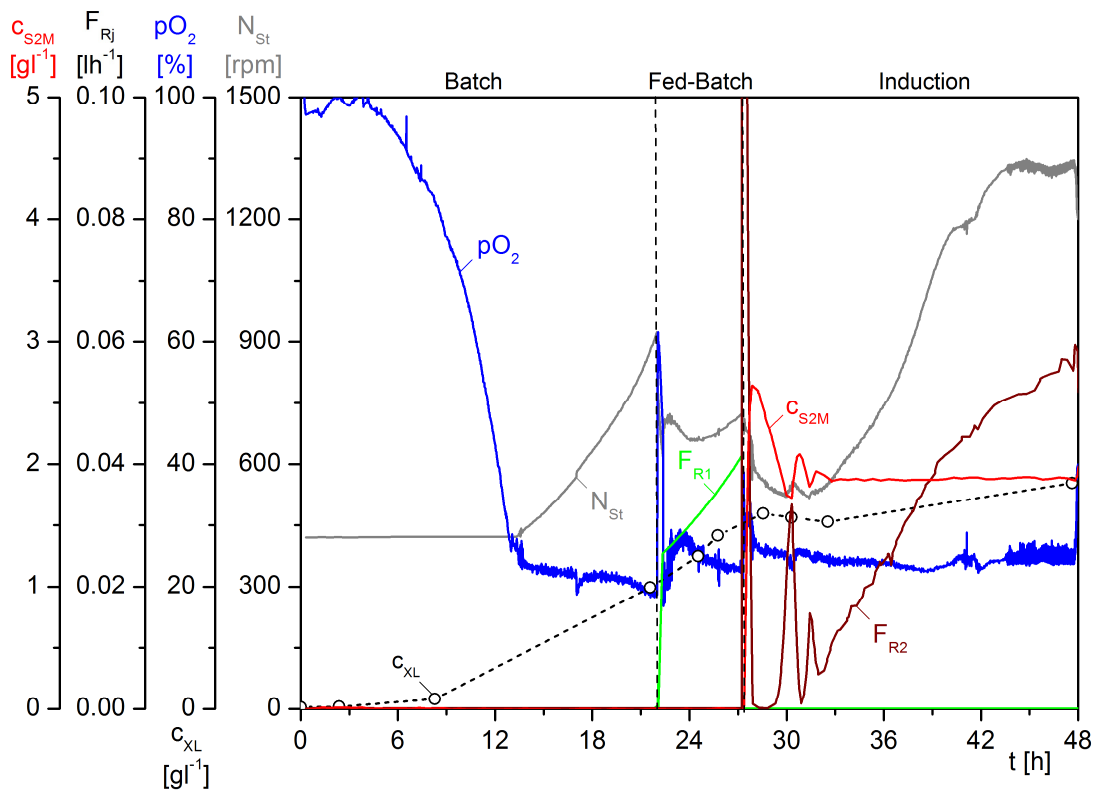


Abb. 3.3: Ablauf einer dreiphasigen Kultivierung zur Herstellung rekombinanter Proteine
 Zunächst erfolgt ein unlimitiertes Wachstum auf dem Substrat Glycerol, um Zellmasse zu generieren. Anschließend wird ein substratlimitierter Glycerol Fed-Batch durchgeführt. Die Limitierung bewirkt eine Derepression des AOX Promotors. Somit wird der Zellmetabolismus langsam von einem Wachstum auf Glycerol hin zu einer Verstoffwechslung von Methanol verändert. Die dritte Phase beinhaltet einen Methanol Fed-Batch (engl. induction), in dem über die Induzierung der beiden AOX Promotoren neben der Expression von AOX auch die des Zielproduktes erfolgt. [Cregg, 2007]

Bei der gezeigten Kultivierung dauert die Batch Phase, in der ein unlimitiertes exponentielles Wachstum auf Glycerol erfolgt, circa 22 Stunden. Die Zelldichte c_{XL} steigt in dieser Zeit auf 20 g l^{-1} an. Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 fällt nach einer kurzen lag-Phase exponentiell ab und wird nach dem Unterschreiten des pO_2 -Sollwertes von 25 % bis zum Ende der Kultivierung über die Veränderung der Rührerdrehzahl N_{St} geregelt.

Nach dem vollständigen Verbrauch des Substrates beginnt die zweite Phase der Kultivierung, ein gesteuerter Glycerol Fed-Batch. Dazu wird über ein exponentielles Zufütterungsprofil der Sollwert der Glycerolzufüterraterate F_{R1w} ,

$$F_{R1w}(t) = F_{R1k} \cdot e^{\mu_{S1w} \cdot (t-t_k)}, \quad (3.1)$$

in Abhängigkeit von der eingestellten Wachstumsrate μ_{S1w} variiert. Mit den Werten des Volumens V_{Lk} und der Zelldichte c_{XLk} zum Startzeitpunkt t_k wird der Startwert F_{R1k} ,

$$F_{R1k} = \frac{\mu_{S1w} \cdot V_{Lk} \cdot c_{XLk}}{y_{X/S1w} \cdot c_{S1R1}}, \quad (3.2)$$

berechnet, der von der Glycerolkonzentration der Vorlage c_{S1R1} und dem μ -abhängigen Glycerolausbeutekoeffizient $y_{X/S1w}$ abhängt.

Die zur Berechnung des μ -abhängigen Glycerolausbeutekoeffizienten $y_{X/S1w}$,

$$y_{X/S1w} = \frac{\mu_{S1w} \cdot y_{X/S1gr}}{\mu_{S1w} + y_{X/S1gr} \cdot q_{S1/Xm}}, \quad (3.3)$$

notwendigen Parameterwerte müssen in Vorversuchen experimentell bestimmt werden. Dabei entspricht $y_{X/S1gr}$ dem Zellzuwachsbeutekoeffizient für Glycerol und $q_{S1/Xm}$ der zellspezifischen Glycerol-Maintenanceaufnahmerate. Eine detaillierte Beschreibung und Herleitung des gesteuerten Glycerol Fed-Batches (open loop feed control) ist bei [Peuker, 2006] und [Jenzsch et al., 2006] zu finden. Im Verlauf der circa fünfstündigen Fed-Batch Phase erhöht sich die Zelldichte auf 30 g l^{-1} .

In der dritten Phase, der Induktion, wird ein geregelter Methanol Fed-Batch durchgeführt. Dazu wird in der Kulturbrühe die Methanolkonzentration c_{S2M} gemessen und diese über die Veränderung der Methanol Zufüterraterate F_{R2} geregelt. Für eine hohe Zellvitalität und einer damit verbundenen hohen Expressionsrate sind während der Induktion ein hoher pO_2 bei gleichzeitiger hoher Methanolkonzentration ($> 7 \text{ g l}^{-1}$) zu vermeiden [Cregg, 2007].

Die Regelung des pO_2 sowie der Methanolkonzentration ist somit bereits der erste Schritt zu einer Prozessoptimierung. Gleichzeitig erhöht die Realisierung dieser Regelkreise zusammen mit weiteren Automatisierungsschritten die Reproduzierbarkeit.

ständigen Verbrauch des Substrates S1 steigt der pO₂ sprunghaft an und die Rührerdrehzahl sinkt aufgrund der Reaktion des pO₂-Reglers. Werden für den pO₂-Anstieg sowie für den Abfall von N_{St} zuvor definierte Schwellenwerte überschritten, gilt das Ende der Batch Phase als erkannt. Danach wird die wachstumsgesteuerte Fed-Batch Phase automatisch eingeleitet.

Mit diesen Automatisierungsstrukturen können bereits reproduzierbare Kultivierungen durchgeführt werden. Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, die vielfältige Optimierung des Herstellungsprozesses rekombinanter Proteine, wird die Prozessführungsstrategie erweitert, der Automatisierungsgrad des Prozesses erhöht sowie die Kultivierungsbedingungen optimiert.

Als Qualitätskriterium des Herstellungsprozesses wurde eine Produktivität PRD definiert. Bei der allgemeinen Herstellung von Proteinen setzt sich diese aus der erzielten Konzentration des Produktes bezogen auf die benötigte Produktionszeit zusammen. Im vorliegenden Fall der Expression eines Enzyms wird für die Definition der Produktivität PRD,

$$PRD = \frac{V_M(t_j) \cdot C_{P_{lactM}}(t_j)}{V_L(t_j) \cdot (t_j - t_0)}, \quad (3.4)$$

die volumetrische Aktivität der Lipase $C_{P_{lactM}}$ (in UI^{-1}) betrachtet, wobei t_0 für den Anfang und t_j für den Endzeitpunkt des Prozesses steht. Die Aktivität wird in Units (U) angegeben, was einer Umsatzrate eines Substrates (in $\mu\text{mol}/\text{min}$) entspricht. Durch die Verwendung der volumetrischen Aktivität (Kapitel 4.3.1) wird neben der Lipasekonzentration auch die Qualität des Enzyms berücksichtigt. Eine reine Betrachtung der erreichten Lipasekonzentration würde einen eventuellen Aktivitätsverlust durch eine Konformationsänderung des Enzyms, z. B. aufgrund von ungünstigen Kultivierungsbedingungen, nicht berücksichtigen. Das in Gl.(3.4) betrachtete Medienvolumen V_M in Bezug zu dem Gesamtvolumen V_L spiegelt indirekt das Volumen der Zellen wieder und ist somit ein Maß für die zellspezifische Produktivität.

Eine Erhöhung der Produktivität über die Prozessführung kann mit einer Verkürzung der Produktionszeit erreicht werden. Durch die Verwendung von zwei Bioreaktoren, die parallel betrieben werden, lässt sich die in Abb. 3.3 gezeigte Kultivierung in zwei Abschnitte aufteilen. So könnten der Batch und der Fed-Batch im ersten Reaktor und nach einem Transfer der Kulturbrühe die Induktion im zweiten Reaktor stattfinden. Über diese sequenzielle und zugleich parallele Prozessführung wird die Produktivität erhöht (vgl. Kapitel 5.3.1).

In dem nachfolgenden Kapitel werden der Aufbau, die Vernetzung und die Verbindungen einer Integrierten Pilotanlage aufgezeigt, bei der für die Herstellung rekombinanter Proteine zwei Bioreaktoren und für die Weiterverarbeitung der Kulturbrühe mehrere Downstreamoperationen eingesetzt werden. Basierend auf der Pilotanlage werden anschließend in Kapitel 5 Prozessführungsstrategien mit dem Ziel diskutiert, die sequenzielle und zugleich parallele Betriebsführung in Hinsicht auf eine Produktivitätssteigerung aufzubauen.

4 Aufbau eines Integrierten Bioprozesses

4.1 Konzeption einer industriekompatiblen Scale-down Produktionsanlage

4.1.1 Unit Operations des Gesamtprozesses

In diesem Abschnitt werden die Komponenten einer industriekompatiblen Scale-down Produktionsanlage und deren verfahrenstechnische Verbindung beschrieben. Die Entwicklung einer effizienten Prozessführungsstrategie erfolgt in Kapitel 5, während die Erläuterung der zugehörigen Prozessautomatisierung in Kapitel 6 vorgenommen wird.

Die aufgebaute Integrierte Pilotanlage besteht aus fünf Teilanlagen. Für den Upstream werden zwei Bioreaktoren verwendet, die verfahrenstechnisch miteinander verbunden sind. Für den Downstream stehen ein Tellerseparator, eine Mikrofiltrationsanlage sowie ein Chromatographiesystem zur Verfügung. Diese Einheiten werden ebenfalls in den Integrierten Prozess mit eingebunden.

Ein Schema des Integrierten Bioprozesses ist in Abb. 4.1 dargestellt. Der Upstream ist in der oberen und der Downstream in der unteren Bildhälfte gezeigt.

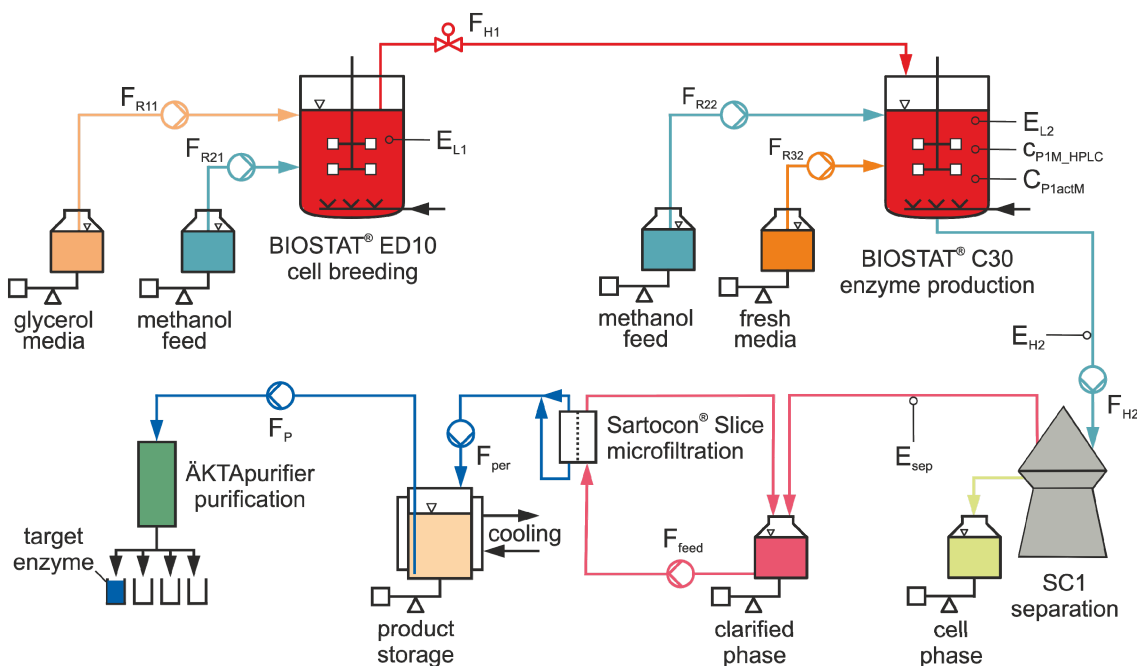


Abb. 4.1: Schema des Integrierten Bioprozess mit seinen fünf Teilanlagen

Der verfahrenstechnische Fluss durch die Anlage beginnt im ersten Bioreaktor, einem BIOSTAT® ED10, als Zellanzuchtprozess (cell breeding). Hauptziel dieses Prozesses ist die Generierung von *Pichia pastoris* Zellen. Der nächste Schritt erfolgt im zweiten Bioreaktor, einem BIOSTAT® C30, in dem der Produktionsprozess (enzyme production) stattfindet. Ziel dieses Prozesses ist die Herstellung des Zielproduktes CALB. Damit ist der Upstream abgeschlossen und es folgt ein dreistufiger Downstream.

Im ersten Downstreamprozess, der Separation, wird *Pichia pastoris* vom umgebenden Medium in die Zellphase (cell phase) abgetrennt. Aufgrund der erfolgten Sekretion des Produktes ins Medium, wird die Klarphase (clarified phase) weiter prozessiert.

Im zweiten Downstreamprozess, der Mikrofiltration, wird die Klarphase von verbliebenen Zellen sowie von Zellbruchstücken gereinigt. Ziel des letzten Prozessschrittes ist die Konzentrierung und die Aufreinigung des Zielproduktes aus dem Permeat der Mikrofiltration. Diese erfolgt zunächst durch eine Adsorption des Zielproduktes an ein Trägermaterial in einem Chromatographiesystem und einer nachfolgenden Elution von der Säule. Diese Chromatographieprozedur bewirkt gleichzeitig eine Umpufferung für eine stabilere Lagerung des Enzyms.

4.1.2 Integration der verfahrenstechnischen Einheiten

Das in Abb. 4.2 dargestellte Rohrleitungs- und Instrumentierungsfließbild (R+I Fließbild) zeigt die Verbindung der gegenüber Abb. 4.1 ausgewählter Anlagenteile über pneumatisch ansteuerbare Ventile (Bürkert, Ingelfingen und GEMÜ, Ingelfingen-Criesbach), die für einen steriltechnisch einwandfreien Transfer von Kulturbrühe und der Klarphase notwendig sind.

Die Rohrleitung zwischen den Reaktoren ist durch zwei Ventile unterbrochen (V1859 und V1850), mit denen diese Transferleitung in drei Abschnitte unterteilt wird. Der mittlere Abschnitt wird mit den Ventilen V1861 und V1852 sterilisiert. Die beiden äußeren Abschnitte, die jeweils in einem Reaktor enden, werden über die Handventile V1860 bzw. V1851 manuell mit Dampf beaufschlagt. Dies geschieht einmalig zusammen mit der Sterilisation der Bioreaktoren. V994 dient zur Reduzierung der in den Reaktor eingebrachten Menge an Kondensat, indem über V1851 und V994 die Leitung vor der Reaktorsterilisation mit Dampf erhitzt wird.

Die Bereitstellung der Kulturbrühe aus dem Produktionsreaktor zur Separation erfolgt über das Bodenablassventil V101 sowie über die Ventile V1841, V2002 und V2005. Zusätzlich besteht die Option, die Kulturbrühe über V2001 direkt der Mikrofiltrationsanlage (Crossflow) zur Verfügung zu stellen. Die während der Separation erzeugte und in einem Klarphasantank (clarified phase tank) aufgefangene Klarphase, wird über die Ventile V2011 und V2003 ebenfalls der Mikrofiltrationsanlage zugeführt.

Die Rohrleitung vom Produktionsreaktor zum Separator wird über die Ventile V111, V102, V1841, V2002 und V2006 sterilisiert. Zusätzlich besteht die Möglichkeit die Rohrleitung mit vollentsalztem Wasser (VE Wasser) zu spülen, indem anstatt V111 das Ventil V103 geöffnet wird. Die Verbindung vom Klarphasantank zur Filtrationsanlage wird mit den Ventilen V2010 und V2004 sterilisiert.

Die Ansteuerung der Ventile zum Transfer von Kulturbrühe oder Klarphase sowie die Automatisierung der Leitungssterilisationen erfolgt über das Prozessleitsystem SIMATIC PCS 7 der Firma Siemens, Karlsruhe (siehe Kapitel 6.1).

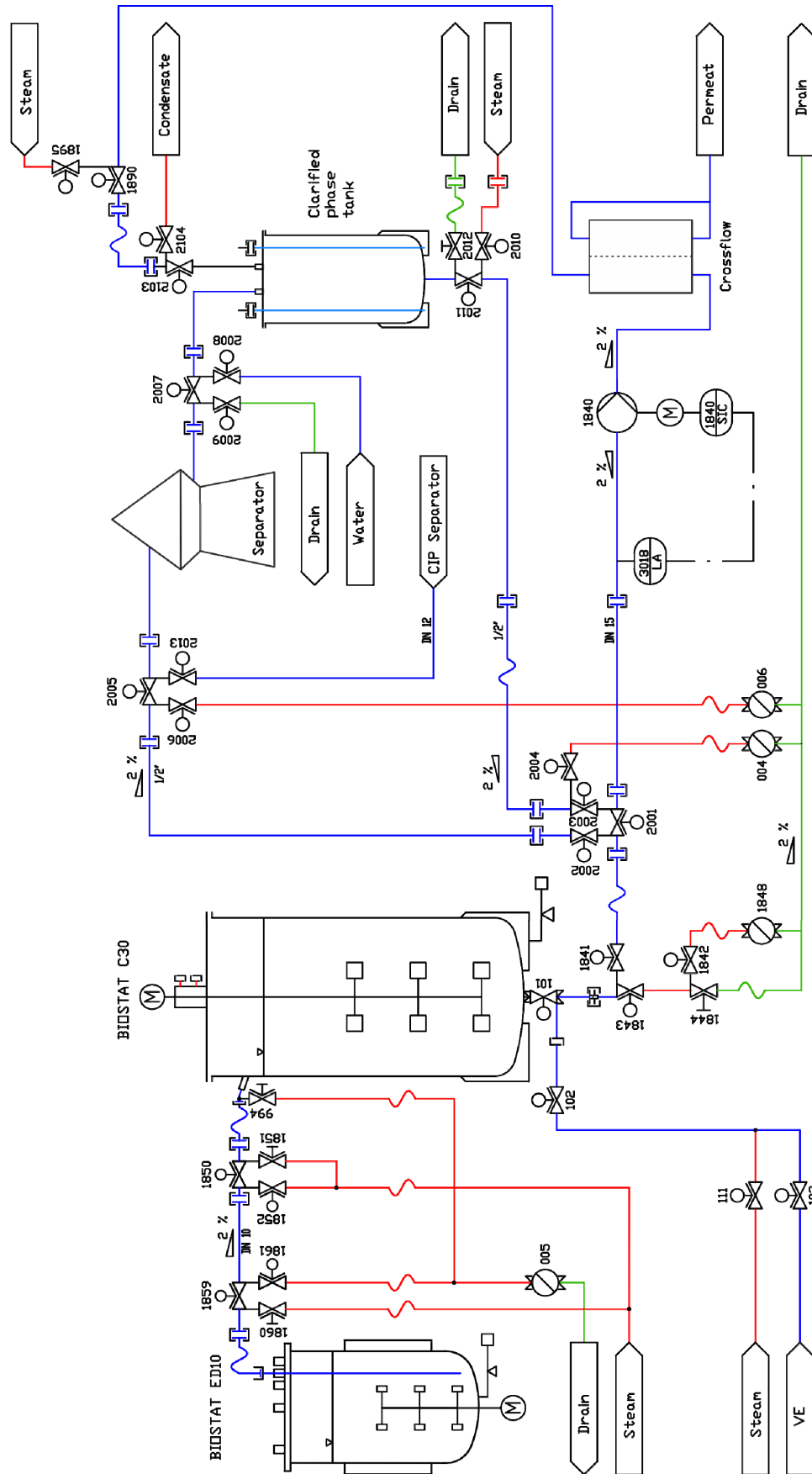


Abb. 4.2: R+I Fließbild zu der Verbindung der beiden Bioreaktoren sowie der Anbindung des Separators und der Mikrofiltrationsanlage

4.1.3 Hierarchische Automatisierungsstruktur

Die hierarchisch aufgebaute Automatisierungsstruktur ist in Abb. 4.3 gezeigt. An der Spitze befindet sich das Prozessleitsystem SIMATIC PCS 7. Dieses erfüllt übergeordnete Automatisierungsaufgaben, bietet eine Bedienerschnittstelle und verbindet einzelne Teilanlagen miteinander (siehe Kapitel 6.1). Über eine Ethernet Verbindung ist die SCADA Software (supervisory control and data acquisition) MFCS/win 3.0 (multi fermenter control system for Windows) der Firma Sartorius Stedim Biotech, Göttingen an PCS 7 angeschlossen. Diese erfüllt ebenfalls Automatisierungsaufgaben und wird für die Datenaufzeichnung des Gesamtprozesses eingesetzt.

Mit MFCS/win verbunden sind zwei DCU (digital control unit, Version II oder III) Frontend-Kontrolleinheiten. Über eine DCU II erfolgt die Regelung, Steuerung und Beobachtung des Zellanzuchtprozesses im BIOSTAT® ED10. Der Produktionsprozess im BIOSTAT® C30 sowie die der Separation nachgeschalteten Mikrofiltrationseinheit Sartocoon® Slice (Sartorius, Göttingen) werden über eine DCU III automatisiert.

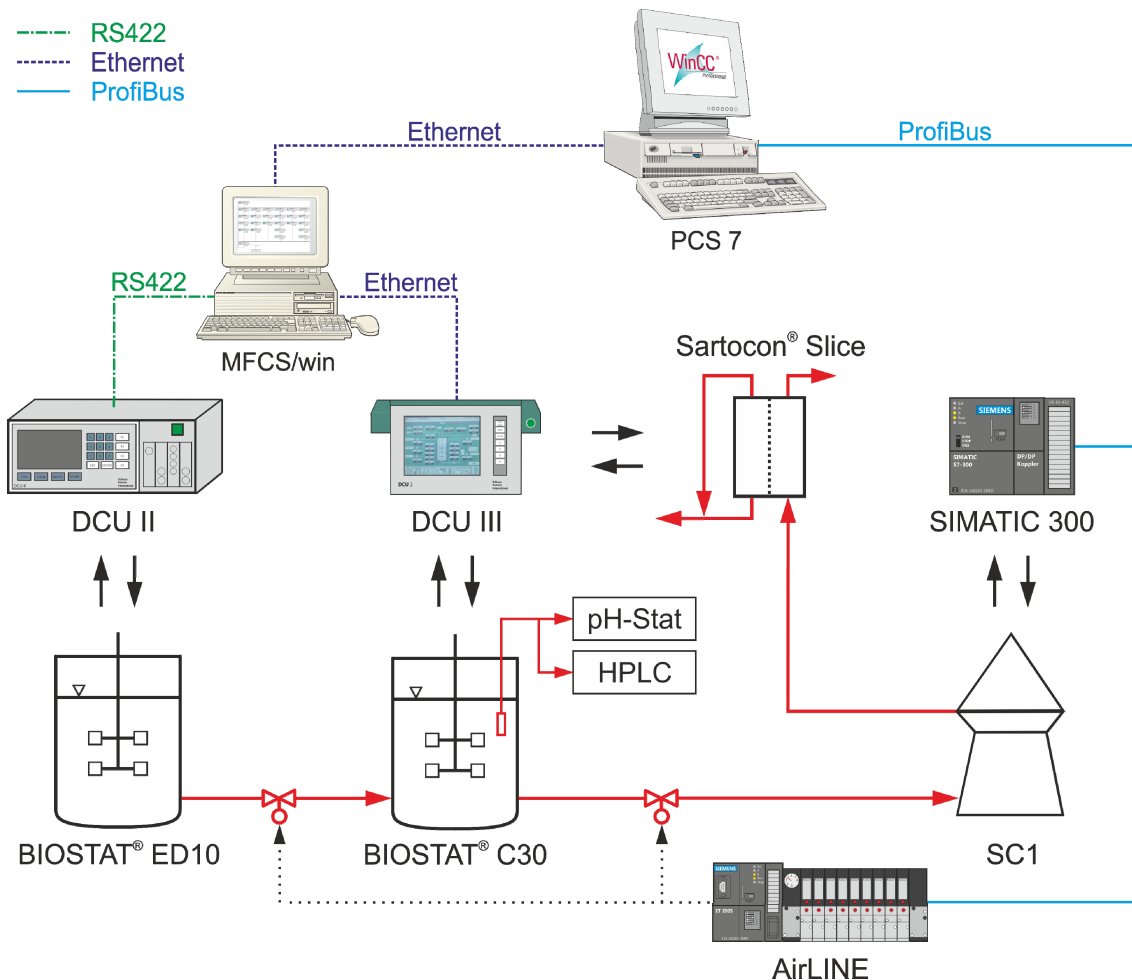


Abb. 4.3: Hierarchische Automatisierungsstruktur der Pilotanlage

Der Separator SC1 (GEA Westfalia Separators, Oelde) wird mit einer SIMATIC 300 (Siemens, Karlsruhe) automatisiert. Der Datenaustausch mit PCS 7 erfolgt über eine Profibus Verbindung. Die Ventile in den Rohrleitungen zur Verbindung der Teilanlagen, von denen in

Abb. 4.3 exemplarisch zwei dargestellt sind, werden über ein AirLINE Modul (Bürkert, Ingelfingen) angesteuert. Dieses Modul ist ebenfalls mit einer ProfiBus-Verbindung an PCS 7 angeschlossen. Der Datenaustausch mit einem pH-Stat und einer HPLC erfolgt über MFCS/win, siehe Kapitel 4.3.3.

4.1.4 Ansicht der Scale-down Produktionsanlage

In Abb. 4.4 ist der aus obiger Konzeption entstandene Aufbau der Anlage gezeigt, bei dem ein gesamter Herstellungsprozess auf 20 m² installiert ist. Links im Vordergrund ist der Produktionsreaktor mit seinen sechs Vorlagen zu sehen. Auf dessen Rückseite befinden sich, nicht einsehbar, der Anzuchtreaktor und eine Atline-Produktanalytik. Auf der rechten Seite ist der Klärseparator SC1 platziert, der sowohl mit dem Produktionsreaktor als auch mit der gegenüberliegenden Mikrofiltrationseinheit verrohrt ist. Den Abschluss bildet das im Hintergrund gezeigte Chromatographiesystem ÄKTApurifier100 der Fa. GE Healthcare.

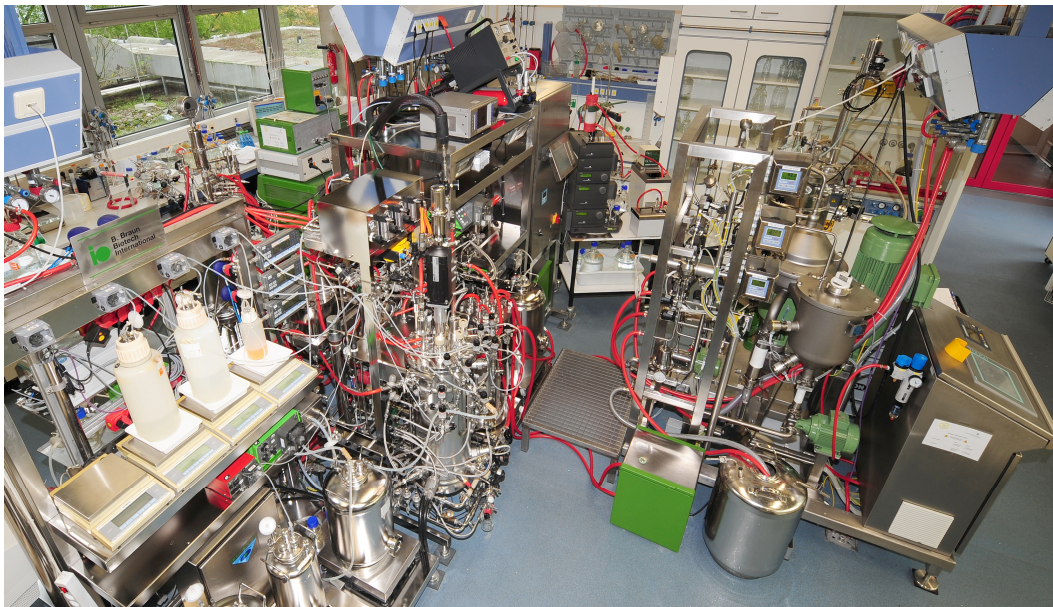


Abb. 4.4: Industriekompatible Integrierte Bioprozessanlage

Alle eingesetzten Geräte sind kommerziell erhältliche Produktionseinheiten, die upscalebar auf dem Markt zur Verfügung stehen. Daher besitzt die aufgebaute Anlage ein hohes Potential für Prozessentwicklungen im Scale-down Maßstab.

4.2 Beschreibung der Anlagenkomponenten

4.2.1 Der Zellananzuchtreaktor BIOSTAT[®] ED10

Der in Abb. 4.5 gezeigte Zellananzuchtreaktor ist ein BIOSTAT[®] ED10 Bioreaktor (B. Braun Biotech International, Melsungen) aus Edelstahl mit einem Maximalvolumen von 15 Litern und einem Arbeitsvolumen von zehn Litern. Die Temperierung des Reaktors erfolgt über einen Doppelmantel, dessen Wasserkreislauf über einen Wärmetauscher gekühlt oder über ein

Heizelement erwärmt werden kann. Die Sterilisation erfolgt vor Ort (SIP, sterilization in place).

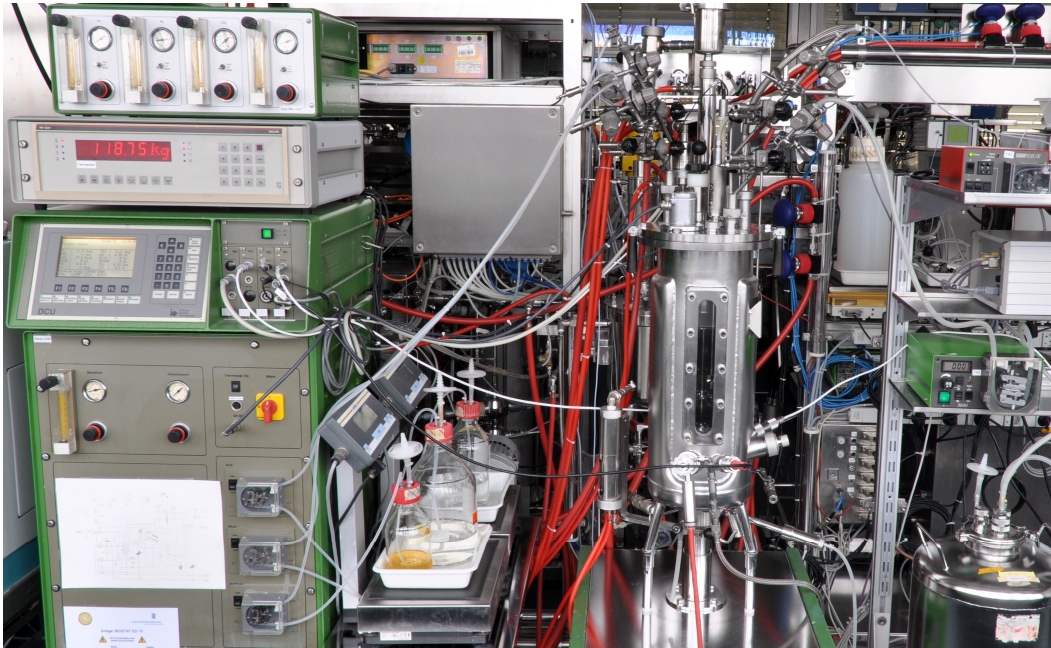


Abb. 4.5: Zellanzuchtreaktor BIostat® ED10 mit Peripheriegeräten

In Abb. 4.5 links unten gezeigt befindet sich das Grundgerät, in dem der Wärmetauscher, das Heizelement, Automatikventile sowie die Titrationspumpen verbaut sind. Darüber befindet sich die DCU II, der Messverstärker für die Reaktorwaage sowie eine Gasmischstation. Zwischen dem Grundgerät und dem Reaktor stehen die Titrationsvorlagen auf Waagen.

Zur sterilen Probenahme ist eine durchdämpfbare Sterilhülse am Probenahmeventil des Reaktors angebracht. In den Reaktordeckel ist ein Steigrohr eingelassen, über welches Kulturbrühe in den Produktionsreaktor transferiert werden kann. Zur Messung des Reaktionsgewichtes m_{L1} und der damit verbundenen Bilanzierung des Reaktionsvolumens V_{L1} steht der Reaktor auf einer Waage.

Die in dem Reaktor eingebauten Sonden, die für Regelungsaufgaben verwendeten Stellglieder sowie die eingesetzten peripheren Messsysteme sind in Tab. 4.1 aufgeführt. Da es sich um Messgrößen des ersten von zwei Reaktoren handelt, ist dies im Index der Variable mit einer 1 verdeutlicht.

In der Kulturbrühe werden der pH-Wert pH_1 , der Gelöstsauerstoffpartialdruck pO_{21} , die Temperatur ϑ_{L1} sowie die Trübung E_{L1} inline gemessen. Für eine Kaskadenregelung von ϑ_{L1} wird die Doppelmanteltemperatur ϑ_{DJ1} ebenfalls gemessen. Zur Begasung des Reaktors wird eine Gasmischstation verwendet, über die ein Volumenstrom von Luft F_{nAIR1} , von Sauerstoff F_{nO21} oder von Stickstoff F_{nN21} eingestellt werden kann.

Im Kopfraum des Reaktors wird der Reaktorüberdruck p_{G1} und im Abgas die Stoffmengenanteile von Sauerstoff x_{O21} sowie von Kohlenstoffdioxid x_{CO21} gemessen. Die Messung des

Sauerstoffs basiert auf einer Sauerstoffpumpe aus Zirkoniumoxid, die Messung des Kohlenstoffdioxidanteils auf der Absorption von Infrarotlicht.

Tab. 4.1: Mess- und Stellgrößen des Zellanzuchtreaktors

Prozessgröße	Einheit	Hersteller	Modelltyp
pH_1	-	Mettler Toledo	405-DPAS-SC-K8S
pO_{21}	%	Ingold	34100 3005
ϑ_{L1}	°C	BBI	PT-100
ϑ_{DJ1}	°C	BBI	PT-100
E_{L1}	AU	optek-Danulat	ASD19-N
F_{nAIR1}	$l \text{min}^{-1}$	Bronkhorst	EL-FLOW
F_{nO21}	$l \text{min}^{-1}$	Bronkhorst	EL-FLOW
F_{nN21}	$l \text{min}^{-1}$	Bronkhorst	EL-FLOW
p_{G1}	mbar	PMA	9404 263 20071
x_{O21}	%	BlueSens gas sensor	BPC-O2
x_{CO21}	%	BlueSens gas sensor	BPC-CO2
N_{St1}	rpm	Georgii Kobold	KGC 7011
F_{R21}	$l \text{h}^{-1}$	Watson Marlow	101 U/R
F_{R31}	$l \text{h}^{-1}$	Watson Marlow	503 U
m_{L1}	kg	Philips	PR1597
m_{R21}	g	Sartorius	LP 34000 P
m_{R31}	g	Sartorius	QA65EDE-S
m_{T11}	kg	Sartorius	QA15DCE-S
m_{T21}	kg	Sartorius	QA7DCE-S

Über die Rührerdrehzahl N_{St1} wird der Stoffübergang von der Gasphase in die Flüssigphase beeinflusst. Die Rührerwelle, auf der drei Sechsstab-Scheibenrührer befestigt sind, ist durch den Reaktorboden geführt.

Die Methanolzugabe F_{R21} sowie die Zugabe von frischem Medium F_{R31} erfolgen über Ventilbrücken im Reaktordeckel mittels Schlauchquetschpumpen (Watson Marlow, Rommelskirchen). Für eine detaillierte Bilanzierung des Prozesses werden neben dem Reaktorgewicht m_{L1} auch die Gewichte der Methanolvorlage m_{R21} , der Refreshvorlage m_{R31} , der Säurevorlage m_{T11} sowie der Laugevorlage m_{T21} gemessen.

Diese Messgrößen bilden die Grundlage für eine erweiterte Prozessbeobachtung, die in Kapitel 9 thematisiert wird.

4.2.2 Der Produktionsreaktor BIOSTAT® C30

Als Produktionsreaktor wird ein BIOSTAT® C30 (Sartorius Stedim System, Melsungen) mit einem Gesamtvolumen von 42 Litern, bei einem maximalen Arbeitsvolumen von 30 Litern eingesetzt. Die Temperierung erfolgt über einen Doppelmantel, in dessen Wasserkreislauf ein Wärmetauscher für Kühlwasser sowie ein Heizelement eingebaut sind.

In Abb. 4.6 ist der Reaktor gezeigt, der zusammen mit der Mikrofiltrationsanlage Sartocoon Slice (Sartorius AG, Göttingen) verrohrt und automatisiert wurde. Es handelt sich hier um eine Integrierte Anlage, die gemeinsam von der Firma B. Braun Biotech International und der HAW Hamburg konzipiert wurde. Für das in Kapitel 4.1 beschriebene Konzept wurde

zwischen dem Reaktor und der Mikrofiltrationsanlage verfahrenstechnisch der Tellerseparator eingefügt.



Abb. 4.6: Produktionsreaktor BIOSTAT[®] C30 (links) und Mikrofiltrationsanlage Sartocon[®] Slice (rechts) mit Retentat- und Permeattank

Der Produktionsreaktor verfügt im Gegensatz zu dem Zellanzuchtreaktor über einen oberen Stutzenkranz. An zwei der oberen Zugänge sind Steigrohre montiert, über die Substrate direkt ins Medium geleitet werden können.

Im Vordergrund der Mikrofiltrationsanlage stehen zwei Edelstahltanks, die als Retentat- bzw. Permeatvorlage dienen. Der Retentattank dient gleichzeitig zur Aufbewahrung der Klarphase aus der Separation (siehe Abb. 4.2). Beide Edelstahltanks sind kühlbar und gewährleisten somit eine hohe Produktstabilität.

Eine Übersicht der eingesetzten Messtechnik des Produktionsreaktors ist in Tab. 4.2 gezeigt. Wie auch der Zellanzuchtreaktor verfügt er über Sonden zur Messung des pH-Wertes pH_2 , des Gelöstsauerstoffpartialdruckes pO_{22} , der Temperatur ϑ_{L2} sowie der Doppelmanteltemperatur ϑ_{DJ2} und der Trübung E_{L2} . Über eine Gasmischstation erfolgt die Begasung des Reaktors, über die wie auch beim Zellanzuchtreaktor die Luftbegasung F_{nAIR2} , die mit Sauerstoff, F_{nO22} , oder mit Stickstoff, F_{nN22} , ergänzt werden kann.

Die Messung des Reaktorüberdruckes p_{G2} und die Bestimmung von x_{O22} und x_{CO22} mit zwei Abgassensoren (BlueSens, Herten) erfolgen in der Abluftstrecke. Ebenfalls im Abgas wird der Anteil an organischen Kohlenstoffverbindungen mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) gemessen. Daraus wird die Methanolkonzentration im Medium c_{S2M2} korreliert und somit ein

geregelter Methanol Fed-Batch realisiert. Beim Produktionsreaktor ist die Rührerwelle durch den Deckel geführt. Die Umwälzung der Kulturbrühe erfolgt ebenfalls mit drei Sechsstab-Scheibenrührern.

Tab. 4.2: Mess- und Stellgrößen des Produktionsreaktors

Prozessgröße	Einheit	Hersteller	Modelltyp
pH_2	-	Mettler Toledo	405-DPAS-SC-K8S
pO_{22}	%	Mettler Toledo	P52201012
ϑ_{L2}	°C	Jumo	E 043.3-3012-4 Me
ϑ_{DJ2}	°C	Endress + Hauser	TSPT-4007HAA L
E_{L2}	AU	optek-Danulat	ASD25-BT-N
F_{nAIR2}	$l\text{min}^{-1}$	Bronkhorst	EL-FLOW
F_{nO22}	$l\text{min}^{-1}$	Bronkhorst	EL-FLOW
F_{nN22}	$l\text{min}^{-1}$	Bronkhorst	EL-FLOW
p_{G2}	mbar	PMA	9404 263 20071
x_{O22}	%	BlueSens gas sensor	BPC-O2
x_{CO22}	%	BlueSens gas sensor	BPC-CO2
c_{S2M2}	$g\text{l}^{-1}$	Bernath Atomic	3006
N_{S12}	rpm	Seidel	6SM57M-3000
F_{R22}	$l\text{h}^{-1}$	Watson Marlow	101 U/R
F_{R32}	$l\text{h}^{-1}$	Watson Marlow	504 U
m_{L2}	kg	Global Weighing Technologies	PR6207/51D1
m_{R22}	g	Sartorius	QC65EDE-S
m_{R32}	g	Sartorius	QC65EDE-S
m_{T12}	g	Sartorius	LP 12000 S
m_{T22}	g	Sartorius	LP 12000 S
m_{AF2}	g	Sartorius	LP 12000 S
$C_{P1actM2}$	$ku\text{l}^{-1}$	Metrohm	ProcessLab 875
IA_{P1M2}	AUs	VWR-Hitachi	LaChrom Elite

Reines Methanol (F_{R22}) oder frisches Medium (F_{R32}) kann über einen Zugang im oberen Stutzenkranz in den Reaktor gepumpt werden. Das Reaktorvolumen V_{L2} wird über die Messung des Reaktorgewichtes m_{L2} mittels Wägezellen bilanziert. Im Vergleich zum Zellanzuchtprozess wird bei der Produktion neben den Substrat- und Titrationsvorlagen auch das Vorlagengewicht des Antischaummittels m_{AF2} gemessen. Dieses geht somit in eine Bilanzierung des Produktionsprozesses mit ein.

Zur erweiterten Überwachung des Produktionsprozesses sind zwei Atline-Analysensysteme angeschlossen, die zur Bestimmung der Enzymaktivität $C_{P1actM2}$ (Kapitel 4.3.1) und Zielproduktkonzentration IA_{P1M2} (Kapitel 4.3.2) eingesetzt werden.

4.2.3 Der Separator SC1

Das Ziel der Separation ist die Trennung von Feststoff (Zellen) und Flüssigkeit (Medium). Der verwendete Separator, Modell SC1, der Firma GEA Westfalia Separators, Oelde, ist eine Scale-down Version eines industriellen Separators, und somit für den Übergang vom Labor- zum Pilotbetrieb geeignet. Es handelt sich um einen semi-kontinuierlichen Tellerseparator, der

sich mit 8000 bis 12500 Umdrehungen pro Minute dreht, kontinuierlich befüllt wird (20 bis 180 l h^{-1}) und in zuvor definierten Zeitintervallen den Feststoff auswirft (Teilentleerung).

Der Separator ist über eine STEP 7 Programmierung in einer SIMATIC 300 (Siemens, Karlsruhe) automatisiert und kann per Hand über ein Touch Panel oder per Remote über PCS 7 bedient werden. Ein vereinfachtes Rohrleitungs- und Instrumentierungsfließbild des Separators ist in Abb. 4.7 gezeigt.

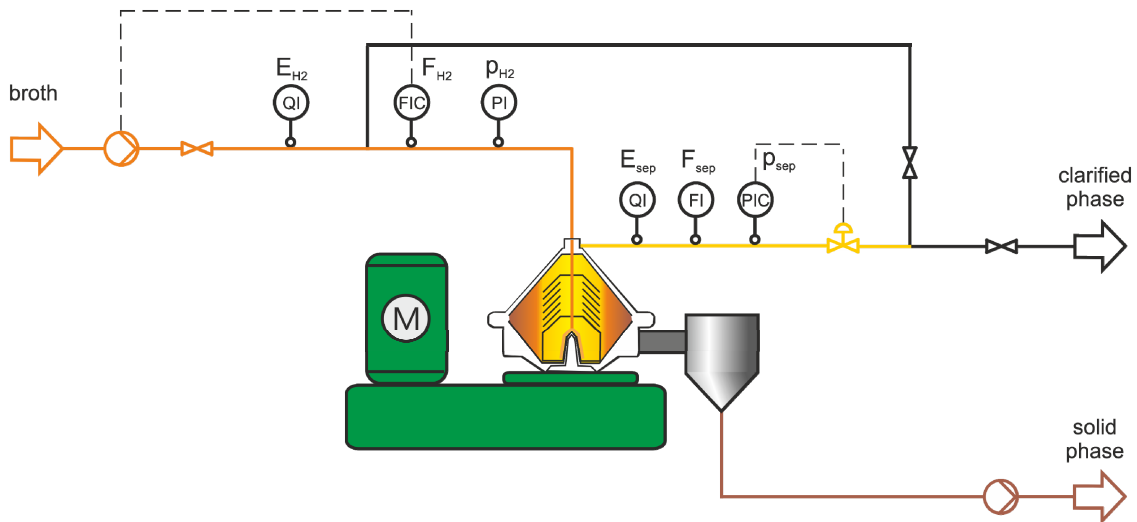


Abb. 4.7: Vereinfachtes R+I Fließbild des Separators SC1

Im Eingang wird die Trübung E_{H2} (Durchlichtmessung, optek-Danulat, Essen), der Durchfluss F_{H2} (magnetisch-induktive Messung, Bürkert, Ingelfingen) sowie der Druck p_{H2} (Wika, Klingenberg) gemessen. Die Regelung des Volumenstroms erfolgt über eine Membranpumpe (Jabsco, Norderstedt).

Am Klarphasenausgang wird ebenfalls die Trübung E_{sep} (Streulichtmessung, optek-Danulat, Essen), der Durchfluss F_{sep} (magnetisch-induktive Messung, Bürkert, Ingelfingen) sowie der Druck p_{sep} (Wika, Klingenberg) gemessen. Der Ablaufdruck wird mit Hilfe eines Stellventils (Bürkert, Ingelfingen) geregelt, da mit einer Druckbeaufschlagung des Ablaufes eine Blasenbildung im Separator unterdrückt und die Separation somit nicht gestört wird.

Die Klarphase wird in einem gekühlten Klarphasentank aufgefangen (siehe Abb. 4.2). Der Feststoff wird zunächst in einen Zyklon ausgeworfen und anschließend abgepumpt.

4.2.4 Die Mikrofiltrationsanlage Sartocoon® Slice

Die Mikrofiltration ist der Separation nachgeschaltet, um verbliebende Zellen sowie Zellbruchstücke aus der Klarphase zu entfernen. Es wird eine Sartocoon® Slice Halterung (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) verwendet, die bereits in Abb. 4.6 gezeigt wurde. In diese können ein bis maximal acht Filtrationsmodule eingespannt werden. Die Module besitzen je eine Klärfläche von 0.1 m^2 mit einem Porendurchmesser von $0.2 \mu\text{m}$. Eine Darstellung der Regelkreise zur Mikrofiltration ist in Abb. 4.8 gezeigt.

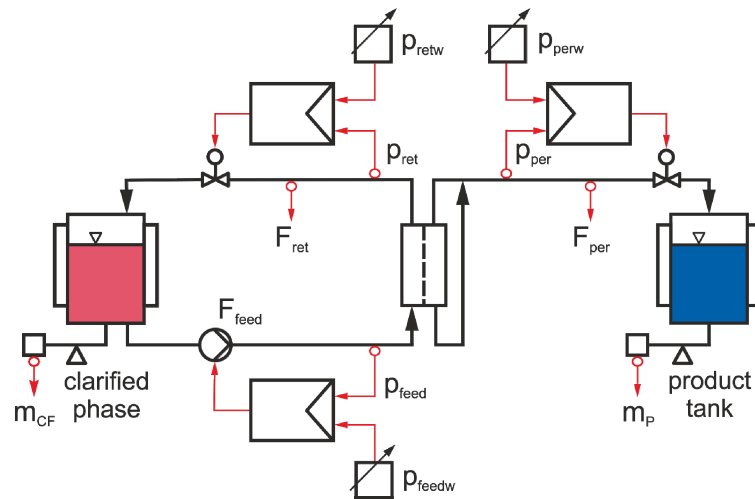


Abb. 4.8: Regelkreise der Mikrofiltration

Die Filtration wird nach dem Cross Flow Prinzip betrieben. Die Klarphase wird mit F_{feed} über eine Sichelpumpe (Pureflo/Jabsco, Norderstedt) angesaugt und über die Filtrationsmembran zurück in den Klarphasentank gepumpt (Retentat). Die Überströmgeschwindigkeit resultiert aus den geregelten Drücken p_{feed} und p_{ret} im Feed und im Retentat.

Auf der anderen Seite der Membran (Permeat) wird der Druck p_{per} geregelt. Über die drei Regelgrößen ergibt sich ein Transmembrandruck, aus dem eine Durchflussgeschwindigkeit durch die Membran resultiert. Diese verringert sich während der Filtration aufgrund der Bildung eines Filterkuchens (Membranfouling) aus den zu filtrierenden Zellen und Zellbruchstücken. Sobald das Volumen im Klarphasentank einen kritischen Wert unterschreitet, wird die Mikrofiltration beendet.

Die Filtration ist über eine Schrittkette in der DCU III automatisiert. Ebenso die Abläufe zur Sterilisation und zur Reinigung dieses Anlagenteils. Die Bedienung kann vor Ort an der DCU oder per Remote über MFCS/win erfolgen.

4.2.5 Das Chromatographiesystem ÄKTApurifier 100

Für eine abschließende Feinreinigung des Zielproduktes wird ein ÄKTApurifier 100 der Firma GE Healthcare, Großbritannien als FPLC (fast protein liquid chromatography) verwendet, der in Abb. 4.9 gezeigt ist. Die FPLC wurde zum Zeitpunkt dieser Arbeit als standalone Gerät verwendet. Ein Datenaustausch mit MFCS/win oder PCS 7 fand nicht statt.

In der linken Hälfte der Abbildung ist der modulare Aufbau der Anlage, bestehend aus einer Pumpeinheit, der UV-Messung zusammen mit dem Messverstärker für pH und Konduktivität, einer zentralen Stromversorgung mit Netzwerkverwaltung sowie einem optional verwendbaren Probensammler zu erkennen. In der Mitte des Bildes ist die eingesetzte präparative Säule gezeigt, die mit einem Wasserbad über einen Doppelmantel temperiert wird. Ein weiteres Wasserbad dient zur Kühlung des Eluates und somit der Stabilisierung der Enzyme.



Abb. 4.9: Chromatographiesystem ÄKTApurifier 100 mit präparativer Säule

Die Anlage besitzt zwei Pumpen mit denen vier Fließmittel in gewünschtem Mischungsverhältnis durch das System gepumpt werden können. Eine zusätzliche Pumpe wird zur Probenaufnahme verwendet. Mit sechs six-Port Ventilen sind unterschiedliche Säulenschaltungen möglich. Am Säulenausgang wird der pH-Wert, die Leitfähigkeit sowie die UV-Absorption bei 254 und 280 nm gemessen.

4.3 Atline-Produktanalytik

4.3.1 Atline-Messung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wird mit Hilfe einer Hydrolysereaktion und der damit verbundenen Freisetzung einer Säure bestimmt, indem der pH-Wert mit einem automatischen Titrator (pH-Stat Prinzip) geregelt wird. Die zur Titration notwendige Menge an Natronlauge (NaOH) ist ein Maß für die Enzymaktivität. Das zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzte Substrat ist Tributyrin. Diese Reaktionskomponente ist ein dreifach mit Buttersäure verestertes Glycerolmolekül. Die Hydrolysereaktion von Tributyrin durch das Enzym CALB ist in Abb. 4.10 gezeigt.

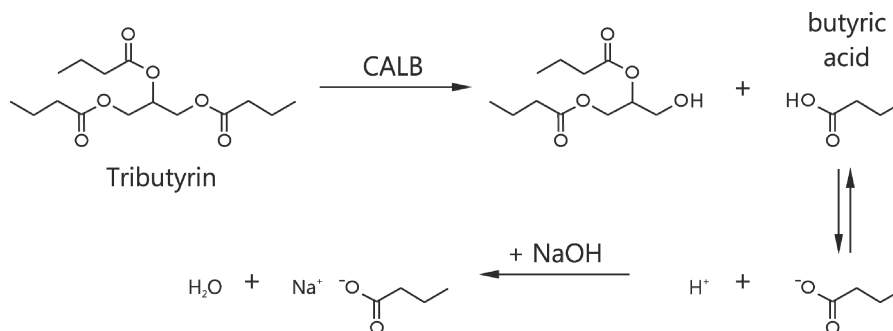


Abb. 4.10: Hydrolysereaktion von Tributyrin durch CALB

Bei der Reaktion wird eine Esterverbindung des Moleküls Tributyrin durch CALB hydrolysiert und somit Buttersäure freigesetzt. Diese dissoziiert sofort im Wasser zum Buttersäureanion und einem Hydroniumion, wodurch der pH-Wert sinkt. Durch die Titration mit Natron-

lauge werden die freigesetzten Hydroniumionen durch die Übertragung der zusätzlichen Wasserstoffionen auf die freien OH-Gruppen neutralisiert. Zudem entsteht das Natriumsalz der Buttersäure, Natriumbutyrat.

Der zur automatischen Durchführung der Enzymaktivitätsbestimmung eingesetzte Titrator ProcessLab 875 (Metrohm, Filderstadt) ist in Abb. 4.11 gezeigt.

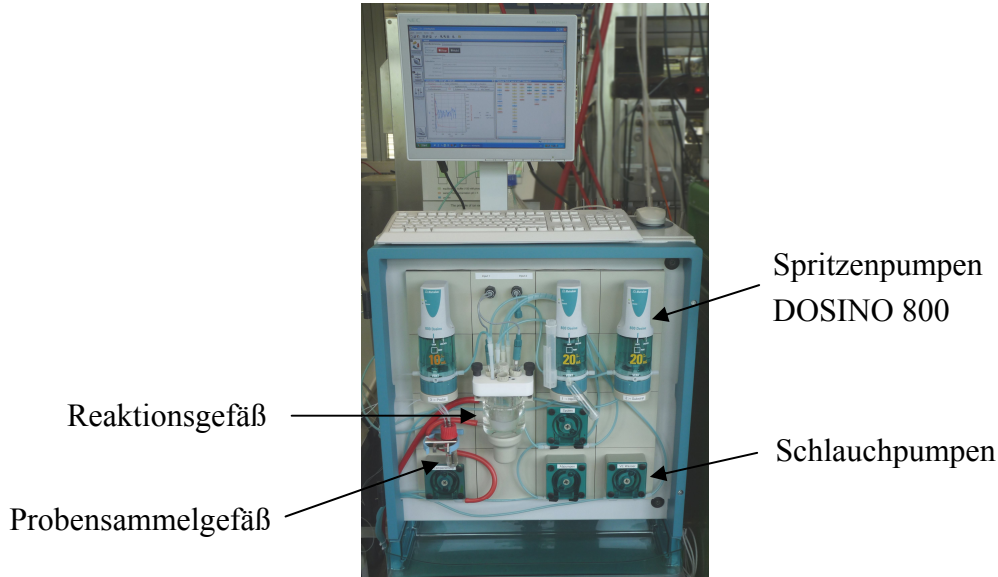


Abb. 4.11: Vollautomatischer Titrator ProcessLab 875 zur Bestimmung der Enzymaktivität Die Titration sowie die Vorbereitungen zur Messung erfolgen über Spritzen- und Schlauchquetschpumpen. Der Titrator verfügt über drei Spritzenpumpen (1 x 10 ml, 2 x 20 ml), vier Schlauchquetschpumpen sowie über ein 50 ml Reaktionsgefäß mit Doppelmantel. Im Reaktionsraum werden der pH-Wert sowie die Temperatur über ein PT-1000 gemessen. Die Temperierung des Reaktionsraumes erfolgt durch den Doppelmantel über die Pumpe eines Wasserbades. Das Schema des Messaufbaus ist in Abb. 4.12 dargestellt.

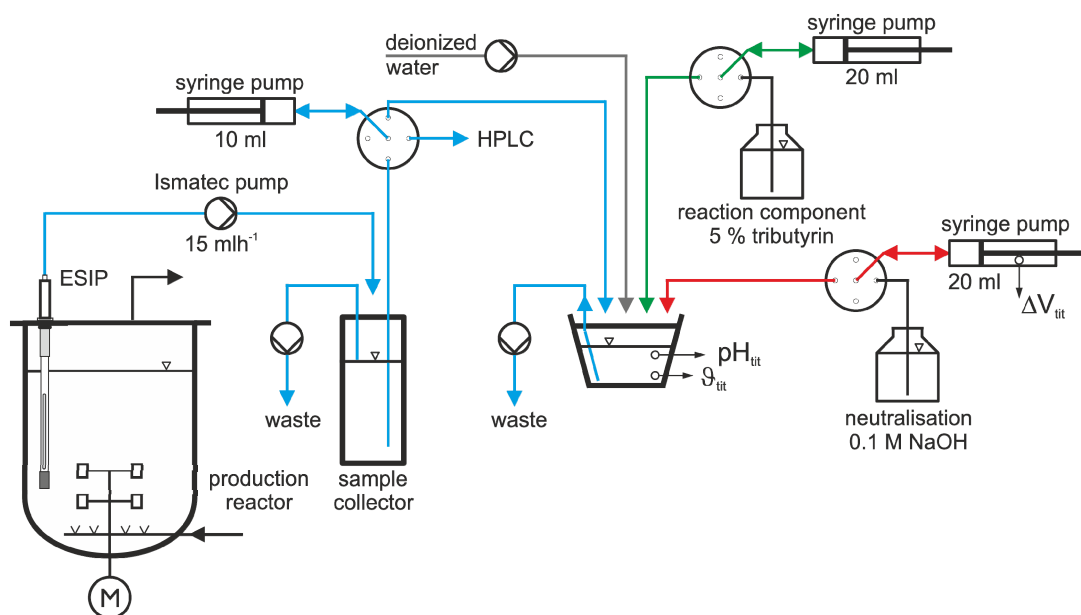


Abb. 4.12: Messaufbau der Atline-Enzymaktivitätsmessung

In dem Produktionsreaktor ist eine Filtrationssonde eingebaut (ESIP, Eppendorf sterilizable inline probe). Diese besteht aus einer Polypropylenmembran mit einer Porengröße von 0.2 μm . Damit kann über eine Schlauchquetschpumpe (Ismatec, Wertheim) ein zellfreier Analysenstrom realisiert werden. Die Probe wird kontinuierlich mit 15 mlh^{-1} in ein Proben-sammelgefäß gepumpt, dessen maximaler Füllstand von 6 ml über das Abpumpen überschüssiger Probe gewährleistet ist.

Zu Beginn einer Messung werden 10 ml des Substrates Tributyrin in das Reaktionsgefäß gepumpt, dort mit 25 ml VE Wasser verdünnt und die Temperatur überwacht. Bei Erreichen der Reaktionstemperatur von 36°C wird 0.1 ml Probe in das Reaktionsgefäß gepumpt und die pH-Stat Titration mit 0.1 M Natronlauge gestartet. Die Titration auf pH 7.0 wird zehn Minuten durchgeführt und im Anschluss die Enzymaktivität über das verwendete Laugen-volumen berechnet. Dabei ist eine Aktivitätsunit U definiert als der Umsatz von 1 μmol Tributyrin pro Minute bzw. als die Titration von 10 μl NaOH pro Minute. Die volumetrische Enzymaktivität C_{P1actM} ergibt sich schließlich aus der gemessenen Aktivität und dem eingesetzten Probenvolumen.

Die Methode zur Durchführung einer Messung ist mit einer Schrittkettenprogrammierung in der Software Tiamo (Metrohm, Filderstadt) automatisiert. Ein Ausschnitt dieser Programmierung ist in Abb. 4.13 gezeigt.

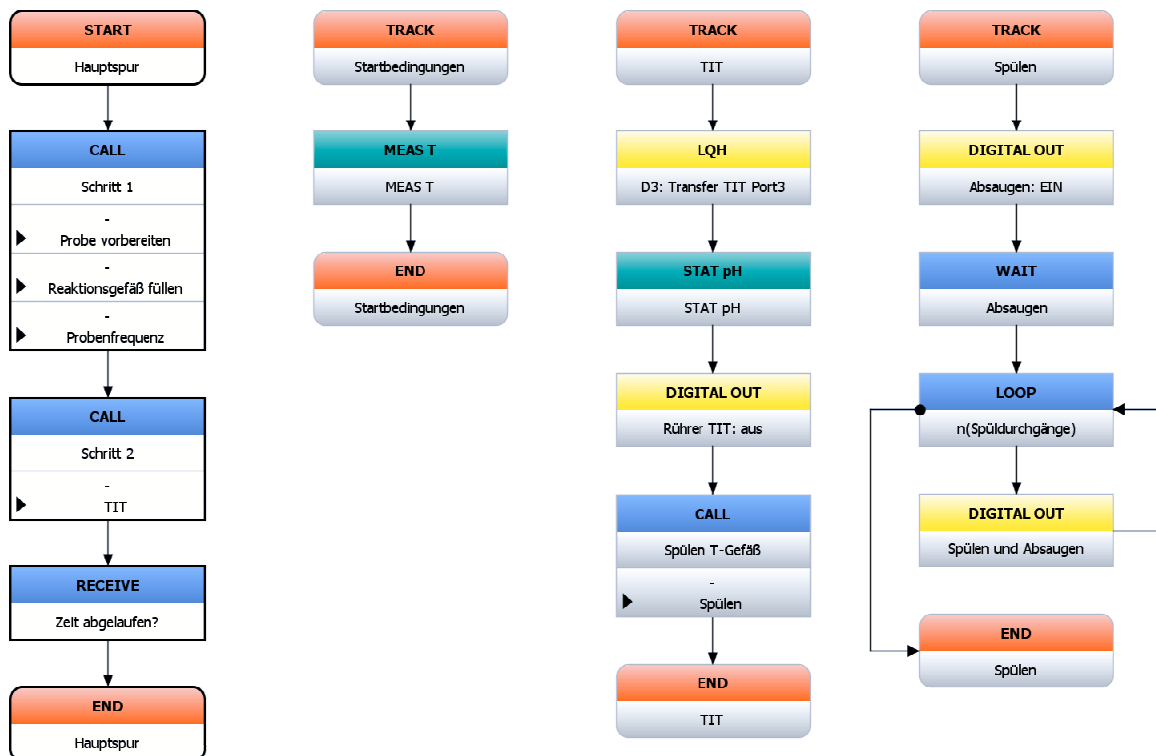


Abb. 4.13: Ausschnitt aus der Schrittkettenfolge zur Automatisierung der Enzymaktivitätsbestimmung

Links im Bild ist die Hauptspur definiert, von der aus Nebenspuren mit CALL Bausteinen aufgerufen werden. In einer Nebenspur zur Vorbereitung der Messung (nicht gezeigt) werden über Liquid Handling (LQH) Bausteine die Schlauchleitungen sowie eine Spritzenpumpe mit

der Probe gespült sowie das Substrat im Reaktionsgefäß vorgelegt. Über einen Regelbaustein (MEAS T), der in der zweiten abgebildeten Spur eingebaut ist, wird die Temperatur des Substrates überwacht und bei einer Temperaturänderung kleiner als $0.1^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ die Überwachung beendet. Damit ist der erste CALL-Aufruf der Hauptspur abgeschlossen und die Titrationsspur (dritte von links) wird gestartet. Diese beginnt mit der Dosierung der Probe in das Reaktionsgefäß und startet anschließend die Titration mit dem Regelbaustein STAT pH.

Nach Abschluss der Titration wird eine Reinigungspur (vierte von links) aufgerufen, die in mehreren Wiederholungen das Reaktionsgefäß mit VE-Wasser füllt und wieder abpumpt.

Sobald ein Fehler in der Methode auftritt, z. B. das Blockieren einer Spritzenpumpe, wird der Ablauf gestoppt und die Fehlerspur (nicht gezeigt) aktiviert, die eine Fehlermeldung in die Datenbank der Methode schreibt. Wenn die Methode ohne Fehler ausgeführt wurde, wird in der Exitspur (nicht gezeigt) die Enzymaktivität berechnet und diese in die Tiamo Methodendatenbank sowie in eine Textdatei exportiert.

Die Messung dauert insgesamt 35 Minuten und wird in einer Endlosschleife automatisch wiederholt. Die Dauer setzt sich neben der zehnminütigen Titration aus dem Spülen der Spritzenpumpe zur Probenzugabe, der Temperierung des Reaktionsvolumens sowie der anschließenden Reinigung des Reaktionsgefäßes zusammen. Zusätzlich wird ein Teil der Probe aus dem Probensammelgefäß während der Probenvorbereitung zu einer HPLC gepumpt.

4.3.2 HPLC-Einsatz zur Produktmessung

Eine HPLC (**high pressure liquid chromatography**) wird zur Bestimmung der Zielprotein-konzentration verwendet. Dazu wird die zellfreie Probe, die über die ESIP aus dem Produktionsreaktor entnommen und vom Titrator bereitgestellt wurde, analysiert. Die HPLC-Anlage (LaChrom Elite, VWR-Hitachi) ist in Abb. 4.14 gezeigt.



Abb. 4.14: HPLC LaChrom Elite zur Bestimmung der Produktkonzentration

Diese besteht aus einem Organizer, einer HPLC-Pumpe L-2130, einem Jetstream 2 Plus Säulenofen sowie einem UV-Detektor L-2400. Über die Pumpe werden drei Six-Port Ventile (ERC, Riemerling) angesteuert. Übergeordnet steht ein Rechner mit der Software EZChrom Elite, mit der die Steuerung und Automatisierung der Anlage sowie die Auswertung der Chromatographie erfolgt.

Die Methode der Chromatographie basiert auf der Veröffentlichung von Trodler [Trodler et al., 2008] zu einer einstufigen Aufreinigung von CALB über einen Kationenaustauscher. Da CALB im Gegensatz zu den meisten Proteinen keinen pI-Wert, sondern ein pI-Band besitzt, ist ein niedriger pH-Wert zur Bindung einzustellen. Die Proteine der zellfreien Probe liegen allerdings im Kultivierungsmedium (Molarität circa 270 mM) bei pH 5.5 vor. Daher wird eine zweistufige Methode umgesetzt, die eine Umpufferung bzw. Entsalzung sowie eine Adsorption enthält [Loegering et al., 2010].

Die verwendete Säule zur Entsalzung ist eine 5 ml HiTrap Sephadex G-25 Superfine (HiTrap Desalting, GE Healthcare) mit einem Größenausschluss M_r von 5000. Als Kationenaustauscher wird eine 1 ml AcroSep Ceramic HyperD S (PALL) verwendet. Die Säulenschaltung ist in Abb. 4.15 gezeigt.

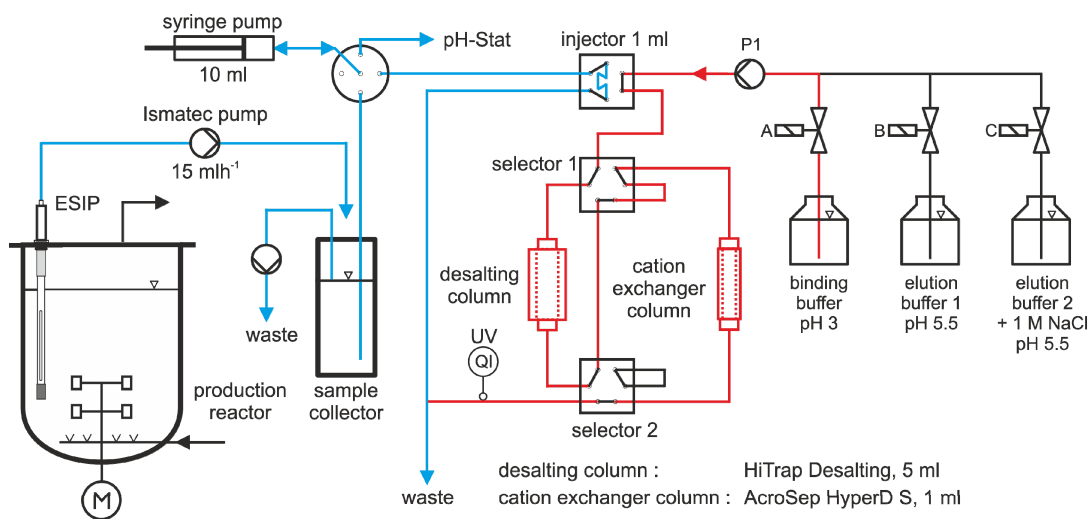


Abb. 4.15: Messaufbau der Atline-Proteinkonzentrationsmessung

Ein Probenvolumen von 1 ml wird für eine Messung verwendet. Dazu ist eine entsprechende Probenschleife am Injektionsventil angebracht, die über eine Spritzenpumpe des Titrators aus dem Probensammelgefäß gefüllt wird.

Zu Beginn der Messung wird die Probenschleife mit dem Fließsystem verbunden und die Probe durch die Entsalzungssäule geleitet. Aufgrund des Größenausschlussprinzips werden die in der Probe enthaltenen Salze und niedermolekularen Bestandteile verzögert und die Proteine somit in den Laufpuffer, einen 20 mM Citratpuffer bei pH 3.0, überführt.

Die Proteine adsorbieren schließlich am Kationenaustauscher. Bevor die verzögerten Salze aus der Entsalzungssäule ausgespült werden, wird diese mit Hilfe der zwei Selektoren aus dem System geschaltet.

Die Elution des Ionenaustauschers findet in zwei Stufen statt, einer pH- und einer Salzelution. Zunächst wird das Zielprodukt eluiert, indem das Fließmittel auf den ersten Elutionspuffer, ein 30 mM Acetatpuffer bei pH 5.5, umgestellt wird. Dies entspricht immer noch einer sauren Bedingung. Aufgrund des pI-Bandes von CALB ändert sich allerdings dessen Oberflächenladung und das Zielprodukt verlässt die Säule. Im zweiten Elutionsschritt werden unter Hochsalzbedingungen mit dem zweiten Elutionspuffer, ein 30 mM Acetatpuffer mit 1 M NaCl bei pH 5.5, die restlichen auf der Säule befindlichen Proteine eluiert. Abschließend erfolgt die Reinigung der Entsalzungssäule mit dem Laufpuffer.

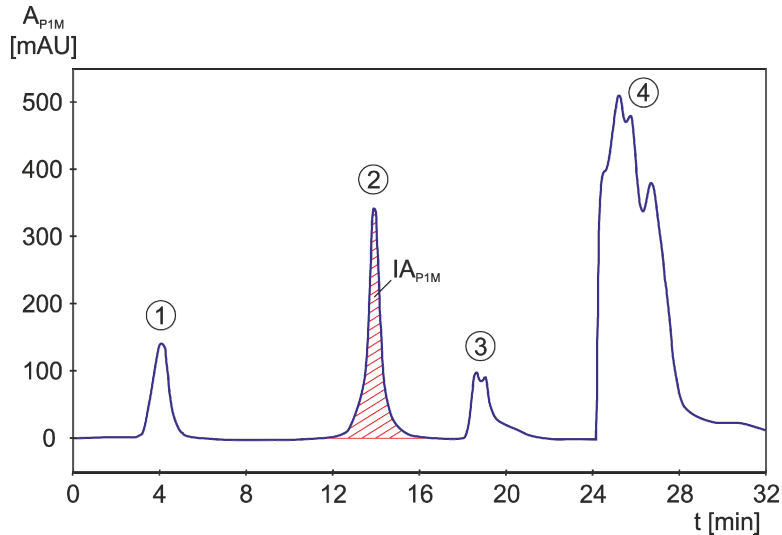


Abb. 4.16: Chromatogramm der Zielproduktmessung

Das aus dieser Methode resultierende Chromatogramm ist in Abb. 4.16 gezeigt. Es sind vier Peaks zu erkennen, die aufgrund der folgenden Ereignisse entstehen: Durchlauf ungebundener Proteine (1), Zielproduktelution (2), Elution von Fremdproteinen (3), Regeneration der Entsalzungssäule (4). Über die Integration des Zielproduktelutionspeaks wird IA_{P1M} bestimmt, das ein Maß für die Konzentration von CALB in der Probe darstellt.

4.3.3 Einbindung der Analysengeräte

Die beschriebenen Analysengeräte (Titratoren und HPLC) zur Bestimmung der Enzymaktivität und der Zielproduktkonzentration werden über je einen Rechner bedient und automatisiert und sind über Datenbanken an MFCS/win angebunden.

Die Software Tiamo zur Durchführung der Aktivitätsmessung exportiert das Analyseergebnis nach erfolgreicher Messung in eine Textdatei. Mit einem Visual Basic Programm, das im Hintergrund ausgeführt wird, erfolgt jede Minute eine Abfrage, ob ein neuer Eintrag in der Textdatei vorhanden ist. Bei einer positiven Abfrage wird das neue Ergebnis in eine SQL- (Structured Query Language) Datenbank mit ODBC-Schnittstelle (open database connectivity) geschrieben.

Die Software EZChrom Elite der HPLC speichert das Ergebnis der Chromatographie ebenfalls in eine Textdatei und startet zusätzlich ein Visual Basic Programm am Ende der Analyse. Dieses schreibt das Ergebnis auch in eine SQL-Datenbank mit ODBC-Schnittstelle.

Die beiden SQL-Datenbanken des Titrators und der HPLC sind zum Lesen jeweils über ein Netzlaufwerk für den MFCS/win Rechner freigegeben. Auf diesem wird pro Analysengerät ein Treiber gestartet, der neue Ergebnisse aus der jeweiligen SQL-Datenbank auf eine zuvor definierte Prozessvariable schreibt. Die Analyseergebnisse der atline Messungen werden somit direkt nach deren Generierung zusammen mit den Prozessdaten von MFCS/win gespeichert.

4.4 Offline-Analytik

Die Qualität sowie Quantität des Zielproduktes CALB ist während des Prozesses über die Entnahme einer Probe aus dem Bioreaktor zu überprüfen. Dies geschieht offline durch die Messung der Enzymaktivität sowie der Proteinkonzentration. Des Weiteren wird die Zelldichte bestimmt, um das Wachstum der Kultur zu beobachten sowie um Bilanzierungen aufstellen zu können. Zusätzlich wird die Substratkonzentration (Glycerol) offline bestimmt.

Bei einer Probenahme werden circa zehn Milliliter Kulturbrühe über das Probenahmeventil aus dem Reaktor entnommen. Das Ventil wird im Anschluss mit Kondensat aus der Dampfleitung gespült und fünf Minuten mit Dampf sterilisiert. Damit steht es einer nachfolgenden Probenahme wieder keimfrei zur Verfügung.

Je ein Milliliter Kulturbrühe wird in zwei 1.5 ml Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Diese sind zuvor bei 80°C getrocknet und gewogen worden. Die Gefäße werden bei 5000 rpm und 4°C für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird auf zwei weitere 1.5 ml Gefäße verteilt und bei -20°C eingefroren. Dieser steht somit für eine spätere Offline-Analytik zur Bestimmung der Enzymaktivität, der Proteinkonzentration sowie der Substratkonzentration zur Verfügung.

Die beiden Gefäße mit dem zurückgebliebenen Pellet werden gewogen. Die Differenz zwischen dem Leergewicht und dem Gewicht mit dem Pellet ergibt die Biofeuchtmasse BFM. Die Reaktionsgefäße werden anschließend bei 80°C für zwei Tag getrocknet und erneut gewogen. Diese Gewichtsdiﬀerenz entspricht der Biotrockenmasse BTM, aus der die Zelldichte c_{XLi} berechnet wird.

Die Bestimmung der Enzymaktivität beruht auf der in Abb. 4.17 gezeigten Hydrolyse des Substrates para-Nitrophenylacetat (pNPA) zu para-Nitrophenol (pNP).

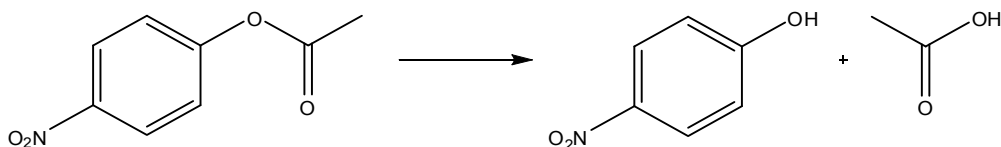


Abb. 4.17: Reaktionsschema der Hydrolyse von pNPA zu pNP und Essigsäure

Im protonierten Zustand ist pNP farblos und wird in wässriger alkalischer Umgebung gelb. Ist die Hydroxylgruppe von pNP als Acetatester gebunden besteht keine Möglichkeit der

Protonierung und das Molekül ist farblos. Aufgrund der Hydrolyse von pNPA zu pNP und Essigsäure durch die Lipase erfolgt ein Farbumschlag, der bei 405 nm gemessen wird.

Die Messung erfolgt auf einer 96-Well Mikrotiterplatte. Dazu wird die Probe zusammen mit Phosphatpuffer und dem Substrat pNPA in ein Well pipettiert und anschließend die Reaktion in einem Plattenlesegerät (Tecan Group Ltd., Schweiz) für fünfzehn Minuten verfolgt. Aus der Kinetik der Absorption wird mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von para-Nitrophenol die Aktivität des Enzyms bestimmt. Dabei ist eine Aktivitätsunit U definiert als die Umsetzung von 1 μmol pNPA pro Minute.

Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford Assay [Bradford, 1976] bestimmt. Dazu wird die Probe in einen Konzentrationsbereich zwischen 12.5 und 200 mg l^{-1} verdünnt. Die Messung erfolgt auf einer 96-Well Mikrotiterplatte zusammen mit einer Standardreihe von acht verschiedenen Konzentrationen. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue wird zu der Probe gegeben, welcher mit den darin enthaltenen Proteinen einen Komplex bildet. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 auf 595 nm. Die Absorption pro Well der Mikrotiterplatte wird mit einem Plattenlesegerät (Tecan Group Ltd., Schweiz) gemessen. Anhand der Standardreihe wird die Proteinkonzentration in den Proben aus den Absorptionwerten korreliert.

Die Bestimmung der Glycerolkonzentration erfolgt mit einer HPLC. Als Trennsäule wird eine RHM Monosaccharide H+ (8 %) (phenomenex, Aschaffenburg) und als Laufmittel eine 25 mM Schwefelsäure-Lösung verwendet. Das Trennprinzip der Säule ist ein Ionenausschluss. Das Säulenmaterial entspricht einem Ionenaustauscher, wodurch ionisierte Moleküle vom Säulenmaterial abgestoßen und nicht-ionisierte Moleküle kurzzeitig an dem Säulenmaterial zurückgehalten werden. Es tritt daher eine Verzögerung von organischen Substanzen beim Durchströmen der Säule auf. Hinter der Säule wird der Brechungsindex mit einem RI-Detektor (refraction index) bestimmt.

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze für Glycerol wird eine Zehnpunktkalibrierung durchgeführt. Dazu werden zehn Standards analysiert, die definierte Glycerolkonzentrationen in äquidistanten Abstufungen enthalten.

Wie in Abb. 4.18 dargestellt, können die Standards gegen die jeweiligen resultierenden Integrationsflächen aufgetragen werden. Besteht ein linearer Zusammenhang, so werden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze gemäß der Vorschriften laut DIN 32645 [DIN, 2008; Kolb et al., 1993] berechnet. Nach der Analyse einer Kultivierungsprobe mit der HPLC wird anhand der resultierenden Integrationsfläche über die Steigung a der linearen Trendlinie sowie deren Achsenabschnitt b die Glycerolkonzentration c_{SIM} berechnet.

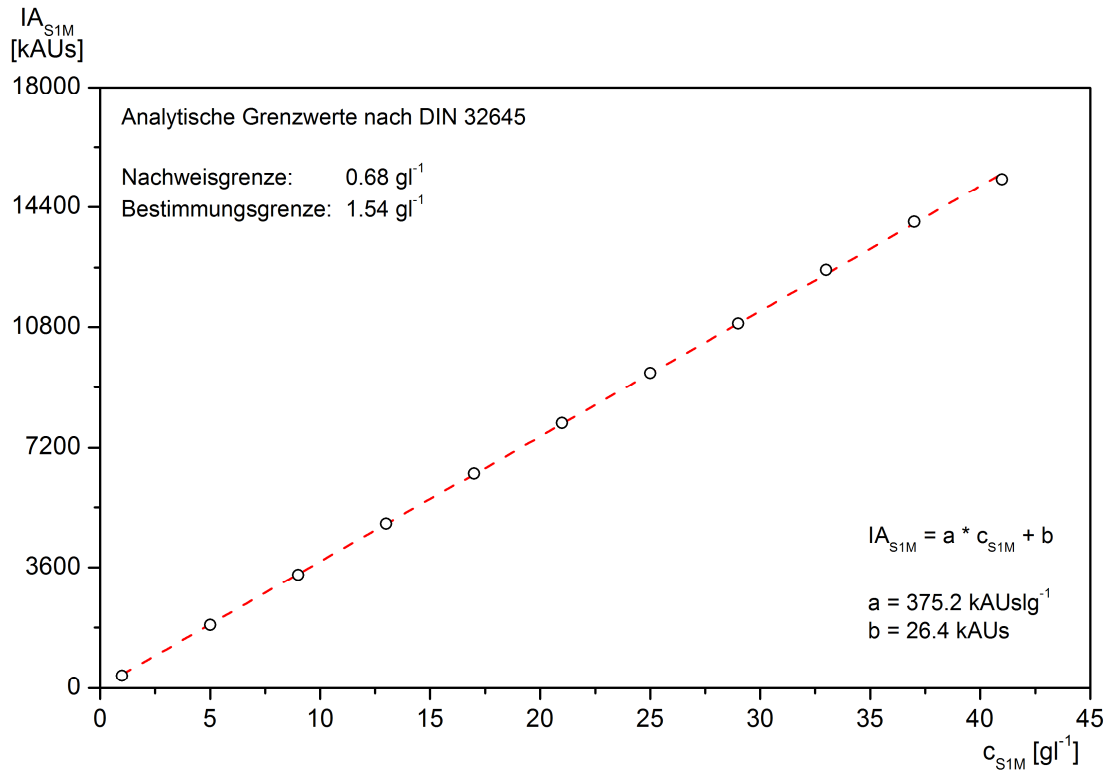


Abb. 4.18: Zehnpunktkalibrierung mit Grenzwerten nach DIN 32645 und linearer Trendlinie
 Bei dem in Abb. 4.18 gezeigten Beispiel ist die Definition der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wie folgt zu deuten. Liegt die ermittelte Glycerolkonzentration einer Probe unterhalb der Nachweisgrenze von 0.68 gl^{-1} , so gilt bei dieser Probe Glycerol als nicht nachgewiesen. Beträgt die Glycerolkonzentration mehr als 0.68 gl^{-1} so wird bei der Probe Glycerol als nachgewiesen aber nicht bestimmbar angegeben. Bei einer Konzentration oberhalb der Bestimmungsgrenze von 1.54 gl^{-1} wird der jeweilige Zahlenwert angegeben.

5 Entwicklung sequenzieller Prozessführungsstrategien

5.1 Stand der Wissenschaft

Wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, soll hinsichtlich einer hohen Produktivität eine Prozessführungsstrategie basierend auf zwei Bioreaktoren entwickelt werden. Dazu gibt es bereits verschiedene Ansätze, von denen einige nachfolgend erläutert werden.

Für die Umwandlung von Biomasse zu Wasserstoff hat Modigell [Modigell et al., 2007] ein zweistufiges Verfahren entwickelt. Bei diesem wird Biomasse in einer ersten Stufe mit Hilfe von Mikroorganismen in einer thermophilen Fermentation zu Wasserstoff und organischen Säuren zersetzt. In einer zweiten Stufe werden die entstandenen Säuren mit anderen Mikroorganismen über eine Photofermentation weiter oxidiert, sodass letztendlich nur Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid übrig bleiben. Das Prinzip dieses zweistufigen Prozesses basiert demnach auf dem Einsatz von unterschiedlichen Mikroorganismen zur Erhöhung der Ausbeute. Eine räumliche Trennung aufgrund von verschiedenen Kultivierungsbedingungen ist dazu notwendig.

Bei der Arbeit mit nur einem Organismus kann ebenfalls eine Ertragssteigerung erreicht werden. So entwickelte Anastassiadis [Anastassiadis et al., 2006] einen zweistufigen Prozess zur Herstellung von Gluconsäure mit *Aureobasidium pullulans*. Die Produktivität von *A. pullulans* ist abhängig von der Produktkonzentration im Medium. Durch die Verwendung von zwei Reaktoren konnte für eine niedrige Gluconsäurekonzentration im ersten Reaktor sowie für eine hohe Konzentration im zweiten Reaktor jeweils optimale Kultivierungsbedingungen eingestellt werden.

Zur Produktion von L-Isoleucin mit *Corynebacterium glutamicum* entwickelte Eiden [Eiden et al., 1993] ein kontinuierliches zweistufiges Produktionsverfahren, bei dem im ersten Bioreaktor eine turbidostatische und im zweiten Reaktor eine chemostatische Prozessführung durchgeführt wurde. Der Hintergrund war, dass unter Produktionsbedingungen eine Selektion von Rückmutanten eintritt, die es zu vermeiden galt. Mit der zweistufigen Prozessführung konnten somit dem Produktionsreaktor kontinuierlich frische Zellen zugeführt werden, während im ersten Reaktor kontinuierlich neue Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen erzeugt wurden.

Einen ähnlichen Ansatz verfolgt Su [Su et al., 2011], der zur Herstellung von Lipiden die Mikroalge *Nannochloropsis oculata* kultiviert. Su verwendet allerdings im Gegensatz zu Eiden keine kontinuierliche, sondern eine sequenzielle Prozessführung. Dabei wird zunächst in einem Bioreaktor unter guten Wachstumsbedingungen Biomasse erzeugt und diese anschließend in einen zweiten Reaktor transferiert. Unter wachstumshemmenden Umgebungsbedingungen wird dort die Produktion der Lipide induziert. Mit der zweistufigen Prozessführung konnte Su die Produktivität um das 2.8-fache steigern.

Den gleichen prozesstechnischen Ansatz hatte einige Jahre zuvor bereits Kreis [Kreis et al., 1990] beschrieben, der mit zwei Blasensäulenreaktoren das Therapeutikum Deacetyl-lanatoside C mit Pflanzenzellen der *Digitalis lanata* (Wolliger Fingerhut) herstellte. Er nutzte ebenfalls einen Reaktor zur Zellanzucht und einen weiteren zur Produktion. Kreis entwickelte zudem ein sequenziell/paralleles Verfahren, indem er nach einem Zelltransfer einen geringen Anteil an Zellen im ersten Reaktor verbleiben ließ und diese direkt als neues Inokulum nutzte. So konnten die Prozesse in den beiden Reaktoren parallel stattfinden.

Ein weiteres Beispiel für einen sequenziellen/parallelen Prozess gibt Chang [Chang et al., 1998]. Er setzt zur Produktion einer α -Amylase die Hefe *Yarrowia lipolytica* ein. Dazu entwickelte er einen zweistufigen Prozess, bei dem in beiden Reaktoren ein Fed-Batch über eine exponentiell ansteigende Medienzugabe durchgeführt wurde. Die Substratkonzentration im Medium wurde ausgelegt, um eine konstante Zelldichte zu erreichen, d. h. die Verdünnungsrate durch das Medium war genauso groß wie die Wachstumsrate der Zellen. Mit dieser Prozessführung konnte Chang schließlich die volumetrische Produktivität verdoppeln.

Ausgehend von diesen Ansätzen zur Auslegung eines zweistufigen Prozesses wurde für die Herstellung von CALB mit *Pichia pastoris* eine geeignete Prozessführungsstrategie entwickelt. Die Ziele der Prozessführung lagen bei einer Steigerung der Produktivität, bei dem Erreichen einer hohen Reproduzierbarkeit und zugleich bei der Entwicklung eines einfachen Kultivierungskonzeptes, um die Industriekompatibilität zu gewährleisten.

Es sollte eine sequenziell/parallele Strategie verfolgt werden (vgl. Kreis und Chang), die gemäß des Hostsystems *Pichia pastoris* aus einer Zellanzucht mit dem Substrat Glycerol und einer Produktionsphase mit dem Substrat Methanol besteht. Verschiedene Möglichkeiten zur Umsetzung werden im Nachfolgenden erläutert und diskutiert.

5.2 Betrachtung der zweiphasigen Kultivierungsstrategie

Zunächst wird eine Kultivierung mit *Pichia pastoris* betrachtet, die im Gegensatz zu der in Kapitel 3.3 vorgestellten Verfahrensweise nur zwei Phasen enthält, eine Batch und eine Induktionsphase. Die in der Literatur oft beschriebene Glycerol Fed-Batch-Phase [Cregg, 2007] wird nicht näher betrachtet, da hinsichtlich einer industriellen Anwendung eine einfache Prozessführung entwickelt werden sollte.

Die zweiphasige Kultivierung ist in Abb. 5.1 gezeigt. Zur Generierung von Zellmasse erfolgt eine unlimitierte Wachstumsphase (batch) auf Glycerol. Anschließend wird ein Methanol Fed-Batch (ab $t = 14.5$ h) zur Proteinexpression durchgeführt. Die Fed-Batch Phase kann allerdings in zwei Abschnitte geteilt werden, in eine Induktion (induction) und eine Produktion (production).

Während der Induktion wird der Metabolismus von *Pichia pastoris* auf die Verstoffwechslung des neuen Substrates Methanol umgestellt. Dies ist am fehlenden Wachstum der Zellen sowie an dem Abfall der Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} zu erkennen. In der Produktion erhöht

sich schließlich die Zelldichte c_{XL} sowie die Sauerstoffaufnahme rate und die Gesamtprotein-konzentration c_{PtotM} . Diese Kultivierung kann demnach in zwei Phasen (Batch und Fed-Batch) oder in drei Abschnitte (Batch, Induktion, Produktion) eingeteilt werden.

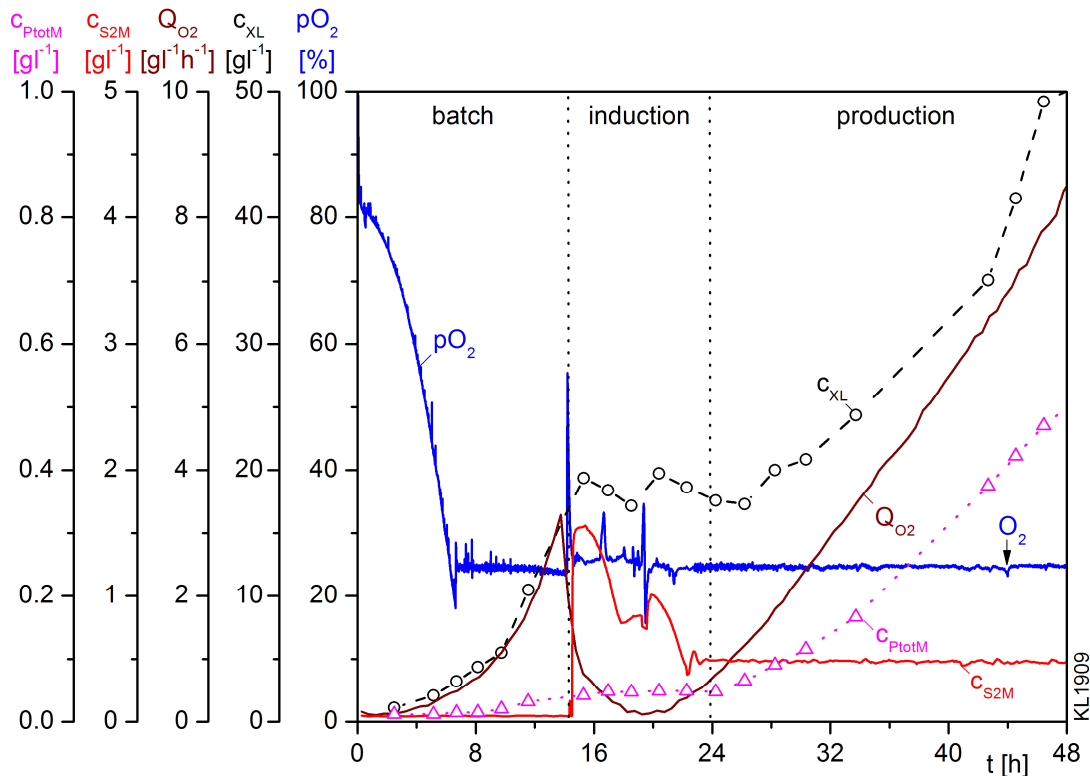


Abb. 5.1: Zweiphasige Kultivierung mit Glycerol Batch und Methanol Fed-Batch

Nach 44 h war bei dieser Kultivierung die Zugabe von reinem Sauerstoff zur Begasung notwendig, um den pO_2 weiterhin regeln zu können, da die Rührerdrehzahl ihren Maximalwert erreicht hatte. Eine Verlängerung des Prozesses hätte demnach ein Kostenzuwachs in Form von reinem Sauerstoff bedeutet.

Aufgrund der industriellen Ausrichtung des zu entwickelnden Prozesses sollte auf eine Zugabe von reinem Sauerstoff aufgrund von ökonomischen und sicherheitsrelevanten Aspekten abgesehen werden. Die Kultivierungsdauer wurde schließlich auf 48 h festgelegt, um einen bedienerfreundlichen Prozess zu erhalten. Eine eventuelle Sauerstofflimitierung in den letzten vier Stunden des Prozesses durch den ausschließlichen Einsatz von Luft zur Begasung wurde akzeptiert. Die Limitierung der Kultivierungsdauer geht allerdings mit einer Begrenzung der Produktausbeute einher, da besonders bei hohen Zelldichten, also gegen Ende der Kultivierung, eine hohe Produktivität erreicht wird.

In Hinblick auf eine Steigerung der Produktivität des Prozesses sollte die Produktion von CALB auf eine sequenzielle Prozessführung erweitert werden. Eine Möglichkeit der Umsetzung einer solchen Strategie ist die wiederholte Teilentnahme von Kulturbrühe aus dem Reaktor, z. B. in einem 24 h Intervall, mit einer nachfolgenden Verdünnung der zurückgebliebenen Zellen mit frischem Medium [Pfeffer et al., 2006; Loegering et al., 2010; Martens et al., 2011]. Somit können mehrere Teilkultivierungen nacheinander durchgeführt werden, die im Nachfolgenden als Zyklen bezeichnet werden.

Der Vorteil einer derartigen Strategie ist ein Zeitgewinn sowie eine Kostenersparnis durch das Wegfallen der Reaktorreinigung und -sterilisation zwischen den Experimenten sowie der nur einmalig durchzuführenden Inokulation. Nachteilig an einer sequenziellen Strategie ist die Übernahme der Historie des Prozesses in jeden neuen Zyklus. Es kann zu einer Akkumulation von wachstums- oder expressionsinhibierender Metabolite im Medium kommen, die den Prozess langfristig schädigen. Besonders bei Optimierungsexperimenten, in denen pro Zyklus Prozessparameter variiert werden, können Bedingungen vorherrschen, die die Zellen nachhaltig schädigen oder die Sekretion von Inhibitoren fördern. Eine derartige Beeinträchtigung kann das Ergebnis des Prozesses verfälschen.

Um dies zu vermeiden kann zu Beginn eines Zyklus die verbliebene Kulturbrühe stark verdünnt und somit die Zelldichte stark verringert werden. Die Zyklusdauer wird damit allerdings verlängert, wenn eine zuvor definierte Zelldichte am Ende eines Zyklus erreicht werden soll. Eine Möglichkeit, die Vorteile zu nutzen und die Nachteile zu umgehen ist die Weiterentwicklung des sequenziellen Prozesses zu einem sequenziell/parallelen Prozess, bei dem zwei Bioreaktoren eingesetzt werden. Die Strategie, einen Zyklus in zwei Stufen zu teilen und diese parallel durchzuführen, wird in Nachfolgenden näher erläutert.

5.3 Der zweistufige Kultivierungsprozess

5.3.1 Die sequenziell/parallele Produktionsidee

Anhand von Abb. 5.2 soll das Konzept einer sequenziell/parallelen Prozessführung erläutert werden. Es sind zwei Bioreaktoren gezeigt, die verfahrenstechnisch über eine Rohrleitung miteinander verbunden sind. Die detaillierte Ausführung der Verbindung beider Reaktoren wurde bereits in Kapitel 4.1 erläutert.

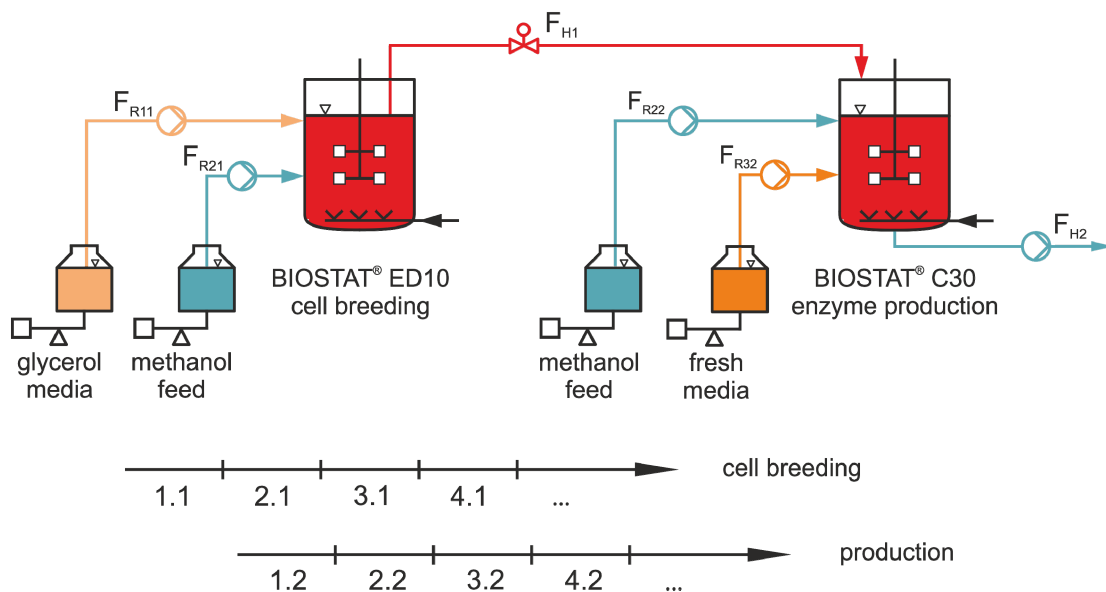


Abb. 5.2: Konzept der zweistufigen sequenziell/parallelen Produktion

Der Gesamtprozess zur Herstellung von CALB mit einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden wird in zwei jeweils 24 Stunden dauernde Stufen geteilt. In der ersten Stufe wird das Ziel der Biomassegenerierung (Zellanzucht, engl. cell breeding) im ersten Bioreaktor verfolgt. Anschließend wird ein Großteil der Zellen in den zweiten Reaktor transferiert, in welchem durch die Induktion mit Methanol die Zielproduktexpression (Produktion, engl. production) durchgeführt wird. Nach erfolgtem Transfer werden die im ersten Reaktor verbliebenen Zellen mit frischem Medium verdünnt und es beginnt ein neuer Zellanzuchtzyklus.

Die beiden Teilprozesse Zellanzucht und Produktion finden daher parallel statt. Der Gesamtprozess wiederum setzt sich aus den Teilprozessen zusammen, die nacheinander durchgeführt werden. Somit kann die Prozessführungsstrategie als sequenziell/parallel bezeichnet werden.

Die zeitliche Abfolge der Teilprozesse ist in Abb. 5.2 anhand der unten abgebildeten Pfeile verdeutlicht. Zunächst wird ein Zellanzuchtprozess (Zyklus 1.1) durchgeführt, der nach der Transferierung der Kulturbrühe im Produktionsreaktor (Zyklus 1.2) fortgeführt wird. Gleichzeitig beginnt eine neue Zellanzucht (Zyklus 2.1) im ersten Reaktor.

Die Prozessführungsstrategie zur Enzymproduktion ist durch das Hostsystem *Pichia pastoris* und der erfolgten gentechnischen Manipulation vorgegeben. Durch die Anwesenheit von Methanol im Produktionsreaktor wird über den AOX Promotor die Zielproduktexpression induziert. Für den Zellanzuchtprozess wiederum gibt es mehrere Möglichkeiten der Auslegung, um das Ziel der Biomassegenerierung zu erreichen.

5.3.2 Konzepte der Zellanzucht

Generell gibt es zwei Grundarten, den Zellanzuchtprozess durchzuführen. Es kann zum einen ein unlimitiertes Wachstum durchgeführt werden, für das zu Beginn des Prozesses eine definierte Substratkonzentration im Medium vorgelegt wird und keine weitere Substratzugabe stattfindet. Dies wird als Batch-Prozess bezeichnet. Zum anderen ist ohne die Vorlage von Substrat im Medium eine kontinuierliche Substratzugabe während des Prozesses möglich, was als Fed-Batch bezeichnet wird.

Der reine Batch-Prozess wäre aus prozesstechnischer Sicht am einfachsten zu realisieren. Mit der Vorgabe eines 24-stündigen Prozesses und einer Endzelldichte von 30 g l^{-1} ergibt sich rein rechnerisch eine einzustellende Anfangszelldichte von circa 0.25 g l^{-1} . Um eine so niedrige Anfangszelldichte zu realisieren, dürften zur Initialisierung eines neuen Zyklus weniger als 100 ml Kulturbrühe im Reaktor verbleiben. Dies ist verfahrenstechnisch nicht reproduzierbar zu realisieren.

Bei einem Fed-Batch Prozess ändert sich das Volumen während der Kultivierung aufgrund der Substratzugabe. Bei der Zellanzucht mit *Pichia pastoris* besteht diese aus einer konzentrierten Glycerollösung. Es besteht allerdings die Option die Glycerolkonzentration der Vorlage derart auszulegen, dass die Verdünnung durch die Substratzugabe die Zunahme der Zelldichte ausgleicht. In diesem Fall würde die Zellmasse während der Zellanzucht zunehmen, die Zell-

dichte wiederum konstant bleiben. Dieser Fall wird als turbidostatischer Fed-Batch bezeichnet.

Der turbidostatische Ansatz beruht auf einem gesteuerten Glycerol Fed-Batch, der bereits in Kapitel 3.3 erläutert wurde. Damit wird unter substratlimitierten Bedingungen bei einer konstanten spezifischen Wachstumsrate μ_{1w1} die Zellmasse vergrößert.

Die Umsetzung eines substratlimitierten Glycerol Fed-Batches zur Zellanzucht bietet den Vorteil einer schnellen Adaption der Zellen auf die Verstoffwechselung von Methanol. Dies beruht auf der Dereprimierung des AOX Promotors aufgrund der niedrigen Glycerolkonzentration. Als weiterer Vorteil ist die Verwendung von nur einem Substrat (Glycerol) zu sehen.

Die Zelldichteänderung,

$$\dot{c}_{XL1}(t_j) = -\frac{F_{R11}(t_j)}{V_{L1}(t_j)} \cdot c_{XL1}(t_j) + \mu_{1w1}(t_j) \cdot c_{XL1}(t_j), \quad (5.1)$$

beruht nur auf der Verdünnung durch die Substratzugabe (F_{R11}) und dem Wachstum der Zellen mit μ_{1w1} , wenn eine Volumenzunahme durch die Titration mit Lauge oder eine Antischaummittelzugabe vernachlässigt wird. Bei dem turbidostatischen Fed-Batch ist die Zelldichteänderung gleich null, sodass Gl.(5.1) zu

$$\frac{F_{R11}(t_j)}{V_{L1}(t_j)} = \mu_{1w1}(t_j), \quad (5.2)$$

vereinfacht werden kann.

Unter der Annahme eines exponentiellen Wachstums,

$$c_{XL1}(t_j) = c_{XL1}(t_{j0}) \cdot e^{\mu_{1w1}(t_j - t_{j0})}, \quad (5.3)$$

und aufgrund einer konstanten Zelldichte wird die einzustellende spezifische Wachstumsrate μ_{1w1} ,

$$\mu_{1w1} = \frac{\ln\left(\frac{V_{L1}(t_{jend})}{V_{L1}(t_{j0})}\right)}{t_{jend} - t_{j0}}, \quad (5.4)$$

anhand der gewünschten Volumina zu Beginn und am Ende des Zellanzuchtprozesses definiert.

Die Beziehung zwischen Wachstumsrate und Substratzugabe aus Gl.(5.2) zusammen mit einem definiertem μ_{1w1} soll genutzt werden, um die erforderliche Substratkonzentration der Vorlage c_{S1R11} zu berechnen.

Dazu wird die Bilanzierung der Glycerolkonzentration,

$$\begin{aligned} \dot{c}_{\text{SIMI}}(t_j) = & \frac{F_{\text{R11}}(t_j) \cdot c_{\text{SIR11}}}{V_{\text{MI}}(t_j)} - \frac{\rho_Z \cdot F_{\text{inI}}(t_j) - \alpha_{\text{Z/X}} \cdot q_{\text{X/X}}(t_j) \cdot V_{\text{LI}}(t_j) \cdot c_{\text{XL1}}(t_j)}{\rho_Z \cdot V_{\text{MI}}(t_j)} \cdot c_{\text{SIMI}}(t_j) \\ & - q_{\text{SI/X}}(t_j) \cdot \frac{V_{\text{LI}}(t_j) \cdot c_{\text{XL1}}(t_j)}{V_{\text{MI}}(t_j)}, \end{aligned} \quad (5.5)$$

betrachtet [Luttmann, 2002]. Eine Veränderung der Glycerolkonzentration wird durch die Zugabe von Glycerol aus der Vorlage, durch eine Verdünnung durch zugeführtes Volumen sowie durch die Aufnahme durch die Zellen beeinflusst. Die Glycerolkonzentration im Medium c_{SIMI} ist gleich null zu setzen, da der gesteuerte Fed-Batch bei einer Substratlimitierung durchgeführt wird. Die Änderung der Glycerolkonzentration kann somit ebenfalls gleich null gesetzt werden. Dadurch vereinfacht sich Gl.(5.5) zu

$$\frac{F_{\text{R11}}(t_j) \cdot c_{\text{SIR11}}}{V_{\text{MI}}(t_j)} = q_{\text{SI/X}}(t_j) \cdot \frac{V_{\text{LI}}(t_j) \cdot c_{\text{XL1}}(t_j)}{V_{\text{MI}}(t_j)}. \quad (5.6)$$

Durch die Einbeziehung von Gl.(5.2) kann eine Formel zur Berechnung der Vorlagenkonzentration c_{SIR11} ,

$$c_{\text{SIR11}} = \frac{q_{\text{SI/X}}(t_j)}{\mu_{1\text{wI}}(t_j)} \cdot \frac{V_{\text{LI}}(t_j) \cdot c_{\text{XL1}}(t_j)}{V_{\text{MI}}(t_j)}, \quad (5.7)$$

gefunden werden.

Mit der Festlegung auf eine gewünschte Zelldichte c_{XLwI} und einer spezifischen Wachstumsrate $\mu_{1\text{wI}}$ kann Gl.(5.7) unter Verwendung der allgemeinen Definition des Medienvolumens V_{M} (siehe Kapitel 7.2),

$$V_{\text{M}}(t) = V_{\text{L}}(t) \cdot \left[\frac{\rho_Z - \alpha_{\text{Z/X}} \cdot c_{\text{XL}}(t)}{\rho_Z} \right], \quad (5.8)$$

und der Glycerolaufnahmerate $q_{\text{SI/X}}$,

$$q_{\text{SI/X}} = \frac{\mu_{1\text{wI}}}{y_{\text{X/SIw}}}, \quad (5.9)$$

weiter zu

$$c_{\text{SIR11}} = \frac{c_{\text{XLwI}}}{y_{\text{X/SIw}} \cdot \left[\frac{\rho_Z - \alpha_{\text{Z/X}} \cdot c_{\text{XLwI}}}{\rho_Z} \right]}, \quad (5.10)$$

vereinfacht werden. Der μ -abhängige Ausbeutekoeffizient $y_{\text{X/SIw}}$ ergibt sich anhand Gl.(3.3).

In Abb. 5.3 sind fünf Zyklen eines Zellanzuchtprozesses unter der Anwendung des turbidostatischen Fed-Batch Konzeptes gezeigt. Zu Beginn der Kultivierung fand ein circa 18-stündiger Glycerol-Batch statt, um eine Zelldichte nahe dem gewünschten Sollwert von 35 gl^{-1} zu erreichen.

Die Zykluslänge wurde auf 23 h festgesetzt, da circa eine Stunde für den Transfer der Kulturbrühe und die Sterilisation der Transferleitung eingeplant wurde. Am Ende jedes Zyklus sollten acht Liter Kulturbrühe zum Transfer bereitstehen. Das Mindestvolumen des Zellan-
zuchtreaktors betrug 2.7 l. Anhand von Gl.(5.4) war demnach eine spezifische Wachstumsrate von 0.06 h^{-1} einzustellen, was einem μ -abhängigen Ausbeutekoeffizienten von 0.66 gg^{-1} entspricht. Die laut Gl.(5.10) für das turbidostatische Konzept in der Vorlage einzustellende Glycerolkonzentration betrug 60 gl^{-1} .

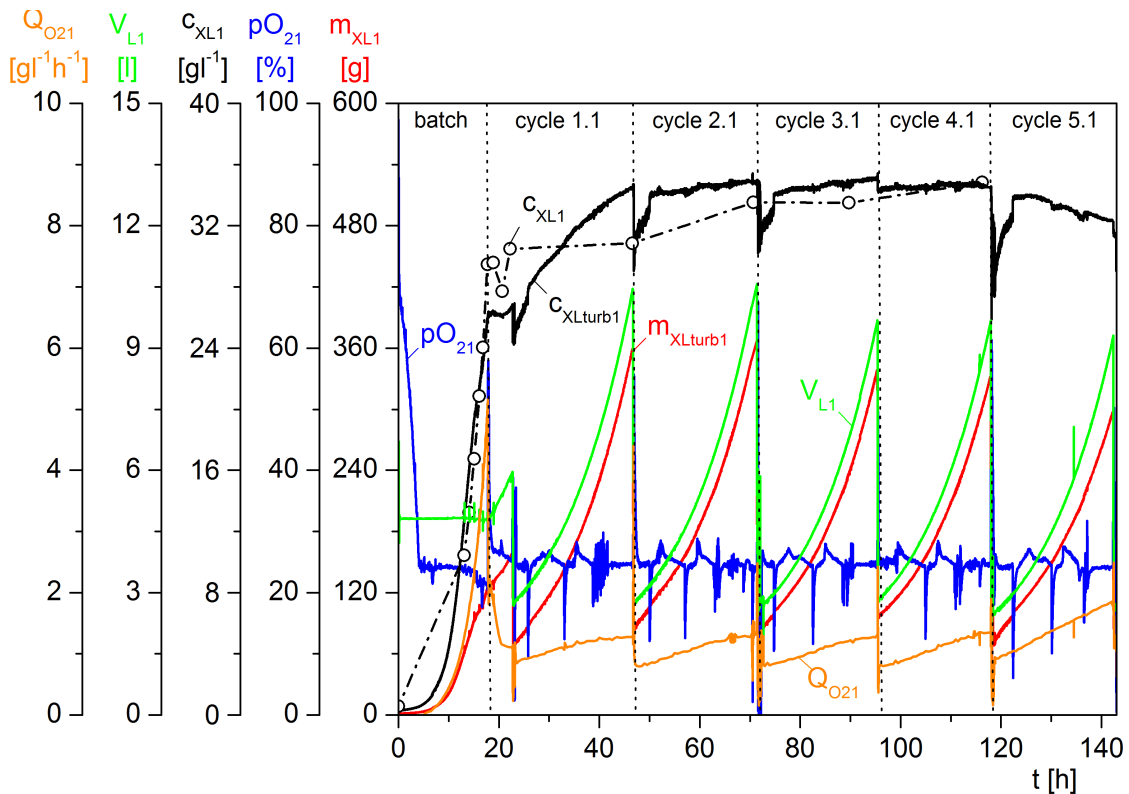


Abb. 5.3: Verlauf von fünf Zyklen eines Zellan-
zuchtprozesses nach dem turbidostatischen
Fed-Batch Konzept

In Abb. 5.3 ist neben der offline bestimmten Zelldichte c_{XL1} auch die aus dem Trübungssignal berechnete Zelldichte $c_{XLturb1}$ gezeigt (siehe Kapitel 7.1.1). Während der Batch Phase wurde nur eine Zelldichte von 30 gl^{-1} erreicht. Das hatte zur Folge, dass die angestrebte Zelldichte von 35 gl^{-1} erst während des zweiten Zyklus erreicht wurde.

Im fünften Zyklus sind ein Abfall in der Trübungsmessung, sowie ein erhöhter Anstieg der Sauerstoffeintragsrate Q_{O21} zu erkennen. Der Abfall des Trübungssignals war auf eine morphologische Veränderung der *Pichia pastoris* Zellen zurückzuführen. Es ist bekannt, dass viele Pilze zwischen einzelligem Wachstum und der Ausbildung mehrzelliger Filamente wechseln können. Dieses Phänomen wird als Dimorphismus bezeichnet. Einzellige und filamentöse Wachstumsformen bilden eigene Zelltypen mit charakteristischen Eigenschaften aus, deren Umdifferenzierung durch innere und äußere Signale gesteuert wird [Mösch, 2002].

Durch eine erneute Anzucht der morphologisch veränderten Zellen im Schüttelkolben, konnte eine Rückkehr zur kugeligen Zellform beobachtet werden. Diese Erkenntnisse lassen darauf

schließen, dass die Zellveränderung wahrscheinlich aufgrund der andauernden Substratlimitierung ausgelöst wurde.

Die Prozessstrategie des turbidostatischen Fed-Batches zeigte, dass über einen Zeitraum von 140 h keine gleichbleibende Qualität der Zellen erreicht werden konnte. Für das Konzept der sequenziell/parallelen Produktion müssen die einzelnen Zellanzuchtzyklen aber von reproduzierbar guter Qualität sein, um den Prozess im Produktionsreaktor mit gleichbleibenden Anfangsbedingungen starten zu können. Die Strategie des turbidostatischen Fed-Batches konnte somit für weitere experimentelle Arbeiten ausgeschlossen werden.

Eine andere Möglichkeit den Zellanzuchtprozess auszulegen ist dessen Unterteilung in zwei Abschnitte, einer Zellmassegenerierung und einer Vorinduktion. Wie bereits bei der in Abb. 5.1 gezeigten Kultivierung ersichtlich war, folgt nach dem Wachstum auf Glycerol mit dem Beginn der Methanolzugabe eine Phase der metabolischen Anpassung, in der kein Zellwachstum stattfindet. Diese Phase der Vorinduktion kann in den ersten Reaktor verlagert werden, damit nach dem Transfer der Zellen in den Produktionsreaktor die Zielproduktexpression ohne Verzögerung beginnen kann.

Bei dieser Strategie wird die Dauer der Batch-Phase auf circa 12 h reduziert. Dies würde, ausgehend von einer gewünschten Zelldichte von 30 gl^{-1} am Ende des Zellanzuchtprozesses sowie unter der Annahme, dass das Zellwachstum während der Vorinduktion vernachlässigt werden kann, eine Anfangszelldichte von circa 2.7 gl^{-1} notwendig machen. Das zurückzuhaltende Volumen an Kulturbrühe beträgt damit circa 800 ml. Dies ist verfahrenstechnisch reproduzierbar realisierbar.

Ein Vorteil dieser Strategie ist, dass keine Glycerolvorlage benötigt wird, da das Substrat in dem Refreshmedium vorgelegt werden kann, das zu Beginn eines Zyklus in den Reaktor gegeben wird. Für die Induktionsphase wird reines, unverdünntes Methanol verwendet.

Die Zugabe von Methanol kann auf zwei Arten erfolgen. Es kann zum einen eine definierte Methanolkonzentration im Reaktor über die Variation des Substratvolumenstromes geregelt werden. Oder es kann zur Substratzugabe die Verwendung eines definierten Zufütterungsprofils gewählt werden.

Vorteil einer geregelten Methanolzugabe ist ein daraus resultierendes unlimitiertes Wachstum der Zellen. Zudem wird sichergestellt, dass die Methanolkonzentration im Reaktor keinen toxischen Level überschreitet. Nachteilig an dieser Strategie ist, dass die Methanolkonzentration im Medium gemessen und daher eine entsprechende Messtechnik angeschafft, gewartet und kalibriert werden muss. Zudem ist eine gleichbleibende Anfangszelldichte notwendig, da die metabolischen Bedingungen im Zellinneren am Ende des Zellanzuchtprozesses reproduzierbar sein sollen. Eine variable Anfangszelldichte würde die Länge der Batch-Phase beeinflussen und somit auch die Zeit der Induktionsphase, da der Gesamtprozess auf eine Dauer von 24 h festgelegt ist. Für eine gleichbleibende Anfangszelldichte in Kombination mit

einem unlimitierten Wachstum auf Methanol müsste verfahrenstechnisch eine Einflussnahme auf die Anfangszell-dichte realisiert werden.

Bei der Variante des gesteuerten Zufütterungsprofils ist keine Methanolf-messung erforderlich. Zudem wird in jedem Zyklus eine definierte und gleichbleibende Menge an Methanol in den Reaktor gegeben und damit abhängig von dem Methanolausbeutekoeffizienten eine definierte Menge an Zellen gebildet. Die Zelldichte am Ende eines Zyklus ist somit gleichbleibend. Eine konstante Anfangszelldichte kann daher mit einem konstanten Restvolumen an Kulturbrühe zu Beginn des Zyklus realisiert werden. Es besteht allerdings das Risiko, zeitweilig eine Substratlimitierung oder eine Überfütterung und eine damit verbundene Wachstumsinhibierung zu erzeugen.

Als Zellanzucht-konzept wurde schließlich die zweite Möglichkeit, das Methanol-Zufütterungsprofil gewählt, da dieses prozesstechnisch und verfahrenstechnisch einfacher und somit robuster zu realisieren ist, insbesondere durch die Verwendung eines konstanten Restvolumens an Kulturbrühe für einen neuen Zyklus.

In Abb. 5.4 sind drei Zyklen des Batch/Induktion Konzeptes für den Zellanzuchtprozess mit dem Methanol-Zufütterungsprofil gezeigt.

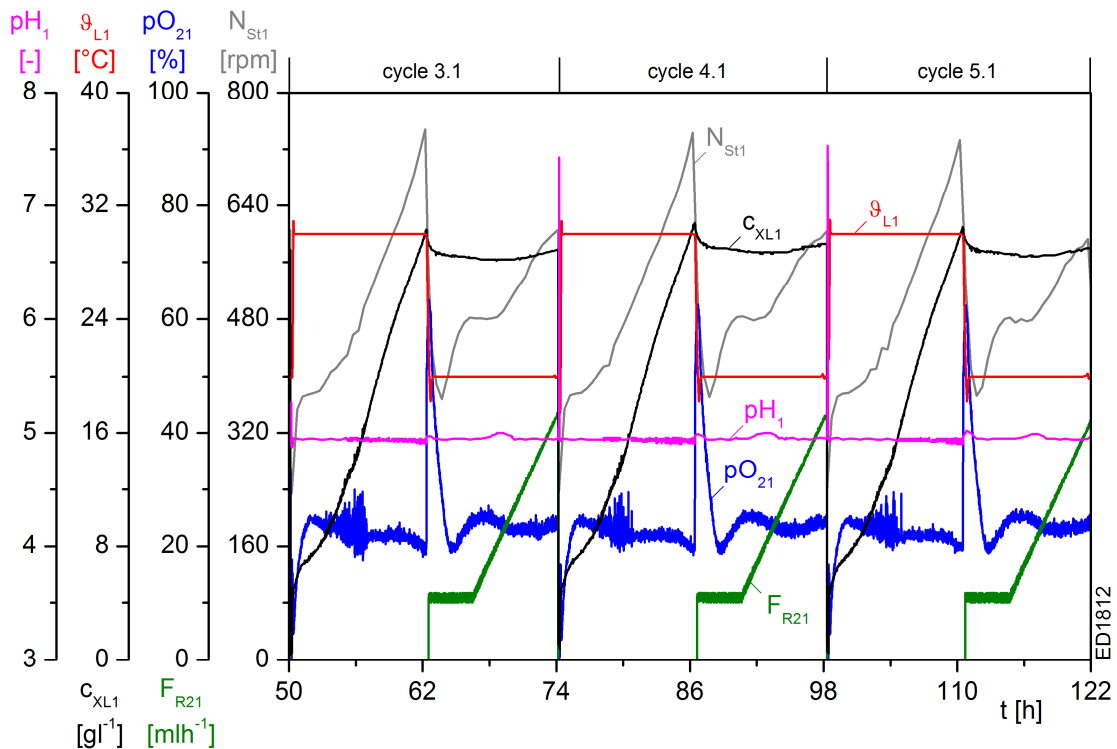


Abb. 5.4: Verlauf von drei Zyklen eines Zellanzuchtprozesses nach dem Batch/Induktion-Konzept

Die Batch-Phase beginnt mit einem Startvolumen von 9 l, nachdem 0.7 l Kulturbrühe vom vorherigen Zyklus im Reaktor verblieben sind. Während eines Zellanzuchtzyklus soll eine Zelldichte von 30 g l^{-1} erreicht werden. Da das Zellwachstum in der Induktionsphase vernachlässigt werden kann, musste eine vom Glycerolausbeutekoeffizienten $y_{X/S1}$ abhängige

Glycerolkonzentration im Refreshmedium vorgelegt werden. Die während der Batch-Phase erreichbare Zelldichte,

$$c_{\text{XLe}nd1} = c_{\text{XL}01} + y_{\text{X/S1}} \cdot c_{\text{S1M}01}, \quad (5.11)$$

ergibt sich aus der Glycerolkonzentration $c_{\text{S1M}01}$ sowie aus der Anfangszelldichte $c_{\text{XL}01}$,

$$c_{\text{XL}01}(t_j) = c_{\text{XLe}nd1}(t_{j-1}) \cdot \frac{V_{\text{Lrest}1}}{V_{\text{L}01}}, \quad (5.12)$$

die wiederum von der Endzelldichte des vorherigen Zyklus sowie dem Verdünnungsverhältnis abhängig ist. Da der Prozess ausgelegt wurde, dass 0.7 l Kulturbrühe im Reaktor verbleiben ($V_{\text{Lrest}1}$) und anschließend mit Refreshmedium auf 9 l aufgefüllt wird ($V_{\text{L}0}$), ergibt sich bei einer Endzelldichte von 30 gl^{-1} eine Startzelldichte von 2.3 gl^{-1} .

Um eine Zelldichte von 30 gl^{-1} zu erreichen, muss anhand Gl.(5.11) mit einem Glycerolau-beutekoeffizienten $y_{\text{X/S1}}$ von 0.69 gg^{-1} (ermittelt aus Vorversuchen, siehe [Cornelissen, 2004]) eine Glycerolkonzentration von 40.1 gl^{-1} zu Beginn eines Zellanzuchtzyklus vorliegen. Die in der Vorlage einzustellende Glycerolkonzentration $c_{\text{S1R}31}$ beträgt aufgrund der Verdünnung mit dem Restvolumen der Kulturbrühe 43.5 gl^{-1} .

Nach der circa 12-stündigen Batch-Phase, in der die Zellen exponentiell wachsen, folgt nach dem vollständigen Verbrauch des vorgelegten Glycerols die Induktionsphase. Das Ende der Batch-Phase wird dabei durch einen pO_2 Peak angezeigt. Daraufhin beginnt die Zugabe von Methanol ($\text{F}_{\text{R}21}$) anhand eines Zufütterungsprofils. Zunächst erfolgt ein konstanter Volumenstrom von 11 mlh^{-1} . Nach vier Stunden wird dieser linear von 11 mlh^{-1} auf 44 mlh^{-1} in einem Zeitraum von acht Stunden erhöht. Die Anwesenheit von Methanol im Medium mit der gleichzeitigen Abwesenheit von Glycerol induziert die Expression von Alkoholoxidase (AOX) und somit auch die des Zielproduktes CALB.

Zu Beginn der Induktionsphase wird die Temperatur $\vartheta_{\text{L}1}$ von 30°C auf 20°C verringert. Dies reduziert die Aktivität von Proteasen und trägt somit während des Methanol Fed-Batches zu einer Steigerung der Produktivität bei [Loegering et al., 2010]. Die Induktionsphase wird bis zum Erreichen einer Gesamtdauer des Zellanzuchtprozesses von 24 Stunden durchgeführt. Schließlich stehen 8.3 l mit einer Zelldichte von 30 gl^{-1} für den Transfer in den Produktionsreaktor zur Verfügung.

Der Transfer der Kulturbrühe verläuft über ein durch den Reaktordeckel eingelassenes Steigrohr, dessen Ende allerdings nicht bis zum Reaktorboden reicht. Die Länge des Steigrohres ist ausgelegt, dass nach der Entnahme des maximal möglichen Volumens an Kulturbrühe ein Restvolumen von 0.7 l im Reaktor verbleibt.

Eine Übersicht der zur Umsetzung des Batch/Induktion-Konzeptes notwendigen Automatisierung ist in Abb. 5.5 gezeigt.

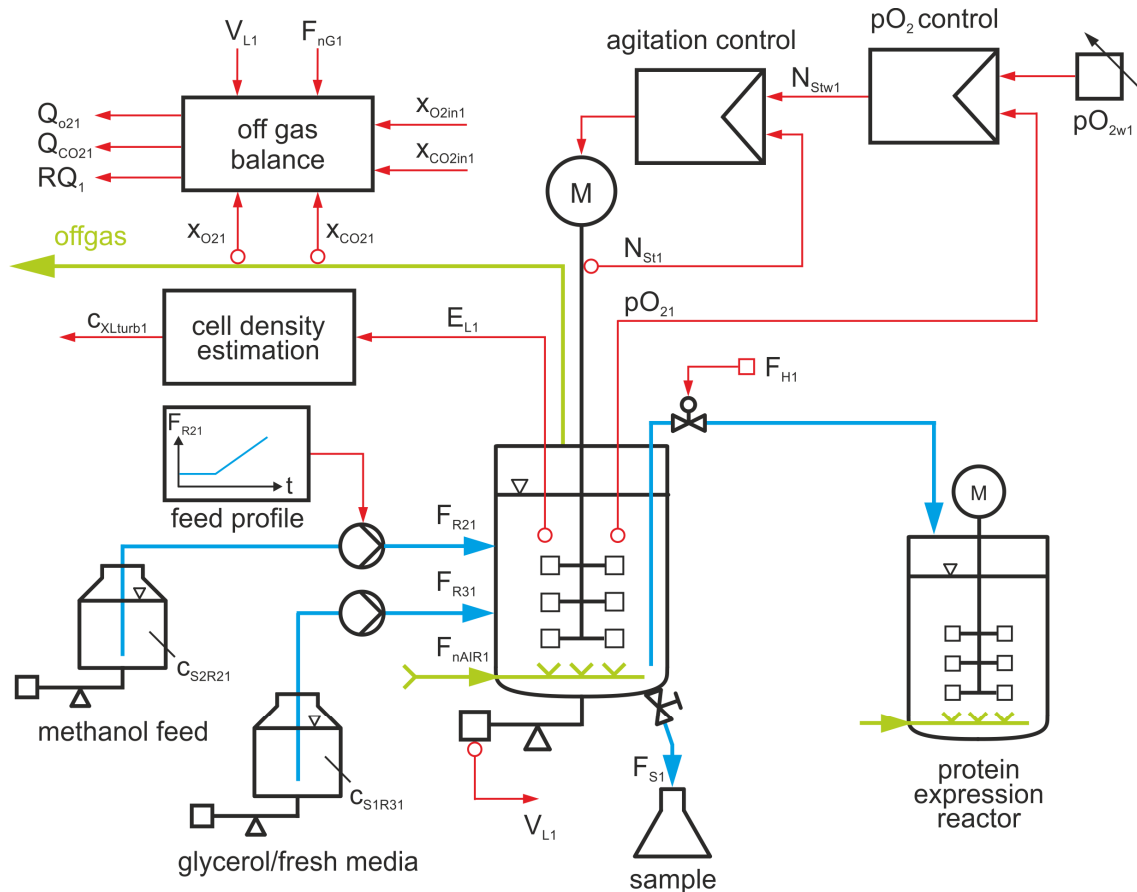


Abb. 5.5: Automatisierungsstruktur des Zellanztreaktors

Der Reaktor wird mit Luft begast (F_{nAIR1}) und aus zwei Vorlagen mit Medium versorgt. Eine Vorlage (R3) enthält frisches Medium mit Glycerol, die andere Vorlage (R2) enthält unverdünntes Methanol. Die Methanolzugabe erfolgt nach einem definierten Profil. Während des Zellanztprozesses wird die Trübung des Mediums gemessen (E_{L1}) und daraus eine Zelldichte korreliert (siehe Kapitel 7.1.1). Zudem wird der pO_{21} über die Veränderung der Rührerdrehzahl N_{St1} geregelt. Im Abgas werden die Stoffmengenanteile von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid gemessen und daraus eine Abgasbilanzierung erstellt (siehe Kapitel 7.1.2). Am Ende jedes Zellanztzyklus wird die Kulturbrühe in den Produktionsreaktor transferiert (F_{H1}).

Die Durchführung der Batch/Induktion-Strategie zur Zellanzt verlief über viele Zyklen reproduzierbar und damit erfolgreich. Eine gleichbleibende Zelldichte am Ende jedes Zyklus sowie eine gleichbleibende Dauer der beiden jeweiligen Phasen wurde beobachtet. Auch die Anforderung einer industriell möglichen und somit einfachen Prozessführung wurde erfüllt. Die Glycerolzugabe erfolgt einmalig pro Zyklus über das Refreshmedium und das Substrat Methanol kann unverdünnt anhand eines festen Profils in den Reaktor gegeben werden.

Somit konnte im Anschluss eine Auslegung des Produktionsprozesses erfolgen, um die zwei-stufige, sequentiell/parallele Produktionsidee umzusetzen.

5.3.3 Die sequenziell/parallele zweistufige Enzymproduktion

In der zweiten Stufe der sequenziellen Produktionsidee, dem Produktionsprozess, wurde ein geregelter Methanol Fed-Batch durchgeführt. Somit erfolgte ein unlimitiertes Wachstum auf Methanol, verbunden mit der Expression des Zielproduktes CALB.

Die Verläufe der beiden Stufen, die zusammen den Upstream bilden, sind in Abb. 5.6 gezeigt. Zunächst erfolgt der 24-stündige Zellanzuchtprozess, der in die Phasen Batch und Induktion geteilt ist. Daran ist der 24-stündige Produktionsprozess im zweiten Reaktor angeschlossen.

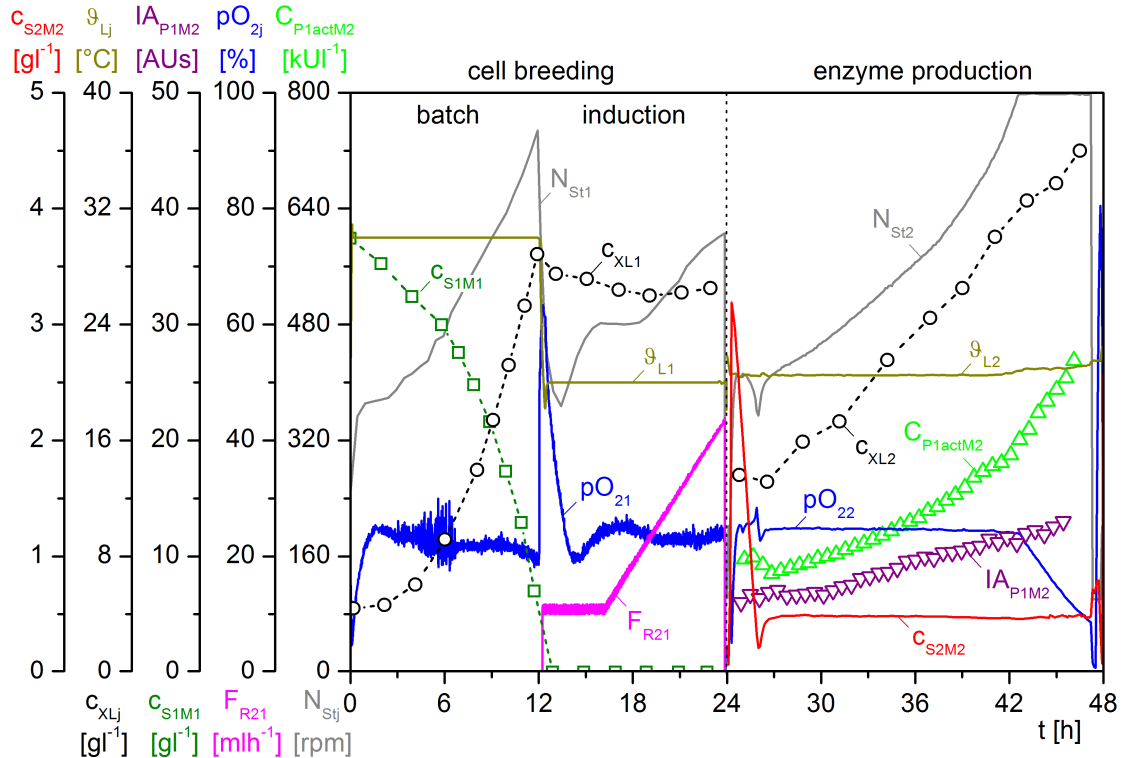


Abb. 5.6: Verlauf des zweistufigen Upstreams, bestehend aus dem Zellanzuchtprozess und dem Produktionsprozess

Bevor die Zellen aus dem Zellanzuchtreaktor in den Produktionsreaktor überführt werden, wird dort frisches Medium vorgelegt, welches allerdings keine Substrate enthält. Das Volumen an Medium sowie das zu transferierende Volumen an Kulturbrühe wird dahingehend angepasst, dass der Produktionsprozess immer mit einer Zelldichte von 15 gl^{-1} sowie einem Volumen von 15 l beginnt. Damit wird, wie anhand der Kultivierung aus Abb. 5.1 ersichtlich, gewährleistet, dass der pO_{22} über den Großteil der Kultivierung mit einer Veränderung der Rührerdrehzahl geregelt werden kann. Eine Erhöhung der Startzelldichte würde entweder die Beimengung an reinem Sauerstoff notwendig machen oder bei dem Verzicht auf eine Sauerstoffzugabe eine Sauerstofflimitierung zur Folge haben.

Die Methankonzentration c_{S2M2} und die Temperatur θ_{L2} sind während des Produktionsprozesses konstant. Der pO_{22} hingegen fällt am Ende ab, da die Stellgröße N_{St2} das Maximum erreicht hat. Eine Sauerstofflimitierung tritt nicht ein, da durch die maximale Rührerdrehzahl eine homogene Durchmischung des Reaktors erfolgt. Die atline Werte der Enzymaktivität

$C_{P_{\text{lactM2}}}$ und das Signal der Zielproteinkonzentration $IA_{P_{\text{IM2}}}$ zeigen eine Expression sowie Sekretion von CALB während des gesamten Produktionsprozesses (siehe Kapitel 4.3).

Abschließend wird am Ende des 24-stündigen Produktionszyklus die Kulturbrühe dem Downstream Prozess zur Verfügung gestellt. Der Reaktorinhalt wird vollständig über das Bodenablassventil mit der Zulaufpumpe des Tellerseparators geleert. Nach Abschluss der Leerung kann ein neuer Zyklus im Produktionsreaktor beginnen.

Die Prozesse Zellanzucht und Produktion werden sequenziell betrieben und finden aufgrund ihrer räumlichen Trennung gleichzeitig bzw. parallel statt. Die Umsetzung der sequenziell/parallelen Produktionsidee anhand Abb. 5.2 ist somit umgesetzt und damit eine quasi-kontinuierliche Enzymproduktion aufgebaut, bei der eine tägliche Ernte der Kulturbrühe möglich ist.

Verdeutlicht wird die sequenziell/parallele Prozessführung nochmals durch Abb. 5.7. Dort ist in der oberen Bildhälfte der Zellanzuchtprozess und in der unteren Bildhälfte der Produktionsprozess dargestellt.

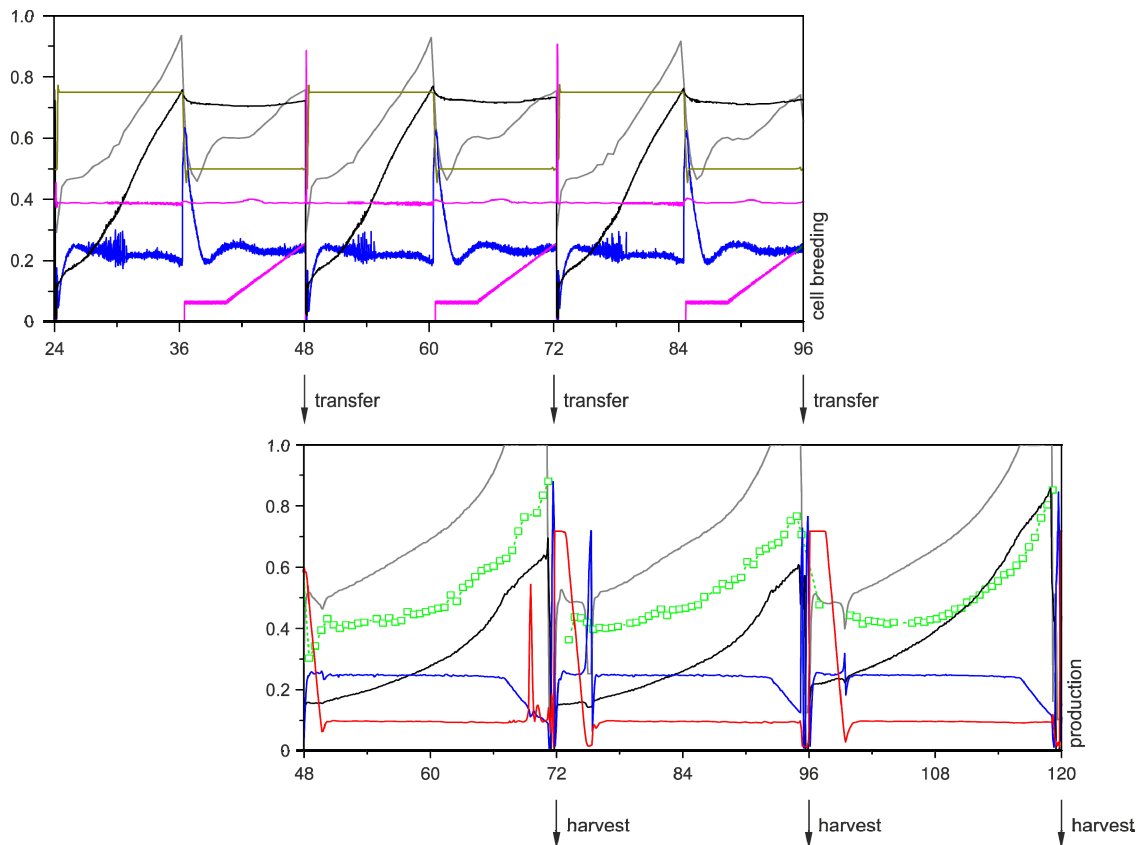


Abb. 5.7: Darstellung der parallelen und zugleich sequenziellen Prozessführung

Alle 24 Stunden wird zunächst die Kulturbrühe im Produktionsreaktor geerntet und anschließend ein Transfer vom Zellanzuchtreaktor in den Produktionsreaktor durchgeführt. Eine detaillierte Darstellung und Erläuterung der Ernte- und Transferprozesse folgt in Kapitel 6.5, in dem auch die Automatisierung der sequenziell/parallelen Prozessführung beschrieben ist.

5.4 Die konsekutiven Aufarbeitungsschritte

Eine Voraussetzung für die Entwicklung eines fünfstufigen Integrierten Bioprozesses war es, den dreistufigen Downstreamprozess dahingehend auszurichten, dass dieser eine Dauer von 24 h nicht überschreitet, um eine tägliche Ernte durchführen zu können. Der Ablauf der konsekutiven Aufarbeitungsschritte ist in Abb. 5.8 gezeigt.

Zunächst erfolgt die Separation der Kulturbrühe bei einer Drehzahl von 12500 min^{-1} , einer Zulauftrate F_{sep} von 40 lh^{-1} und einem Ablaufdruck p_{sep} von 3.4 bar. Die Trübung im Eingang E_{H2} sowie im Ausgang E_{sep} wird überwacht. Die Unterbrechungen der Separation resultieren aus den Teilentleerungen des Feststoffraumes. Es wird eine Zellabreicherung um den Faktor 40000 erreicht. Die Massenwiederfindung des Zielproduktes liegt bei 95 %, da mit jeder Teilentleerung auch ein geringer Anteil an produktthaltiger Klarphase ausgestoßen wird. [Müller, 2011]

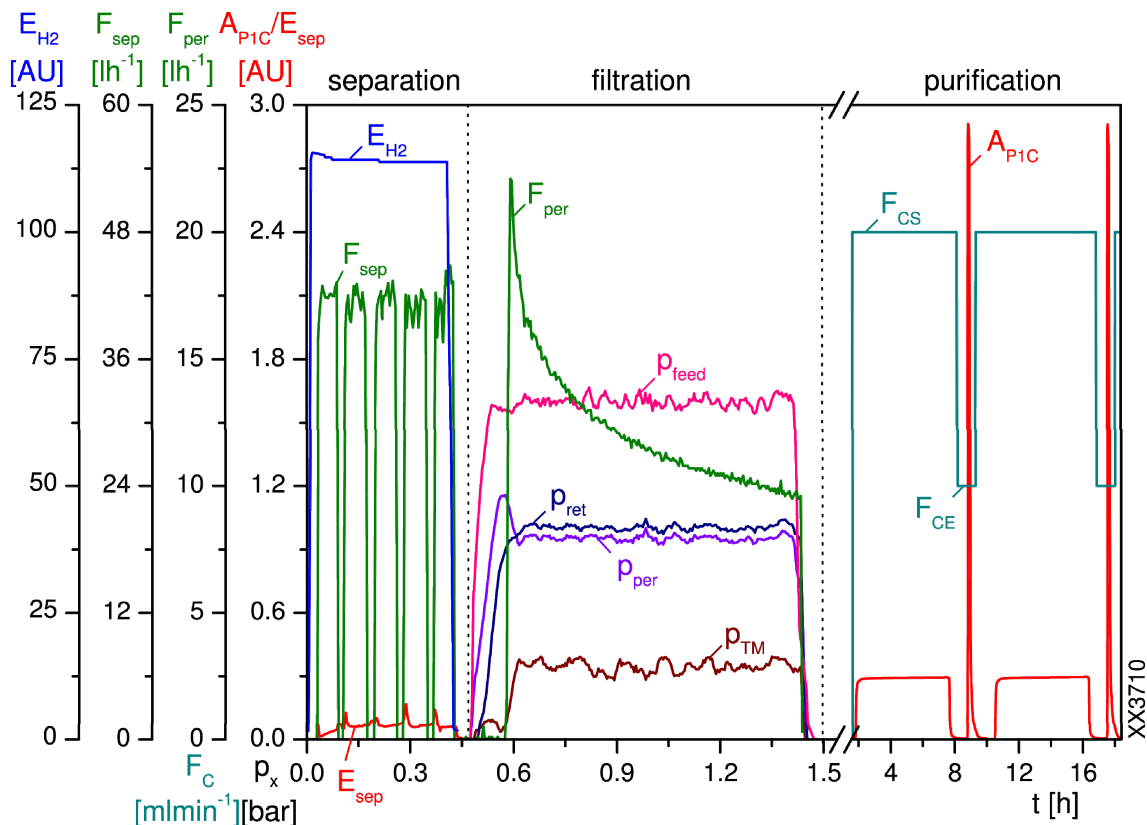


Abb. 5.8: Übersicht der dreistufigen Aufarbeitung mit Separation, Mikrofiltration und Feinreinigung

Nach der Separation folgt die Mikrofiltration der Klarphase. Der Druck im Feed p_{feed} wird auf 1.4 bar, der Druck im Retentat p_{ret} auf 1 bar und der Druck im Permeat p_{per} auf 0.9 bar geregelt [Zahn, 2010]. Daraus resultiert ein Transmembrandruck p_{TM} von 0.3 bar. Die Fließrate des Permeates F_{per} verringert sich während der Mikrofiltration aufgrund der Filterkuchenbildung. Die Massenwiederfindung des Zielproduktes beträgt 79 %. Dies beruht auf dem Verlust an Klarphase in dem Totvolumen der Anlage sowie auf der Zurückhaltung von Zielprotein in dem Filterkuchen. [Zahn, 2010]

Der dritte Schritt der Aufarbeitung des Zielproduktes ist die Adsorption von CALB an ein Trägermaterial und die anschließende Elution zur Abtrennung von Fremdproteinen und zur Konzentrierung des Produktes. Die Methode der Umpufferung mit anschließendem Einsatz eines Kationenaustauschers, wie sie bei der Atline-Analytik durchgeführt wird, kann im präparativen Maßstab nicht eingesetzt werden. Die Umpufferung würde ein sehr großes Säulenvolumen benötigen und wäre sehr zeitintensiv. Daher wurde mit der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) eine andere geeignete Methode verwendet [Rotticci-Mulder et al., 2001].

Das Permeat wird mit Ammoniumsulfat auf eine Molarität von 0.8 mol l^{-1} gebracht. Anschließend wird dieses in zwei Schritten mit jeweils sechs Litern durch 225 ml Säulenmaterial mit hydrophoben funktionellen Gruppen gefördert (F_{CS}). Die adsorbierten Proteine werden jeweils mit 300 ml Phosphatpuffer (50 mM) eluiert (F_{CE}). Während der Adsorption und Elution wird die UV-Absorption A_{P1C} gemessen. Es wird eine 20-fache Konzentrierung und eine Reinheit von 99 % erreicht. Die Massenwiederfindung des Adsorptionsschrittes beträgt 98 %. [Wagenführer, 2010]

Als Gesamtbilanz des Downstreamprozesses sind von 6.9 g CALB am Ende eines Produktionszyklus noch 5.1 g nach der Adsorption vorhanden. Dies entspricht einer Gesamtwiederfindung von 74 %.

6 Automatisierung des sequenziell/parallelen Prozesses

6.1 Aufbau des SIMATIC PCS 7 Systems

Für die Automatisierung des Integrierten Bioprozesses, der Visualisierung von Prozessgrößen sowie die Bedienung einzelner Anlagenteile wird das industriell eingesetzte SIMATIC PCS 7 System der Firma Siemens, Karlsruhe verwendet. PCS 7 ist ein Prozessleitsystem (engl. **Distributed Control System, DCS**), das über leistungsstarke Engineering Tools die Automatisierung vieler Komponenten in sich vereinen kann. Daher wird zur Automatisierung es Integrierten Bioprozess PCS 7, wie bereits anhand Abb. 4.3 verdeutlicht, auf der hierarchisch obersten Stufe eingesetzt und ist mit den beiden Bioreaktoren, dem Separator und der Mikrofiltrationsanlage verbunden.

Mit PCS 7 ist somit der Datenaustausch zwischen den Teilanlagen realisiert. Außerdem werden Prozesswerte der Anlagenteile übersichtlich visualisiert, sodass der Status eines Teilprozesses vom Bediener schnell erfasst werden kann. Dazu wurde pro Teilanlage eine schematische Darstellung der Komponenten mit der entsprechenden Verrohrung erstellt, in der Prozesswerte dort angezeigt werden, wo sie beim realen Prozess auch gemessen werden.

Des Weiteren werden Sollwerte über die Bedienoberfläche von PCS 7 an die Teilanlagen übermittelt, um beispielsweise den Separationsprozess zu steuern oder Statusrückmeldungen zu geben. Aktionen, wie die Sterilisation einer Rohrleitung, werden ebenfalls über die Bedienoberfläche initiiert. Für derartige Aktionen wurden Automatisierungsroutinen in PCS 7 programmiert, die eine benutzerfreundliche und zugleich sichere Anlagenbedienung gewährleisten.

Das PCS 7 System ist, wie in Abb. 6.1 dargestellt, in die Bereiche Automatisierungsstation (automation station, AS), Visualisierungsstation (operator station, OS) und Programmierstation (engineering station, ES) zu unterteilen. Jede dieser Stationen erfüllt spezielle Aufgaben und ist auf einem Computersystem lokalisiert.

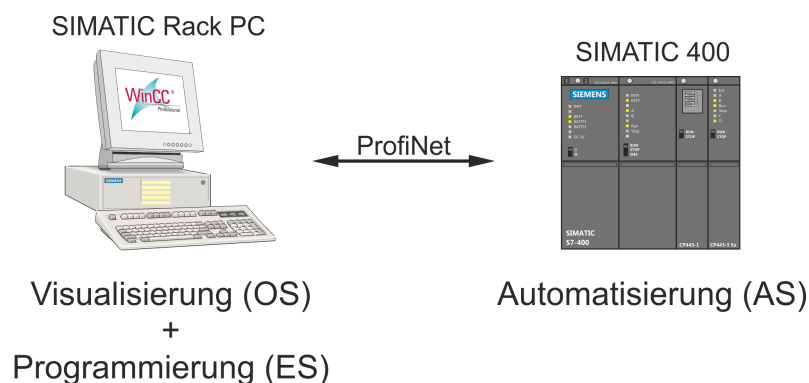


Abb. 6.1: Unterteilung des SIMATIC PCS 7 Systems in drei Bereiche (AS, OS und ES)

Bei dem verwendeten System handelt es sich um ein Einzelplatzsystem. Dies bedeutet, dass die OS und die ES auf einem Computer lokalisiert sind. Dazu wird ein SIMATIC Rack PC

(547B ES/OS IE) mit Windows XP SP3 verwendet. Die AS ist mit einer SIMATIC 400 realisiert. Der Datenaustausch zwischen den Stationen erfolgt über eine ProfiNet-Verbindung.

Die Aufgaben der AS [Siemens, 2009b] sind:

- Erfassung von Prozessgrößen
- Verarbeitung von Daten nach den Vorgaben im Anwenderprogramm
- Ausgeben von Steuervorgaben und Sollwerten an den Prozess
- Zur Verfügung stellen von Daten für die OS zur Visualisierung
- Erkennen von Bedingungen an der OS und deren Rückgabe an den Prozess

Die OS stellt ein HMI (**h**uman **m**aschine **i**nterface) dar, deren Aufgabe es ist, eine Bedienung und Beobachtung des Prozesses zu ermöglichen.

Die Aufgaben der ES [Siemens, 2009b] sind:

- Konfiguration der Hardware und des HMI
- Projektierung der Kommunikationsnetzwerke
- Projektierung von kontinuierlichen und sequenziellen Prozessabläufen
- Übersetzen und Laden aller Projektierungsdaten auf die Zielsysteme AS und OS

Die ES kann demnach als Verbindungsglied zwischen der AS und der OS angesehen werden, in der die Programmierungen und Konfigurationen zur Erfüllung der AS- und OS-Aufgaben durchgeführt werden. Die Bearbeitung eines PCS 7 Projektes erfolgt schließlich in zwei Phasen, der Programmierung (AS-Engineering) und der Visualisierung (OS-Engineering) [Siemens, 2009c]. Dies kann an der Einrichtung einer neuen Messstelle erläutert werden.

Der Messverstärker der Sonde wird an die AS über ein Peripheriegerät angeschlossen. In einem AS-Engineering Schritt wird die Adresse des Anschlusses einer Variablen zugewiesen und diese Konfiguration in die AS geladen. Eine eventuelle Weiterverarbeitung der Werte kann ebenfalls in dem AS-Engineering projektiert werden. Nachfolgend wird in einem OS-Engineering Schritt ein Ausgabefeld mit der Variablen verknüpft und dies in die OS geladen. Damit wird der Messwert in einem Anlagenbild dem Benutzer angezeigt.

6.2 Automatisierungseinheiten und deren Verbindung

Das Gesamtsystem zur Bedienung und Automatisierung der Integrierten Pilotanlage besteht mit dem SIMATIC PCS 7 System aus einer komplexen Struktur aus Hardware und Software verschiedener Hersteller, um die spezifischen Aufgaben jeder Teilanlage zu erfüllen. Die hierarchische Struktur der Elemente wurde bereits in Kapitel 4.1.3 mit Abb. 4.3 erläutert. Nachfolgend werden nun die Automatisierungskomponenten und deren Verbindung untereinander in Abb. 6.2 vorgestellt. Dabei stellen die oberen drei Kästen die Softwareebene und die unteren Kästen die Hardwareebene dar.

Die Prozesse in den beiden Bioreaktoren für die Zellanzucht (BIOSTAT[®] ED10) und die Enzymproduktion (BIOSTAT[®] C30) werden mit der Prozessleitsoftware MFCS/win 3.0 überwacht, gesteuert und über eine ANSI/ISA-88 Struktur automatisiert (siehe Kapitel 6.6). Jeder Reaktor verfügt über eine Vor-Ort-Automatisierung sowie Bedienung über eine DCU (Version

II oder III). Im Fall des ED10 sind Waagen und Pumpen an einen CAN-Knoten (Controller Area Network) angeschlossen, welcher mit MFCS/win verbunden ist. Messwerte von Sonden werden von der DCU II über eine RS422-Verbindung bereitgestellt.

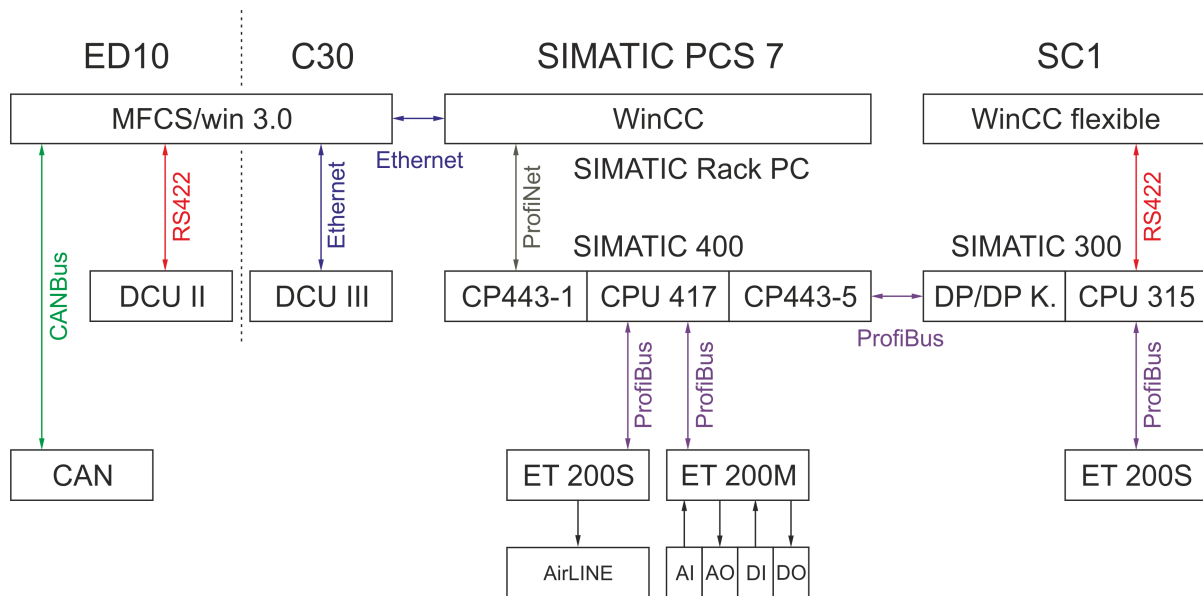


Abb. 6.2: Übersicht der Verbindung zwischen den Teilanlagen ED10, C30 und SC1 über das SIMATIC PCS 7 System

Beim Reaktor C30 sind alle Sonden, Waagen und Pumpen direkt an die DCU III angeschlossen. Deren Messwerte werden über eine Ethernet-Verbindung von MFCS/win abgerufen. Außerdem sind die Abläufe der Mikrofiltration in der DCU III automatisiert und über MFCS/win bedien- und beobachtbar (vgl. Abb. 4.3).

Auf der OS (SIMATIC Rack PC) wird das Windows Control Center (WinCC) verwendet, welches eine Visualisierung der Anlage bereitstellt und somit als Bediener-Schnittstelle (HMI) dient. Der SIMATIC Rack PC ist über Ethernet mit dem MFCS/win Computer verbunden. Über eine OPC-Schnittstelle werden Daten zwischen WinCC und MFCS/win ausgetauscht. Die OPC-Verbindung ist ein wichtiges Element für die Automatisierung der Gesamtanlage sowie für die Datenerfassung. In MFCS/win ist der OPC-Server BBI.MFCSOPCS.1 konfiguriert, auf dem Variablen beider Reaktoren, der Mikrofiltrationsanlage sowie globale Variablen für einen Lese- bzw. Schreibzugriff freigegeben sind. WinCC enthält eine Vielzahl an Unterprogrammen, die im WinCC Explorer aufgerufen werden. Unter anderem ist dort eine Variablenverwaltung mit integriertem OPC-Client verfügbar. Für jede vom OPC-Server bereitgestellte Variable ist im WinCC Explorer eine komplementäre Variable angelegt.

Der SIMATIC Rack PC ist über ProfiNet mit der AS verbunden. Als Automatisierungssystem wird eine SIMATIC 400 verwendet, welche eine CPU 417-4H (central processing unit) enthält. An diese sind zwei modulare Peripheriegeräte (ET 200S und ET 200M) angeschlossen. Die Peripheriegeräte enthalten E/A-Baugruppen, mit denen Pilotventile angesteuert (ET 200S mit AirLINE Modul) oder Signale von externen Messverstärkern in die AS eingebunden werden (ET 200M). Die ET 200-Stationen enthalten je ein IM-153-Modul zur Kommunikation über ProfiBus mit der CPU. Zusätzlich sind an diese zwei Kommunikations-

prozessoren (CP443-1 und CP443-5 Ext.) für die Verbindung mit der OS bzw. mit dem Separator an die CPU angeschlossen.

Der CP443-5 Ext. ist über ProfiBus mit einem DP/DP-Koppler des SIMATIC 300 Automatisierungssystems des Separators SC1 verbunden. Dieses enthält eine CPU 315-2, an welche wiederum eine ET 200S angeschlossen ist. Mit der ET 200S werden Pilotventile angesteuert und Messwerte aus externen Messverstärkern für die CPU bereitgestellt. Für eine Vor-Ort-Bedienung ist als HMI die Software WinCC flexible auf einem Bedienpanel installiert, welches über eine serielle Schnittstelle mit der SIMATIC 300 verbunden ist.

Messwerte des Separators werden über die SIMATIC 400 an WinCC weitergeleitet. Von dort werden diese Daten zusammen mit Werten von der ET 200M an MFCS/win übertragen. MFCS/win speichert alle anfallenden Daten. Dazu wird pro Bioreaktor eine Datenbank angelegt. In die Datenbank des Zellanzuchtreaktors werden nur Kultivierungsdaten geschrieben. In der Datenbank des Produktionsreaktors werden neben den Kultivierungsdaten auch atline Analysenergebnisse sowie Daten der Separation und der Mikrofiltration gespeichert.

6.3 Programmierung des Automatisierungssystems

6.3.1 Das Engineering-Tool SIMATIC Manager

Für die Konfiguration bzw. Umsetzung der Aufgaben der AS wird das Engineering Tool SIMATIC Manager verwendet. In diesem ist ein Multiprojekt definiert, welches als Projekt den Integrierten Bioprozess sowie eine Stammdatenbibliothek enthält. Die Oberfläche des SIMATIC Manager ist in Abb. 6.3 gezeigt.

Im SIMATIC Manager gibt es die technologische Sicht, die Komponentensicht und die Prozessobjektsicht (nicht gezeigt). In der technologischen Sicht ist die Anlage (BIOSTAT) gemäß ihrer Hierarchie in Teilanlage (C30, ED10, ...), Funktion, etc. sortiert. In der Komponentensicht ist die Hardware gemäß ihrer Hierarchie aufgeführt. Die AS (SIMATIC 400) ist auf einer Ebene mit der ES/OS (BPA110). Die Teilanlagen der AS (CPU 417-4 H, CP443-1 und CP 443-5 Ext) enthalten wiederum Programme, in denen Quellen, Bausteine und Pläne abgelegt sind. In der Prozessobjektsicht erfolgt die Gliederung analog zur technologischen Sicht, zudem sind alle Engineering-Aspekte wie Parameter, Signale, Meldungen, etc. in tabellarischer Form abrufbar.

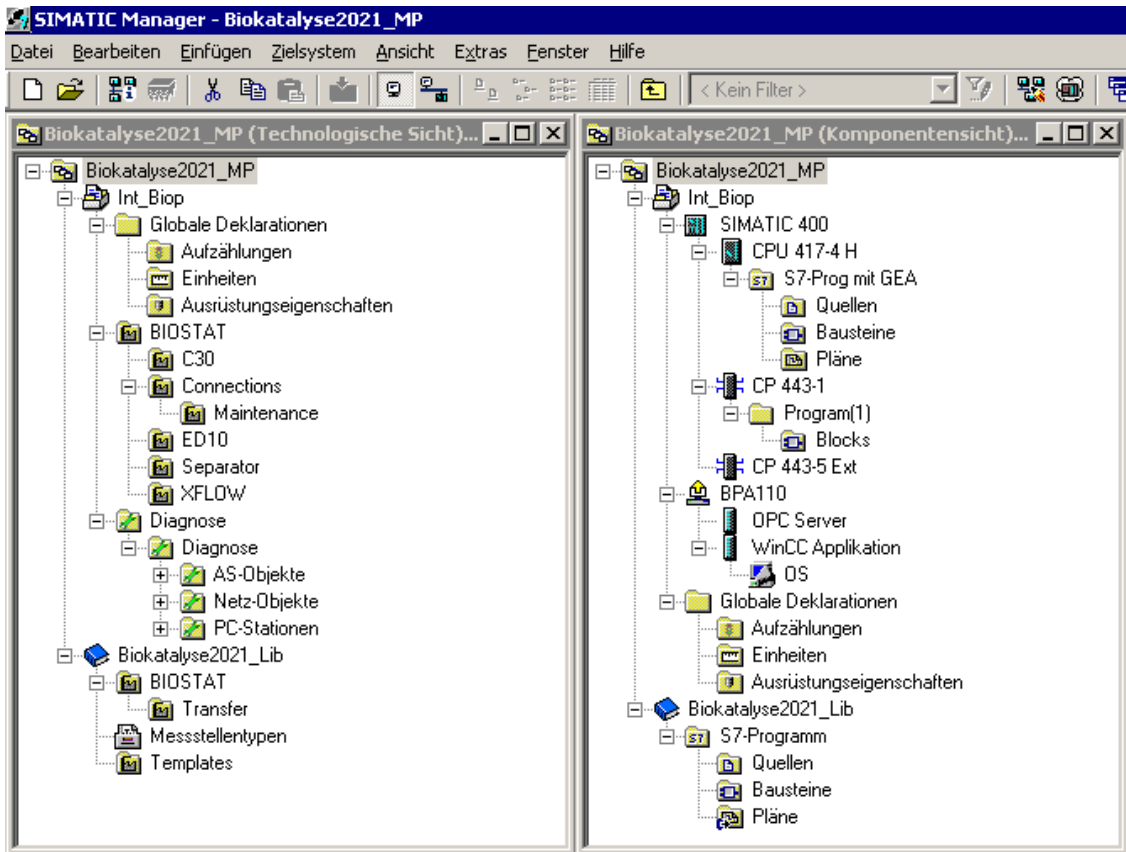


Abb. 6.3: Oberfläche des SIMATIC Manager mit geöffnetem Multiprojekt (links: Technologische Sicht, rechts: Komponentensicht)

In den Ordnern der Teilanlagen sind Elemente für das AS- und das OS-Engineering abgelegt. In Abb. 6.4 ist beispielhaft der Inhalt der Teilanlage Connections gezeigt. Darin befinden sich ein Unterordner Maintenance, elf CFCs (continuous function chart) sowie das Teilanlagenbild Connections.

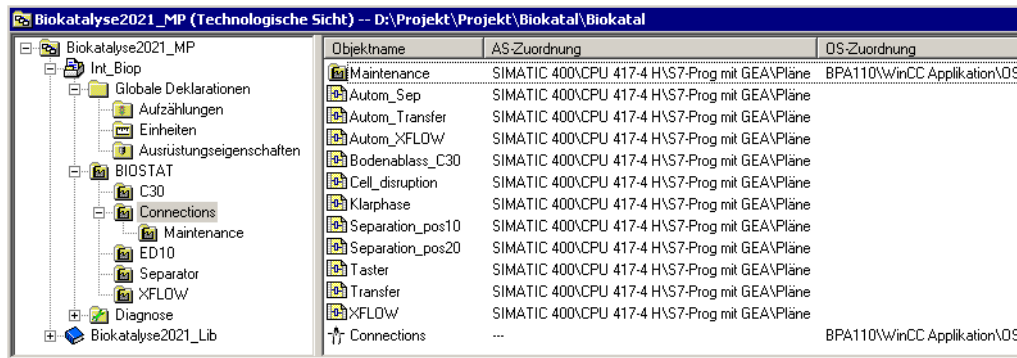


Abb. 6.4: Technologische Sicht: Teilanlage Connections mit Unterordner, CFCs und Bild
Die CFCs besitzen eine Zuordnung zu der AS, das Bild ist der OS zugeordnet. Diese Zuordnungen sind wichtig bei der Übersetzung der Pläne und somit der späteren Bereitstellung von Daten zwischen AS und OS.

6.3.2 Continuous Function Chart

Die CFCs werden allgemein zur Projektierung der Automatisierungslogik, Verriegelungen, Algorithmen, Steuerungen, etc. verwendet [Siemens, 2009a]. Zur Umsetzung dieser Aufgaben stehen Bausteine mit vorgegebenen Funktionen zur Verfügung. Zusätzlich können neue Bausteine über einen SCL (structured control language) Algorithmus erstellt werden. Die Bausteine werden per Drag&Drop aus der Stammdatenbibliothek in den CFC eingefügt und anschließend Ein- und Ausgänge verbunden.

Generell stehen zwei Arten von Bausteinen zur Verfügung: Funktionsbausteine (FB) und Funktionsaufrufe (FC). Ein Funktionsbaustein ist ein Baustein mit Gedächtnis, d. h. zusammen mit ihm wird beim Übersetzen ein Datenbaustein (DB) erzeugt, in dem Werte zwischengespeichert werden. Ein Funktionsaufruf ist ein Baustein ohne Gedächtnis, d. h. in ihm werden die erzeugten Werte sofort verarbeitet.

Der Aufruf von Bausteinen erfolgt über Organisationsbausteine (OB). Neun vordefinierte OBs werden über Weckalarme aufgerufen, die zwischen 10 ms und 5 s lang sind. Wird ein Funktionsbaustein zum Beispiel im OB34 eingesetzt, so erfolgt der Aufruf des Bausteins zyklisch alle 200 ms.

Eine besondere Gruppe von Funktionsbausteinen stellen Bedienbausteine dar. Diese sind eine Bedienschnittstelle zwischen CFC und OS. Beim Übersetzen des CFC und dem Laden in die OS wird ein Bildbaustein in der OS erzeugt, der mit dem Funktionsbaustein im CFC verbunden ist. Ein Beispiel eines Bedienbausteins ist der Ventilbaustein (VlvL). Dieser und weitere Bausteine sind in Abb. 6.5 gezeigt.

Alle Bausteine sind im OB34 eingesetzt und werden daher zyklisch in einem 200 ms Intervall aufgerufen. Der CFC enthält drei Funktionsaufrufe, die eine ODER-Verknüpfung bereitstellen (Or04). Zudem sind ein Interlock (Intlk04), ein Trigger (OpTrig) sowie ein Funktionsbaustein für einen digitalen Ausgang (Pcs7DiOu) enthalten.

Die erste ODER-Verknüpfung (OrV20051) enthält vier mögliche Eingänge für die Aktivierung des Automatikmodus des Ventilbausteins (AutModLi). Da der Eingang OpenAut gleich eins gesetzt ist, wird das Ventil im Automatikmodus geöffnet. Das Signal der ODER-Verknüpfung ist zudem negiert mit dem Eingang des Trigger Bausteins (OpTrig) verbunden. Wenn das Signal zur Aktivierung des Automatikmodus nicht mehr anliegt, wird dadurch ein Impuls über die ODER-Verknüpfung OrV20052 an den Eingang CloseFor des Ventilbausteins gesendet. Der Eingang CloseFor zwingt das Ventil zum Schließen.

Im Gegensatz dazu wird das Ventil mit dem Eingang OpenForc zum Öffnen gezwungen. Diese Funktionen sind je nach Anwendung bei manuellen Arbeiten oder zur Sicherheit bei automatischen Prozessen sinnvoll. Des Weiteren kann das Ventil über den Interlock Baustein und dem Eingang Intlock des Ventilbausteins für den Bediener in der OS gesperrt werden.

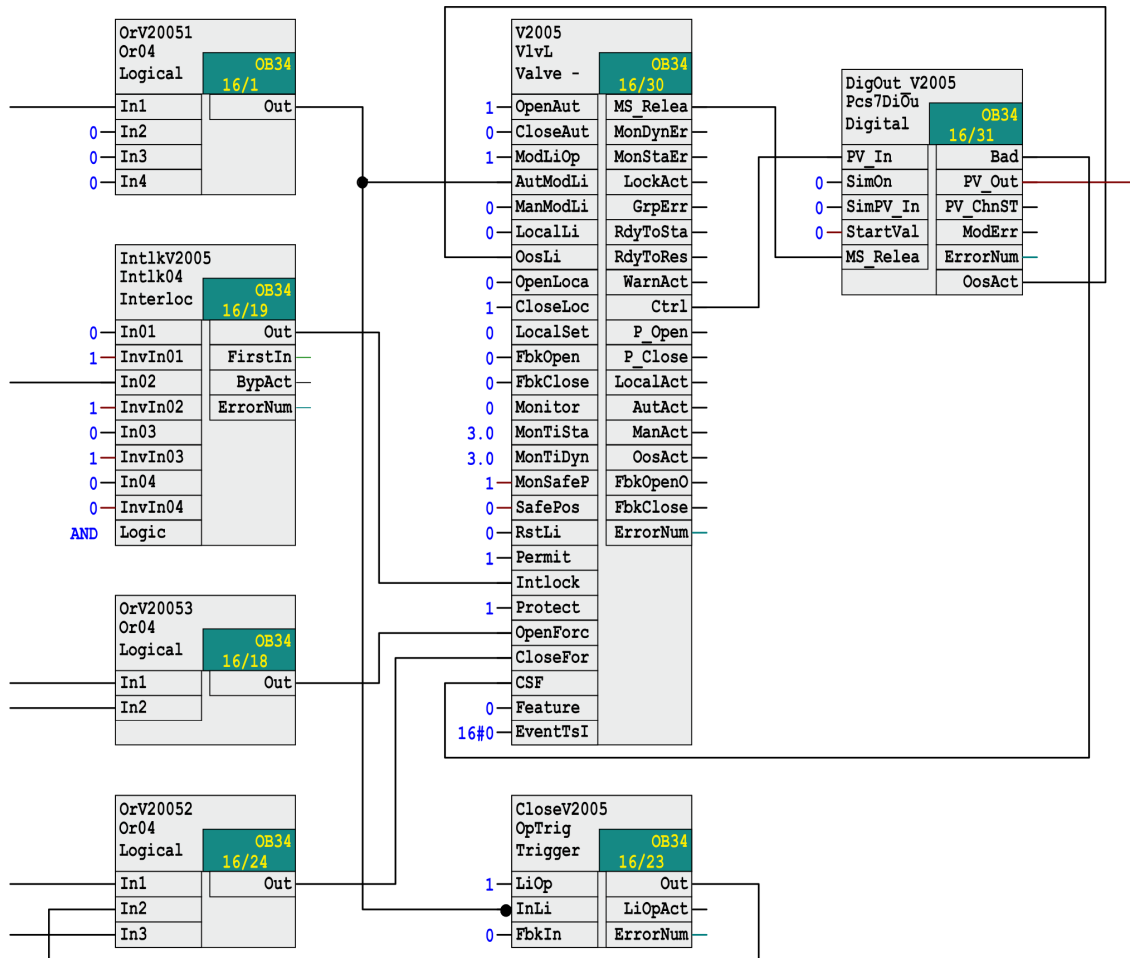


Abb. 6.5: CFC zur Ansteuerung eines pneumatischen Ventils

Die Weiterleitung des Ausganges Ctrl des Ventilbausteins erfolgt über einen digitalen Ausgang FB. Dieser ist wiederum mit einem Kanal der ET 200S verbunden und schaltet dort ein Pilotventil. Über weitere Verbindungen sperren sich die Bausteine gegenseitig, falls Wartungsarbeiten durchgeführt werden.

Nach diesem Schema werden 36 Ventile in der Anlage angesteuert. Mit CFCs werden zudem Abläufe automatisiert. Die Sterilisation von Rohrleitungen erfolgt beispielsweise mit Timer-Bausteinen, die ein zeitgesteuertes Öffnen von Ventilen für die Dampfzuleitung und Kondensatableitung bewirken. Der Timerbaustein und somit die Sterilisation kann in der OS über das Drücken eines Buttons ausgelöst werden oder erfolgt nach einem Prozessschritt (z. B. Transfer der Kulturbrühe).

Der Transfer der Kulturbrühe aus dem Zellanzuchtreaktor in den Produktionsreaktor ist mit einem Dosierbaustein automatisiert. Dieser besitzt zwei Ausgänge, die abhängig von dem dosierten Volumen geschaltet werden. Zunächst werden über den ersten Ausgang die Ventile für den Transfer (siehe Abb. 4.2) permanent geöffnet. Sobald 80 % des gewünschten Volumens transferiert wurde, wird der zweite Ausgang geschaltet, welcher wiederum mit einem Pulsbreitenmodulationsbaustein verbunden ist. Dieser bewirkt eine kurze Öffnung der Transferleitung von 1 s und wartet anschließend 9 s bis zur nächsten Öffnung, um eine Überdo-

sierung zu vermeiden. Mit Abschluss des Transfers erfolgt automatisch die Sterilisation der Transferleitung.

6.3.3 Batch-Identifikation

Für eine eindeutige Zuordnung von Zyklen des Zellanzuchtprozesses sowie des Produktionsprozesses wurde die Variable BatchID definiert. Diese enthält eine zehnstellige Zahl, die aus fünf Werten zusammengesetzt wird. Eine Übersicht über die Bildung der BatchID ist in Tab. 6.1 gezeigt.

Tab. 6.1: Zusammensetzung der BatchID am Beispiel eines Zyklus des Produktionsreaktors

2	12	42	03	800	BatchID
2	Reaktornummer: 1 := ED10, 2 := C30				
12	Jahreszahl				
42	Kalenderwoche				
03	Zyklusnummer				
800	ProcessPhase Wert				

Die erste Stelle der BatchID gibt die Reaktornummer wieder, demnach kann zwischen Zellanzuchtprozess und Produktionsprozess unterschieden werden. Die nächsten beiden Stellen bilden das Jahr, in dem der Prozess durchgeführt wurde. Zur genaueren Eingrenzung des Zeitpunktes steht an der vierten und fünften Stelle die Kalenderwoche, in der der Prozess begann. Dann folgen zwei Stellen für die Zyklusnummer und schließlich drei Stellen für den Wert der Variablen ProcessPhase.

Der Wert der BatchID wird zusammen mit den Prozessdaten gespeichert. Daher bietet diese Zahl eine einfache Filtermöglichkeit, um bestimmte Datensätze aus der Datenbank zu extrahieren.

6.3.4 Datenaustausch mit dem Separator

Der Datenaustausch mit dem Separator ist über zwei Datenbausteine (DB) realisiert. Ein Datenbaustein (DB99) wird verwendet, um Daten zum Separator zu schicken und ein anderer (DB98) empfängt die Daten, die der Separator bereitstellt. Dazu wird ein Funktionsbaustein (FB524) verwendet, der als AWL (Anweisungsliste) programmiert ist. Dieser ist in einem OB33 eingesetzt und wird daher in einem Intervall von 0.5 s aufgerufen. In der AWL ist hinterlegt, dass der gesamte Inhalt des DB99 auf einen Datenbaustein in der AS des Separators (S7-300) geschrieben wird. Anschließend wird der Inhalt eines anderen Datenbausteins aus der S7-300 in den DB98 geschrieben.

Das Schreiben in den DB99 erfolgt je nach Anwendung über einen CFC oder direkt aus der OS, wenn z. B. die Dauer des Teilentleerungszyklus geändert werden soll. Über den DB99 werden auch boolsche Signale übergeben, die definierte Aktionen beim Separator auslösen (z. B. die manuelle Auslösung einer Teilentleerung oder die Aktivierung der Trübungsmes-

sung). Diese Steuerbefehle sind als Taster definiert, d. h. es existiert ein Eingang zur Aktivierung und ein Eingang zur Deaktivierung.

Wird in der OS ein Button für eine Aktion des Separators gedrückt, wird dieses Signal zunächst an einen SCL programmierten Baustein in einen CFC weitergeleitet. Dieser Baustein verlängert das Signal mit einem internen Timerbaustein auf eine Länge von 1 s und leitet es an den DB99 weiter. Damit wird gewährleistet, dass das Signal innerhalb des 0.5 s Übertragungsintervall mindestens einmal übergeben wird.

Die eingehenden Daten im DB98 sind Statusmeldungen, Fehlermeldungen oder Istwerte. Diese werden je nach Anwendung direkt in der OS angezeigt oder in einem CFC weiterverarbeitet. Zur Überwachung der Kommunikation wird im OB33 außerdem ein weiterer Funktionsbaustein (FB501) aufgerufen. Dieser startet einen Timer mit einer Länge von 10 s, wenn ein Bit im DB98 gesetzt ist. Dieses Bit wird in der AS des Separators sekundlich alternierend gesetzt. In dem Fall, dass die Kommunikation länger als 10 s unterbrochen ist, läuft der Timer aus und es wird eine Fehlermeldung ausgegeben.

6.4 Programmierung des Visualisierungssystems

6.4.1 Das Engineering-Tool WinCC Explorer

Für das OS-Engineering wird die Software WinCC Explorer verwendet, die eine Vielzahl an Unterprogrammen enthält. Die WinCC Runtime ist das eigentliche HMI, von der aus der Prozess beobachtet und bedient wird. Die Runtime wird aus dem WinCC Explorer heraus gestartet. Sie enthält Bilder, die nach derselben Hierarchie angeordnet sind, wie in der Technologischen Sicht des SIMATIC Managers.

Durch die Zuordnung von Bildern und CFCs in einem Ordner in der technologischen Sicht des SIMATIC Manager (vgl. Abb. 6.4) werden beim Übersetzen der OS für die Bedienbausteine im CFC automatisch entsprechende Bildbausteine (z. B. Ventilsymbol) in dem Bild erzeugt. Die Anordnung der Bildbausteine und die weitere graphische Gestaltung der Bilder erfolgt im WinCC Graphics Designer. Dort werden außerdem E/A-Felder eingebaut, die mit Variablen der OS oder der AS verbunden sind.

6.4.2 Anlagenbild Rohrleitungsfließbild

In Abb. 6.6 ist das Bild *Connections* gezeigt, wie es in der Runtime aufgerufen werden kann. In der oberen Leiste erfolgt die Bildauswahl der Teilanlagen, darunter befindet sich das jeweilige Anlagenbild. In diesem Bild sind die Teilanlagen ED10 (Zellanzucht), C30 (Produktion), SC1 (Separation) und X-Flow (Mikrofiltration) zu erkennen.

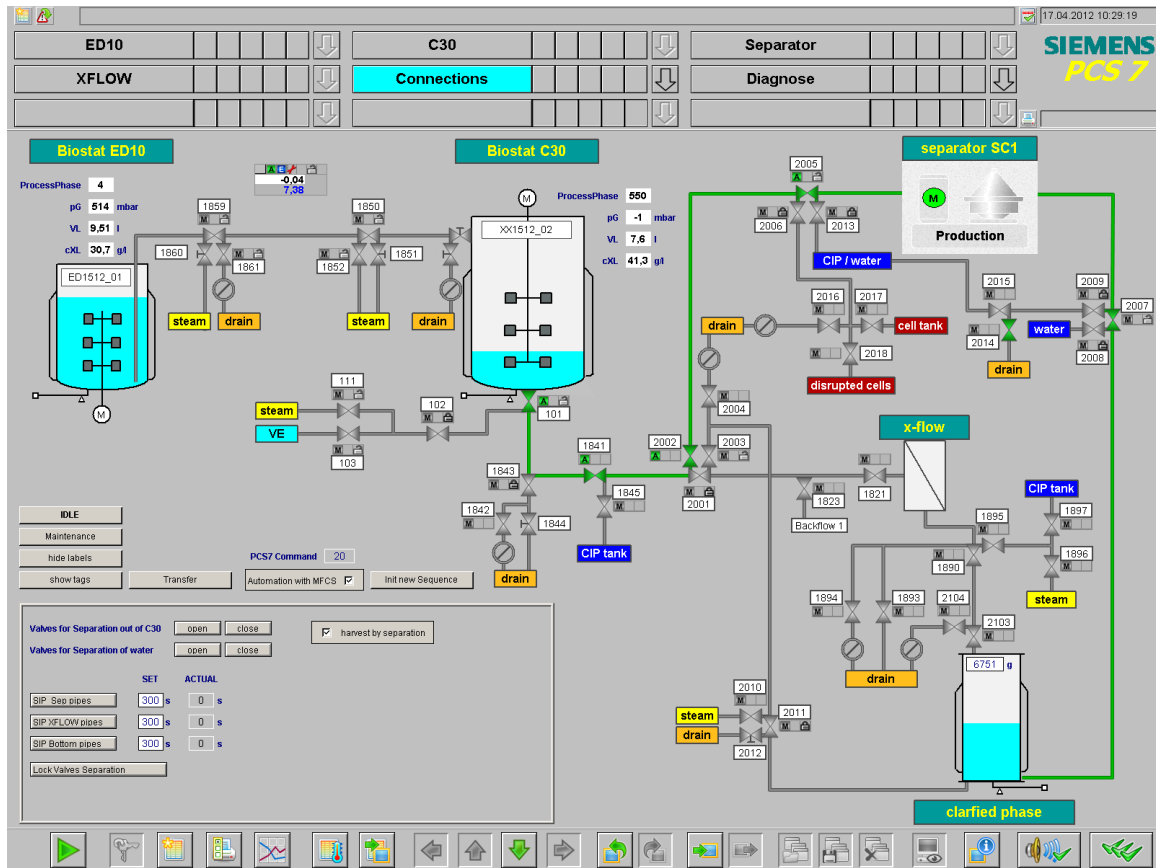


Abb. 6.6: Anlagenbild *Connections* in der WinCC Runtime

Dieses Rohrleitungsfließbild dient zur Bedienung der in der Anlage verbauten Ventile (vgl. Abb. 4.2). Es können Ventile oder Ventilgruppen manuell geöffnet, geschlossen oder gesperrt werden. Gleichzeitig wird durch eine grüne Markierung der Ventile und der Rohrleitungen angezeigt, welche Verbindungen momentan geöffnet sind.

In Abb. 6.6 ist zu erkennen, dass die Verbindung vom Produktionsreaktor zum Separator sowie vom Separator zum Klarphasentank geöffnet ist. Ebenso sind die Füllstände der Reaktoren sowie des Klarphasentanks (clarified phase) ablesbar. In dem Kasten in der unteren linken Bildposition sind Buttons zur Bedienung von Ventilgruppen und zur manuellen Initialisierung von Rohrleitungssterilisationen angebracht, deren Dauer über ein Eingabefeld vorgegeben und über ein Ausgabefeld angezeigt wird.

6.4.3 Anlagenbild Produktionsreaktor BIOSTAT® C30

Ein anderes Beispiel für ein Anlagenbild, bei dem der Vordergrund auf der Beobachtung und nicht der Bedienung liegt, ist in Abb. 6.7 gezeigt. Dieses Bild gibt die Teilanlage Produktionsreaktor BIOSTAT® C30 wieder. Das Anlagenbild für den Zellanzenkulturreaktor BIOSTAT® ED10 (nicht gezeigt) ist analog dazu aufgebaut.

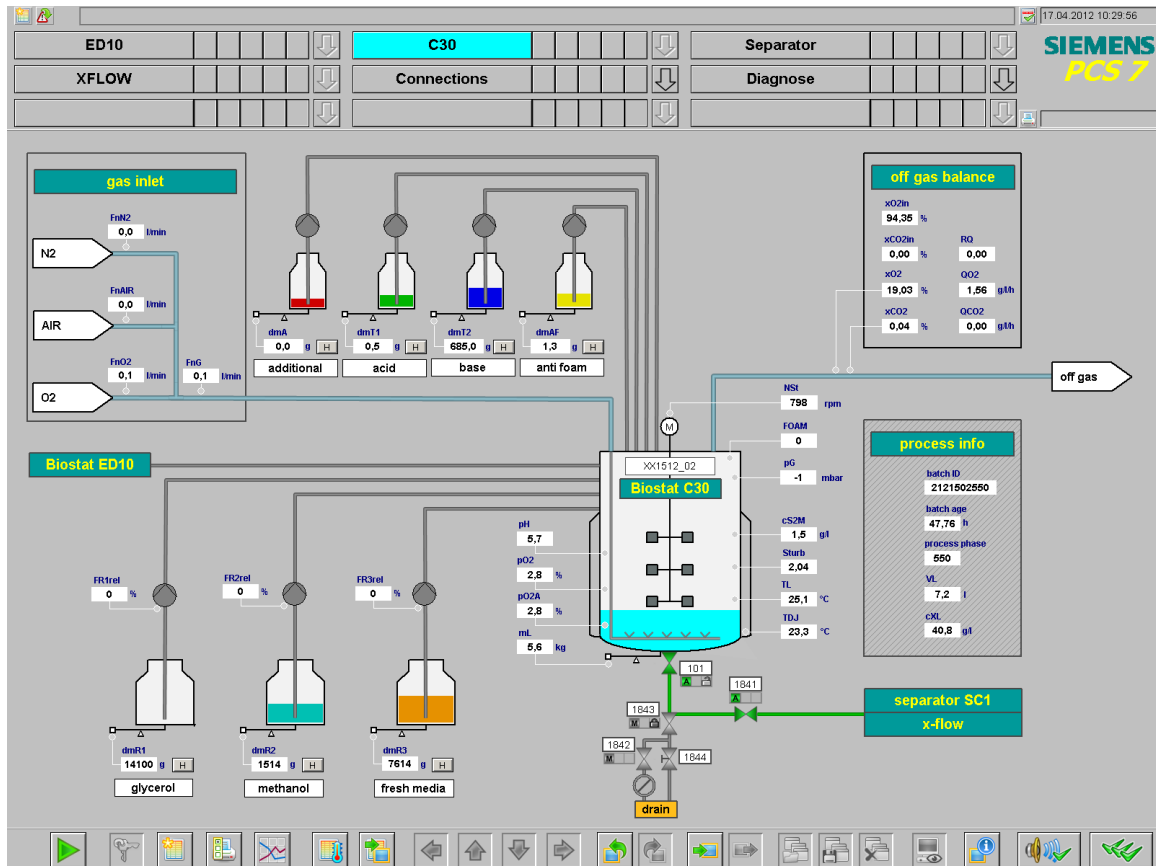


Abb. 6.7: Anlagenbild C30 (Produktionsreaktor) in der WinCC Runtime

Der in der Mitte des Bildes dargestellte Reaktor ist umgeben von Messwerten, die von MFCS/win übermittelt werden. Im Reaktor ist eine an das Reaktorvolumen gekoppelte Füllstandsanzeige (hellblau) eingebracht, deren Stand aufgrund der fortgeschrittenen Separation bereits sehr niedrig ist. Oben links im Bild wird die Gasmischstation angezeigt, rechts daneben die Vorlagen zur Titration und die Antischaummittelvorlage. Diese Vorlagen stehen auf Waagen, deren Werte unterhalb angezeigt werden. Neben dem Waagensignal befindet sich ein kleiner Button (H) für eine Halte-Funktion der Waage für optionale Nachfüllungen während des Prozesses. Links unten sind die Vorlagen für die Substratzugabe dargestellt, bei denen zusätzlich die aktuelle relative Drehgeschwindigkeit des Pumpenkopfes angezeigt wird. Rechts oben im Bild können gemessene und berechnete Werte der Abgasanalyse beobachtet werden. Schließlich befindet sich rechts neben dem Reaktor ein Kasten mit berechneten Werten, die ebenfalls von MFCS/win übermittelt werden.

6.4.4 Anlagenbild Separator SC1

Das in Abb. 6.8 dargestellte Anlagenbild zur Bedienung des Separators SC1 ist nicht anhand des Rohrleitungsfließbildes strukturiert, sondern anhand funktioneller Teilprozesse. Es gibt sechs Blöcke, die Informationen über den Zulauf, den Separatorzustand, den Ablauf, den Separationsprozess, die Rezirkulation sowie über Füllstände des Zu- und Ablaufes enthalten.

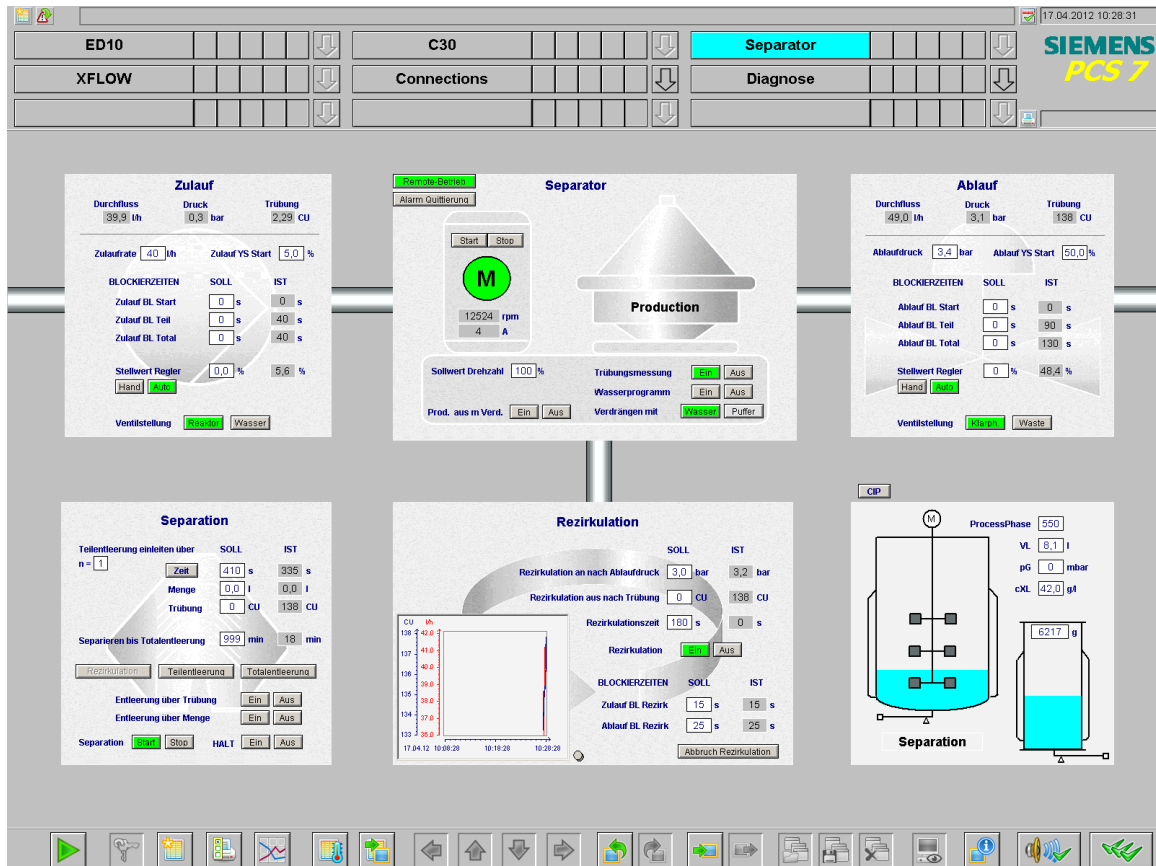


Abb. 6.8: Anlagenbild Separator SC1 in der WinCC Runtime

Im Block Zulauf bzw. Ablauf werden die Messwerte der Sonden in der Zulauf- bzw. Ablaufleitung angezeigt (vgl. Abb. 4.7), die Sollwerte für die Zulauf- und den Ablaufdruck eingegeben sowie Blockierzeiten für die Regler eingestellt. Die Blockierzeiten ermöglichen eine schnelle Rückkehr zu stabilen Separationsbedingungen nach einer Teilentleerung. Vom oberen mittleren Block aus wird der Separator gestartet, dessen Drehzahl überwacht und generelle Einstellungen vorgenommen.

Im linken unteren Block werden Einstellungen für den Separationsprozess vorgenommen, u. a. die Festlegung des Zeitintervalls der Teil- und Totalentleerungen sowie den Start und die Beendigung der Separation. Die Einstellungen zur Rezirkulation während des Separationsprozesses, Startbedingung, Dauer, etc., werden im mittleren unteren Block vorgenommen. Schließlich sind im letzten Block die Füllstände des Produktionsreaktors C30 und des Klarphasentanks abgebildet. Damit kann die Separation einfach bedient sowie deren Fortschritt übersichtlich beobachtet werden.

6.4.5 Anlagenbild Mikrofiltrationsanlage Sartocoon® Slice

Das Anlagenbild zur Bedienung und Beobachtung der Mikrofiltration, das in Abb. 6.10 dargestellt ist, wurde wiederum anhand des Rohrleitungsfließbildes strukturiert.

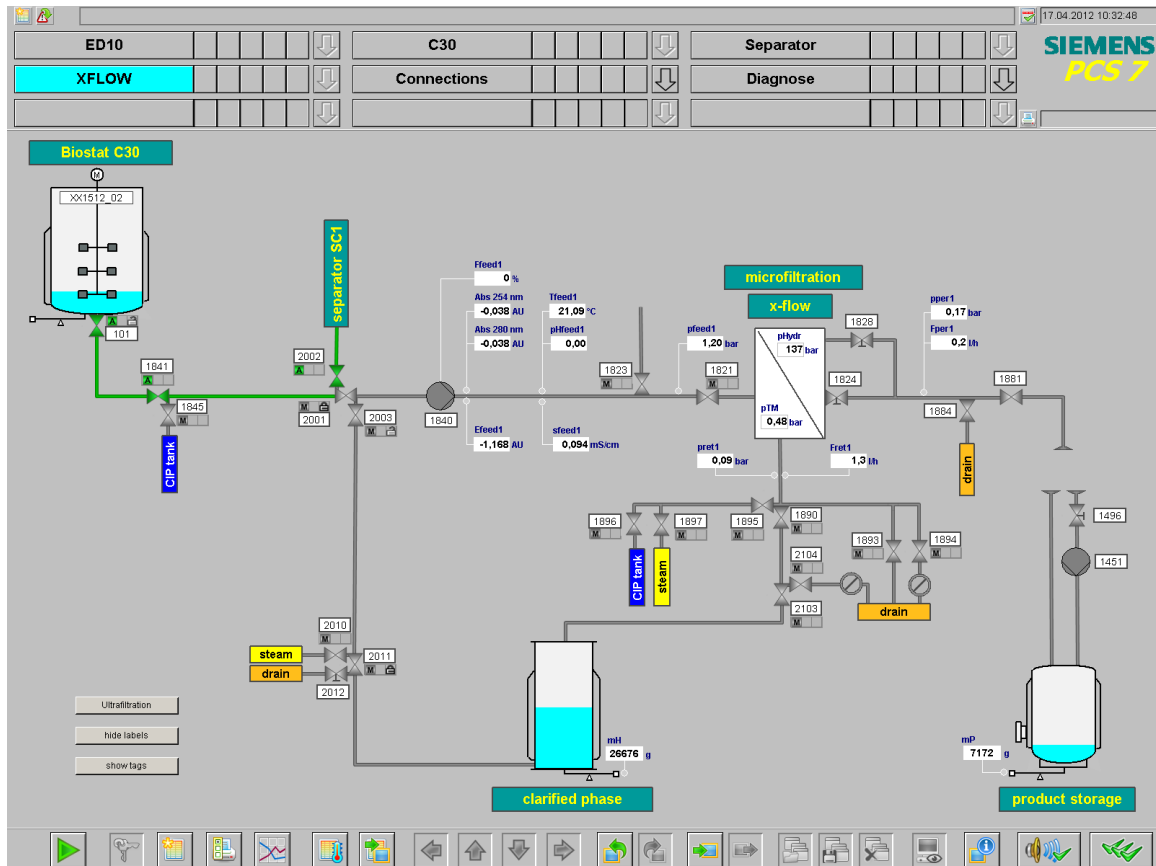


Abb. 6.9: Anlagenbild Mikrofiltration in der WinCC Runtime

Aufgrund der Option, die Kulturbrühe direkt aus dem Produktionsreaktor in die Mikrofiltrationsanlage zu leiten, ist der Reaktor mit einer Füllstandsanzeige in diesem Anlagenbild links oben dargestellt. In der Regel wird aber die Klarphase vom Separationsprozess filtriert, die sich in dem unten dargestellten Klarphasentank befindet.

Die während der Mikrofiltration gemessenen Drücke sowie weitere Messwerte werden an der Einbauposition der jeweiligen Sonde angezeigt und ermöglichen somit zusammen mit den Füllstandsanzeigen der Klarphase und des Permeates (product storage) eine übersichtliche Beobachtung des Mikrofiltrationsprozesses.

6.4.6 Globales Skript zur Datenübertragung

Die Datenübermittlung von MFCS/win zu WinCC sowie von WinCC zu MFCS/win erfolgt über eine OPC Server/Client-Verbindung. In einigen Anwendungsfällen ist allerdings eine Übermittlung von Variablenwerten von MFCS/win zur AS sowie von der AS zu MFCS/win notwendig. Dies ist mit einem globalen Skript realisiert. Dieses Skript wird nach der Aktivierung der WinCC Runtime in einem 1 s Zyklus aufgerufen. Basis des Skriptes ist eine C Programmierung.

Es werden Werte aus Variablen des einen Automatisierungssystems eingelesen und auf Variablen des anderen Systems geschrieben. Zum Beispiel wird die aus dem Trübungssignal berechnete Zelldichte des Produktionsreaktors für die Berechnung der Separationsdauer benötigt. Die Separationsdauer wiederum wird mit einem SCL programmierten Baustein in

einem CFC berechnet. Demnach muss die Zelldichte aus MFCS/win direkt in ein CFC in der AS geschrieben werden. Daten der Separation, die in MFCS/win gespeichert werden, werden in die andere Richtung übertragen, also aus dem DB98 in eine MFCS/win Variable.

Mit Hilfe des globalen Skriptes ist auch zwischen MFCS/win und WinCC eine Kommunikationsüberwachung implementiert. Es wird ein Wert einer Variable innerhalb von MFCS/win alternierend auf null oder eins gesetzt und dem OPC-Client zur Verfügung gestellt. Das globale Skript schreibt den Wert auf den Eingang eines Timerbausteins in einem CFC. Bei einem länger als 60 s anhaltenden Signalverlust wird eine Fehlermeldung ausgegeben.

6.5 Automatisierungsablauf

Zur Realisierung eines reproduzierbaren Prozesses ist eine vollständige Automatisierung obligatorisch. Dazu sind folgende zur Umsetzung der in Kapitel 5.3.3 vorgestellten sequenziell/parallelen Prozessführung notwendige Schritte durchzuführen:

- Entleerung des Produktionsreaktors über den Separator (harvest 2)
- Zugabe von frischem Medium in den Produktionsreaktor (refresh 2)
- Transfer der Kulturbrühe vom Zellanzuchtreaktor in den Produktionsreaktor (transfer 1/2)
- Vollständige Entleerung des Zellanzuchtreaktors (waste 1)
- Zugabe von glycerolhaltigem Medium in den Zellanzuchtreaktor (refresh 1)

Zusätzlich müssen die Kultivierungsbedingungen für den Produktionsprozess (production 2) und die zwei Phasen des Zellanzuchtprozesses (batch 1, induction 1) eingestellt werden. Ein Überblick über diese zu automatisierenden Prozessschritte und deren Abfolge ist in Abb. 6.10 dargestellt.

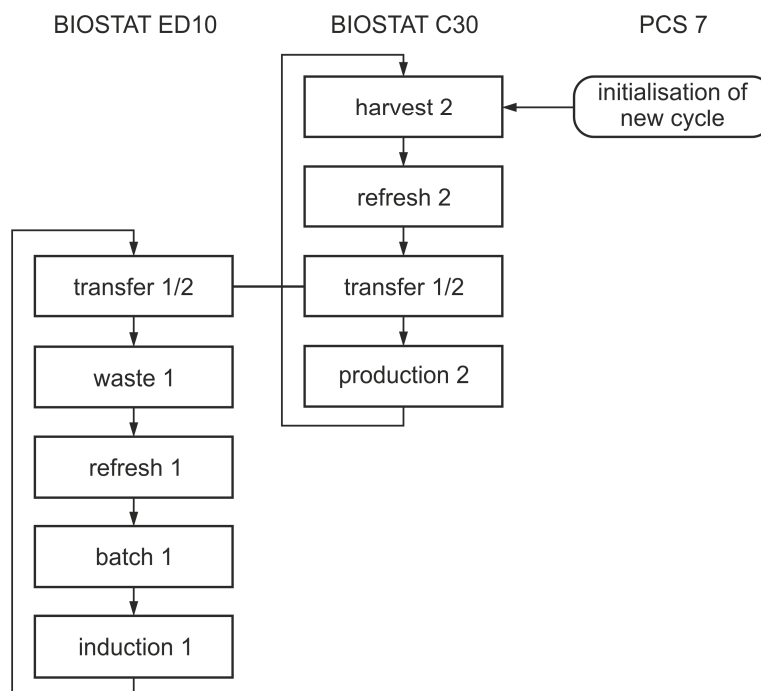


Abb. 6.10: Übersicht der Automatisierungsschritte zur sequenziell/parallelen Prozessführung

Vor der Initialisierung eines neuen Zyklus über PCS 7 befinden sich der Produktionsprozess im BIOSTAT® C30 in der Produktionsphase und der Zellanzuchtprozess im BIOSTAT® ED10 in der Induktionsphase. Nach der Initialisierung erfolgt zunächst die Ernte (harvest 2) des Produktionsreaktors, indem die gesamte Kulturbrühe dem Separator zugeführt wird. Ist der Reaktor vollständig geleert, wird dieser mit frischem Medium (refresh 2) und schließlich mit Kulturbrühe aus dem Zellanzuchtreaktor (transfer 1/2) gefüllt. Damit beginnt im Produktionsreaktor ein neuer Produktionszyklus (production 2).

Der Zellanzuchtreaktor wird nach dem Transfer auf ein definiertes Restvolumen entleert (waste 1) und anschließend mit frischem, glycerolhaltigem Medium wieder gefüllt (refresh 1). Damit beginnt die Batch Phase des Zellanzuchtprozesses (batch 1) und nach dem vollständigen Verbrauch des Glycerols schließlich die Induktionsphase (induction 1).

Anhand Abb. 6.10 wird erneut die zyklische Prozessführung deutlich und die Verbindung der beiden Prozesse über den Transfer der Kulturbrühe. Insbesondere die exakte Erfüllung der Aufgaben rund um den Transfer ist entscheidend, um die beiden Teilprozesse Zellanzucht und Produktion reproduzierbar durchführen zu können.

In Abb. 6.11 ist ein detaillierter Blick auf die Volumenänderungen und die relativen Zugaben an Refreshmedium in den jeweiligen Reaktoren vor, während und nach dem Transfer dargestellt.

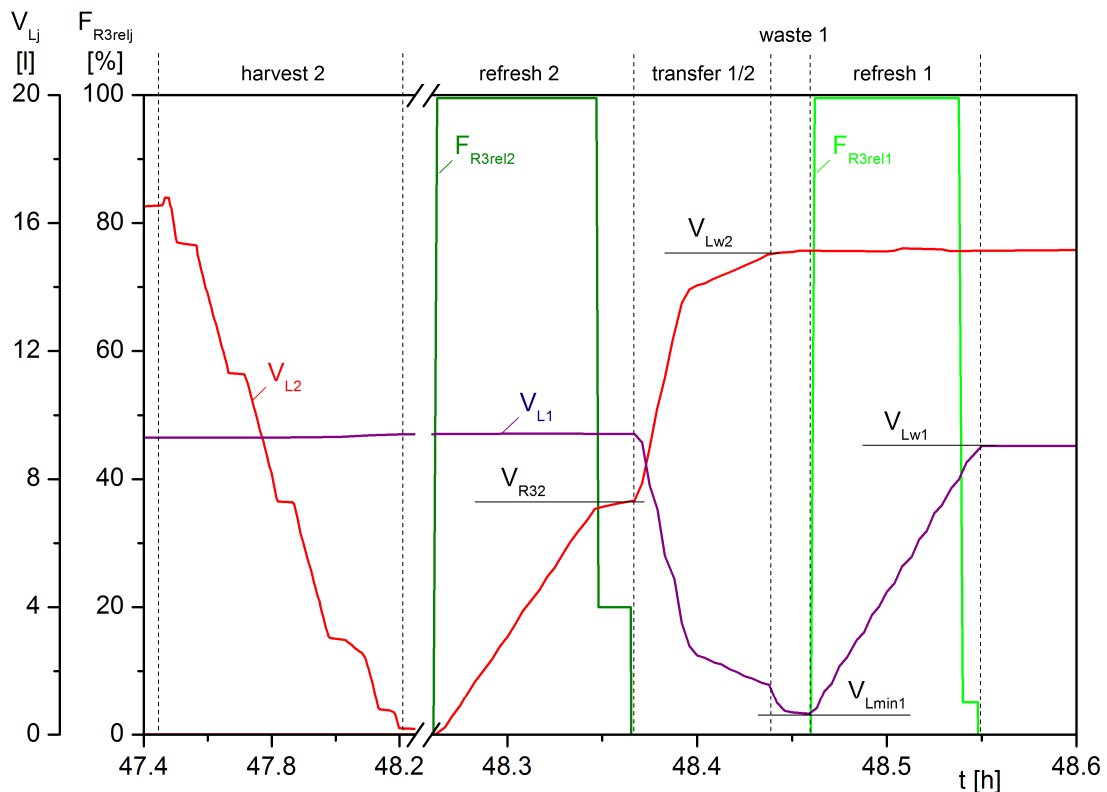


Abb. 6.11: Verlauf des Volumens und der relative Mediumvolumenströme des Zellanzucht- und Produktionsreaktor

Nach der Initialisierung eines neuen Zyklus beginnt zunächst die Separation der in dem Produktionsreaktor befindlichen Kulturbrühe. Das Volumen im Produktionsreaktor V_{L2} nimmt

dabei solange ab, bis der Reaktor vollständig entleert ist. Die Stufen im Signal entstehen aufgrund der Rezirkulation im Separationsprozess, die zur Stabilisierung der Separationsbedingungen nach einer Teilentleerung durchgeführt wird.

Nach Abschluss der Separation wird das zu transferierende Volumen an Kulturbrühe sowie das benötigte Volumen an Refreshmedium zum Erreichen der gewünschten Anfangsbedingungen berechnet. Das zu transferierende Volumen V_T ,

$$V_T(t_j) = V_{Lw2} \cdot \frac{c_{XLw2}}{c_{XL1}(t_j)}, \quad (6.1)$$

ergibt sich aus dem zuvor definierten Startvolumen des Produktionsreaktors V_{Lw2} , der ebenfalls zuvor definierten Startzelldichte c_{XLw2} und der aktuellen Zelldichte im Zellanzuchtreaktor c_{XL1} . Das Volumen des Refreshmediums V_{R32} ,

$$V_{R32}(t_j) = V_{Lw2} - V_T(t_j), \quad (6.2)$$

ist schließlich die Differenz zwischen dem Startvolumen und dem Volumen der zu transferierenden Kulturbrühe.

Das Refreshmedium wird zuerst in den Produktionsreaktor gegeben und dies anhand des Reaktorwaagensignals verfolgt. Zunächst erfolgt die Dosierung (F_{R3rel2}) mit dem maximal möglichen Volumenstrom und kurz vor dem Erreichen von V_{R32} mit 20 % der maximalen Rate, um eine Überdosierung zu vermeiden. Im Anschluss beginnt der Transfer der Kulturbrühe, der ebenfalls zunächst mit einem maximalen Volumenstrom und kurz vor dem Erreichen von V_{Lw2} langsam erfolgt (siehe Kapitel 6.3.2). Nach dem Abschluss des Transfers beginnt im Produktionsreaktor ein neuer Zyklus (vgl. Abb. 6.10).

Im Zellanzuchtreaktor endet mit dem Transfer die Induktionsphase und das Reaktorvolumen V_{L1} verringert sich um den in den Produktionsreaktor transferierten Anteil. Um ein konstantes Restvolumen V_{Lmin1} im Zellanzuchtreaktor zu erhalten wird die überschüssige Kulturbrühe nach dem Transfer in den Abfall geleitet (waste 1). Dann erfolgt auch im Zellanzuchtreaktor eine Zugabe von Refreshmedium (F_{R3rel1}) bis das Startvolumen V_{Lw1} erreicht ist. Damit beginnt die Batch-Phase des Zellanzuchtprozesses.

Die Umsetzung der Automatisierung zur sequenziell/parallelen Prozessführung erfolgt schließlich aus einer Kombination von Automatisierungselementen in MFCS/win und PCS 7. In MFCS/win wird eine Schrittkettenprogrammierung nach ANSI/ISA-88 verwendet (siehe Kapitel 6.6), die im Folgenden als Rezept bezeichnet wird. Die Automatisierung in PCS 7 erfolgt über eine Vielzahl an CFCs, die bereits in Kapitel 6.3.2 näher erläutert wurden.

Ausgehend von der Übersicht in Abb. 6.10 und in Anlehnung an Abb. 6.11 wird nun im Folgenden der Automatisierungsfluss detailliert mit den beiden Teilbildern in Abb. 6.12 und Abb. 6.13 beschrieben. Dieses Flussdiagramm stellt den gesamten Ablauf der sequenziell/parallelen Kultivierung dar. Es ist in drei Spalten gegliedert: dem Rezept des Zellanzuchtprozesses, dem Rezept des Produktionsprozesses sowie der PCS 7 Automatisierung.

Zwischen den einzelnen Automatisierungsschritten befinden sich Transitionen, deren Weichschaltbedingung entweder von einer Prozessgröße (z. B. Waagensignal beim Refresh) oder von einem Statuswert abhängig ist. Der Einsatz von Statuswerten ist aufgrund der Vernetzung der beiden Automatisierungssystemen PCS 7 und MFCS/win notwendig.

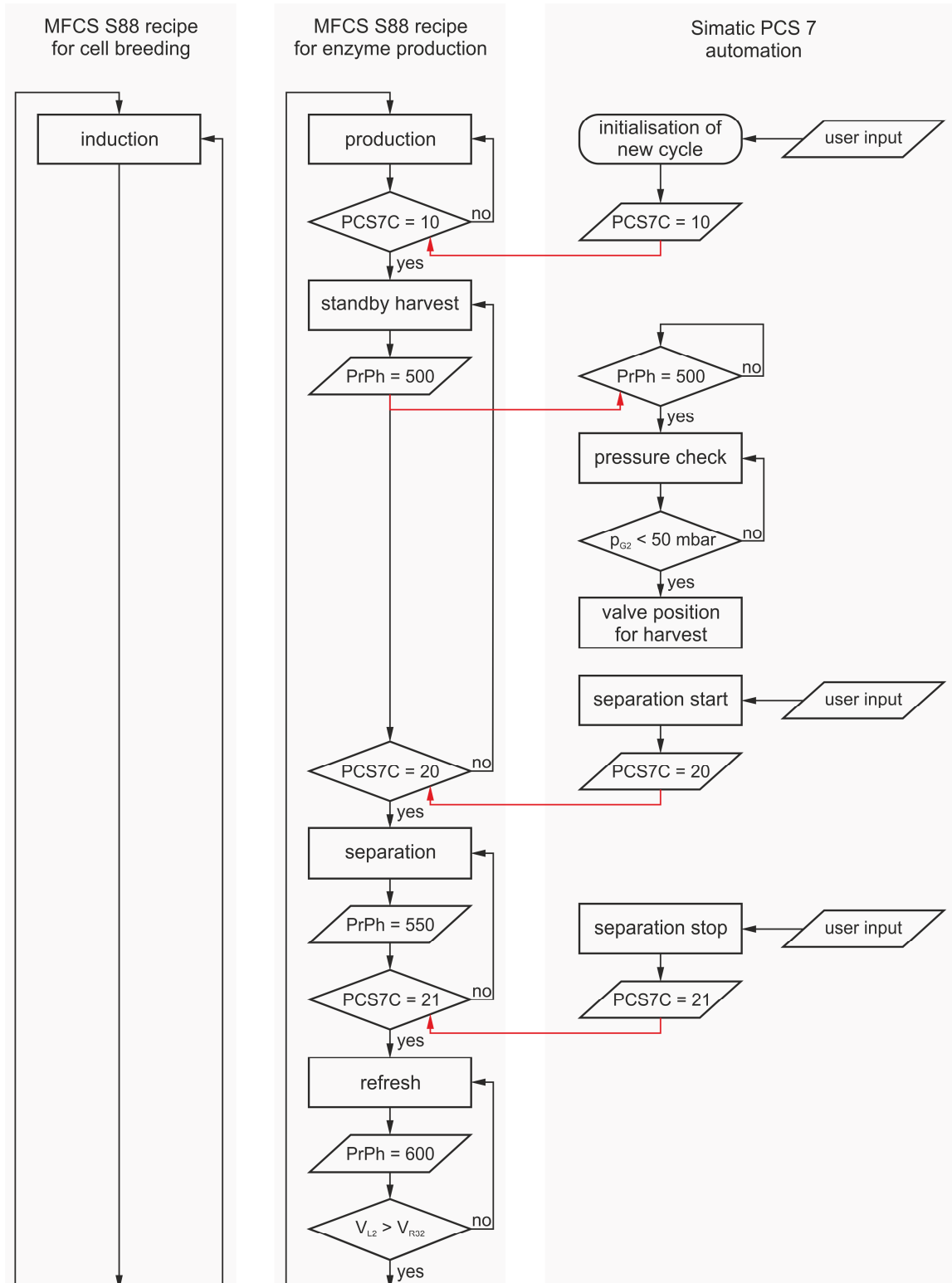


Abb. 6.12: Flussdiagramm der Upstream-Automatisierung, Teil 1

Eine gegenseitige Statusabfrage zwischen PCS 7 und MFCS/win ist über zwei Variablen realisiert, deren Werte mit der OPC-Verbindung übermittelt werden. Im PCS 7 System ist die

Variable PCS7Command (kurz PCS7C) definiert, deren Wert direkt mit einem Status in der Automatisierung verbunden ist. In der MFCS/win Automatisierung ist die Variable ProcessPhase (kurz PrPh) definiert, deren Wert den jeweiligen Status des Reaktors wiedergibt.

Die ersten beiden Spalten in Abb. 6.12 repräsentieren sich wiederholende zyklische Schrittketten in MFCS/win. In der dritten Spalte sind die Automatisierungsschritte in PCS 7 sowie die Benutzereingaben über die OS dargestellt. So ist die erste Eingabe die Initialisierung eines neuen Zyklus für die Produktion und die Zellanzucht. Verfahrenstechnisch ist der Produktionsreaktor zuerst abzuernten, bevor Zellen aus der Zellanzucht transferiert werden können und somit auch dort ein neuer Zyklus beginnen kann.

Ein Zyklus der Zellanzucht beginnt per Definition mit dem Beginn des Refresh und endet mit dem Abschluss der Entleerung (waste 1). Ein Zyklus der Produktion beginnt ebenfalls mit dem Refresh und endet mit dem Abschluss der Separation, d. h. der vollständigen Entleerung des Produktionsreaktors. Das Flussdiagramm, in dem als Start die Initialisierung eines neuen Zyklus gewählt ist, beginnt mit den aktuell vorliegenden Prozessphasen der Zellanzucht und Produktion. Der Zellanzuchtprozess befindet sich in der Induktionsphase und wartet auf den Beginn des Transfers, der Produktionsprozess befindet sich im Methanol Fed-Batch und wartet auf den Beginn der Separation.

Mit der Benutzereingabe in PCS 7, dem Drücken eines Buttons in der OS, wird der Variable PCS7Command der Wert 10 zugewiesen. Dies erfüllt die Transition des Produktionsprozesses und die Ernte (harvest 2) wird vorbereitet. Die Variable ProcessPhase erhält den Wert 500. Dies initialisiert eine Druckprüfung, da die Kulturbrühe nur drucklos dem Separator zugeführt werden darf. Sobald der Grenzwert von 50 mbar für p_{G2} unterschritten wird, werden die Rohrleitungen zwischen dem Produktionsreaktor und dem Separator automatisch geöffnet.

Die Separation wird durch den Benutzer gestartet, woraufhin PCS7Command auf den Wert 20 gesetzt wird. Dies erfüllt eine Transition im Produktionsprozess, wodurch auch im Rezept des Produktionsreaktors ersichtlich ist, dass die Separation im Betrieb ist. Mit der Zuweisung des Wertes 550 auf die Variable ProcessPhase wird die Druckprüfung deaktiviert. Die Separation wird durch den Benutzer wieder beendet und damit PCS7Command der Wert 21 zugewiesen. Dies erfüllt die Transition im Produktionsprozess und leitet damit den Medienrefresh ein.

Es beginnt ein neuer Zyklus im Produktionsreaktor. Dazu wird das Refreshvolumen V_{R32} mit Gl.(6.2) berechnet und anschließend Medium in den Reaktor gepumpt. Über die Beobachtung des Reaktorgewichtes wird der Refresh nach Erreichen des berechneten Volumens beendet. Nach dem Refresh beginnt der Transfer von Kulturbrühe. Diese und weitere Automatisierungsaufgaben sind in Abb. 6.13 dargestellt. Die ProcessPhase wird auf den Wert 700 gesetzt und erfüllt damit die Transition des Zellanzuchtprozesses. Dort wird der Transfer vorbereitet, indem der Fed-Batch beendet und mehrere Regler deaktiviert werden.

Gleichzeitig wird der Transfer auf der Ebene der PCS 7 Automatisierung initialisiert. Dies aktiviert einen Dosierer und öffnet die Rohrleitung zwischen den Reaktoren. Zudem wird die

Variable PCS7Command auf den Wert 30 gesetzt. Dies erfüllt eine Transition im Produktionsprozess, wodurch in dessen Rezept der Betrieb des Transfers angezeigt wird.

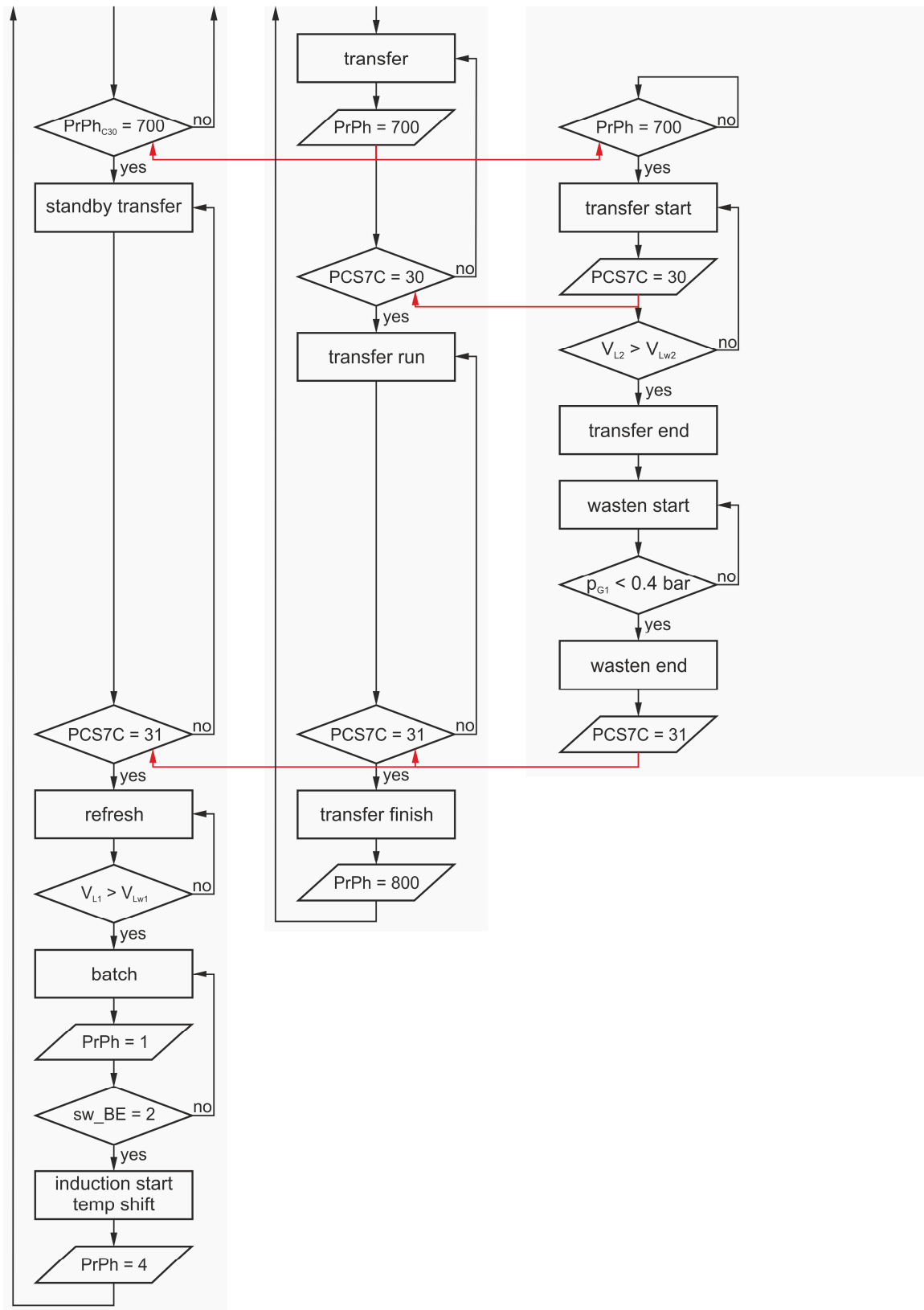


Abb. 6.13: Flussdiagramm der Upstream-Automatisierung, Teil 2

Der Transfer ist beendet, wenn das Reaktorvolumen im Produktionsreaktor V_{L2} das Zielvolumen V_{Lw2} übersteigt. Im Anschluss wird die im Zellanzuchtreaktor verbliebene Kulturbrühe

über eine Abzweigung in der Transferleitung entnommen (waste 1), bis das Ende des Steigrohres über dem Reaktor-Füllstand ist.

Dies hat im Zellananzuchtreaktor einen schnellen Druckabfall zur Folge. Unterschreitet der Reaktorüberdruck p_{G1} den Schwellenwert von 0.4 bar, ist das Ende der Ernte detektiert und der Variablen PCS7Command wird der Wert 31 zugewiesen.

Damit ist eine Transition im Produktionsprozess erfüllt, woraufhin die ProcessPhase auf 800 gesetzt wird und der Methanol Fed-Batch startet. Die Automatisierungsaufgaben im PCS 7 System sowie im Rezept des Produktionsreaktors sind somit erfüllt.

Im Zellananzuchtprozess beginnt mit dem Refresh ein neuer Zyklus. Es wird frisches Medium in den Reaktor gepumpt bis das Zielvolumen V_{Lw1} erreicht ist. Daraufhin startet die Batch-Phase. Für eine optionale spätere Auswertung der Batch-Phase wird diese mit dem Wert eins für die Variable ProcessPhase des Zellananzuchtreaktors markiert.

Ein Visual Basic-Programm erkennt das Ende des Batches anhand des pO_2 Wertes. Bei vollständigem Verbrauch des Substrates Glycerol sinkt die Sauerstoffaufnahme drastisch ab und der pO_2 Wert steigt. Überschreitet der pO_2 einen Schwellenwert wird der Variablen sw_BE der Wert zwei zugewiesen. Es erfolgt die Absenkung der Reaktortemperatur und die Zufütterung von Methanol beginnt. Dies wird mit dem Wert vier der ProcessPhase markiert. Damit sind auch alle Automatisierungsaufgaben des Zellananzuchtprozesses bis zur erneuten Initialisierung eines neuen Zyklus erfüllt.

6.6 Prozessleitsoftware MFCS/win

Die Prozessleitsoftware MFCS/win der Firma Sartorius AG, Göttingen wurde in Version 3.0 für die Prozesssteuerung, Datenaufzeichnung und Prozessvisualisierung verwendet.

MFCS/win ist ein modular aufgebautes System in einer Server/Client-Struktur. Dabei werden Server-Module im Hintergrund ausgeführt und Client-Module über eine Bedienoberfläche gestartet. Die Aufgaben von MFCS/win können in die Bereiche Systemkonfiguration, Prozessverwaltung, Durchführung von Kultivierungen sowie Dokumentation der Prozesse unterteilt werden

In der Systemkonfiguration werden Variablen angelegt, Berechnungen definiert, Alarmgrenzen festgelegt und Variablenlisten zur Prozessbeobachtung erstellt. Des Weiteren wird die Konfiguration der OPC-Verbindung und der Datenspeicherung sowie die Programmierung der Schrittketten zur Automatisierung des Kultivierungsablaufes durchgeführt. Die Schrittkettenprogrammierung erfolgt nach dem ANSI/ISA-88 Standard und ist in Operationen und Phasen gegliedert.

In der Prozessverwaltung werden die Kultivierungen verwaltet. Durchzuführende Kultivierungen werden dort definiert und ihnen eine Schrittkettenprogrammierung zugeordnet. Für die anschließende Durchführung der Kultivierung stehen drei Module zur Verfügung. Jeweils ein Modul zur Verwaltung der genommenen Proben, zur Visualisierung der Messwerte und zur

Bedienung des Prozesses. Nach Abschluss der Kultivierung können die gewonnenen Messwerte über das Modul zur Dokumentation der Prozesse exportiert werden.

6.6.1 Automatisierung des Zellanzuchtprozesses

Die Automatisierung des Zellanzuchtprozesses mit einem ISA-88 Rezept in MFCS/win ist in Abb. 6.14 gezeigt. Es gibt vier parallele Stränge, welche für den Transfer, den Refresh, die Batch-Phase und die Induktionsphase stehen. Am Ende der Induktionsphase ist der letzte Phasenblock *End_Sequence* aktiv. Nachfolgend steht eine Transition, die erfüllt ist, wenn die Variable ProcessPhase des Produktionsreaktors den Wert 700 annimmt. Damit wird der Transfer (Standby_Transfer) initiiert. Da sich das Volumen des Zellanzuchtreaktors auf 700 ml verringert, wird die Regelung der Temperatur, des pH-Wertes und des pO₂ deaktiviert.

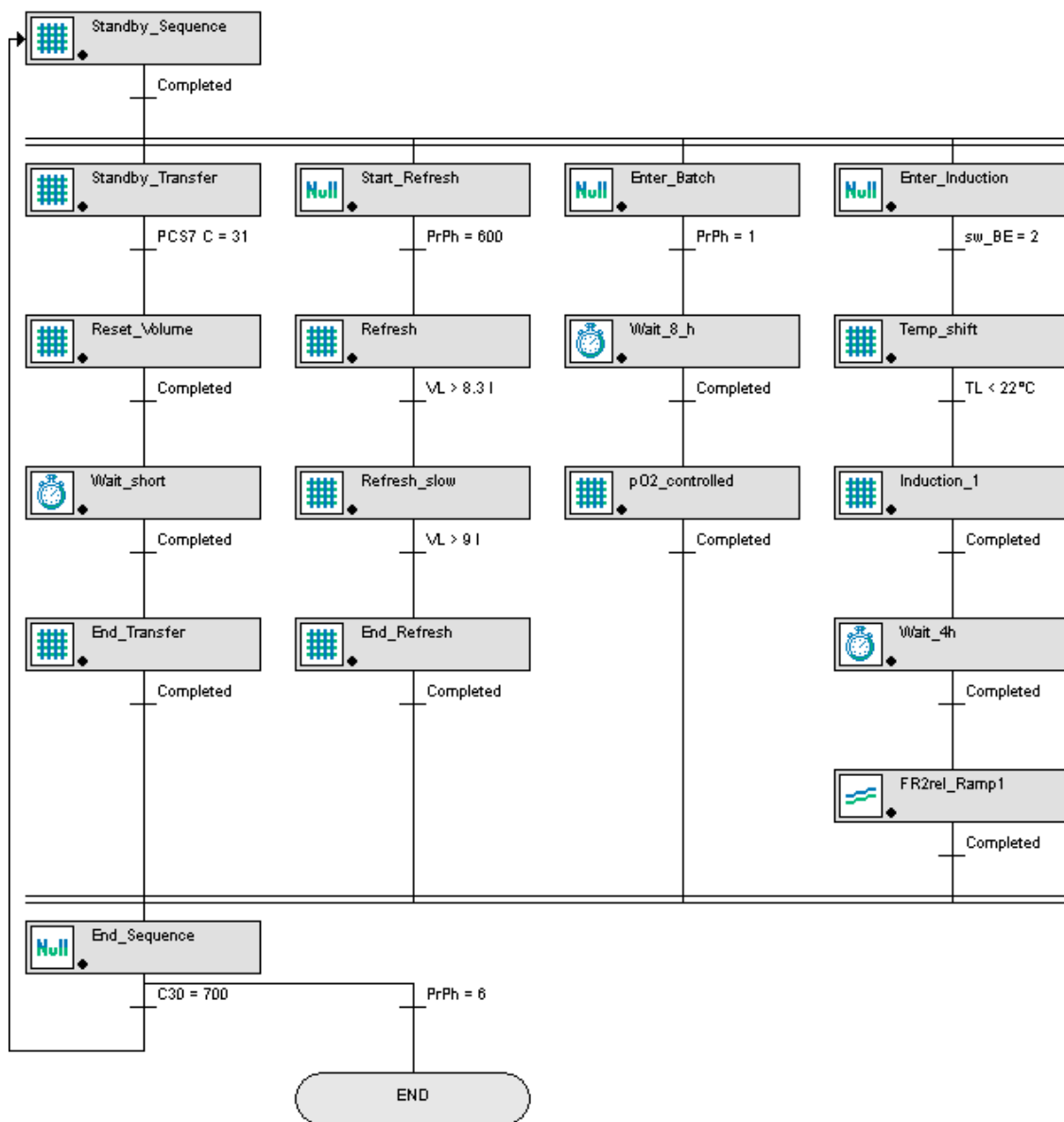


Abb. 6.14: ISA-88 Rezept der Zellanzuchtautomatisierung mit MFCS/win

Nach dem Transfer und der restlichen Entleerung erfolgt die Rückmeldung von PCS 7 (PCS7Command = 31). Das Volumen, welches sich aus dem Reaktorgewicht abzüglich einer zyklusspezifischen Konstante berechnet, wird in der ersten Spalte auf 0.7 Liter zurück gesetzt.

Der Medienrefresh wird in der zweiten Spalte initialisiert und mit einer Schlauchquetschpumpe durchgeführt. Die Pumpleistung beträgt am Anfang 100 % und wird nach dem Erreichen von 92 % des Endvolumens auf eine Leistung von 5 % verringert, um eine Überdosierung zu vermeiden. Sobald das Endvolumen von neun Litern erreicht ist, startet die Batch-Phase (dritte Spalte).

In dieser werden alle zuvor deaktivierten Regelkreise wieder aktiviert und der Temperatursollwert auf 30°C gesetzt. In der Batch-Phase läuft zunächst ein Timer von acht Stunden, anschließend wird die Batch-End-Erkennung anhand des pO₂ Verlaufs über ein Hintergrundprogramm gestartet. Wurde das Ende der Batch-Phase detektiert, folgt die Induktionsphase (vierte Spalte). Es wird der Temperatursollwert auf 20°C gesetzt. Beträgt die Temperatur weniger als 22°C startet die Methanolzugabe anhand des Zufütterungsprofils.

6.6.2 Automatisierung des Produktionsprozesses

Die Umsetzung der Automatisierungsaufgaben des Produktionsprozesses ist in Abb. 6.15 gezeigt. Diese Schrittkettenprogrammierung ist ebenfalls in vier Spalten gegliedert, welche für die Ernte, den Refresh, den Transfer und die Produktion stehen.

Während der Produktion befindet sich der aktive Phasenblock in der vierten Spalte mit der Transition PCS7Command = 10. Diese Bedingung wird mit der Initialisierung eines neuen Zyklus im PCS 7 System erfüllt. Die Schrittkette beginnt daraufhin wieder von oben und durchläuft die erste Spalte. Darin wird die Regelung der Temperatur, des pH-Wertes und des pO₂ deaktiviert, die Rührerdrehzahl auf einen niedrigen Wert festgesetzt, die Begasung beendet und der Druck im Reaktor abgelassen.

Anschließend erfolgt die Separation durch einen manuellen Start in PCS 7 mit Rückmeldung (PCS7Command = 20). Nach abgeschlossener Separation und somit der vollständigen Entleerung des Reaktors (PCS7Command = 21) wird das Reaktorvolumen auf null Liter zurückgesetzt und der Refresh gestartet (zweite Spalte).

Dazu erfolgt zunächst die Berechnung des notwendigen Refreshvolumens (V_{R32}) bevor der Medienrefresh über eine Schlauchquetschpumpe beginnt. Die Pumpleistung wird nach dem Erreichen von 92 % des Refreshvolumens auf 20 % gesenkt, um eine Überdosierung zu vermeiden. Nach Abschluss des Refresh wird die Begasung wieder gestartet und die Regelung des Reaktorüberdruckes auf 300 mbar eingeschaltet.

Mit einem Reaktorüberdruck des Zellanzuchtreaktors von 500 mbar und der daraus resultierenden Druckdifferenz von 200 mbar zwischen den Reaktoren wird der Transfer der Kulturbrühe realisiert. Dieser Transfer ist über PCS 7 automatisiert. Es erfolgt eine Rückmeldung von PCS 7 an die Schrittkette in der dritten Spalte über die Variable PCS7Command.

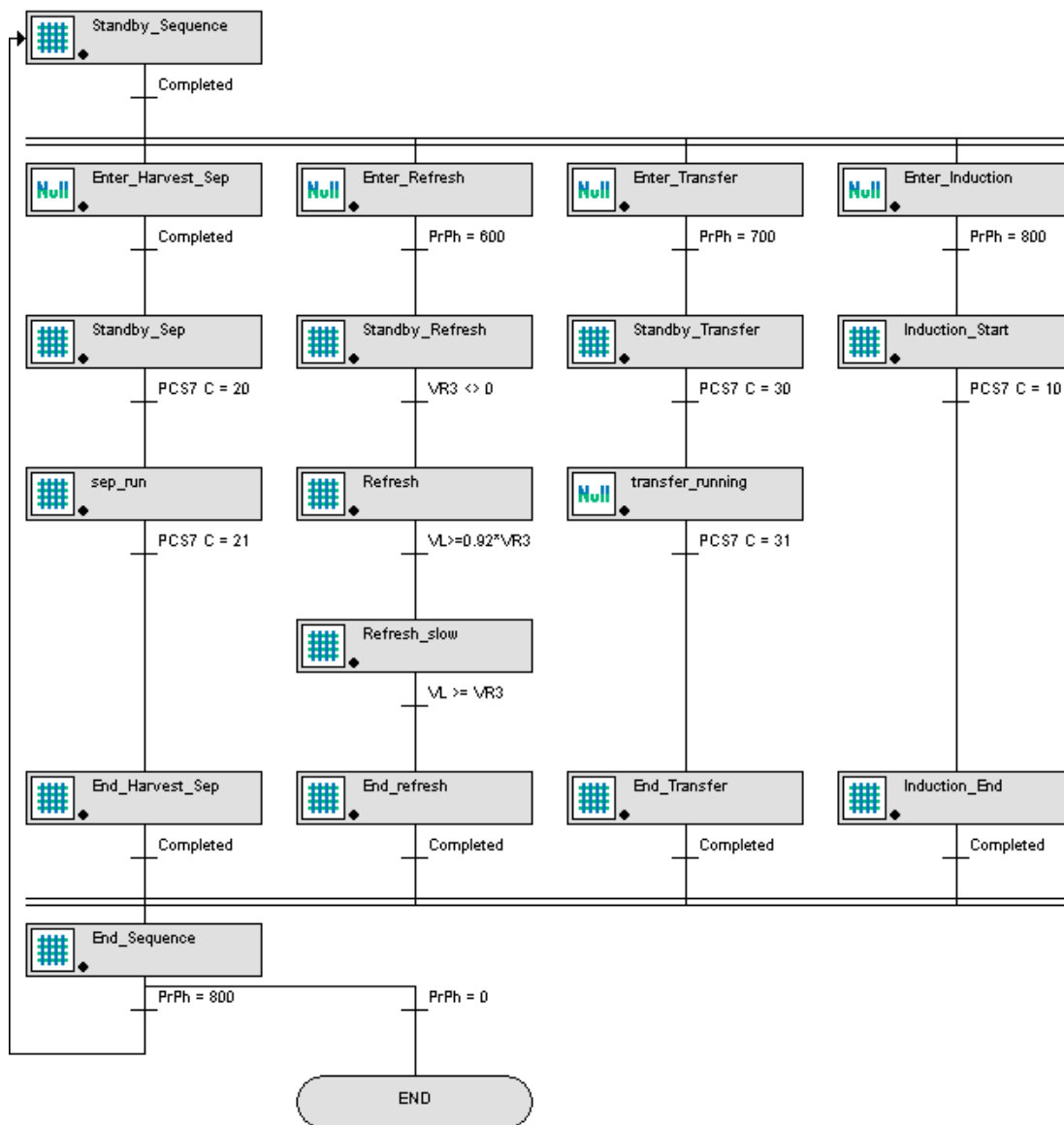


Abb. 6.15: ISA-88 Rezept der Produktionsautomatisierung mit MFCS/win

Nach Abschluss des Transfers wird die Regelung der Temperatur, des pH-Wertes und des pO_2 wieder aktiviert (End_Transfer). Schließlich wird in der vierten Spalte die Regelung der Methanolkonzentration gestartet (Induction_Start) und somit ein neuer Produktionszyklus initiiert.

Die Kombination aus dem industriellen Prozessleitsystem PCS 7 und der ISA-88 Automatisierung in MFCS/win ermöglicht die Realisierung sowie die reproduzierbare Ausführung einer komplexen Prozessführungsstrategie und trägt somit zu einer Steigerung der Prozessausbeute bei. Außerdem ermöglicht diese vollständige Automatisierung die Ermittlung reaktor-spezifischer und reaktionskinetischer Daten (Kapitel 7), die biochemische Optimierung der Enzymproduktion (Kapitel 8) sowie ein Prozessmonitoring über eine multivariate Datenverarbeitung (Kapitel 9).

7 Ermittlung reaktorspezifischer und reaktionskinetischer Daten

7.1 Reaktorspezifische Daten

Die Ermittlung von reaktorspezifischen Daten wird im nachfolgenden Kapitel thematisiert. Diese Daten sind wichtig, um den Kultivierungsprozess zu verfolgen (z. B. anhand der Zelldichte) und um den Metabolismus der Zellen zu verstehen (z. B. anhand des Respiratorischen Quotienten). Außerdem kann mit der Kenntnis von reaktorspezifischen Stoffübergangskoeffizienten und Transferkapazitäten ein Scale-Up bei Bedarf ausgelegt werden.

7.1.1 Trübungsanpassung

In beiden Bioreaktoren werden Sonden eingesetzt, mit denen die Trübung der Kulturbrühe im Nahinfrarot Bereich zwischen 840 und 910 nm gemessen wird [optek-Danulat, 2011]. Da die Trübung hauptsächlich durch die im Medium befindlichen *Pichia pastoris* Zellen beeinflusst wird, kann aus den Messwerten eine Zelldichte berechnet werden.

Die online zur Verfügung stehende Information über die Zelldichte wird in der Automatisierung genutzt. Die Zelldichte im Zellanzuchtprozess wird zur Berechnung des Transferolumens verwendet und die Zelldichte des Produktionsprozesses zur Berechnung des Teilentleerungsintervalls der Separation. Desweiteren kann über die Beobachtung des Verlaufes der Zelldichte eine eventuelle Prozessveränderung erkannt werden.

Der Zusammenhang zwischen der Trübung des Mediums und der darin enthaltenen Zelldichte wird durch eine Näherungsgleichung ausgedrückt [Kaiser, 2010]. Die Zelldichte c_{XLturb} ,

$$c_{XLturb}(t) = a \cdot (e^{b \cdot E_L(t)} - 1), \quad (7.1)$$

wird anhand eines exponentiellen Ansatzes aus der Trübung E_L berechnet. Die notwendigen stamm- und reaktorspezifischen Parameter a und b dazu müssen bestimmt werden. Dies erfolgt über eine Anpassung der aus dem Trübungssignal berechneten Zelldichten an offline gemessenen Werte.

Dazu werden zunächst Startwerte für die Parameter a und b vorgegeben und anschließend diese Parameter mit einem Nelder und Mead Hillclimbing Algorithmus solange variiert, bis der Abstand zwischen der berechneten und der gemessenen Zelldichte minimal ist. Ein Beispiel für eine Anpassung ist in Abb. 7.1 gezeigt.

Es ist zu erkennen, dass die berechnete Zelldichte zeitweise über und unter der gemessenen Zelldichte liegt, im Mittel diese aber gut wiedergibt.

Für den Zellanzuchtprozess wurden aus mehreren *Pichia pastoris* Kultivierungen im BIOSTAT® ED10 die Parameter,

$$a_1 = 2.05 \text{ gl}^{-1} \text{ und } b_1 = 1.005 \text{ AU}^{-1},$$

postexperimentell bestimmt.

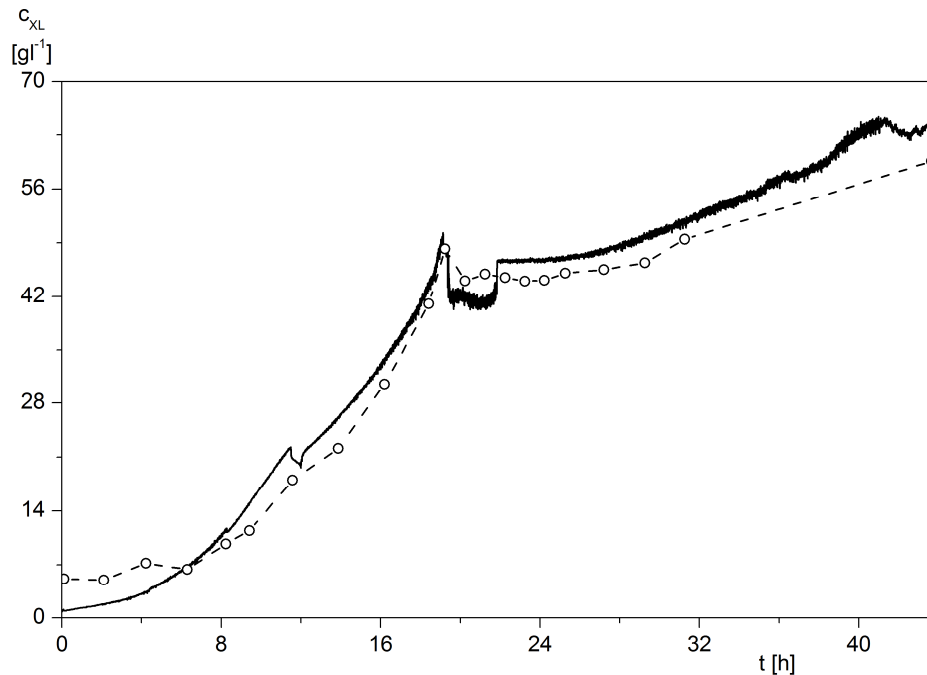


Abb. 7.1: Verlauf der offline bestimmten Zelldichte (Symbol) und der aus dem Trübungssignal berechneten Zelldichte (Linie)

Für den Produktionsprozess wurden aus mehreren *Pichia pastoris* Kultivierungen im BIOSTAT® C30 die Parameter,

$$a_2 = 0.012 \text{ gl}^{-1} \text{ und } b_2 = 3.992 \text{ AU}^{-1},$$

für die Berechnung der Zelldichte bestimmt. Die Parameter sind für beide Reaktoren unterschiedlich, da verschiedene Sondentypen eingesetzt werden und die Reaktorinnengeometrie unterschiedlich ist.

7.1.2 Abgasbilanzierung

In beiden Bioreaktoren werden die Stoffmengenanteile von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in der Abluft gemessen. Mit der Kenntnis der Eingangsstoffmengenanteile kann eine Bilanzierung erstellt werden, wie viel Sauerstoff aufgenommen und wie viel Kohlenstoffdioxid von den Zellen produziert wurde. Das wiederum ermöglicht eine genaue Prozessbeobachtung sowie die Möglichkeit der Beurteilung des Prozesses.

Die Eingangsstoffmengenanteile von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid werden nicht gemessen, sondern berechnet. Dazu wird die Gesamtbeegasungsrate F_{nG} ,

$$F_{nG}(t) = F_{nAIR}(t) + F_{nO_2}(t) + F_{nN_2}(t), \quad (7.2)$$

betrachtet, die sich aus den einzelnen Beegasungsraten für Luft, Sauerstoff und Stickstoff zusammensetzt. Der Eingangsstoffmengenanteile für Sauerstoff $x_{O_{2in}}$,

$$x_{O_{2in}}(t) = \frac{F_{nO_2}(t) + F_{nAIR}(t) \cdot x_{O_{2AIR}}}{F_{nG}(t)}, \quad (7.3)$$

sowie für Kohlenstoffdioxid x_{CGin} ,

$$x_{CGin}(t) = \frac{F_{nAIR}(t) \cdot x_{CAIR}}{F_{nG}(t)}, \quad (7.4)$$

ergeben sich aus den Teilbegasungsraten mit deren jeweiligen Stoffmengenanteilen bezogen auf die Gesamtbegasungsrate.

Mit den Werten der Stoffmengenanteile wird der Respiratorische Quotient RQ,

$$RQ(t) = \frac{-[x_{CGin}(t) \cdot (1 - x_{OG}(t)) - x_{CG}(t) \cdot (1 - x_{OGin}(t))]}{[x_{OGin}(t) \cdot (1 - x_{CG}(t)) - x_{OG}(t) \cdot (1 - x_{CGin}(t))]}, \quad (7.5)$$

berechnet. Der RQ stellt das molare Verhältnis von produziertem Kohlenstoffdioxid zu verbrauchtem Sauerstoff dar und dient zur Beurteilung der metabolischen Aktivität.

Zur Berechnung der O₂-Eintragsrate und CO₂-Austragsrate werden zunächst die maximalen jeweiligen Angebotsraten bestimmt. Die maximale Sauerstoffangebotsrate Q_{O2max} ,

$$Q_{O2max}(t) = \frac{F_{nG}(t) \cdot M_{O2}}{V_{nM} \cdot V_L(t)}, \quad (7.6)$$

sowie die maximale Kohlenstoffdioxidangebotsrate Q_{CO2max} ,

$$Q_{CO2max}(t) = \frac{F_{nG}(t) \cdot M_{CO2}}{V_{nM} \cdot V_L(t)}, \quad (7.7)$$

sind abhängig von der Gesamtbegasungsrate F_{nG} sowie vom Reaktionsvolumen V_L , welches aus dem Reaktorgewicht m_L ermittelt wird.

Schließlich können über die berechneten Stoffmengenanteile von O₂ und CO₂ im Eingang, den gemessenen Stoffmengenanteilen in der Abluft, dem RQ und den maximalen Angebotsraten die Sauerstoffeintragsrate Q_{O2} ,

$$Q_{O2}(t) = Q_{O2max}(t) \cdot \frac{x_{OGin}(t) - x_{OG}(t)}{1 - [1 - RQ(t)] \cdot x_{OG}(t)}, \quad (7.8)$$

und die Kohlenstoffdioxidaustragsrate Q_{CO2} ,

$$Q_{CO2}(t) = Q_{CO2max}(t) \cdot \frac{x_{CG}(t) - x_{CGin}(t)}{1 - [1 - RQ^{-1}(t)] \cdot x_{CG}(t)}, \quad (7.9)$$

berechnet werden.

Die O₂-Eintragsrate und die CO₂-Austragsrate sind neben dem RQ ebenfalls entscheidend für die Beurteilung des Prozesses, da diese Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen zulassen.

7.1.3 Scale-up-Kriterium

Die Bewertung der Skalierbarkeit der industriell ausgerichteten Pilotanlage kann mit reaktor-spezifischen Daten erfolgen. Dazu wird der volumetrische Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ für Sauerstoff sowie die O_2 -Transferkapazität OTC (**o**xxygen **t**ransfer **c**apacity) berechnet. Die OTC ist eine Zusammenfassung des $k_L a$, der Sauerstoffeintragsrate Q_{O_2} und der Sauerstoff-transferrate OTR.

Zunächst erfolgt eine Betrachtung der Sauerstofftransferrate OTR,

$$OTR(t) = k_L a(t) \cdot [c_{OL}^*(t) - c_{OL}(t)], \quad (7.10)$$

die sich aus dem Stoffübergangskoeffizienten und der Differenz der Gleichgewichtskonzentration und Gelöstkonzentration für Sauerstoff ergibt.

Diese Gleichung wird erweitert, sodass die Sauerstofftransferrate,

$$OTR(t) = k_L a(t) \cdot \left(c_{OLmax}(t) \cdot x_{OG}(t) - c_{OL100}(t) \cdot \frac{p_{O_2}(t)}{100\%} \right) \stackrel{!}{=} Q_{O_2}(t), \quad (7.11)$$

über die maximale Gelöstsauerstoffkonzentration c_{OLmax} ,

$$c_{OLmax}(t) = \frac{p_G(t)}{H_{O_2}(t)}, \quad (7.12)$$

und die O_2 -Sättigungskonzentration c_{OL100} ,

$$c_{OL100}(t) = \frac{p_{Gcal} \cdot x_{OGcal}}{H_{O_2}(t)}, \quad (7.13)$$

beschrieben werden kann. Unter der Annahme eines quasi-stationären Zustandes kann in Gl.(7.11) die Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} mit der Sauerstofftransferrate OTR gleichgesetzt werden.

Die maximale Gelöstsauerstoffkonzentration c_{OLmax} sowie die O_2 -Sättigungskonzentration c_{OL100} werden über den Reaktordruck p_G bzw. dem Kalibrierungsdruck p_{Gcal} und dem Henrykoeffizienten H_{O_2} berechnet. Der Henrykoeffizient H_{O_2} ,

$$H_{O_2}(t) = \frac{H_{nO_2}}{1 + \sum_{i=1}^4 K_{iO_2} \cdot \vartheta_L^i(t)}, \quad (7.14)$$

der die Gasaufnahme von Sauerstoff in Wasser wiedergibt, ist abhängig von der Temperatur der Flüssigphase ϑ_L . Gl.(7.14) basiert auf der Umformung des Bunsengesetzes [Luttmann, 2002] und enthält den theoretischen Henrykoeffizienten für O_2 bei $0^\circ C$ unter Normbedingungen,

$$H_{nO_2} = 1.448 \cdot 10^6 \text{ Nmkg}^{-1},$$

sowie die vier Konstanten,

$$\begin{aligned} K_{1O_2} &= -2.723 \cdot 10^{-2} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}, \\ K_{2O_2} &= 5.627 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-2}, \\ K_{3O_2} &= -6.597 \cdot 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-3}, \\ K_{4O_2} &= 3.283 \cdot 10^{-8} \text{ } ^\circ\text{C}^{-4}, \end{aligned}$$

des modifizierten Bunsengesetzes.

Die maximale Sauerstoffeintragsrate OTR_{\max} ,

$$OTR_{\max}(t) = k_L a(t) \cdot c_{OL\max}(t), \quad (7.15)$$

wird aus dem $k_L a$ -Wert und der maximalen Gelöstsauerstoffkonzentration berechnet, bzw. unter Verwendung von Gl.(7.11),

$$OTR_{\max}(t) = \frac{Q_{O_2}(t)}{x_{OG}(t) - \frac{c_{OL100}(t)}{c_{OL\max}(t)} \cdot \frac{pO_2(t)}{100\%}}, \quad (7.16)$$

aus der Sauerstoffaufnahme und dem Sauerstoffpartialdruck pO_2 .

Durch die Umformung von Gl.(7.15) oder Gl.(7.11) kann schließlich der Stoffübergangskoeffizient $k_L a$,

$$k_L a(t) = \frac{OTR_{\max}(t)}{c_{OL\max}(t)} = \frac{Q_{O_2}(t)}{c_{OL\max}(t) \cdot x_{OG}(t) - c_{OL100}(t) \cdot \frac{pO_2(t)}{100\%}}, \quad (7.17)$$

berechnet werden.

Über die maximale Sauerstoffaufnahme OTR_{\max} , der maximalen Sauerstoffangebotsrate $Q_{O_2\max}$ (Gl.(7.6)) sowie dem Stoffmengenanteil von Sauerstoff in der Begasungsluft x_{O_2in} kann die O_2 -Transferkapazität OTC,

$$OTC(t) = \frac{OTR_{\max}(t) \cdot Q_{O_2\max}(t) \cdot x_{OGin}(t)}{OTR_{\max}(t) + Q_{O_2\max}(t)}, \quad (7.18)$$

berechnet werden, die als Scale-up-Kriterium herangezogen werden kann.

Hinsichtlich der industriellen Ausrichtung des Integrierten Bioprozesses wird bei dem Zellanzuchtprozess und dem Produktionsprozess auf eine Anreicherung der Begasungsluft mit reinem Sauerstoff verzichtet. Der O_2 -Stoffmengenanteil der Begasung ist daher als konstant anzusehen.

In Abb. 7.2 sind zwei Zyklen des Zellanzuchtprozesses gezeigt (vergleiche Abb. 5.6). Dort sind die Verläufe der O_2 -Transferkapazität OTC und des Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ zusammen mit der Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} , der Rührerdrehzahl N_{St} und dem Respiratorischen Quotienten RQ dargestellt.

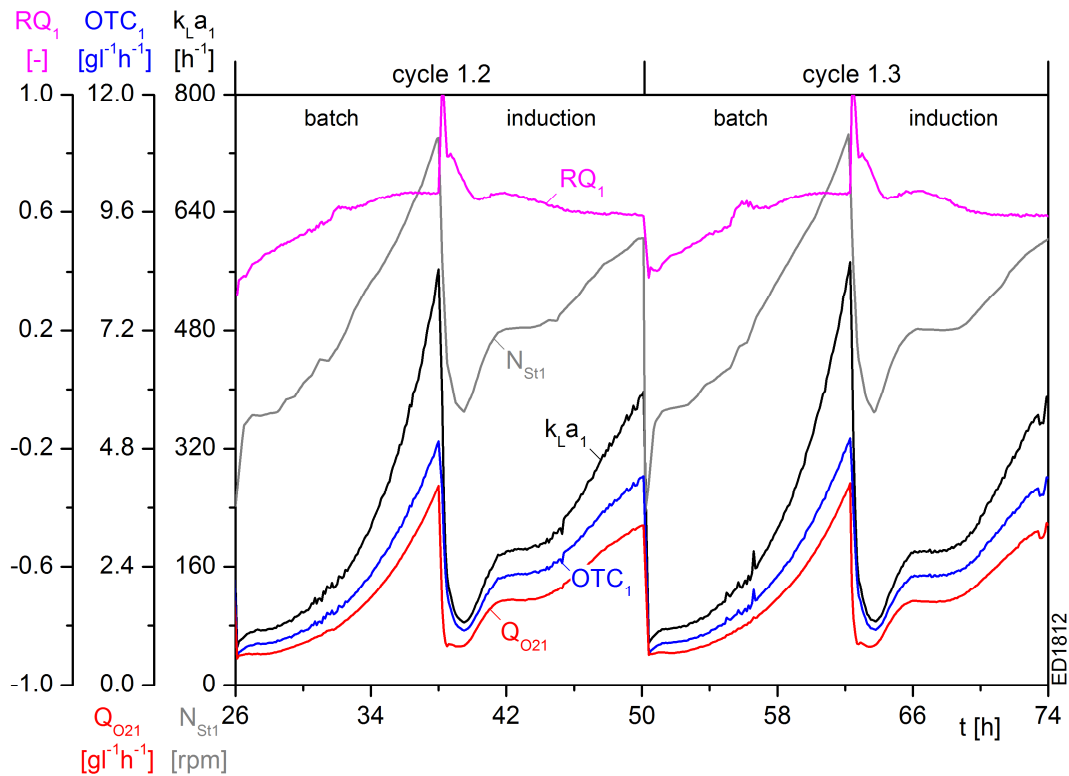


Abb. 7.2: Verlauf der reaktorspezifischen Größen während zwei Zyklen des Zellanzuchtprozesses

Da die Begasungsrate während des Zellanzuchtprozesses konstant gehalten wird und das Volumen nur geringfügig durch die Titration mit Lauge zunimmt, ist die OTC sowie der k_{La} vornehmlich von der Rührerdrehzahl abhängig. Am Ende der Batch-Phase wird die höchste Rührerdrehzahl und damit eine durchschnittliche maximale OTC von $4.9 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ und ein k_{La} Wert von 565 h^{-1} erreicht. Am Ende der Induktionsphase liegt die OTC bei $4.3 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ und der k_{La} bei 395 h^{-1} . Während des Zellanzuchtprozesses liegt die höchste Rührerdrehzahl bei 740 rpm . Das Drehzahlmaximum beträgt allerdings 1500 rpm . Daher könnte eine höhere O_2 -Transferkapazität erreicht werden.

Das Verhältnis der Sauerstoffaufnahme zur Kohlenstoffdioxidproduktionsrate, ausgedrückt im RQ, verändert sich während des Zellanzuchtprozesses. Nach dem Refresh liegt der RQ bei circa 0.4 und nähert sich innerhalb der Batch-Phase auf einen Wert von 0.65 . Nach Beginn der Induktionsphase steigt der RQ zunächst an und verringert sich dann innerhalb von zwei Stunden wieder auf einen Wert von 0.65 . Im weiteren Verlauf der Induktionsphase steigt der RQ nochmals leicht an und fällt dann weiter ab.

Der RQ-Verlauf spiegelt die zellinterne Anpassung von *P. pastoris* auf die Verstoffwechslung von Methanol wider. Die berechneten RQ Werte für die Induktionsphase stimmen mit Angaben von Xie [Xie et al., 2013] überein, der einen RQ von 0.64 beim Wachstum auf Methanol als einzige Kohlenstoffquelle angibt. Die Gruppe von Krainer [Krainer et al., 2012] gibt einen RQ von 0.57 für eine CALB Kultivierung mit *P. pastoris* an. Dieser Wert lag am Ende der Induktionsphase vor.

Die zellinterne Anpassung auf den Methanolstoffwechsel wird auch anhand der Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} deutlich, die in der Induktionsphase zunächst kurz konstant ist, dann zunimmt, erneut konstant verläuft und schließlich langsam weiter zunimmt.

Die Ermittlung reaktorspezifischer Daten wurde ebenfalls für den Produktionsprozess durchgeführt. In Abb. 7.3 sind die Verläufe für zwei Zyklen gezeigt (vergleiche Abb. 5.6).

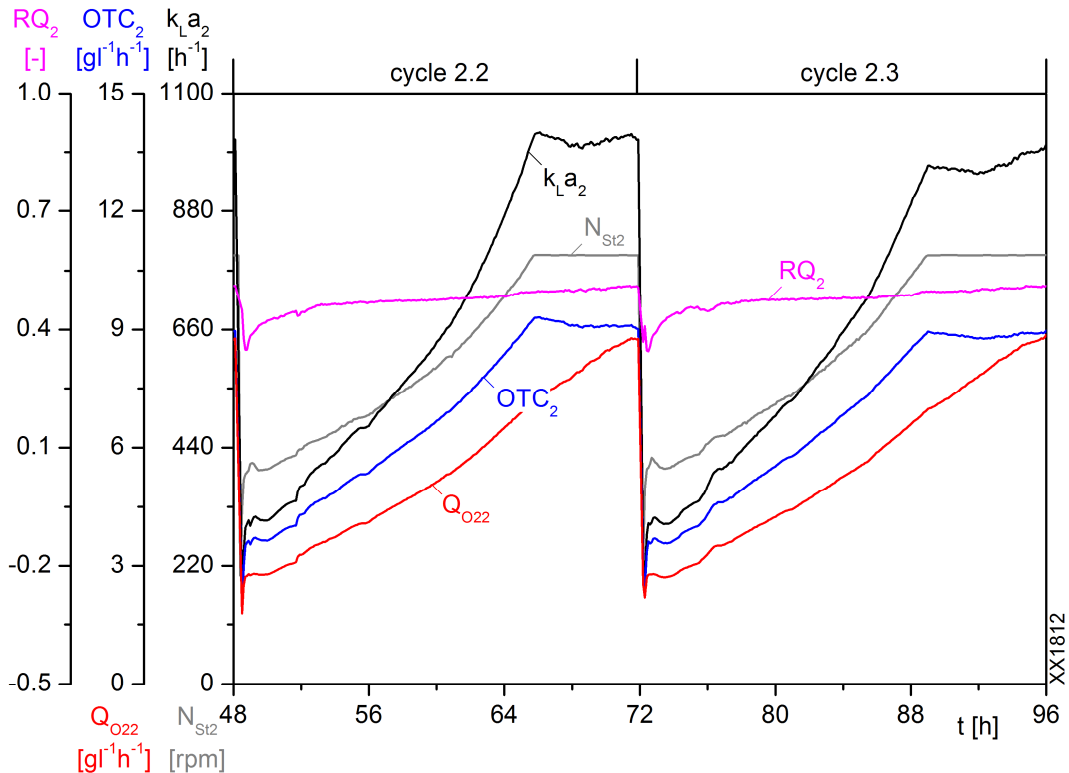


Abb. 7.3: Verlauf der reaktorspezifischen Größen während zwei Zyklen des Produktionsprozesses

Die Q_{O_2} , die OTC sowie der k_{La} steigen im Verlauf des Prozesses zusammen mit der Rührerdrehzahl an. Diese erreicht allerdings circa sechs Stunden vor dem Ende des Produktionsprozesses das Maximum von 800 rpm. Während die Sauerstoffaufnahme weiterhin ansteigt, sinkt die OTC bis zum Prozessende leicht ab. Der k_{La} sinkt zunächst ebenfalls, steigt anschließend aber wieder leicht an.

Beim Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl liegt die OTC durchschnittlich bei $9.1 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ und hätte durch eine reine Sauerstoffbegasung auf maximal $43.3 \text{ gl}^{-1}\text{h}^{-1}$ erhöht werden können. Es werden durchschnittliche k_{La} Höchstwerte von 990 h^{-1} erreicht.

Der RQ steigt während des gesamten Produktionsprozesses von anfänglich 0.4 auf 0.5 an. Der steile Abfall des RQ zu Beginn des Prozesses ist auf die CO_2 -Pufferung des Refreshmediums zurückzuführen. Die im Vergleich zu Krainer [Krainer et al., 2012] und Xie [Xie et al., 2013] niedrigen Werte des RQ in der Produktionsphase lassen vermuten, dass durch den Transfer der Zellen vom Zellanzuchtreaktor in den Produktionsreaktor, verbunden mit der Verdünnung durch Refreshmedium, eine Stoffwechselveränderung stattgefunden hat.

7.2 Reaktionskinetische Daten

Die Ermittlung von reaktionskinetischen Daten wird im nachfolgenden Kapitel thematisiert. Diese Daten sind wichtig, um die zellinternen metabolischen Prozesse innerhalb eines Zyklus sowie über den Verlauf von vielen Zyklen besser zu verstehen.

7.2.1 Dreiphasenmodell

Für eine korrekte Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter wird der Inhalt eines Bioreaktors in ein Dreiphasenmodell gegliedert [Peuker, 2006]. Dieses besteht aus der Gasphase G, der Medienphase M sowie der Biofeuchtphase Z.

Das Flüssigvolumen V_L ,

$$V_L(t) = V_M(t) + V_Z(t), \quad (7.19)$$

kann daher als Summe des Medienvolumens V_M und des Volumens der Zellen V_Z beschrieben werden. Das Biofeuchtvolumen V_Z ,

$$V_Z(t) = \frac{\alpha_{Z/X} \cdot V_L(t) \cdot c_{XL}(t)}{\rho_Z}, \quad (7.20)$$

wird anhand des Gewichtsverhältnisses $\alpha_{Z/X}$ von feuchten zu trockenen Zellen, der Zelldichte c_{XL} sowie der Dichte von feuchten Zellen ρ_Z bestimmt.

Das Medienvolumen V_M ,

$$V_M(t) = V_L(t) \cdot \left[\frac{\rho_Z - \alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t)}{\rho_Z} \right], \quad (7.21)$$

ergibt sich schließlich aus der Umformung der Gln.(7.19) und (7.20).

Der für die Bilanzierung zu berücksichtigende Eintrittsvolumenstrom F_{in} ,

$$F_{in}(t) = F_{R2}(t) + F_{T1}(t) + F_{T2}(t) + F_{AF}(t), \quad (7.22)$$

setzt sich aus der Methanolzufüterraße F_{R2} , den Titrationsraten F_{T1} und F_{T2} sowie der Antischaummittelzugabe F_{AF} zusammen. Eine Zufütterung von Glycerol mit F_{R1} wird im gesamten Upstreamprozess nicht durchgeführt und daher nicht im Eintrittsvolumenstrom berücksichtigt. Eine Zugabe von frischem Medium mit F_{R3} erfolgt nur in der Refresh Phase und wird ebenfalls für die nachfolgende Bilanzierung nicht betrachtet.

Der abfließende Volumenstrom F_{out} ,

$$F_{out}(t) = F_A(t) + F_S(t) + F_H(t), \quad (7.23)$$

beinhaltet den Analysenstrom F_A , die Probenahme F_S und die Ernterate F_H . Im Gegensatz zu F_S und F_H wird über F_A ein zellfreier Volumenanteil aus V_M entnommen. Die Ernterate ist nur in der Transfer- bzw. Harvestphase ungleich null und wird daher nachfolgend nicht betrachtet.

Die durch das Zellwachstum bedingte Volumenverlustrate der Medienphase F_Z ,

$$F_Z(t) = q_{X/X}(t) \cdot V_Z(t), \quad (7.24)$$

ist von der zellspezifischen Wachstumsrate $q_{X/X}$ sowie dem Biofeuchtvolumen V_Z abhängig.

7.2.2 Ermittlung zellspezifischer Reaktionsraten

Nachfolgend werden die Bilanzgleichungen der Zelldichteänderung sowie der beiden Substratkonzentrationsänderungen (Glycerol und Methanol) und der Enzymaktivitätsänderung aufgestellt [Cornelissen, 2004]. Diese bilden die Grundlage zur späteren Berechnung von zellspezifischen reaktionskinetischen Raten.

Die Bilanz der Zelldichte,

$$\dot{c}_{XL}(t) = - \left[\frac{F_{in}(t) - F_A(t)}{V_L(t)} + q_{X/X}(t) \right] \cdot c_{XL}(t), \quad (7.25)$$

beinhaltet neben der zellspezifischen Wachstumsrate $q_{X/X}$ auch die Volumenänderung durch F_{in} und F_A .

Die Bilanzierung des ersten Substrates Glycerol (S1),

$$\begin{aligned} \dot{c}_{SIM}(t) = & - \frac{\rho_Z \cdot F_{in}(t) - \alpha_{Z/X} \cdot q_{X/X}(t) \cdot V_L(t) \cdot c_{XL}(t)}{\rho_Z \cdot V_M(t)} \cdot c_{SIM}(t) \\ & - q_{S1/X}(t) \cdot \frac{V_L(t) \cdot c_{XL}(t)}{V_M(t)}, \end{aligned} \quad (7.26)$$

berücksichtigt die Konzentrationsänderung durch Verdünnung mit F_{in} , die Aufkonzentrierung durch das Zellwachstum sowie die Glycerolaufnahme durch die Zellen.

Die Bilanzierung des zweiten Substrates Methanol (S2),

$$\begin{aligned} \dot{c}_{S2M}(t) = & \frac{F_{R2}(t) \cdot c_{S2R2}}{V_M(t)} - \frac{\rho_Z \cdot F_{in}(t) - \alpha_{Z/X} \cdot q_{X/X}(t) \cdot V_L(t) \cdot c_{XL}(t)}{\rho_Z \cdot V_M(t)} \cdot c_{S2M}(t) \\ & - q_{S2/X}(t) \cdot \frac{V_L(t) \cdot c_{XL}(t)}{V_M(t)} + \frac{\dot{m}_{S2T}(t)}{V_M(t)}, \end{aligned} \quad (7.27)$$

beinhaltet bezogen auf die Glycerolbilanzierung zusätzlich die Methanolzufürrate F_{R2} mit der Reservoirkonzentration c_{S2R2} . Der Methanoltransfer \dot{m}_{S2T} in die Gasphase ermöglicht zwar die Messung der Methanolkonzentration in der Abluft mit einem Flammenionisationsdetektor, kann aber nachfolgend vernachlässigt werden [Cornelissen, 2004].

Die Bilanzierung der volumetrischen Enzymaktivität C_{PlactM} ,

$$\begin{aligned} \dot{C}_{\text{PlactM}}(t) = & -\frac{\rho_Z \cdot F_{\text{in}}(t) - \alpha_{Z/X} \cdot q_{X/X}(t) \cdot V_L(t) \cdot c_{\text{XL}}(t)}{\rho_Z \cdot V_M(t)} \cdot C_{\text{PlactM}}(t) \\ & + Q_{\text{Plact/X}}(t) \cdot \frac{V_L(t) \cdot c_{\text{XL}}(t)}{V_M(t)}, \end{aligned} \quad (7.28)$$

berücksichtigt ebenfalls eine Änderung durch Verdünnung und Zellwachstum. Zudem erhöht sich die volumetrische Enzymaktivität mit der Produktion von Enzymen, wiedergegeben über die zellspezifische Produktaktivitätsbildungsrate $Q_{\text{Plact/X}}$.

Die zeitlichen Ableitungen der Komponenten Zelldichte, Glycerol- und Methanolkonzentration sowie der volumetrischen Enzymaktivität werden über die Bildung des mittleren Differenzenquotienten approximiert. Die Zelldichteänderung,

$$\dot{c}_{\text{XL}}(t_j) = \frac{dc_{\text{XL}}(t_j)}{dt} \approx \frac{c_{\text{XL}}(t_{j+1}) - c_{\text{XL}}(t_{j-1})}{[t_{j+1} - t_{j-1}]}, \quad (7.29)$$

sowie die Änderung der Substratkonzentrationen,

$$\dot{c}_{\text{SIM}}(t_j) = \frac{dc_{\text{SIM}}(t_j)}{dt} \approx \frac{c_{\text{SIM}}(t_{j+1}) - c_{\text{SIM}}(t_{j-1})}{[t_{j+1} - t_{j-1}]}, \quad (7.30)$$

$$\dot{c}_{\text{S2M}}(t_j) = \frac{dc_{\text{S2M}}(t_j)}{dt} \approx \frac{c_{\text{S2M}}(t_{j+1}) - c_{\text{S2M}}(t_{j-1})}{[t_{j+1} - t_{j-1}]}, \quad (7.31)$$

und die Aktivitätsänderung,

$$\dot{C}_{\text{PlactM}}(t_j) = \frac{dC_{\text{PlactM}}(t_j)}{dt} \approx \frac{C_{\text{PlactM}}(t_{j+1}) - C_{\text{PlactM}}(t_{j-1})}{[t_{j+1} - t_{j-1}]}, \quad (7.32)$$

können somit berechnet werden.

Die Volumenströme der Medienkomponenten K ,

$$F_K(t_j) = -\frac{\dot{m}_K(t_j)}{\rho_K} \approx -\frac{m_K(t_{j+1}) - m_K(t_{j-1})}{[t_{j+1} - t_{j-1}] \cdot \rho_K}, \quad (7.33)$$

werden anhand der Waagensignale ebenfalls mit dem mittleren Differenzenquotienten berechnet.

Zur Ermittlung der zellspezifischen Reaktionsraten werden nun die Bilanzgleichungen umgestellt. Zur Bestimmung der Wachstumsrate wird durch die Umformung von Gl.(7.25) die Auswertgleichung,

$$c_{\text{XL}}(t_j) \cdot q_{X/X}(t_j) = \frac{[F_{\text{in}}(t_j) - F_A(t_j)] \cdot c_{\text{XL}}(t_j)}{V_L(t_j)} + \dot{c}_{\text{XL}}(t_j), \quad (7.34)$$

bereitgestellt.

Die Berechnung der mittleren Wachstumsrate $\bar{q}_{X/X}$ über einen definierten Zeitraum erfolgt mit MATLAB. Dazu wird ein Least-Square-Algorithmus eingesetzt. Es werden die Werte der Variablen c_{XL} , F_{in} , F_A , V_L und \dot{c}_{XL} , die zu den auszuwertenden Zeiten j gemessen bzw. berechnet wurden, in die Vektoren \underline{a} und \underline{b} abgelegt. Gl.(7.34) wird somit wie folgt umgeformt,

$$\underline{a} \cdot \bar{q}_{X/X} = \underline{b}, \quad (7.35)$$

und kann im nächsten Schritt gelöst werden.

Die Bestimmung der mittleren Wachstumsrate erfolgt mit MATLAB über die Bildung der Pseudoinversen [Lindfield et al., 2012],

$$\bar{q}_{X/X} = \text{pinv}(\underline{a}) \cdot \underline{b}, \quad (7.36)$$

oder alternativ durch die Verwendung des Backslash-Operators,

$$\bar{q}_{X/X} = \underline{a} \backslash \underline{b}. \quad (7.37)$$

Werden Daten zur Lösung von Gl.(7.34) herangezogen, die während eines unlimitierten Wachstums der Zellen gemessen bzw. berechnet wurden, so ist die mittlere Wachstumsrate $\bar{q}_{X/X}$ in diesem Fall gleich der maximalen Wachstumsrate $q_{X/X \max}$.

Mit diesem Verfahren können auch die weiteren zellspezifischen Reaktionsraten berechnet werden. Die dazu notwendige Auswertgleichung für die zellspezifische Glycerolaufnahmerate,

$$c_{XL}(t_j) \cdot q_{S1/X}(t_j) = - \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot q_{X/X}(t_j) \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot c_{SIM}(t_j) - \frac{\rho_Z - \alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \cdot \dot{c}_{SIM}(t_j), \quad (7.38)$$

wird über Gl.(7.26) hergeleitet.

Die Auswertgleichung für die zellspezifische Methanolaufnahmerate,

$$c_{XL}(t_j) \cdot q_{S2/X}(t_j) = \frac{F_{R2}(t_j) \cdot c_{S2R2}}{V_L(t_j)} - \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot q_{X/X}(t_j) \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot c_{S2M}(t_j) - \frac{\rho_Z - \alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \cdot \dot{c}_{S2M}(t_j), \quad (7.39)$$

wird über Gl.(7.27) hergeleitet.

Und die Auswertgleichung für die zellspezifische Produktaktivitätsbildungsrate,

$$c_{XL}(t_j) \cdot Q_{P_{lact/X}}(t_j) = - \left[\frac{F_{in}(t_j)}{V_L(t_j)} - \frac{\alpha_{Z/X} \cdot q_{X/X}(t_j) \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \right] \cdot C_{P_{lactM}}(t_j) + \frac{\rho_Z - \alpha_{Z/X} \cdot c_{XL}(t_j)}{\rho_Z} \cdot \dot{C}_{P_{lactM}}(t_j), \quad (7.40)$$

wird über Gl.(7.28) hergeleitet.

Die zellspezifische Sauerstoffaufnahme rate,

$$c_{XL}(t_j) \cdot q_{O/X}(t_j) = Q_{O_2}(t_j), \quad (7.41)$$

kann über die Abgasbilanzierung aus Gl.(7.8) berechnet werden.

7.2.3 Untersuchung des Zellanzuchtprozesses

In Abb. 7.4 sind für einen Zyklus des Zellanzuchtprozesses die Verläufe der zellspezifischen Wachstumsrate, der zellspezifischen Glycerolaufnahmerate sowie der zellspezifischen Sauerstoffaufnahme rate neben deren Haupteinflussgrößen gezeigt.

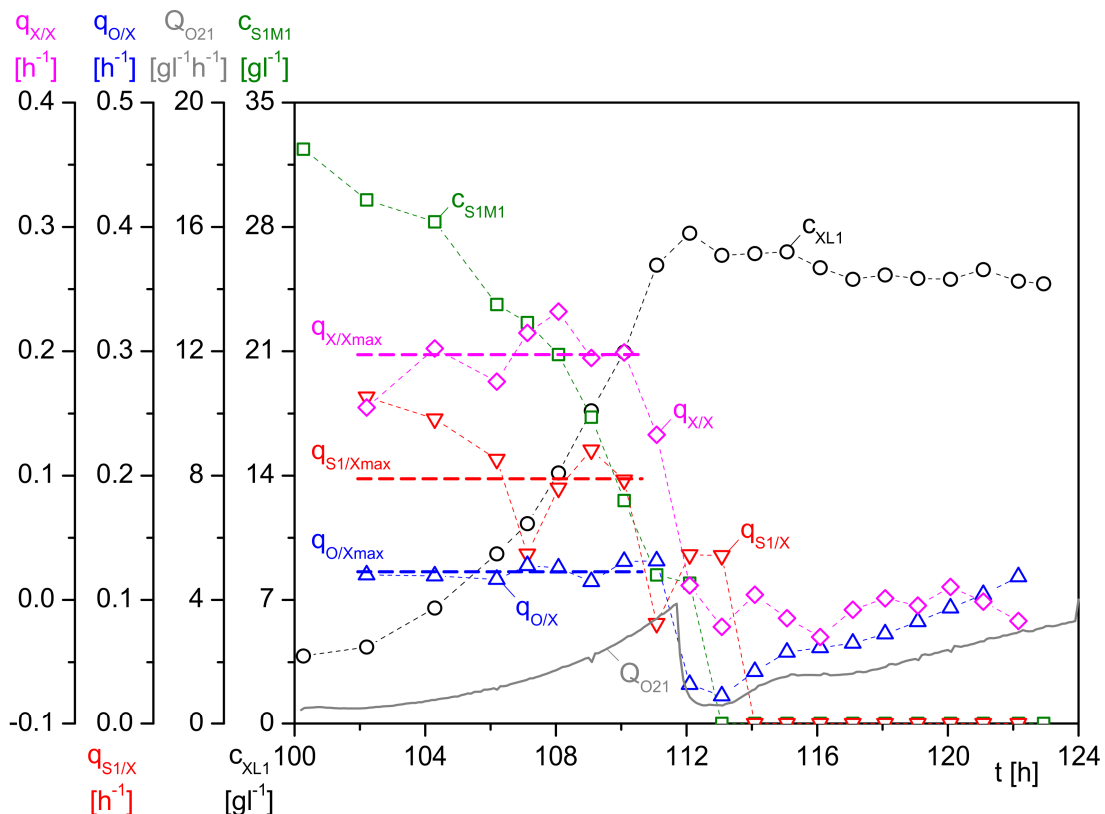


Abb. 7.4: Verlauf der zellspezifischen Reaktionsraten eines Zellanzuchtprozesses

Typisch für den Zellanzuchtprozess steigt die Zelldichte c_{XL} in der Batch Phase zunächst exponentiell an und sinkt in der Induktionsphase wieder leicht ab. Es wurde für die Batch Phase eine Wachstumsrate von circa 0.2 h^{-1} berechnet, die in der Induktionsphase Werte nahe null bzw. teilweise negative Werte annimmt.

Die zellspezifische Glycerolaufnahmerate weist eine starke Streuung in der Batch Phase auf, die auf eine unpräzise Glycerolbestimmung zurückzuführen ist. Die zellspezifische Sauerstoffaufnahmerate ist in der Batch Phase zunächst nahezu konstant bei circa 0.12 h^{-1} . In der Induktionsphase steigt die Rate stetig an und spiegelt somit die Anpassung an das neue Substrat Methanol wider.

Anhand des Verlaufes der Reaktionsraten kann nun ein Bereich festgelegt werden, über den die jeweiligen maximalen Reaktionsraten bestimmt werden sollen.

Aus den zellspezifischen Reaktionsraten werden anschließend die zugehörigen maximalen Ausbeutekoeffizienten,

$$y_{X/I\max} = \frac{q_{IX/X\max}}{q_{I/X\max}}, \quad I = S1, S2, O \quad (7.42)$$

berechnet.

Für den Zellanzuchtprozess standen drei Zyklen zur Verfügung. Diese geringe Anzahl ist darauf zurückzuführen, dass ein Zyklus für eine reaktionskinetische Auswertung häufig (ca. 1x pro Stunde) beprobt werden muss. Damit ist dieser Zyklus nicht mehr mit normalen Zellanzuchtzyklen vergleichbar und eine Auswertung des nachfolgenden Produktionszyklus ist nicht mehr möglich (vgl. Kapitel 8).

In Tab. 7.1 sind die drei, über die beschriebenen Bilanzgleichungen ausgewerteten, verfügbaren Zellanzuchtzyklen gezeigt.

Tab. 7.1: Reaktionskinetische Parameter der Batch Phase des Zellanzuchtprozesses

Zyklus	$q_{X/X\max}$	$q_{S1/X\max}$	$y_{X/S1\max}$	$q_{O/X\max}$	$y_{X/O\max}$
ED3710_4	0.202	0.193	1.046	0.124	1.626
ED3710_5	0.203	0.198	1.025	0.124	1.638
JV4909_N1	0.171	0.241	0.707	0.116	1.472

Zwei Zyklen wurden direkt hintereinander durchgeführt (ED3710_4 und ED3720_5). Die Ergebnisse dieser beiden Zyklen liegen sehr nahe beieinander. Allerdings weichen beim dritten untersuchten Zyklus JV4909_N1 die Werte der maximalen zellspezifischen Wachstumsrate und der maximalen zellspezifischen Glycerolaufnahmerate eindeutig von den anderen Werten ab. Es wurde eine niedrigere Wachstumsrate aber eine höhere Glycerolaufnahmerate berechnet. Aufgrund der geringen Anzahl an zur Verfügung stehenden Zyklen erfolgt keine Mittelwertbildung der maximalen zellspezifischen Reaktionsraten und auch keine Auswertung bzw. Interpretation der Ergebnisse.

7.2.4 Untersuchung des Produktionsprozesses

Der Produktionsprozess wurde ebenfalls hinsichtlich der reaktionskinetischen Daten untersucht. In Abb. 7.5 sind exemplarisch die Reaktionsraten von drei Zyklen gezeigt.

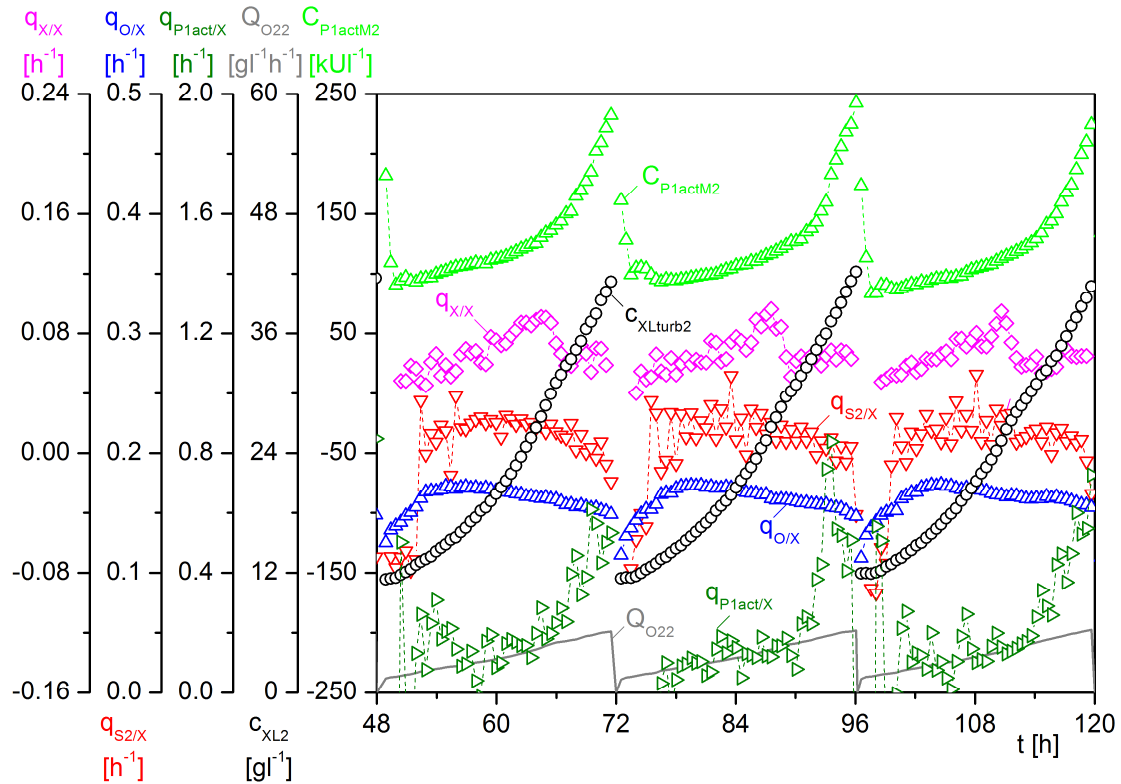


Abb. 7.5: Verlauf der zellspezifischen Reaktionsraten von drei Produktionszyklen

Für diese Zyklen lag eine atline bestimmte Enzymaktivität vor. Auf die Messzeitpunkte der Analyseergebnisse wurden die Zelldichte, das Reaktionsvolumen, die Methanolzufüterraterate, die Sauerstoffaufnahme sowie die Methanolkonzentration interpoliert. Die Rekonstruktion der Verläufe der Reaktionsdaten sowie die Bestimmung der durchschnittlichen Raten erfolgten ebenfalls mit der Software MATLAB.

Die zellspezifische Wachstumsrate $q_{X/X}$ steigt im Verlauf eines Produktionszyklus zunächst leicht an, fällt aber nach circa zwei Drittel der Zykluszeit wieder ab und bleibt dann nahezu konstant. Zusammen mit der Verringerung der Wachstumsrate steigt die Produktaktivitätsbildungsrate $q_{P_{act}/X}$ nach einem eher konstanten Verlauf deutlich an. Dies ist auch an dem Verlauf der volumetrischen Enzymaktivität $C_{P_{act}M}$ zu erkennen. Eine Erklärung dieses Verhaltens wurde nicht gefunden.

Die zellspezifische Sauerstoffaufnahme $q_{O/X}$ steigt in den ersten fünf Stunden des Zyklus zunächst an und fällt dann im Verlauf der restlichen Produktionszeit wieder langsam ab. Dieses Profil ist ansatzweise auch in dem Verlauf der zellspezifischen Methanolaufnahmerate $q_{S2/X}$ zu erkennen. Allerdings wird das Maximum der Rate erst nach der Hälfte der Zykluszeit erreicht.

Die durchschnittlichen Raten pro Zyklus wurden mit einem Least-Square-Verfahren bestimmt. Insgesamt standen sechs Zyklen zur Verfügung, deren zellspezifischen durchschnittlichen Reaktionsraten in Tab. 7.2 aufgelistet sind.

Tab. 7.2: Reaktionskinetische Parameter des Produktionsprozesses

	$q_{X/X}$	$q_{S_2/X}$	y_{X/S_2}	$q_{O/X}$	$y_{X/O}$	$q_{P_{\text{act}}/X}$
XX1812_2	0.070	0.218	0.324	0.163	0.433	0.389
XX1812_3	0.070	0.214	0.328	0.160	0.438	0.305
XX1812_4	0.068	0.213	0.320	0.160	0.426	0.302
XX1812_5	0.066	0.216	0.306	0.163	0.404	0.289
XX1812_6	0.065	0.207	0.312	0.155	0.415	0.231
XX1812_7	0.061	0.199	0.306	0.151	0.403	0.183
Mittelwert	0.067	0.211	0.316	0.159	0.420	---

Anhand aller zellspezifischen Reaktionsraten ist eine Verringerung der jeweiligen Werte mit der zunehmenden Anzahl an Produktionszyklen zu erkennen. Dies lässt auf eine Alterung der Zellen schließen. Eine Kultivierung über mehr als sechs Tage ist anhand dieser Daten nicht zu empfehlen. Die Ursache für diese Zellalterung ist spekulativ aber vermutlich in dem Zellanzuchtprozess begründet. Es kann mit dem wiederholten Wechsel der Substrate in der Zellanzucht und der damit verbundenen metabolischen Umstellung des Substratstoffwechsels zusammenhängen.

Der deutliche Abfall der Produktaktivitätsbildungsrate ist mit der Methode der zellfreien Probenahme zu erklären. Die eingesetzte Filtrationssonde (siehe Kapitel 4.3) unterliegt einem Membranfouling, sodass die Mikrofiltration der Kulturbrühe mit zunehmender Kultivierungsdauer zu einer Ultrafiltration wird und somit Proteine an der Membran zurückgehalten werden. Ein Mittelwert der Produktaktivitätsbildungsrate wurde daher nicht berechnet. Es ist zu vermuten, dass die Verringerung der Produktaktivitätsbildungsrate tatsächlich analog der Wachstumsrate erfolgt.

Zur Durchführung der sequentiell/parallelen Produktionsstrategie über mehrere Wochen muss die Zellalterung minimiert werden. Dabei sollte auch über grundlegend andere Prozessführungsstrategien nachgedacht werden, wie der weiteren verfahrenstechnischen Trennung von Zellmassegenerierung mit Glycerol und der Vorinduktion mit Methanol.

Abschließend ist festzuhalten, dass hinsichtlich einer Produktionssteigerung durch ein Scale-Up Voraussetzungen und Strategien basierend auf den reaktorspezifischen und reaktionskinetischen Daten des Zellanzucht- und Produktionsprozesses berechnet bzw. geplant werden können. Die Erhöhung der Produktivität, also der Ausbeute an Enzymen am Ende des Produktionsprozesses, kann aber auch durch eine Anpassung der Reaktionsbedingungen hinsichtlich einer Erhöhung der Produktaktivitätsbildungsrate erfolgen. Dies wird im nachfolgenden Kapitel thematisiert.

8 Optimierung der Enzymproduktion

8.1 Einleitung

Neben einer verfahrenstechnischen Optimierung über die Automatisierung des Prozesses kann auch eine biochemische Optimierung durchgeführt werden. Dazu werden die Prozessbedingungen angepasst, damit zum einen mehr Zielprodukt gebildet und ausgeschleust und zum anderen weniger Zielprodukt während des Prozesses abgebaut wird.

Das ein biochemisches Optimierungspotential in der Enzymproduktion vorhanden ist, wird in Abb. 8.1 deutlich. Dort sind zwei Zyklen übereinander dargestellt, bei denen ein unterschiedlicher pH-Sollwert eingestellt wurde.

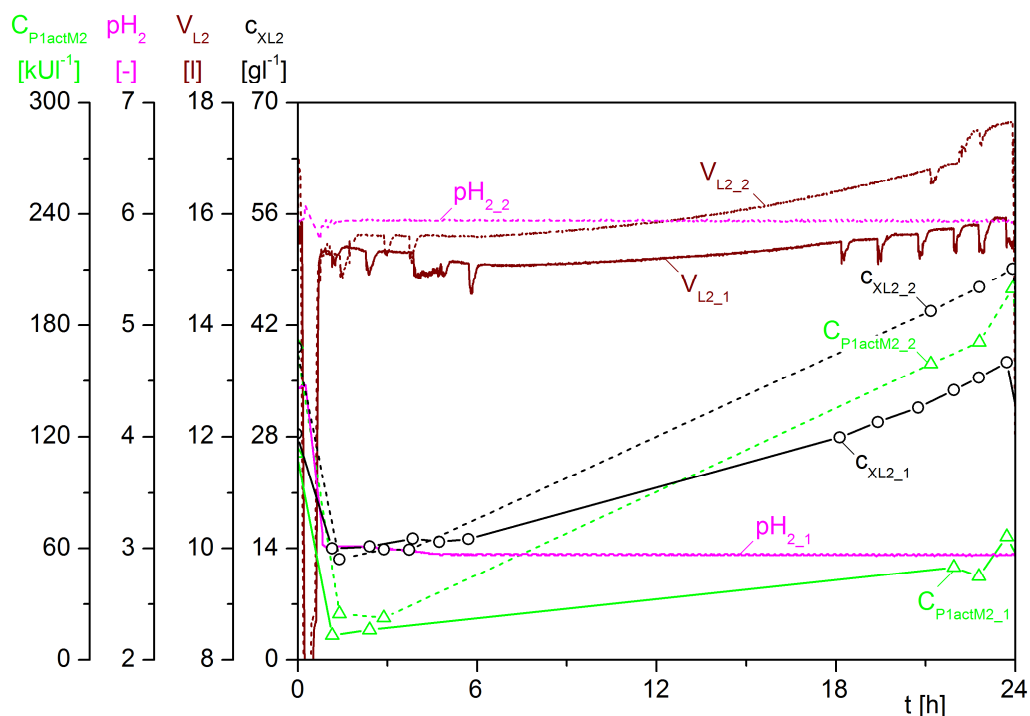


Abb. 8.1: Kultivierungsplot von zwei übereinander gelegten Zyklen der Produktion mit unterschiedlichen pH Sollwerten

Es ist deutlich zu erkennen, dass am Ende der Zyklen die Zielproduktaktivität, die Zelldichte sowie das Volumen unterschiedlich hoch sind. Durch die Erhöhung des pH-Wertes von 3 auf 6 wurde die Produktivität hinsichtlich der Enzymaktivität erhöht.

Dass weitere Veränderungen von Kultivierungsbedingungen ebenfalls einen Einfluss auf die finale Enzymaktivität haben können, ist zu vermuten. Daher ist es das Ziel bei der Optimierung der Enzymproduktion zunächst die Einflussfaktoren zu ermitteln und im Anschluss daran die optimalen Einstellungen für eine maximale Produktivität zu finden.

Dabei kann wie in Abb. 8.1 gezeigt, ein Sollwert eines Parameters für die Dauer eines Zyklus geändert und im Anschluss mit einem anderen Zyklus verglichen werden. Dies entspräche

dem klassischen „Ändere ein Faktor pro Zeit“ Prinzip (COST principle). Dieses Verfahren kann bei mehreren potentiellen Einflussfaktoren aber sehr zeitintensiv sein. Aufgrund von möglichen Wechselwirkungen zwischen den Faktoren besteht zudem die Möglichkeit, dass nur ein lokales Optimum oder kein Optimum gefunden wird [Czitrom, 1999; Eriksson et al., 2008].

Es besteht die Alternative, die Optimierungsexperimente in einem kleineren Maßstab durchzuführen, z. B. in Schüttelkolben. Allerdings ist diese Option hinsichtlich der zumeist fehlenden Möglichkeit der Regelung von Kultivierungsbedingungen, z. B. Substratkonzentration, nur sehr bedingt geeignet.

Eine maßstabsgetreue Optimierung mit vergleichbar wenigen Experimenten bietet die Methode der Statistischen Versuchsplanung (engl. **Design of Experiments**, DoE). Diese basiert auf einer Modellierung der zu optimierenden Größe in Bezug zu den veränderten Kultivierungsbedingungen. Dabei werden pro Zyklus alle untersuchten Parameter gleichzeitig variiert und deren Einfluss im Anschluss bestimmt.

Bei der Methode der Statistischen Versuchsplanung wird zu Anfang ein zu optimierendes System definiert, welches Eingänge (Faktoren) und Ausgänge (Antworten) besitzt. Allgemein ausgedrückt ist das Ziel der Optimierung, Werte für den Eingang zu finden, welche ein optimales Ergebnis am Ausgang erzeugen [Haaland, 1989]. Das Ergebnis kann dabei ein Minimum oder Maximum sein.

Die Optimierung von Kultivierungsbedingungen wird häufig in Bezug auf eine Maximierung der Produktivität durchgeführt. Beispielsweise optimierte Pereira die Bio-Ethanol Ausbeute bei der Fermentation von brasilianischem Zuckerrohr mit *Saccharomyces cerevisiae* über die Zusammensetzung des Mediums [Pereira et al., 2010]. Ghosalkar optimierte die Medienzusammensetzung für Kultivierungen mit *Pichia pastoris* hinsichtlich der Biomasse Produktion [Ghosalkar et al., 2008]. Lin optimierte die Produktion von Fusionsproteinen in Fed-Batch Kultivierungen mit *P. pastoris* u. a. über die Identifizierung des optimalen pH-Wertes und der optimalen Kultivierungstemperatur [Lin et al., 2007].

Die Vorbereitung und Auswertung der Optimierung wurde mit der Software MODDE (Version 9.0) der Firma MKS Umetrics AB, Schweden durchgeführt [Eriksson et al., 2008].

MODDE hilft in der Versuchsvorbereitung bei der Auslegung des Versuchsraumes in Abhängigkeit von der Fragestellung und den zu untersuchenden Parametern. In der Versuchsnachbereitung bzw. Auswertung, wenn vom Benutzer die Ergebnisse der Experimente in die Software eingetragen wurden, berechnet MODDE je nach Fragestellung eine Lösungsgleichung. Mit dieser erfolgt eine Annäherung des Verhaltens der Antwort zu den experimentell bestimmten Daten. Schließlich kann über graphische Illustrationen ein Optimum abgelesen oder aus der Modellgleichung berechnet werden.

Zusätzlich hilft ein Wizard, also ein in der Software hinterlegtes Hilfsprogramm, bei der Auswahl der am besten geeigneten Versuchsdesigns und auch bei der Auswertung der Daten. Mit Hilfe der Software MODDE kann der Anwender auch ohne mathematisches Verständnis der

zu Grunde liegenden Algorithmen der Statistischen Versuchsplanung einen Prozess optimieren.

Für die Optimierung der Enzymproduktion wurden drei reaktionsspezifische Parameter ausgewählt. Diese Faktoren waren der pH-Wert, die Kultivierungstemperatur sowie die Methanolkonzentration. Eine Veränderung der Parameter beeinflusst hauptsächlich zellinterne Abläufe, wobei eine Steigerung der Expression und/oder eine Erhöhung der Produktaus-schleusungsrate erreicht werden kann. Eine höhere Produktkonzentration kann aber auch auf eine Verringerung des zellinternen oder -externen Produktabbaus zurückgeführt werden.

Als Antwort bzw. als Gütekriterium wird für jeden Zyklus k eine Produktivität PRD ,

$$PRD_k = \frac{V_M(t_{k+1}) \cdot C_{P_{lactM}}(t_{k+1})}{V_L(t_{k+1}) \cdot [t_{k+1} - t_k]}, \quad (8.1)$$

definiert, bei der t_k für den Anfang und t_{k+1} für den Endzeitpunkt eines Zyklus steht. Die Produktivität ergibt sich aus dem Produkt des Medienvolumens V_M mit der volumetrischen Enzymaktivität $C_{P_{lactM}}$ am Ende des Zyklus, dividiert durch das Gesamtvolumen V_L und die Dauer des Zyklus. Mit diesem Gütekriterium kann somit jeder Zyklus im Anschluss an das jeweilige Optimierungsexperiment bewertet werden.

Das Prinzip des zweistufigen Upstreams eignet sich hervorragend für Optimierungsexperimente. Dazu wurden die Bedingungen im Zellanzuchtprozess konstant gehalten und die drei genannten Faktoren nur im Produktionsprozess variiert. Jeder Zyklus im Produktionsreaktor begann daher mit identischen Anfangsbedingungen.

Vor dem Ziel, die Antwort zu maximieren, steht die Identifizierung relevanter Prozessgrößen, die einen signifikant messbaren Einfluss auf die Antwort ausüben. Dies wird als Screening bezeichnet, also der Suche nach Einflussfaktoren. Erst nach dem Screening, wenn die signifikanten Faktoren ermittelt wurden, werden die zur Maximierung von y einzustellenden Werte für x_1 bis x_3 gesucht. Dies stellt dann die eigentliche Optimierung dar.

Der Versuchsraum anhand der drei Faktoren, in dem das Optimum gesucht wurde, ist in Abb. 8.2 dargestellt.

Der pH-Wert wurde zwischen 3 und 6, die Kultivierungstemperatur ϑ_L zwischen 16°C und 21°C und die Methanolkonzentration $c_{S_{2M}}$ zwischen 0.2 gl^{-1} und 1.4 gl^{-1} variiert. Ein pH-Wert von 3 war ein empfehlender Ausgangswert laut Cregg [Cregg, 2007]. Oberhalb pH 6 kommt es zu Ausfällungen des Mediums. 16°C beträgt die minimal mögliche Kultivierungstemperatur. Das Optimum der Kultivierungstemperatur ist unterhalb von 21°C zu suchen [Loegering et al., 2010]. Die minimale messtechnische Quantifizierung der Methanolkonzentration liegt bei 0.2 gl^{-1} . Die Festlegung des oberen Grenzwertes von 1.4 gl^{-1} Methanol beruht auf Erfahrungswerten.

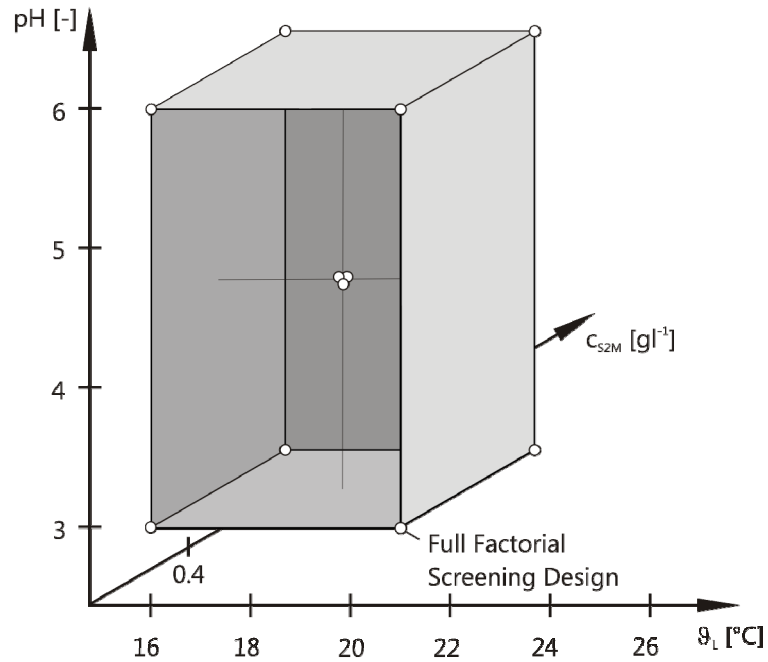


Abb. 8.2: Versuchsraum aus den drei Faktoren pH, ϑ_L und c_{S2M} , in dem das Optimum gesucht wurde

Für eine mathematische Auswertung der Optimierungsexperimente müssen die Faktoren zunächst normiert werden. Dabei wird der Wertebereich eines Faktors von min bis max definiert (z. B. $pH_{\min} = 3$ bis $pH_{\max} = 6$) und der Mittelwert mit dem Index 0 gekennzeichnet (z. B. $pH_0 = 4.5$).

Die normierten Faktoren werden als x_i ,

$$x_1 = \frac{pH - pH_0}{pH_0 - pH_{\min}}, \quad (8.2)$$

$$x_2 = \frac{c_{S2M} - c_{S2M0}}{c_{S2M0} - c_{S2M\min}}, \quad (8.3)$$

$$x_3 = \frac{\vartheta_L - \vartheta_{L0}}{\vartheta_{L0} - \vartheta_{L\min}}, \quad (8.4)$$

bezeichnet und besitzen einen Wertebereich zwischen -1 und 1.

Die Antwort PRD wird allgemein als y ,

$$y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + a_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + a_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + a_{11} \cdot x_1^2 + a_{22} \cdot x_2^2 + a_{33} \cdot x_3^2, \quad (8.5)$$

bezeichnet und kann über eine allgemeine Formel zur Beschreibung des Systemverhaltens bestimmt werden. Diese Formel beinhaltet eine Konstante a_0 , Koeffizienten für das lineare Antwortverhalten a_1 bis a_3 , Koeffizienten für ein Interaktionsverhalten a_{12} , a_{23} und a_{13} sowie Koeffizienten für quadratisches Antwortverhalten a_{11} , a_{22} und a_{33} .

Mit den Optimierungsexperimenten, in denen jeweils mit zuvor festgelegten Werten für x eine Antwort y erzeugt wurde, können die Koeffizienten berechnet werden. Mit der Kenntnis der

Koeffizienten können schließlich Werte für x_1 bis x_3 gefunden werden, bei denen y ein Maximum annimmt. Die Bestimmung eines Koeffizienten erfordert allerdings mindestens ein Experiment. Um den experimentellen Aufwand in Abhängigkeit der Zielsetzung zu stellen, kann die Formel zur Beschreibung der Antwort (vgl. Gl.(8.5)) gekürzt werden.

8.2 Screening

Das Ziel des Screenings war die Überprüfung der drei Faktoren auf ihre Signifikanz hinsichtlich der Beeinflussung der definierten Antwort. Die Formel zur Beschreibung der Antwort y ,

$$y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + a_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + a_{13} \cdot x_1 \cdot x_3, \quad (8.6)$$

wurde entsprechend angepasst, indem die Koeffizienten zur Beschreibung eines quadratischen Verhaltens entfernt wurden. Mit dieser Formel kann also kein Optimum identifiziert sondern nur der Einfluss der Faktoren auf die Antwort bestimmt werden. Der Vorteil liegt darin, dass weniger Experimente notwendig sind.

Es wurde eine Kultivierung durchgeführt, bei der pro Zyklus die drei Faktoren gemäß dem in Abb. 8.2 gezeigten Versuchsraum variiert wurden. Dazu wurde ein vollfaktorielles (full factorial) Design verwendet. Dieses Design beinhaltet jeweils ein Experiment an jedem Eckpunkt des Versuchsraumes. Bei drei Faktoren ergibt dies acht Experimente. Zusätzlich wurden vier Center Point Experimente in der Mitte des Versuchsraumes (pH_0 , c_{S2M0} , ϑ_{L0}) projiziert. Insgesamt war somit die Durchführung von zwölf Zyklen notwendig.

Die Kultivierung, die die Zyklen für das Screening enthält ist in Abb. 8.3 dargestellt.

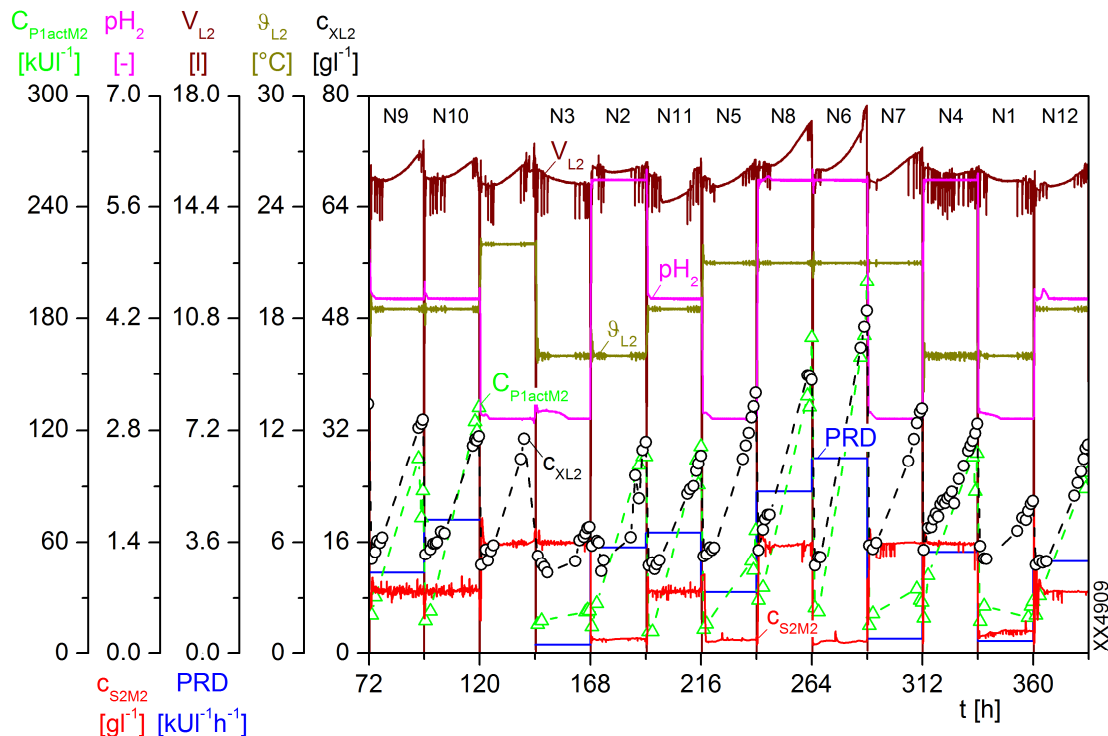


Abb. 8.3: Kultivierungsplot der zwölf Zyklen als Screening-Experimente

Die drei Faktoren pH, ϑ_L und c_{S2M} sind in dieser Abbildung zusammen mit der Produktivität PRD pro Zyklus gezeigt. Zusätzlich sind die zur Berechnung der Produktivität notwendigen Parameter Zelldichte c_{XL} , Reaktorvolumen V_L und die Enzymaktivität C_{P1actM} dargestellt. In einem Zyklus fehlt die Produktivität (120 bis 144 h), da in diesem Zyklus fälschlicherweise eine zu hohe Temperatur eingestellt wurde.

Anhand der Variation der Produktivität pro Zyklus ist bereits zu erkennen, dass mindestens ein Faktor einen signifikanten Einfluss auf die Antwort ausübt. Die Ergebnisse der Versuchsdurchführung sind in Tab. 8.1 gezeigt.

Tab. 8.1: Faktorsollwerte und deren normierte Form (in Klammern) des Screenings pro Zyklus mit der dazugehörigen Antwort

Experiment	Faktoren			PRD [kUL ⁻¹ h ⁻¹]
	pH [-]	c_{S2M} [gl ⁻¹]	ϑ_L [°C]	
N1	3.0 (-1)	0.2 (-1)	16.0 (-1)	0.42
N5	3.0 (-1)	0.2 (-1)	21.0 (+1)	2.04
N3	3.0 (-1)	1.4 (+1)	16.0 (-1)	0.31
N7	3.0 (-1)	1.4 (+1)	21.0 (+1)	0.51
N2	6.0 (+1)	0.2 (-1)	16.0 (-1)	3.50
N6	6.0 (+1)	0.2 (-1)	21.0 (+1)	6.55
N4	6.0 (+1)	1.4 (+1)	16.0 (-1)	3.37
N8	6.0 (+1)	1.4 (+1)	21.0 (+1)	5.39
N10 (CP)	4.5 (0)	0.8 (0)	18.5 (0)	4.42
N11 (CP)	4.5 (0)	0.8 (0)	18.5 (0)	3.98
N12 (CP)	4.5 (0)	0.8 (0)	18.5 (0)	3.05
N9 (CP)	4.5 (0)	0.8 (0)	18.5 (0)	2.69

Aus den ersten acht Experimenten (ohne die Center Points) können nun mit dem jeweiligen Wert für PRD die Koeffizienten berechnet werden. Zunächst wird eine Matrix X,

$$X = \begin{pmatrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & +1 \\ -1 & +1 & -1 \\ -1 & +1 & +1 \\ +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 \end{pmatrix}, \quad (8.7)$$

aufgestellt, die die normierten Faktoreinstellungen (vgl. Tab. 8.1) enthält.

Dann werden die Ergebnisse der jeweiligen Experimente in dem Vektor y ,

$$y = \begin{pmatrix} 0.42 \\ 2.04 \\ 0.31 \\ 0.51 \\ 3.50 \\ 6.55 \\ 3.37 \\ 5.39 \end{pmatrix}, \quad (8.8)$$

zusammengefasst.

Die Berechnung der Koeffizienten erfolgt mit dem Verfahren der Multiple Linear Regression (MLR). Die Voraussetzung zur Durchführung einer MLR ist, dass alle Faktoren orthogonal zueinander stehen müssen [Wold et al., 1984]. Dies ist durch das Versuchsdesign gegeben. Die MLR stellt einen linearen Zusammenhang,

$$y = X \cdot a + E, \quad (8.9)$$

zwischen der Matrix X und dem Antwortvektor y her. In dem Vektor a sind die Regressionskoeffizienten und in der Matrix E die Residuen enthalten. Die Residuen sind diejenigen Werte, die durch die Modellbildung nicht abgebildet werden können.

Da neben den linearen Koeffizienten auch die Konstante sowie Interaktionskoeffizienten berechnet werden sollen, muss die Matrix X entsprechend erweitert werden. Die erweiterte Matrix X ist in Tab. 8.2 gezeigt.

Tab. 8.2: Erweiterte Matrix X zur Berechnung einer Konstanten (1. Spalte), linearen Koeffizienten (2.-4. Spalte) und Interaktionskoeffizienten (5.-7. Spalte)

Konstante	x_1	x_2	x_3	$x_1 \cdot x_2$	$x_1 \cdot x_3$	$x_2 \cdot x_3$
+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1
+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Da die Matrix X nun sieben Spalten breit ist, werden bei der Durchführung der MLR sieben Werte für den Vektor a ermittelt, die der Konstanten, drei linearen Koeffizienten sowie drei Interaktionskoeffizienten entsprechen.

Die verwendete Software MODDE verwendet die Singulärwertzerlegung, SVD (singular value decomposition) zur Berechnung der Regressionskoeffizienten in a [Eriksson et al., 2008].

Dazu wird die Matrix X ,

$$X = U \cdot S \cdot V^T, \quad (8.10)$$

in zwei orthonomale Matrizen U und V zerlegt, die über eine Diagonalmatrix der Singulärwerte S verknüpft sind. Diese werden verwendet, um die pseudoinverse Matrix (Moore-Penrose-Matrix) X^+ ,

$$X^+ = V \cdot \left(\text{diag} \left(\frac{1}{s_{ij}} \right) \cdot U^T \right), \quad (8.11)$$

und schließlich die Regressionskoeffizienten in a ,

$$a = X^+ \cdot y, \quad (8.12)$$

zu berechnen [Otto, 1997].

Weiterführende Informationen zur Singulärwertzerlegung sind in [Golub et al., 1996], [Strang, 1988] und [Press et al., 2007] zu finden.

Zur Beurteilung des Modells wird eine Varianzanalyse bzw. ANOVA (**analysis of variance**) durchgeführt. Dazu werden nachfolgende Quadratsummen berechnet [Eriksson et al., 2008]. Vor der Durchführung der Varianzanalyse wird eine Nullhypothese aufgestellt: *Der Zusammenhang zwischen X und y ist rein zufällig*. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Hypothese zutrifft, muss per Definition geringer als 5 % sein, damit das Modell als gültig anerkannt werden kann.

Zur Überprüfung der Nullhypothese wird das Verhältnis der mittleren Varianz der Regression zu den Residuen einem F-Test unterzogen,

$$F_{\text{regr}} = \frac{MS_{\text{regr}}}{MS_{\text{resid}}}, \quad (8.13)$$

um zu bestimmen, ob die Varianzen von derselben Verteilung stammen. Anhand der Verteilungsfunktion [Wilrich et al., 1987], dem Integral der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, wird die Wahrscheinlichkeit p_{regr} bestimmt, zu der dies zutrifft. Diese Wahrscheinlichkeit muss unter 0.05 bzw. 5 % liegen, um die Nullhypothese zu verwerfen.

Die mittleren Varianzen (MS, **mean square**),

$$MS_{\text{regr}} = \frac{SS_{\text{regr}}}{(G-1)}, \quad (8.14)$$

und

$$MS_{\text{resid}} = \frac{SS_{\text{resid}}}{(N-G)}, \quad (8.15)$$

ergeben sich aus den Varianzen der Regression (SS, **sum of squares; regression**) und der Residuen (**residuals**) durch eine Korrektur um die Freiheitsgrade. N ist dabei die Länge des

Antwortvektors, in diesem Fall acht. G ist die Anzahl an Regressionskoeffizienten, in diesem Fall sieben.

Zudem wird die um einen Mittelwertabzug korrigierte Gesamtvarianz $SS_{\text{tot.corr.}}$,

$$SS_{\text{tot.corr.}} = \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2, \quad (8.16)$$

berechnet (**total corrected**). Die mittlere Varianz $MS_{\text{tot.corr.}}$,

$$MS_{\text{tot.corr.}} = \frac{SS_{\text{tot.corr.}}}{(N-1)}, \quad (8.17)$$

ist die um die Anzahl an Freiheitsgraden korrigierte Gesamtvarianz.

Die Varianz der Regression SS_{regr} ,

$$SS_{\text{regr}} = SS_{\text{tot.corr.}} - SS_{\text{resid}}, \quad (8.18)$$

wird durch einen Abzug der Varianz der Residuen SS_{resid} ,

$$SS_{\text{resid}} = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y})^2, \quad (8.19)$$

von der korrigierten Gesamtvarianz bestimmt. Dazu sind die erwarteten Werte \hat{y} zu bestimmen. Dies erfolgt mit Hilfe der generalisierten Inversen nach dem OLS (**ordinary least square**) Verfahren, wonach ebenfalls die Regressionskoeffizienten in a ,

$$a = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot y, \quad (8.20)$$

bestimmt werden können. Durch Einsetzen in Gl.(8.9) ohne Kenntnis der Residuen können die erwarteten Werte \hat{y} ,

$$\hat{y} = X \cdot (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot y, \quad (8.21)$$

berechnet werden.

Daraus leitet sich die hat-Matrix H [Hoaglin et al., 1978],

$$H = X \cdot (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T, \quad (8.22)$$

ab, die den Zusammenhang zwischen den gemessenen und erwarteten y Werten beschreibt.

Beim Screening lag die Wahrscheinlichkeit, dass der Zusammenhang zwischen X und y rein zufällig ist (p_{regr}) bei 1.4 % und somit unterhalb des Grenzwertes.

Die Varianz des reinen experimentellen Fehlers SS_{pe} (pe , **pure error**) wird mit den Werten der durchgeführten Center Points berechnet. Die mittlere Varianz MS_{pe} ergibt sich erneut aus der Korrektur von SS_{pe} um die Freiheitsgrade, die abhängig von der Anzahl an Center Point-Versuchen sind.

Die Varianz der mangelnden Modellanpassung SS_{lof} (lof, **lack of fit**) wird aus der Differenz zwischen den Varianzen des experimentellen Fehlers SS_{pe} und den Residuen SS_{resid} bestimmt. Die mittlere Varianz MS_{lof} ergibt sich erneut durch Korrektur um die Freiheitsgrade.

Das Verhältnis der mittleren Varianzen des Modellfehlers zu dem experimentellen Fehler wird ebenfalls einem F-Test,

$$F_{\text{lof}} = \frac{MS_{\text{lof}}}{MS_{\text{pe}}}, \quad (8.23)$$

unterzogen. Die Verteilungen sollten ähnlich groß sein, damit von einer gleichen Fehlerherkunft ausgegangen werden kann. Die Wahrscheinlichkeit p_{lof} , dass dies zutrifft muss daher größer sein als 0.05 bzw. 5 %.

Beim Screening erfüllte die Wahrscheinlichkeit einer gleichen Fehlerquelle zwischen Modell und Center Point-Experimenten p_{lof} mit 40.2 % die Bedingung, mehr als 5 % zu betragen.

Die Quadratsumme der Vorhersagbarkeit SS_{pred} (pred, **prediction**) bzw. PRESS (**predicted residual sums of squares**),

$$SS_{\text{pred}} = \sum_{i=1}^N \frac{(y_i - \hat{y})^2}{(1 - h_i)^2} = \text{PRESS}, \quad (8.24)$$

wird mit Hilfe der hat-Matrix berechnet, mit $h_i = i$ -ter Diagonalwert der Matrix H.

Abschließend lässt sich das Bestimmtheitsmaß der Anpassung R^2 (goodness of fit),

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{\text{resid}}}{SS_{\text{tot.corr}}}, \quad (8.25)$$

berechnen.

Das Bestimmtheitsmaß der Vorhersagbarkeit Q^2 (goodness of prediction),

$$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{SS_{\text{tot.corr}}}, \quad (8.26)$$

wird mit Hilfe der Quadratsumme der Vorhersagbarkeit PRESS berechnet.

Allgemein kann ein Modell als gut erachtet werden, wenn Q^2 größer als 0.5 ist und als exzellent bei Q^2 größer als 0.9. Der Unterschied zwischen R^2 und Q^2 sollte dabei weniger als 0.3 betragen [Eriksson et al., 2008].

Beim Screening wurde ein Bestimmtheitsmaß der Anpassung R^2 von 0.92 und ein Bestimmtheitsmaß der Vorhersage Q^2 von 0.45 erreicht. Damit war die kritische Differenz zwischen diesen beiden Werten von maximal 0.3 deutlich überschritten und das Modell daher als nicht gut befunden worden.

Die Modellgüte (model validity) MV,

$$MV = 1 + 0.57647 \cdot \log_{10}(p_{\text{lof}}), \quad (8.27)$$

stellt einen Bezug zum p-Wert des Mangels der Anpassung her. Der Grenzwert 0.05 für p_{lof} ergibt für MV den Wert 0.25. Der beim Screening ermittelte Wert für p_{lof} von 0.402 ist viel größer als der Grenzwert und die sich somit ergebene Modellgüte von 0.77 als ausreichend anzusehen.

Die Reproduzierbarkeit der Center Point-Experimente wird in der Größe RP,

$$RP = 1 - \frac{MS_{\text{pe}}}{MS_{\text{tot.corr.}}}, \quad (8.28)$$

berechnet. Dies spiegelt die Forderung wieder, dass die Varianz des experimentellen Fehlers viel kleiner als die mittlere Varianz sein sollte. Beim Screening ergab sich ein guter Wert für die Reproduzierbarkeit von 0.83.

In Abb. 8.4 sind die Werte der Bestimmtheitsmaße, der Modellgüte und der Reproduzierbarkeit graphisch dargestellt.

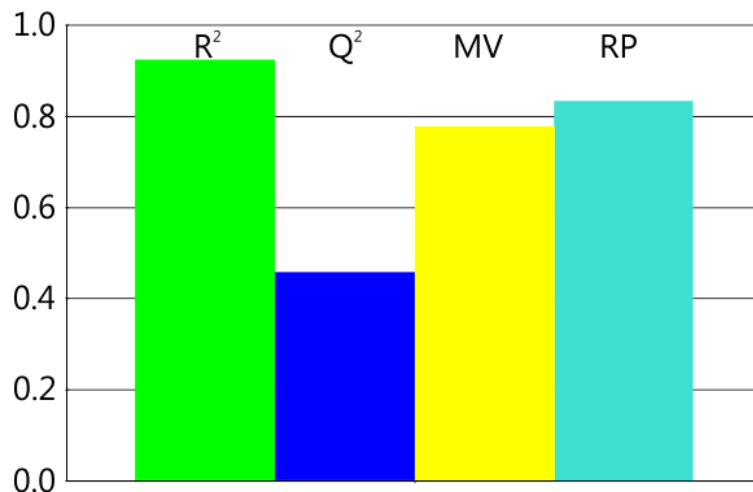


Abb. 8.4: Zusammenfassung der Screening Modellergebnisse

Da der jeweilige Maximalwerte eins beträgt, kann eine Beurteilung des Modells schnell und einfach getroffen werden. Es ist zu erkennen, dass das Bestimmtheitsmaß der Vorhersage Q^2 deutlich geringer ist als die anderen Größen. Daher werden nun die einzelnen Koeffizienten näher betrachtet.

Dies erfolgt anhand eines in Abb. 8.5 gezeigten Balkendiagramms. Dieses Diagramm gibt an, in wie weit sich die Antwort ändert, wenn ein Faktor von der Center Point-Einstellung (0) auf den positiven Wert (+1) geändert wird. Der Einfluss kann dabei positiv oder negativ ausfallen.

Zusätzlich ist pro Koeffizient ein Fehlerbalken dargestellt, der das Vertrauensintervall angibt. Dieses berechnet sich aus der Standardabweichung der Residuen. Für das vorliegende Screening-Modell beträgt das Vertrauensintervall $0.76 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$.

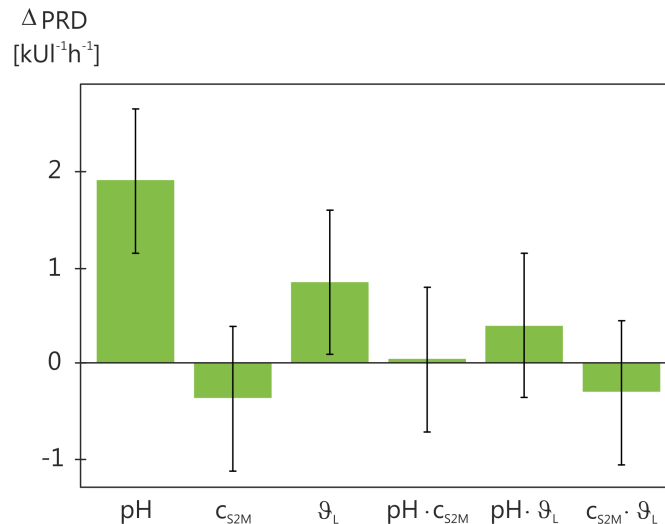


Abb. 8.5: Balkendiagramm der Koeffizientenwerte mit Vertrauensintervall

In dem Fall, dass der Wert des Koeffizienten kleiner als das Vertrauensintervall ist, wird dieser Koeffizient als nicht signifikant betrachtet. Graphisch ist dies bei der Anwesenheit eines Schnittpunktes des Fehlerbalkens mit der Abszisse zu erkennen.

Zur Berechnung eines besseren Modells wurden Spalten aus der Matrix X entfernt, damit keine, laut Abb. 8.5, nicht signifikanten Koeffizienten im Modell beachtet werden. Mit der neuen Matrix X, die in Tab. 8.3 gezeigt ist, werden nur die beiden linearen Koeffizienten der Faktoren pH und θ_L in der Modellierung verblieben.

Tab. 8.3: verkleinerte Matrix X zur Berechnung einer Konstanten (1. Spalte) und den zwei verbliebenen linearen Koeffizienten für den Einfluss von pH bzw. θ_L

Konstante	x_1	x_3
+1	-1	-1
+1	-1	+1
+1	-1	-1
+1	-1	+1
+1	+1	-1
+1	+1	+1
+1	+1	-1
+1	+1	+1

Mit der neuen Matrix X wurde erneut eine MLR durchgeführt und damit ein angepasstes Modell erstellt. Dieses erreichte ein Bestimmtheitsmaß der Anpassung R^2 von 0.84 und ein Bestimmtheitsmaß der Vorhersage Q^2 von 0.72. Damit war die kritische Differenz von 0.3 zwischen diesen beiden Werten unterschritten und mit Q^2 größer 0.5 ein gutes Modell gefunden. Graphisch ist dies in Abb. 8.6 dargestellt.

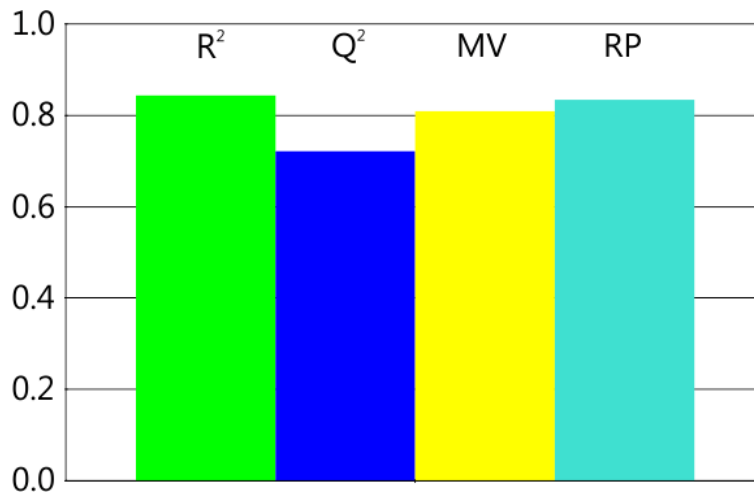


Abb. 8.6: Zusammenfassung der Screening-Ergebnisse des angepassten Modells

Die Wahrscheinlichkeit p_{regr} betrug weniger als 0.1 % und liegt somit weit unterhalb des Grenzwertes von 5 %. Außerdem erfüllte die Wahrscheinlichkeit der gleichen Fehlerquelle p_{lof} mit 46.6 % ebenfalls die Bedingung mehr als 5 % zu betragen. Die Modellgüte MV beträgt somit 0.81. Die Reproduzierbarkeit ist mit 0.83 unverändert, da kein Experiment aus der Modellierung entfernt wurde.

In Abb. 8.7 ist das resultierende Balkendiagramm der Koeffizientenwerte aus dem angepassten Modell des Screenings gezeigt. Es beinhaltet ein Vertrauensintervall von $0.69 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$.

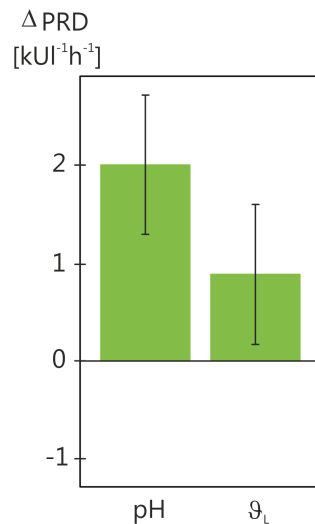


Abb. 8.7: Balkendiagramm der Koeffizientenwerte mit Vertrauensintervall des angepassten Modells

Das Ziel des Screenings wurde erreicht. Im untersuchten Versuchsraum wurden zwei von drei Faktoren identifiziert, die die Antwort signifikant verändern. Es konnte gezeigt werden, dass die Methanolkonzentration in einem Bereich zwischen 0.2 und 1.4 g l^{-1} einen geringeren Einfluss auf die Antwort hat, als die natürliche Variation des Systems selbst.

Die Produktivität eines Zyklus k lässt sich über die verbliebenen zwei Faktoren x_1 und x_3 in einem linearen Modell,

$$\text{PRD}_k = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_3 \cdot x_3, \quad (8.29)$$

mit $a_0 = 3.02 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$; $a_1 = 1.94 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$; $a_3 = 0.86 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$

vorhersagen.

Unter Berücksichtigung der Gln.(8.2) und (8.4) kann die Modellgleichung,

$$\text{PRD}_k = b_0 + b_1 \cdot \text{pH}_k + b_3 \cdot \vartheta_{\text{Lk}} + \varepsilon, \quad (8.30)$$

mit $b_0 = -9.17 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$; $b_1 = 1.29 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$; $b_3 = 0.34 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}\text{°C}^{-1}$

umgeformt werden, sodass die nicht normierten Werte der Faktoren für die Vorhersage der Produktivität verwendet werden können.

Beide Koeffizienten haben positive Werte. Mit einer Erhöhung des dazugehörigen Faktors wird demnach auch die Antwort erhöht. Dies ist graphisch in Abb. 8.8 wiedergegeben. Die Produktivität als Antwort ist farblich dargestellt. Dabei steht eine helle Farbe für niedrige und eine dunkle Farbe für hohe Werte.

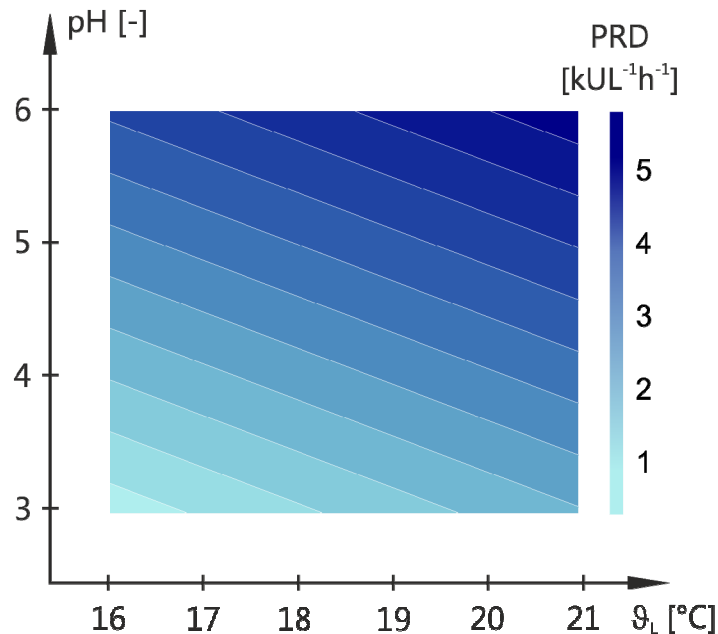


Abb. 8.8: Konturdiagramm der Produktivität in Abhängigkeit der zwei signifikanten Faktoren, Produktivität farblich angezeigt

Bei niedrigem pH (3.0) und niedriger Temperatur (16°C) wird laut Modell eine Produktivität von $0.2 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$ erreicht. Bei mittlerem pH (4.5) und mittlerer Temperatur (18.5°C), also den Center Point-Bedingungen, läge die Produktivität bei $3.0 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$ und bei hohem pH (6.0) und hoher Temperatur (21°C) bei $5.8 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$. Das Modell stellt allerdings nur eine Näherung dar, mit dem kein Optimum gefunden werden kann. Es kann allerdings dazu genutzt werden, die Lage und die Ausdehnung des Versuchsraumes der nachfolgenden Optimierung zu definieren.

8.3 Optimierung

Ausgehend von den Ergebnissen des Screenings wurden die Faktoren pH-Wert und Kultivierungstemperatur näher untersucht. Die lineare Näherung aus Gl.(8.29) deutet auf ein Optimum oberhalb der Center Point-Einstellungen hin, da beide linearen Koeffizienten positiv sind.

Für die Optimierung wurde ein CCC-Design (central composite circumscribed) verwendet, mit dem aufgrund der höheren Anzahl an Experimenten pro Faktor ein quadratisches Modell aufgestellt werden kann. Dieses Design besteht wie bei einem vollfaktoriellen Design aus Experimenten an den Eckpunkten des Versuchsraumes sowie weiteren Experimenten außerhalb der Seitenflächen (Star Points). In Abb. 8.9 ist der aufgespannte Versuchsraum für die Optimierung in Relation zum Suchraum des Screenings dargestellt.

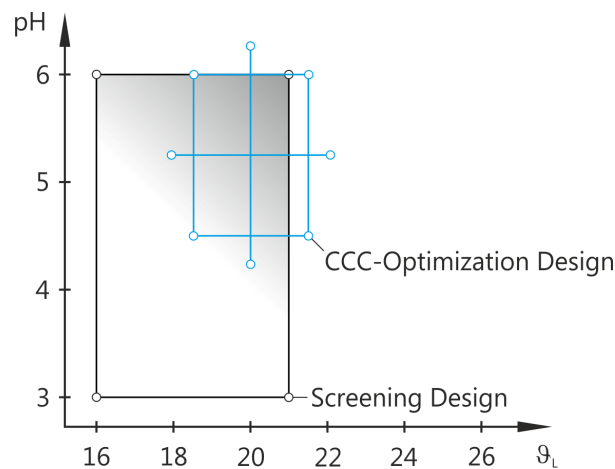


Abb. 8.9: Versuchsraum der Optimierung mit einem CCC-Design

Insgesamt wurde der Suchraum verkleinert und bezogen auf das Screening hin zu höheren Werten verschoben. Der durch die Eckpunkte aufgespannte Raum deckt einen pH-Bereich von 4.5 bis 6 und einen Temperaturbereich von 18.5°C bis 21.5°C ab. Die obere Grenze der Kultivierungstemperatur wurde auf 21.5°C festgelegt, da in vorherigen Arbeiten herausgefunden wurde, dass ein Optimum unterhalb von 22°C zu suchen ist [Loegering et al., 2010]. Der Suchraum des pH-Wertes beginnt aufgrund der Screening Ergebnisse bei 4.5 und endet aufgrund einer verfahrenstechnische Grenze (Präzipitation des Mediums) bei 6.0. Es wurden aufgrund von Vorversuchen insgesamt acht Center Point-Experimente durchgeführt.

Wie beim Screening werden auch bei der Optimierung die Faktoren normiert,

$$x_1 = \frac{\text{pH} - \text{pH}_0}{\text{pH}_0 - \text{pH}_{\min}}, \quad (8.31)$$

$$x_3 = \frac{\vartheta_L - \vartheta_{L0}}{\vartheta_{L0} - \vartheta_{L\min}}, \quad (8.32)$$

damit beide einen Wertebereich zwischen -1 und 1 besitzen.

Für ein ausgewogenes Design sind die Star Points so projiziert, dass diese den gleichen Abstand zu den Center Points besitzen wie die Eckpunkte. In einem normierten zweidimen-

Tab. 8.4: Faktorsollwerte und deren normierte Form (in Klammern) der Optimierung pro Zyklus mit der dazugehörigen Antwort

Experiment	Faktoren		PRD [kUL ⁻¹ h ⁻¹]
	pH [-]	g _L [°C]	
N1	4.50 (-1)	18.5 (-1)	7.05
N3	4.50 (-1)	21.5 (+1)	6.67
N2	6.00 (+1)	18.5 (-1)	7.14
N4	6.00 (+1)	21.5 (+1)	10.26
N5	4.19 (-1.41)	20.0 (0)	4.29
N6	6.31 (+1.41)	20.0 (0)	8.62
N7	5.25 (0)	17.9 (-1.41)	8.05
N8	5.25 (0)	22.1 (+1.41)	9.49
N9 (CP)	5.25 (0)	20.0 (0)	10.86
N10 (CP)	5.25 (0)	20.0 (0)	10.25
N11 (CP)	5.25 (0)	20.0 (0)	10.93
N12 (CP)	5.25 (0)	20.0 (0)	12.00
N13 (CP)	5.25 (0)	20.0 (0)	8.71
N14 (CP)	5.25 (0)	20.0 (0)	11.09
N15 (CP)	5.25 (0)	20.0 (0)	10.49
N16 (CP)	5.25 (0)	20.0 (0)	9.08

Die Auswertung in Form der Bestimmung der Regressionskoeffizienten erfolgt analog zum Screening. Dazu werden die Faktoreinstellungen der Experimente (ohne Center Points) in X mit den zu bestimmenden Koeffizienten als zusätzliche Spalten erweitert. In Tab. 8.5 ist die erweiterte Matrix X gezeigt.

Tab. 8.5: erweiterte Matrix X zur Berechnung einer Konstanten (1. Spalte), linearen Koeffizienten (2. & 3. Spalte) und quadratischen Koeffizienten (4. & 5. Spalte)

Konstante	x ₁	x ₃	x ₁ ²	x ₃ ²
+1	-1	-1	+1	+1
+1	-1	+1	+1	+1
+1	+1	-1	+1	+1
+1	+1	+1	+1	+1
+1	-1.41	0	+2	0
+1	+1.41	0	+2	0
+1	0	-1.41	0	+2
+1	0	+1.41	0	+2

Mit den Ergebnissen der acht Zyklen wurde eine MLR durchgeführt. Das resultierende Modell, mit einem konstanten, zwei linearen und zwei quadratischen Koeffizienten (vgl. Gl.(8.33)), erreichte ein Bestimmtheitsmaß der Anpassung R² von 0.81 und ein Bestimmtheitsmaß der Vorhersage Q² von 0.63. Damit war die kritische Differenz von 0.3 zwischen diesen beiden Werten unterschritten und mit Q² größer 0.5 ein gutes Modell gefunden [Eriksson et al., 2008]. Die Modellergebnisse sind graphisch in Abb. 8.11 dargestellt.

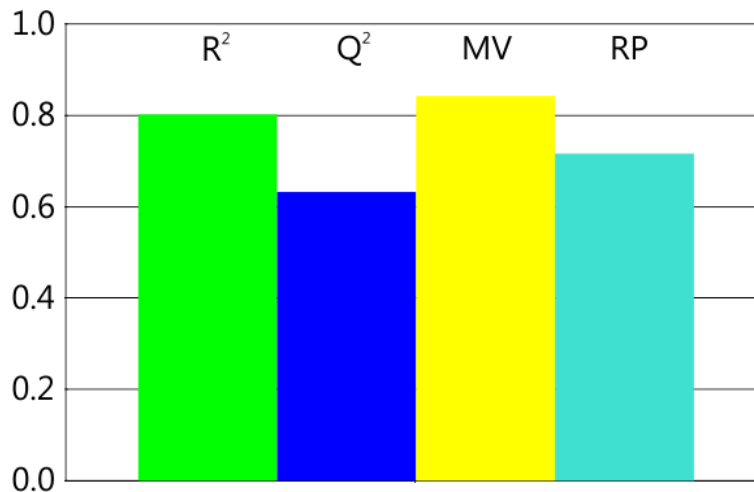


Abb. 8.11: Zusammenfassung der Optimierungsergebnisse

Die Wahrscheinlichkeit p_{regr} betrug 0.1 % und liegt somit weit unterhalb des Grenzwertes von 5%. Außerdem erfüllte die Wahrscheinlichkeit der gleichen Fehlerquelle p_{lof} mit 53.9 % ebenfalls die Bedingung, mehr als 5 % zu betragen. Die Modellgüte MV beträgt somit 0.85, die Reproduzierbarkeit ist mit 0.72 angegeben.

Der jeweilige Einfluss der Koeffizienten auf die Antwort ist in Abb. 8.12 dargestellt. Dort ist zusätzlich das Vertrauensintervall von $0.82 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$ als Fehlerbalken angegeben.

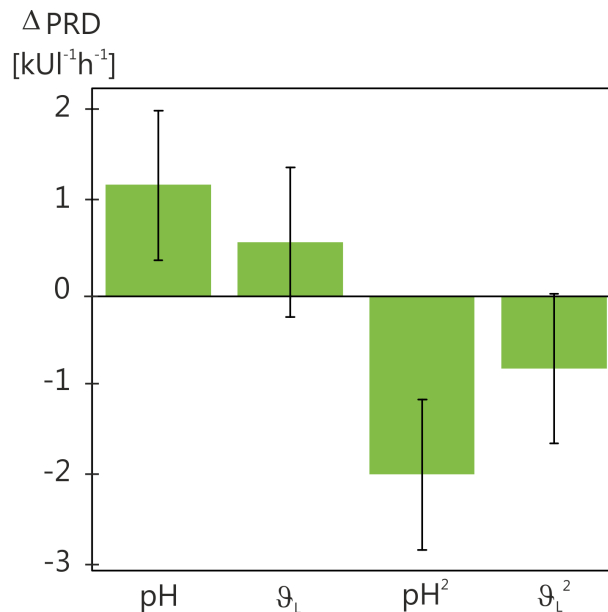


Abb. 8.12: Balkendiagramm der Koeffizientenwerte mit Vertrauensintervall

Beim quadratischen Koeffizienten der Kultivierungstemperatur schneidet der Fehlerbalken knapp die Abszisse. Der quadratische Einfluss der Temperatur ist demnach nicht signifikant und müsste zusammen mit dem linearen Koeffizienten aus der Modellierung entfernt werden. Die Modellgüte in Form des Bestimmtheitsmaßes der Vorhersage Q^2 würde sich dann allerdings um mehr als 0.1 verschlechtern. Daher wird der quadratische Einfluss der Temperatur im Modell belassen. Sobald ein quadratischer Einfluss signifikant ist, verbleibt der dazugehörige lineare Koeffizient ungeachtet seines Betrages in dem Modell.

Die Produktivität eines Zyklus k lässt sich über die zwei Faktoren x_1 und x_3 ,

$$\begin{aligned} \text{PRD}_k &= a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_3 \cdot x_3 + a_{11} \cdot x_1^2 + a_{33} \cdot x_3^2 + \varepsilon, \\ \text{mit } a_0 &= 10.43 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}; \\ a_1 &= 1.23 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}; \quad a_3 = 0.60 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}\text{°C}^{-1} \\ a_{11} &= -1.94 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}; \quad a_{33} = -0.79 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}\text{°C}^{-2} \end{aligned} \quad (8.34)$$

bzw. über die Faktoren pH und ϑ_L ,

$$\begin{aligned} \text{PRD}_k &= b_0 + b_1 \cdot \text{pH}_k + b_3 \cdot \vartheta_{Lk} + b_{11} \cdot \text{pH}_k^2 + b_{33} \cdot \vartheta_{Lk}^2 + \varepsilon, \\ \text{mit } b_0 &= -241.14 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}; \\ b_1 &= 37.95 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}; \quad b_3 = 14.37 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}\text{°C}^{-1} \\ b_{11} &= -3.46 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}; \quad b_{33} = -0.35 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}\text{°C}^{-2} \end{aligned} \quad (8.35)$$

in einem quadratischen Modell vorhersagen.

Mit diesem Ergebnis kann schließlich ein Optimum ermittelt werden. Die partielle Ableitung von Gl.(8.35) nach dem pH -Wert bzw. der Kultivierungstemperatur ergibt den jeweiligen Faktorwert, bei dem die Antwort ein Maximum ergibt. Dies ist nur möglich, da die beiden quadratischen Koeffizienten jeweils negativ sind und somit eine nach unten geöffnete Parabel entsteht.

Der optimale pH -Wert beträgt 5.5 und die optimale Kultivierungstemperatur 20.5°C . Werden diese Faktorwerte in das Optimierungsmodell eingegeben, resultiert eine Produktivität von $10.7 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Die graphische Darstellung der Modellgleichung ist in Abb. 8.13 gezeigt.

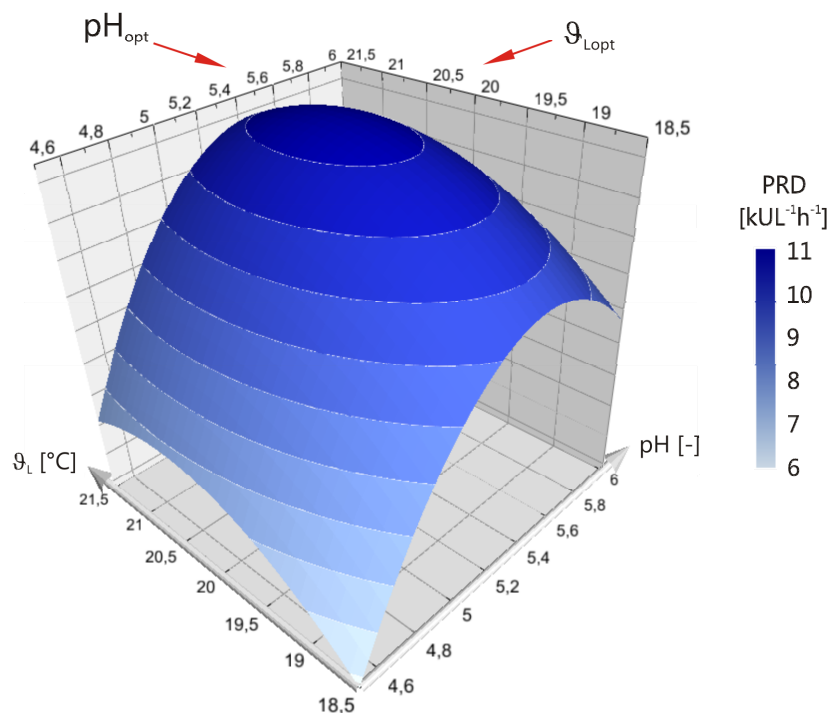


Abb. 8.13: 3D Konturdiagramm der Optimierung, Produktivität farblich dargestellt

In diesem dreidimensionalen Bild sind der pH-Wert und die Kultivierungstemperatur gegen die Produktivität aufgetragen. Zusätzlich ist die Produktivität farblich auf der Oberfläche der entstandenen Kuppel dargestellt. Die helle Farbe steht für niedrige Wert und die dunkle Farbe für hohe Werte der Produktivität. Die optimalen Einstellungen der beiden untersuchten Faktoren sind in dem Bild ablesbar.

Vor der Optimierung mit DoE wurde in der zweistufigen Kultivierung lediglich eine Produktivität von $6.7 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$ erreicht. Diese konnte somit um 60 % auf $10.7 \text{ kUI}^{-1}\text{h}^{-1}$ gesteigert werden. Das gesetzte Ziel der biochemischen Optimierung wurde erreicht. Eine Verifizierung des Ergebnisses über die Durchführung eines Robustheitstests mit DoE war nicht im Fokus dieser Arbeit und wurde nicht durchgeführt.

Die gefundenen Parameter für optimale Kultivierungsbedingungen gelten nur für die Produktion von CALB mit dem in Kapitel 3 vorgestellten *P. pastoris* Stamm. Für die Produktion von anderen Proteinen mit *P. pastoris* sind eigene Optimierungsexperimente durchzuführen [z. B. Fricke et al., 2011].

Der Produktionsprozess wurde hinsichtlich des pH-Wertes, der Kultivierungstemperatur und der Methanolkonzentration optimiert. Bezüglich des pH-Wertes ist es wahrscheinlich, dass beim optimalen pH-Wert von 5.5 die Aktivität von Proteasen in der Kulturbrühe am geringsten ist. Auch die niedrige Kultivierungstemperatur von 20.5°C verringert die Proteaseaktivität. Eine Offline-Untersuchung der Proteaseaktivität im Überstand bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen war nicht möglich. Bei dem verwendeten Protease-Kit hat die ebenfalls im Überstand vorhandene Lipase B das Substrat hydrolysiert und somit die Ergebnisse verfälscht.

Es wurde kein Einfluss der Methanolkonzentration identifiziert. Dies lässt vermuten, dass die eingestellten Methanolkonzentrationen zwischen 0.2 g l^{-1} und 1.4 g l^{-1} weder limitierend noch inhibierend (toxisch) waren und die Produktivität somit nicht beeinflusst haben.

Nach der Optimierung der Kultivierungsbedingungen ist der nächste Schritt zur allgemeinen Prozessoptimierung die Sicherstellung der Prozessstabilität. Diese kann durch eine gute Prozessbeobachtung erreicht werden, die im folgenden Kapitel thematisiert wird.

9 Prozessmonitoring

9.1 Einleitung

Die Sicherstellung eines stabilen und reproduzierbaren Prozesses ist ein wichtiger Bestandteil der Prozessoptimierung. Denn ohne eine gute Reproduzierbarkeit sind Optimierungsexperimente, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, nicht durchführbar. Hauptsächlich liegt die Realisierung der Reproduzierbarkeit in der Automatisierung. Aber eine stetige Kontrolle der Prozesse zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit bzw. zur Einhaltung bestimmter Prozessgrenzen ist ebenfalls überaus wichtig. Mit der Beobachtung und Analyse von Zyklen aus Kultivierungen der Zellanzucht und Produktion befasst sich dieses Kapitel.

Der Fokus liegt hierbei auf dem Zellanzuchtprozess. Die Reproduzierbarkeit des Zellanzuchtprozesses ist obligatorisch für eine Optimierung der Proteinexpression im Produktionsreaktor (siehe Kapitel 8). Da die Zellanzucht zu Beginn des Integrierten Bioprozesses steht, ist deren gleichbleibender Verlauf besonders entscheidend. Bereits kleine Abweichungen in der Zellanzucht können im weiteren Verlauf über die Produktion und den anschließenden Downstream potenziert werden.

Es besteht aber auch die Notwendigkeit eine Reproduzierbarkeit im Produktionsreaktor zu gewährleisten, wenn Optimierungen im Downstream des Integrierten Bioprozesses durchgeführt werden sollen.

Es ist das Ziel des Prozessmonitoring, auch **BSPC (batch statistical process control)** genannt, einen Zyklus über ein Modell zu beurteilen und somit die Reproduzierbarkeit sicher zu stellen. Die Modellierung ist dabei eine Zusammenfassung der Sensordaten mit gleichzeitiger Regression gegen die Kultivierungszeit. Ziele der Modellbildung sind ein gutes Verständnis der typischen Entwicklung eines Zyklus, die Evaluierung einzelner Beobachtungen von vergangenen oder gerade laufenden Kultivierungen sowie eine frühe Detektion von Prozessabweichungen. [Eriksson et al., 2006]

Die Umsetzung des Prozessmonitoring erfolgt über die Multivariate Datenverarbeitung (MVDA, **multi variate data analysis**). Es wird im Allgemeinen von Multivariater Datenverarbeitung gesprochen, wenn im zu analysierenden Datensatz die Anzahl der Variablen fünf übersteigt.

Bei der MVDA gibt es drei Arten von analytischer Fragestellung [Eriksson et al., 2006]:

1. einen Datensatz analysieren, 2. einen Datensatz in mehrere Klassen unterteilen und diese miteinander vergleichen, 3. zwei Gruppen von Datensätzen miteinander vergleichen.

Im Fall 1 wird von einem Datensatz X ausgegangen. Dieser soll mit Hilfe der MVDA analysiert werden, ohne die Daten zu gruppieren.

Im Fall 2 wird ein Datensatz X in mehrere Klassen I, II, etc. aufgeteilt. Diese Klassen können miteinander verglichen und beurteilt werden.

Für den Fall 1 und 2 wird die Hauptkomponentenanalyse (PCA, **p**rinciple **c**omponent **a**nalysis) verwendet.

Im Fall 3 liegen zwei Datensätze (X und Y) vor. Dabei stellen die Werte in X Kultivierungs- oder Sensordaten dar, die inline, online oder atline in regelmäßigen Zeitintervallen erfasst werden. Die Daten in Y sind entweder ein Zeitvektor, zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit, oder Offline-Daten, die zur Beurteilung der Prozessergebnisse herangezogen werden können.

Die für Fall 3 notwendige Methode ist die Regressionsanalyse (PLS, **p**artial **l**east **s**quare **p**rojection to **l**atent **s**tructures) [Wold et al., 1984].

Historisch geht die Multivariate Datenverarbeitung angefangen mit der PCA auf Pearson [Pearson, 1901] zurück, der im Jahre 1901 beschrieb, wie ein Satz von Punkten in einem K-dimensionalen Raum am besten mit Linien und Flächen beschrieben werden kann. Hotelling [Hotelling, 1933] griff diesen Ansatz 32 Jahre später auf und beschäftigte sich mit dem Berechnen eines Sets von mehreren unabhängigen Variablen, die in der Lage sind die originalen Werte der K Variablen abzubilden. Eine ausführliche Beschreibung der Geschichte der MVDA ist bei Jolliffe zu finden [Jolliffe, 2002].

Die Datenverarbeitung und Modellierung bzw. Regression wurden mit der Software SIMCA P⁺ (Version 12.0.1) der Firma MKS Umetrics AB, Schweden durchgeführt [Eriksson et al., 2006]. Diese Software bietet die Möglichkeit, Daten einfach zu importieren und zudem über eine graphische Oberfläche erstellte Modelle zu visualisieren.

Ein Datensatz, nachfolgend als Matrix X bezeichnet, besteht aus Elementen, die einer Spalte (Variable) und einer Zeile (Beobachtung) zugeordnet werden. Die Anzahl der Variablen (= Anzahl der Spalten) in der Matrix X beträgt K. Diese werden auch als Faktoren (engl. factors) bezeichnet. Die Anzahl an Beobachtungen (engl. observations, = Anzahl an Zeilen) beträgt N. Die Daten in X liegen demnach in einer N x K Matrix vor. Ein Beispiel einer X Matrix folgt später in Tab. 9.2.

Die Elemente der Matrix X können als Punktwolke in einem multidimensionalen Koordinatensystem angesehen werden. Nach einem Mittelwertabzug liegt der Ursprung des Koordinatensystems in dem errechneten Mittelpunkt. Die erste Hauptkomponente, die berechnet wird, verläuft durch diese Punktwolke und hat zu den Punkten den geringstmöglichen Abstand.

Die zweite Hauptkomponente, die gebildet wird, verläuft orthogonal zu der ersten Hauptkomponente und hat ebenfalls den geringstmöglichen Abstand zu den Punkten. Mit jeder gebildeten Hauptkomponente sinkt daher der Anteil an unbeschriebener Variation in der Punktwolke, da immer die Methode der kleinsten Fehlerquadrate (least square method) angewendet wird.

Zur Veranschaulichung ist in Abb. 9.1 die Bildung einer Hauptkomponente aus Werten von zwei Variablen gezeigt.

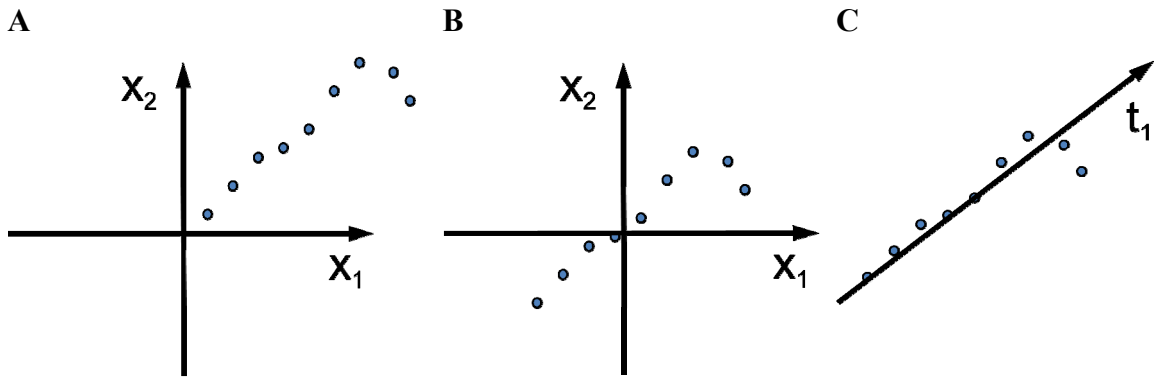


Abb. 9.1: Schema zur Bildung einer Hauptkomponente t_1 .

A: Ursprungsdaten von neun Messungen, B: Zentrierung der Werte auf den Koordinatenursprung, C: Bildung einer neuen Achse mit kleinstmöglichem Abstand zu den Punkten

Die Matrix X ,

$$X = 1 \cdot \bar{x}^T + T \cdot P^T + E, \quad (9.1)$$

lässt sich laut Gl.(9.1) aus drei Teilen zusammensetzen. $1 \cdot \bar{x}^T$ repräsentiert die Mittelwerte und die Ursprünge von der Skalierung. $T \cdot P^T$ modelliert die Struktur, der Term E enthält die Residuen, die nicht mit der Struktur abgebildet werden können. Die Hauptkomponentenwerte sind Spalten in der Matrix T . Die Bedeutung der Hauptkomponenten wird mit den Ladungen (engl. loadings) ausgedrückt. Die Ladungen sind Spalten der Matrix P , welche zur Multiplikation mit T transponiert wird. [Wold et al., 1987]

Jede Variable verläuft zu den gebildeten Hauptkomponenten in einem gewissen Winkel. Der Kosinus dieses Winkels, was dem Wert der Ladung entspricht, gibt diese Orientierung für die Hauptkomponentenachse in Bezug zu der ursprünglichen Achse wieder. [Wold et al., 1987]

9.2 Untersuchung der zyklischen Zellanzucht

Es soll ein mathematisches Modell zur Beobachtung und Analyse von Zyklen der Zellanzucht aus den bereits beschriebenen Gründen erstellt werden. Dazu ist eine ausreichende Datenbasis notwendig, aus der das Modell berechnet werden kann. Diese Daten müssen aus Zyklen stammen, die als gut beurteilt wurden und bei denen identische Sollwerte vorgegeben waren.

Es stehen aus einer Kultivierung im Zellanzuchtreaktor neun Zyklen zur Verfügung, die in Abb. 9.2 dargestellt sind. Diese Zyklen wurden mit identischen Sollwerten und einer zuvor festgelegten Dauer durchgeführt.

Die beiden Phasen Batch (unlimitiertes Wachstum auf Glycerol) und Induktion (Methanol Fed-Batch) während eines Zyklus der Zellanzucht wurden zusammenhängend modelliert. Dadurch wird die Dauer der Batch Phase ebenfalls berücksichtigt.

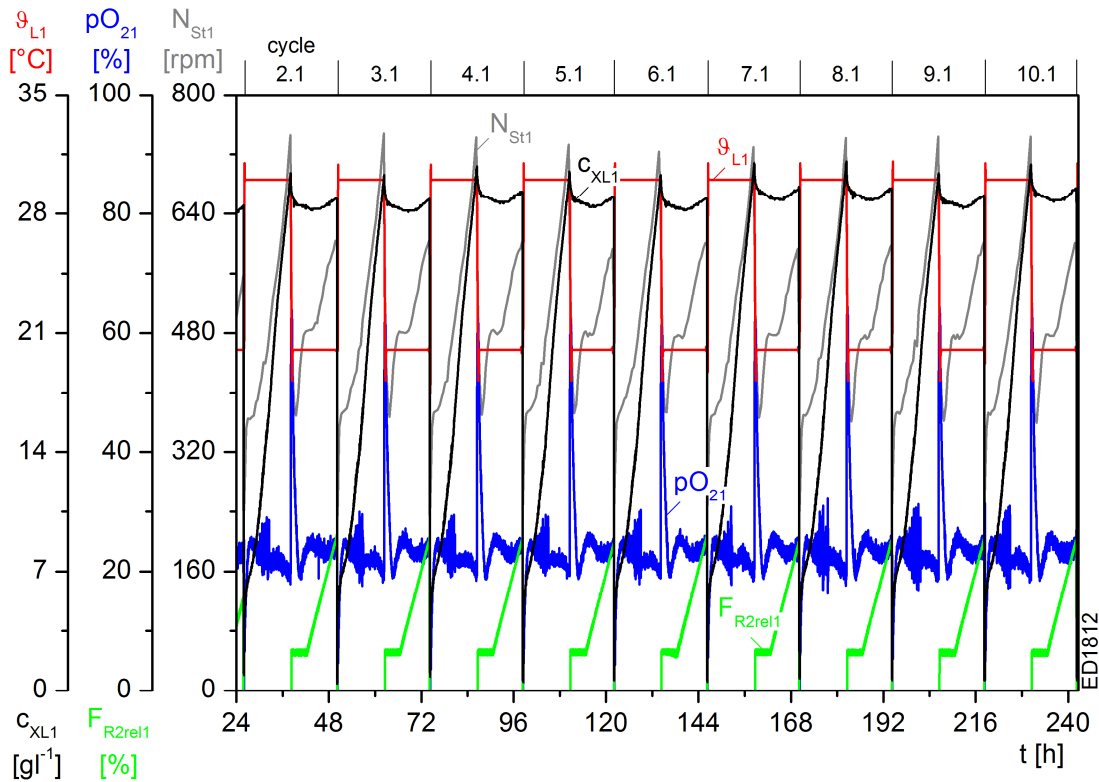


Abb. 9.2: Neun Zyklen einer Zellanzuchtkultivierung, die zur Modellbildung verwendet wurden

Während der Durchführung der Zyklen wurden sechszehn Variablen aufgezeichnet bzw. berechnet, die für die Modellbildung herangezogen werden konnten. Die Variablen sind in Tab. 9.1 aufgelistet.

Tab. 9.1: Variablen für die Modellierung von Zellanzuchtzyklen

Variable	pO_{21}	N_{St1}	$c_{XLturb1}$	F_{R21}	pH_1	Q_{O21}	Q_{CO21}	RQ_1
Einheit	[%]	[rpm]	[gl^{-1}]	[lh^{-1}]	[-]	[$gl^{-1}h^{-1}$]	[$gl^{-1}h^{-1}$]	[-]
Variable	E_{L1}	ϑ_{DJ1}	ϑ_{L1}	V_{L1}	x_{O21}	x_{CO21}	m_{T21}	m_{R21}
Einheit	[AU]	[°C]	[°C]	[l]	[-]	[-]	[g]	[g]

Der normierte Verlauf der sechszehn Variablen aus neun Zyklen über die Zeit ist in Abb. 9.3 dargestellt. Dabei steht jede Farbe für eine Variable.

Eine geringe Variation, d. h. eine überlappende Darstellung zwischen den Verläufen einzelner Variablen über die neun Zyklen ist zu erkennen. Ebenfalls gut sichtbar ist die vorhandene Korrelation der Daten. Viele Verläufe ähneln sich, z. B. die exponentiellen Anstiege einiger Variablen in der Batch Phase. Daher ist eine Dimensionsreduzierung bis auf wenige Hauptkomponenten zu erwarten.

Um die Variation über Hauptkomponenten zu beschreiben, müssen die Daten in eine für die Modellierung mit SIMCA P⁺ gültige Form gebracht werden. Obligatorisch ist dabei, dass alle Werte der sechszehn Variablen demselben Zeitvektor zugeordnet sind.

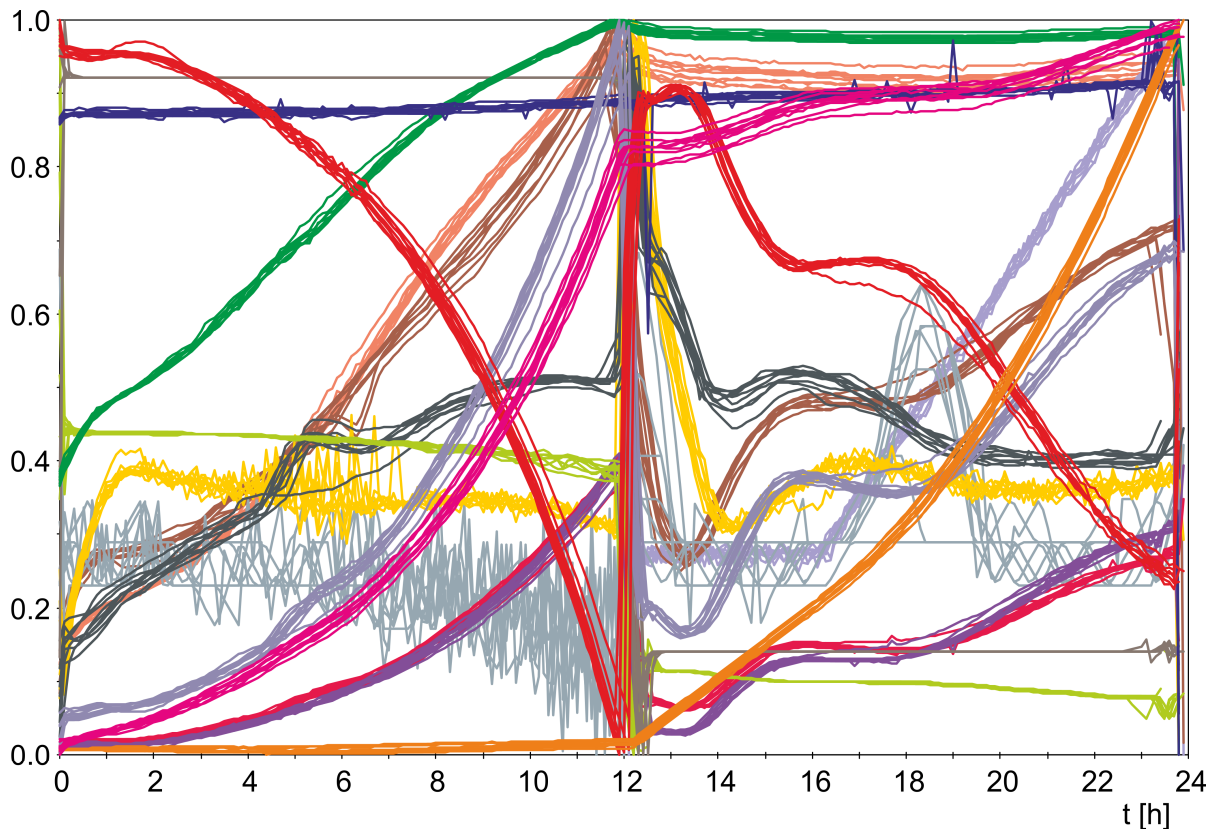


Abb. 9.3: Normierter Verlauf aller 16 Variablen aus neun Zyklen

Je nach Datenaufzeichnungssystem kann daher eine Interpolation einzelner Variablenwerte notwendig sein (z. B. mit MATLAB). Es sind alle Werte der Variablen sowie der Zeitvektor in eine Matrix (z. B. in Excel) zu bringen.

Die Daten werden zur Modellbildung in SIMCA P⁺ importiert und entsprechend zugeordnet. D. h. der Zeitvektor wird als Y Vektor definiert und die Spalten, in denen die Werte der sechzehn Variablen stehen zur X Matrix zugeordnet. Die Zeilen werden für X und Y durchnummeriert und für jeden Zyklus ein Name festgelegt, sodass jede Messung eindeutig einem Zyklus bzw. einem Zeitpunkt zugeordnet werden kann. Ein Auszug einer solchen Datensammlung ist in Tab. 9.2 gezeigt.

Tab. 9.2: Auszug aus den Daten der Zellanzuchtkultivierung.

Drei Messungen pro Zyklus mit Zeitvektor y und exemplarisch drei Spalten (Variablen) in X.

	ID #	y time [h]	x ₁ pO ₂₁ [%]	x ₂ N _{St1} [rpm]	x ₃ c _{XLturb1} [g l ⁻¹]	...
Zyklus 1.1	1	0.1	8.0	297	5.2	...
Zyklus 1.1	2	0.2	11.9	321	5.4	...
Zyklus 1.1	3	0.3	14.1	345	5.7	...
⋮		⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
Zyklus 2.1	237	0.1	9.4	308	5.2	...
Zyklus 2.1	238	0.2	12.4	323	5.5	...
Zyklus 2.1	239	0.3	14.2	338	5.7	...
⋮		⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

Bevor die Modellbildung auf den Datensatz angewendet werden kann, werden die Daten zentriert und skaliert. Dazu wird in der Regel die Autoskalierung [Otto, 1997], identisch mit der UV-Skalierung (**unit variance scaling**) [Eriksson et al., 2006] angewandt. Damit werden die Daten auf einen einheitlichen Wertebereich gebracht und die Varianz auf eins normiert.

Der skalierte Wert x_{ij}^* ,

$$x_{ij}^* = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}, \tag{9.2}$$

ergibt sich aus dem Abzug des Mittelwertes der Spalte j ,

$$\bar{x}_j = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_{ij}, \tag{9.3}$$

und der Standardabweichung s_j ,

$$s_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{N - 1}}. \tag{9.4}$$

Die Skalierung ist für die Modellbildung essentiell, da diese eine Methode der kleinsten Fehlerquadrate ist. Variablen mit großer Varianz hätten ohne Skalierung auch einen hohen Einfluss. Um dies zu vermeiden, wird jede Spalte der Matrix X auf eine Varianz von eins gebracht. Somit hat jede Variable den gleichen Einfluss auf das Modell.

Kritisch kann eine Skalierung bei Variablen werden, die nahezu konstant sind. Liegt der Variation der Variablen hauptsächlich ein Rauschen zu Grunde, so wird dieses durch eine Skalierung verstärkt und bekommt somit einen größeren Einfluss. Daher wurde der pH-Wert in der Datenvorbereitung mit SIMCA P⁺ nur zentriert, alle weiteren Variablen wurden auto-skaliert. Damit wird die Gewichtung der Variable pH₁ verringert. Eine Entfernung dieser Variable aus dem Modell ist nicht sinnvoll, da eine bleibende Regelabweichung dieser einen Einfluss auf den Zellanzuchtprozess hätte und dies im Modell berücksichtigt werden soll.

Ein Auszug der Daten in skalierten Form ist in Tab. 9.3 gezeigt. Die Werte sind alle negativ, da es Werte am Anfang von Zyklen sind und diese niedriger als der jeweilige Mittelwert sind.

Tab. 9.3: Auszug aus den Daten der Zellanzuchtkultivierung nach der Skalierung. Drei Messungen pro Zyklus mit Zeitvektor y und exemplarisch drei Spalten (Variablen) in X .

	ID #	y^*	x_1^*	x_2^*	x_3^*	...
Zyklus 1.1	1	-1.71	-2.44	-2.11	-2.08	...
Zyklus 1.1	2	-1.69	-1.83	-1.85	-2.06	...
Zyklus 1.1	3	-1.68	-1.50	-1.60	-2.02	...
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
Zyklus 2.1	237	-1.71	-2.23	-1.99	-2.08	...
Zyklus 2.1	238	-1.69	-1.77	-1.83	-2.05	...
Zyklus 2.1	239	-1.68	-1.48	-1.67	-2.02	...
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

Es ist gut zu erkennen, dass die Wertebereiche der einzelnen Variablen nach der UV Skalierung deutlich näher zusammen liegen. Somit kann mit der Modellbildung begonnen werden.

Es wird eine PLS mit dem NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) Algorithmus [Geladi, 1986; Wold et al., 1987; Brereton, 2002] durchgeführt. Dieser Algorithmus ist ein iteratives Verfahren zur Bestimmung der Hauptkomponenten und Ladungen. Er wird häufig eingesetzt [Wold et al., 1987; Brereton, 2002], da dieser Algorithmus Hauptkomponenten nacheinander bestimmt und nach einer gewünschten Anzahl an Komponenten gestoppt werden kann. Ein möglicher anderer Weg zur Hauptkomponentenbestimmung ist die Singulärwertzerlegung (SVD) [Krzanowski, 1988; Jolliffe, 2002].

Das Ziel des NIPALS-Verfahrens ist die Regression der Kultivierungsdaten in X mit dem Zeitvektor in Y. Dazu wird die Matrix Y,

$$Y = 1 \cdot \bar{y}^T + U \cdot Q^T + F, \tag{9.5}$$

durch U und Q modelliert. Die Matrix F gibt die Residuen wieder.

Die Projektion U,

$$U = T \cdot B + h, \tag{9.6}$$

beinhaltet eine Diagonalmatrix B, die eine Verbindung zwischen T und U und somit zwischen den Matrizen X,

$$X = 1 \cdot \bar{x}^T + T \cdot P^T + E, \tag{9.7}$$

und Y herstellt. Der Vektor h gibt die Residuen der inneren Beziehung zwischen X und Y wieder [Wold et al., 1984].

Für eine Analyse der Zyklen sind die Werte der Hauptkomponenten in T entscheidend. Sie sind eine Zusammenfassung der Daten in X. Die Daten der neun Zyklen aus der Zellanzuchtkultivierung wurden in drei Hauptkomponenten zusammengefasst. Ein Auszug der Werte ist in Tab. 9.4 gezeigt.

Tab. 9.4: Auszug aus den Hauptkomponentenwerten des Zellanzuchtmodells. Exemplarisch sind drei Messungen pro Zyklus gezeigt.

	ID #	t ₁	t ₂	t ₃
Zyklus 1.1	1	-5.24	1.68	2.10
Zyklus 1.1	2	-5.12	1.54	1.74
Zyklus 1.1	3	-5.02	1.42	1.54
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
Zyklus 2.1	237	-5.17	1.65	2.04
Zyklus 2.1	238	-5.08	1.53	1.71
Zyklus 2.1	239	-4.99	1.43	1.46
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

Für jede Messung liegt pro Hauptkomponente t_1 bis t_3 ein Wert vor. Korrespondierend dazu existiert für jede Ladung p_1 bis p_3 ein Wert pro Variable. Diese sind in Tab. 9.5 auszugsweise aufgelistet.

Tab. 9.5: Auszug aus den Ladungswerten des Zellanzuchtmodells.
Exemplarisch sind die Ladungswerte von drei Variablen gezeigt.

	x_1 pO_{21} [%]	x_2 N_{Stl} [rpm]	x_3 $c_{XLturb1}$ [g l^{-1}]	...
p_1	0.056	0.218	0.331	...
p_2	0.049	-0.444	-0.053	...
p_3	-0.569	0.071	-0.183	...

Die Kombination der Hauptkomponentenwerte mit den Ladungen beschreibt die Variation in den sechzehn gemessenen Variablen. Die Berechnung zu wie viel Prozent die Variation abgebildet ist, wird im Nachfolgenden erläutert.

Theoretisch lässt sich mit jeder weiteren gebildeten Hauptkomponente mehr Variation der Ausgangswerte abbilden. Die Vorhersage wird bei zunehmender Anzahl an Hauptkomponenten allerdings irgendwann wieder schlechter, da das Rauschen verstärkt wird. Daher muss eine optimale Anzahl an Hauptkomponenten bestimmt werden. Hauptkomponenten, die eine Vorhersage verschlechtern, werden als nicht signifikant bezeichnet.

Es gibt mehrere Kriterien zur Bestimmung signifikanter Hauptkomponenten [Otto, 1997; Jackson, 1991], von denen in der verwendeten Software SIMCA-P⁺ die Kreuzvalidierung [Eastment, 1982] verwendet wird. Bei der Kreuzvalidierung werden einzelne Daten aus der Matrix X entnommen und mit den verbleibenden Daten die Hauptkomponenten gebildet. Dann werden die entfernten Daten mit Hilfe des Modells vorhergesagt und diese mit den realen Werten verglichen. Das Verfahren wird solange wiederholt, bis alle Werte der Matrix X ein einziges Mal vorhergesagt wurden. Verschieden Verfahren zur Kreuzvalidierung wurden von Bro verglichen [Bro et al., 2008].

Die Software SIMCA-P⁺ nutzt die Kreuzvalidierung nach Krzanowski [Krzanowski et al., 1995; Bro et al., 2008], bei der ganze Zeilen zur Ermittlung von Ladungsvektoren und ganze Spalten zur Ermittlung von Hauptkomponentenvektoren aus dem Datensatz entfernt werden. Dieses Verfahren wird im Nachfolgenden erläutert.

Für die Matrix X (N x K) soll die Hauptkomponente a validiert werden. Zunächst wird die Summe der Quadrate SSX (sum of squares of X),

$$SSX = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^K x_{ij}^2, \tag{9.8}$$

der skalierten Matrix X gebildet.

Dann werden die Hauptkomponentenwerte und die Ladungen in zwei Zwischenberechnungen gebildet, wobei nach Krzanowski zur Berechnung der Hauptkomponentenwerte die Daten spaltenweise (Variablen) ausgelassen werden und zur Berechnung der Ladungen die Daten zeilenweise (Beobachtungen) ausgespart werden.

Die Vorhersage der Elemente in X,

$$\hat{x}_{ij}(a) = t_i^{-j} \cdot p_j^{-i} \quad (9.9)$$

über die Hauptkomponente a ist schließlich die Multiplikation des Hauptkomponentenwertes t_i , bei dem die Zeile j entfernt wurde, mit dem Ladungswert p_j , bei dem die Spalte i entfernt wurde.

Die Summe der Fehlerquadrate zwischen vorhergesagten und realen Werten wird in der Größe PRESS (predicted residual sum of squares),

$$\text{PRESS}(a) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^K (x_{ij} - \hat{x}_{ij}(a))^2, \quad (9.10)$$

festgehalten. PRESS ist somit eine Größe zur Beurteilung der Vorhersagbarkeit des Modells [Wold et al., 1987; Brereton, 2002]. In der Literatur wird zudem häufig der Wert RMSEP (root mean squared error of prediction) angegeben,

$$\text{RMSEP}(a) = \sqrt{\frac{\text{PRESS}(a)}{N}}, \quad (9.11)$$

welcher sich aus PRESS und der Anzahl an Beobachtungen N ergibt.

Der Anteil an der absoluten Variation Q^2X in der Matrix X pro Komponente a,

$$Q^2X(a) = 1 - \frac{\text{PRESS}(a)}{\text{SSX}}, \quad (9.12)$$

wird häufig angegeben, da durch den Wertebereich von minus unendlich bis eins die gleiche Achse wie bei R^2 verwendet werden kann.

Nach jedem NIPALS-Durchlauf wird die Kreuzvalidierung mit der neusten Hauptkomponente durchgeführt und entschieden, ob der Algorithmus fortgeführt oder die optimale Anzahl an Hauptkomponenten gefunden ist. Dazu wurden für die Software SIMCA-P⁺ einige Regeln aufgestellt [Umetrics AB, 2008].

Im Allgemeinen ist die Kreuzvalidierung ein konservatives Verfahren, welches eher zu weniger als zu vielen Hauptkomponenten führt. Daher werden die Daten nicht überinterpretiert [Wold et al., 1987].

Ist die Modellbildung abgeschlossen, kann das Modell anhand von Kenngrößen beurteilt werden.

Der Anteil einer Hauptkomponente a an der Beschreibung der gesamten Variation in X,

$$R^2X(a) = \frac{\sum_{i=1}^N t_i^2(a)}{\text{SSX}}, \quad (9.13)$$

berechnet sich aus der Quadratsumme der Hauptkomponentenwerte [Brereton, 2002].

Die Summe der erklärenden Variation aller Hauptkomponenten R^2X_{cum} (engl. **cumulative**) spiegelt die Güte der Anpassung (engl. goodness of fit) wieder und variiert zwischen null und eins. Diese steigt mit der Anzahl an Komponenten.

Die Güte der Anpassung kann auch nach der Bildung aller signifikanten Hauptkomponenten berechnet werden. Dazu wird die verbliebende Variation in den Residuen (Matrix E),

$$RSS = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^K e_{ij}^2, \quad (9.14)$$

bestimmt (residual sum of squares).

Somit lässt sich direkt die Güte der Anpassung,

$$R^2X_{\text{cum}} = 1 - \frac{RSS}{SSX}, \quad (9.15)$$

berechnen.

Zur Modellbeurteilung ist die Güte der Vorhersagbarkeit Q^2X (goodness of prediction) wichtiger als die Güte der Anpassung. Die Berechnung von Q^2X pro Hauptkomponente in Gl.(9.12) erfolgt aus den Ergebnissen der Kreuzvalidierung.

Die Güte der Anpassung unter Einbeziehung aller Hauptkomponenten,

$$Q^2X_{\text{cum}} = 1 - \prod_{a=1}^A \left(\frac{PRESS}{SSX} \right)_a, \quad (9.16)$$

ist im Gegensatz zu R^2X nicht eine Summe, sondern ein Produkt.

Die Güte der Anpassung bezogen auf die Daten in der Matrix Y,

$$R^2Y_{\text{cum}} = 1 - \frac{RSS}{SSY}, \quad (9.17)$$

mit

$$SSY = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^K y_{ij}^2, \quad (9.18)$$

wird ebenfalls berechnet.

Auch die Güte der Vorhersagbarkeit für die Daten der Matrix Y,

$$Q^2Y = 1 - \frac{PRESS}{SSY}, \quad (9.19)$$

kann berechnet und somit zur Beurteilung des Modells herangezogen werden.

Die Güte der Anpassung unter Einbeziehung aller Hauptkomponenten,

$$Q^2Y_{\text{cum}} = 1 - \prod_{a=1}^A \left(\frac{PRESS}{SSY} \right)_a, \quad (9.20)$$

berechnet sich analog zu Q^2X_{cum} als Produkt der Güte der Anpassung für jede Komponente.

Analog zu den Richtwerten bei der MLR (siehe Kapitel 8) kann ein Modell als gut erachtet werden, wenn Q^2X_{cum} bzw. Q^2Y_{cum} größer als 0.5 ist und als exzellent bei Q^2X_{cum} bzw. Q^2Y_{cum} größer als 0.9. Der Unterschied zwischen R^2X_{cum} und Q^2X_{cum} bzw. zwischen R^2Y_{cum} und Q^2Y_{cum} sollte dabei weniger als 0.3 betragen [Eriksson et al., 2006].

Bei der Modellierung der Zellanzucht über eine PLS-Regression wurden drei Hauptkomponenten gebildet. Die Variation der Matrix X konnte damit zu 87 % (R^2X_{cum}) beschrieben und eine Güte der Vorhersagbarkeit für Y von 99 % (Q^2Y_{cum}) erreicht werden. Die Ergebnisse der Modellbildung sind detailliert in Tab. 9.6 dargestellt.

Tab. 9.6: Ergebnis des Zellanzucht Modells pro Hauptkomponente a

A	R^2X	R^2X_{cum}	R^2Y	R^2Y_{cum}	Q^2Y	Q^2Y_{cum}
a_1	0.541	0.541	0.926	0.926	0.925	0.925
a_2	0.196	0.737	0.058	0.983	0.761	0.982
a_3	0.132	0.869	0.006	0.989	0.306	0.988

Die durch die Kreuzvalidierung berechnete Größe Q^2Y aus Gl.(9.19) gibt an, wie gut sich die Werte in X zu einem bestimmten Zeitpunkt zuordnen lassen. Wichtiger ist allerdings die Größe R^2X_{cum} aus Gl.(9.15). Diese beschreibt die Güte, mit der die Hauptkomponenten die Daten in X zusammenfassen.

Für die Modellierung wurden 2144 Messungen aus neun Zyklen verwendet. Zu jeder Messung lagen dabei Werte von sechzehn Variablen vor. Basierend darauf soll nun das Modell genutzt werden, um andere Zyklen des Zellanzuchtprozesses zu analysieren und zu beurteilen.

Dazu werden die Hauptkomponentenwerte über die neun Zyklen basierend auf der Kultivierungszeit gemittelt. Zu jedem Zeitpunkt im Datensatz wird zudem die Standardabweichung über die neun Hauptkomponentenwerte berechnet. Neben dem Mittelwert der Hauptkomponente erfolgt eine Angabe des Mittelwertes nach Addition sowie Subtraktion mit dem dreifachen der Standardabweichung. Ein Auszug dieser berechneten Werte ist in Tab. 9.7 gezeigt.

Der Verlauf des jeweiligen Hauptkomponentenmittelwertes über die Zeit mit den Grenzen plus/minus drei Standardabweichungen kann als Goldener Batch bzw. als *golden tunnel* bezeichnet werden.

Tab. 9.7: Auszug aus den Mittelwerten mit Standardabweichungen.
Exemplarisch ist der Mittelwert der ersten Hauptkomponente gezeigt.

y time [h]	t_1 Zyklus 1.1	t_1 Zyklus 2.1	...	\bar{t}_1	$\bar{t}_1 + 3\sigma$	$\bar{t}_1 - 3\sigma$...
0.1	-5.24	-5.17	...	-5.19	-4.96	-5.42	...
0.2	-5.12	-5.08	...	-5.10	-4.88	-5.32	...
0.3	-5.02	-4.99	...	-4.99	-4.82	-5.16	...
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

Für die Analyse von anderen Zellanzuchtzyklen können aus den Werten der sechzehn Variablen in Verbindung mit den Ladungen Werte für die drei Hauptkomponenten berechnet

werden. Dies kann sogar während des Zyklus erfolgen, sodass eine Analyse online durchgeführt werden kann.

Weichen Hauptkomponentenwerte eines Zyklus mehr als drei Standardabweichungen vom jeweiligen Goldenen Batch ab, so liegt eine Prozessabweichung vor, die untersucht werden muss. Da die einzelnen Hauptkomponenten eine abfallende Güte der Anpassung besitzen, ist eine angepasste Beurteilung notwendig. Eine Abweichung im dritten Goldenen Batch (für die dritte Hauptkomponente) hat mit geringerer Wahrscheinlichkeit eine ernste Konsequenz zur Folge, als eine Abweichung im ersten Goldenen Batch (für die erste Hauptkomponente).

In Abb. 9.4 ist der Goldene Batch der ersten Hauptkomponente des Zellanzuchtmodells mit plus/minus drei Standardabweichungen gezeigt.

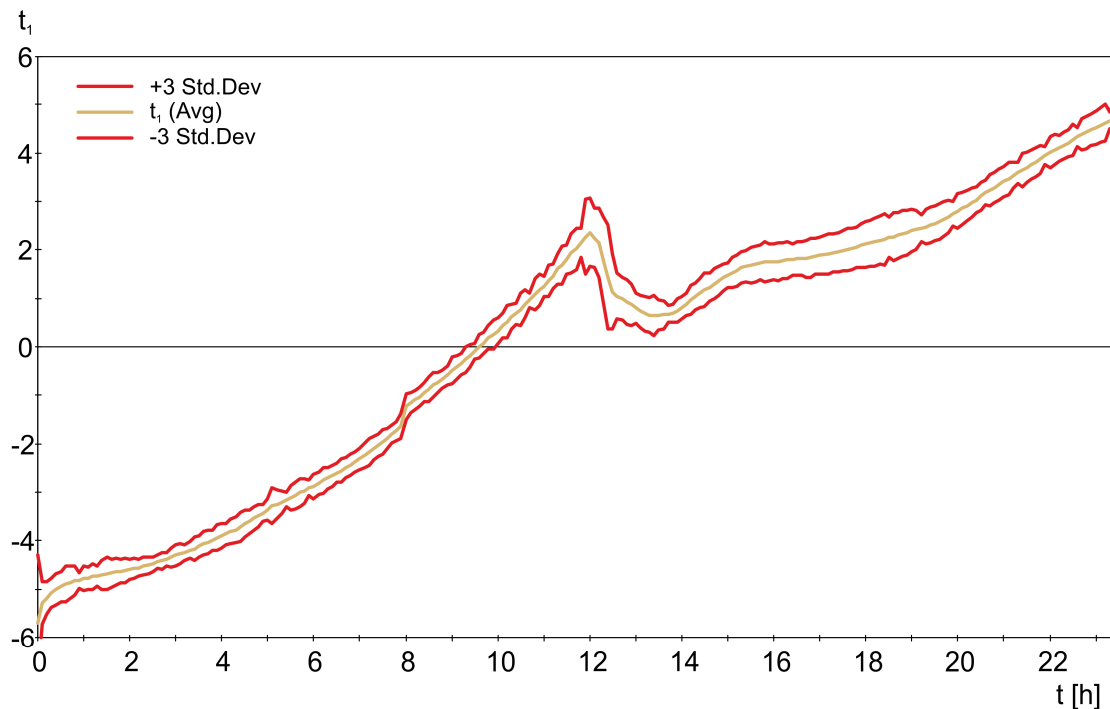


Abb. 9.4: Goldener Batch der ersten Hauptkomponente des Zellanzuchtmodells

Innerhalb der durch den Verlauf des Hauptkomponentenmittelwertes plus/minus drei Standardabweichungen festgelegten Grenzen müssen Hauptkomponentenwerte von Zyklen liegen, damit diese als nicht abweichend beurteilt werden können.

Der Verlauf der Hauptkomponentenwerte der neun Zyklen, die zur Modellbildung verwendet wurden ist in Abb. 9.5 gezeigt. Die Werte liegen zu jedem Zeitpunkt innerhalb des Goldenen Batches.

Da die gezeigten Zyklen für die Modellbildung verwendet wurden, ist dieses Ergebnis nicht überraschend, bestätigt aber die erfolgreiche Modellierung der Zellanzucht. Zur Validierung des Modells sind Zyklen erforderlich, die nachweislich vom Soll abgewichen sind. Mit derartigen Zyklen kann das Modell geprüft und die Erkennung von Abweichungen bestätigt werden.

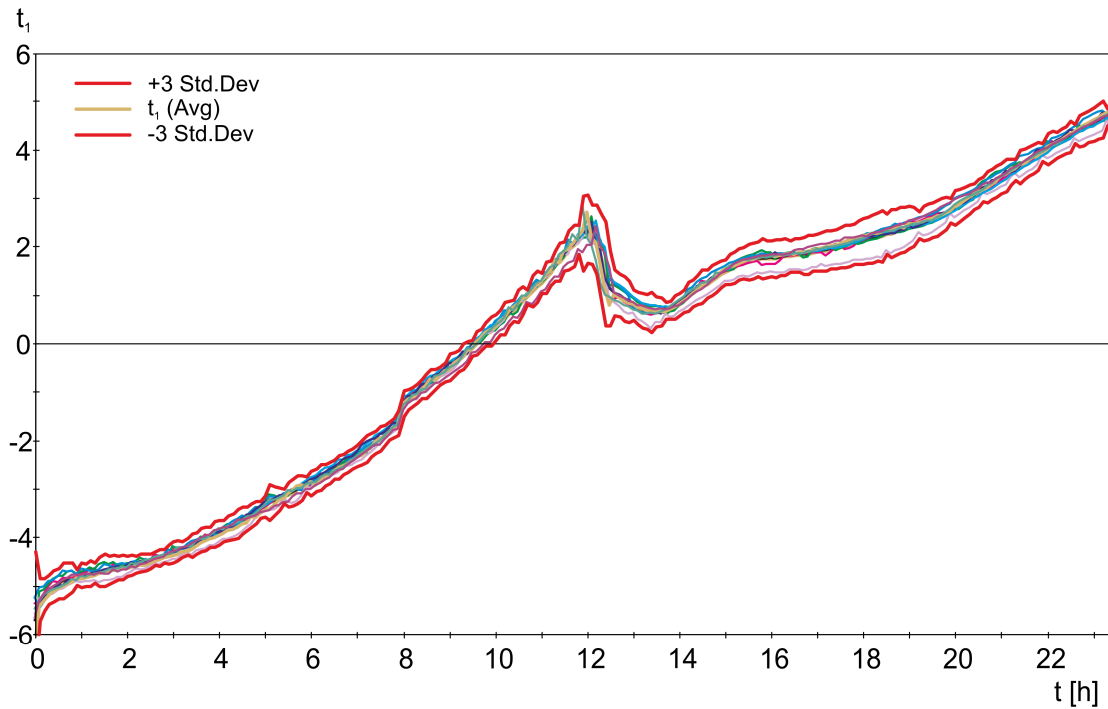


Abb. 9.5: Verlauf der Hauptkomponentenwerte (t_1) der neun Zyklen, die für die Modellbildung verwendet wurden.

In Abb. 9.6 ist ein Zyklus des Zellanzuchtprozesses gezeigt, der manipuliert wurde. In der Induktionsphase bei einer Zykluszeit von 18 h wurde die Methanolvorlage geleert und somit die Zufütterung von Methanol unterbrochen. Dies ist an dem Verlauf der Variable m_{S2in1} zu erkennen, welche die dem Reaktor zugeführte Masse an Methanol wiedergibt.

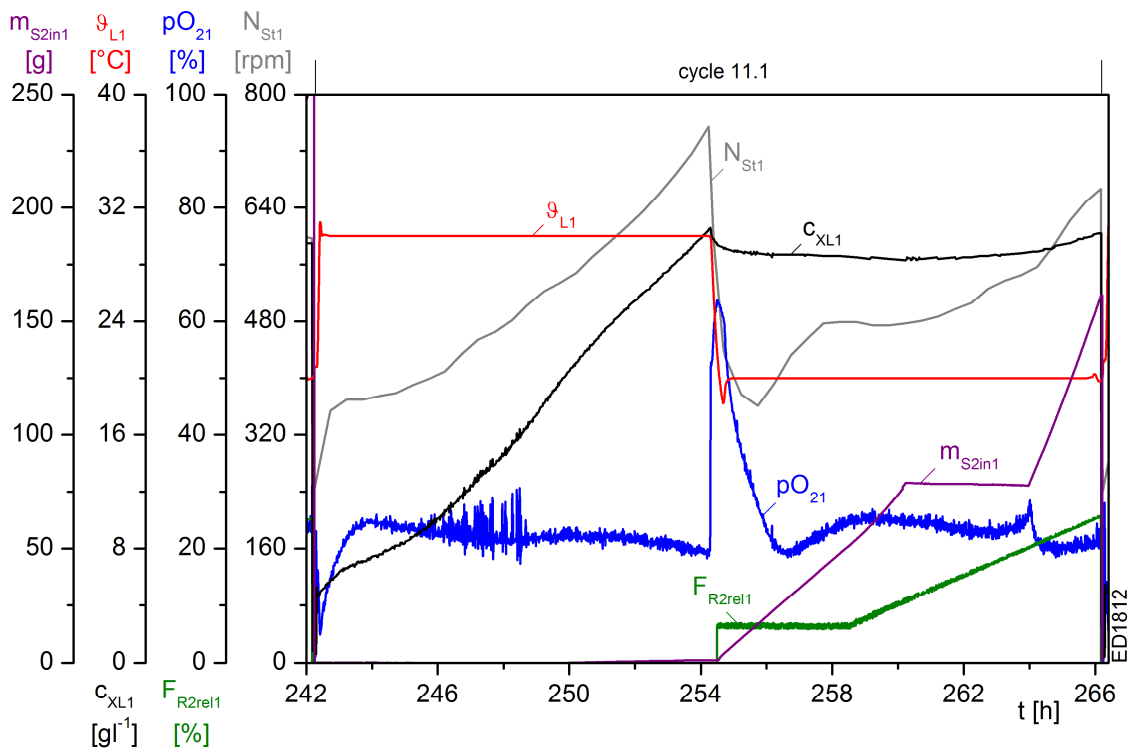


Abb. 9.6: Verlauf einer Auswahl an Variablen eines Validierungszyklus in Zellanzuchtreaktor

Da das Waagsignal der Methanolvorlage m_{R21} ein Bestandteil bei der Modellbildung war, sollte diese Abweichung in dem Verlauf der Hauptkomponenten sichtbar werden. Es ist in Abb. 9.6 erkennbar, dass der pO_{21} Wert zum Ende der Unterbrechung der Methanolzufütterung ansteigt. Alle weiteren Verläufe lassen nicht auf eine Abweichung schließen.

Aus den Daten des Validierungszyklus können über die Ladungswerte des Zellanzuchtmodells Hauptkomponentenwerte berechnet werden. In Abb. 9.7 sind die Werte der ersten Hauptkomponente zusammen mit dem ersten Goldenen Batch dargestellt.

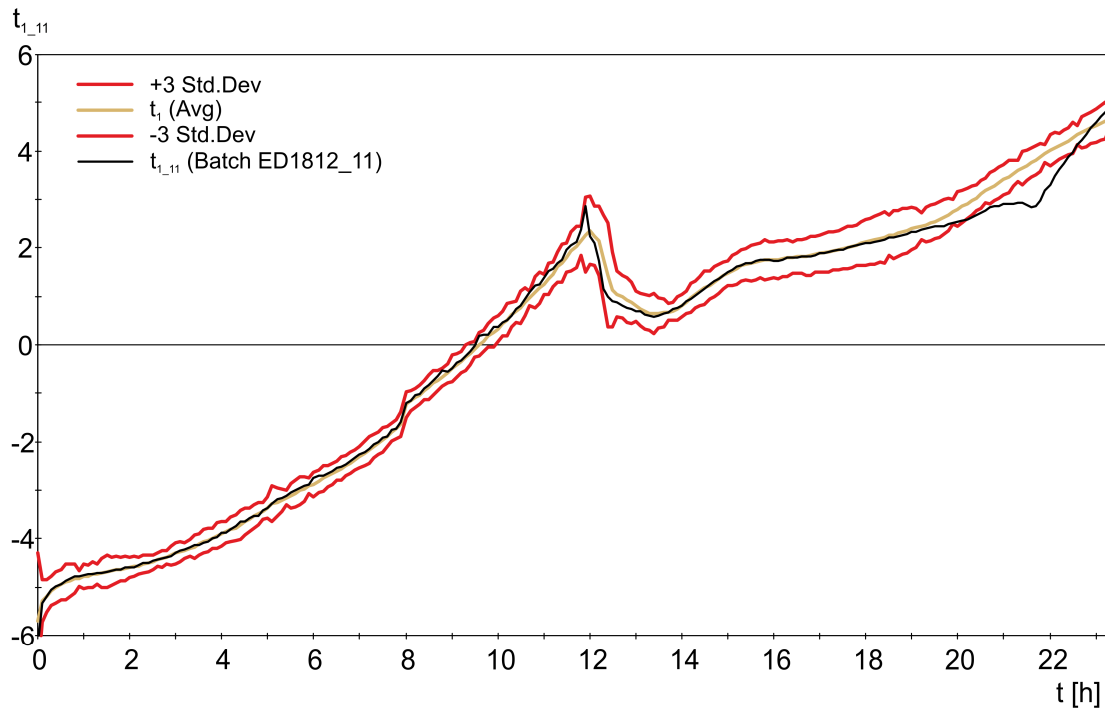


Abb. 9.7: Verlauf der Hauptkomponentenwerte (t_1) des zu analysierenden Zyklus Nummer 11 über dem ersten Goldenen Batch

Während der Batch Phase liegen die Werte innerhalb des ersten Goldenen Batches. In der Induktionsphase bei einer Zykluszeit von ca. 20 h verlassen die Hauptkomponentenwerte den Goldenen Batch. Im weiteren Verlauf nähern sich die Hauptkomponentenwerte wieder dem Goldenen Batch an. Das Modell hat somit funktioniert und über die Abweichung der Hauptkomponentenwerte vom Goldenen Batch den manipulierten Zyklus als abweichend identifiziert.

Mit der Beobachtung der Hauptkomponentenwerte über die Definition von Goldenen Batches können somit Zyklen analysiert und beurteilt werden. Solange die Werte innerhalb der Goldenen Batches liegen ist derjenige Zyklus als nicht abweichend zu betrachten. Eine Analyse ist sehr einfach und schnell, da im vorliegenden Zellanzuchtmodell die Goldenen Batches von nur drei Hauptkomponenten betrachtet werden müssen.

Die Alternative wäre eine Beobachtung der sechzehn Variablen, die in das Modell eingegangen sind. Dies ist aber nicht praktikabel. Zudem sind für die Variablen keine Prozessgrenzen definiert, sodass sehr viel Wissen über den Prozess und dessen Verhalten vorausgesetzt werden muss.

Es wäre zudem möglich, mit diesem Modell der Zellanzucht bereits während der Zyklus läuft Hauptkomponentenwerte zu berechnen und mit dem Goldenen Batch zu vergleichen, um während des Prozesses eventuelle Veränderungen oder Abweichungen zu identifizieren. Damit könnte ein schnelles Handeln ermöglicht und somit Ausschuss verringert werden.

9.3 Untersuchung der zyklischen Produktion

Auch bei dem Produktionsprozess kann über eine Modellbildung mit der Multivariaten Datenverarbeitung eine Analyse und Beurteilung von Zyklen erfolgen. Zur Erstellung eines Modells wurden Daten aus Zyklen der Kultivierung XX3710 verwendet. Diese Kultivierung diente der Generierung von Zellen und Produkt zur anschließenden Durchführung einer Separation und Mikrofiltration. Das Ziel lag in der Optimierung der Mikrofiltration mit Design of Experiments.

Für eine erfolgreiche Durchführung der Optimierung war das Vorliegen von Ausgangsmaterial von möglichst identischer Qualität notwendig. Daher wurden bei der Kultivierung alle Prozessollwerte konstant gehalten. Dies erfüllt die Grundvoraussetzung zur Erstellung von Prozessmodellen, welche später für das Prozessmonitoring genutzt werden können. Der beispielhafte Verlauf einiger Variablen während Zyklen der Produktionskultivierung ist in Abb. 9.8 dargestellt.

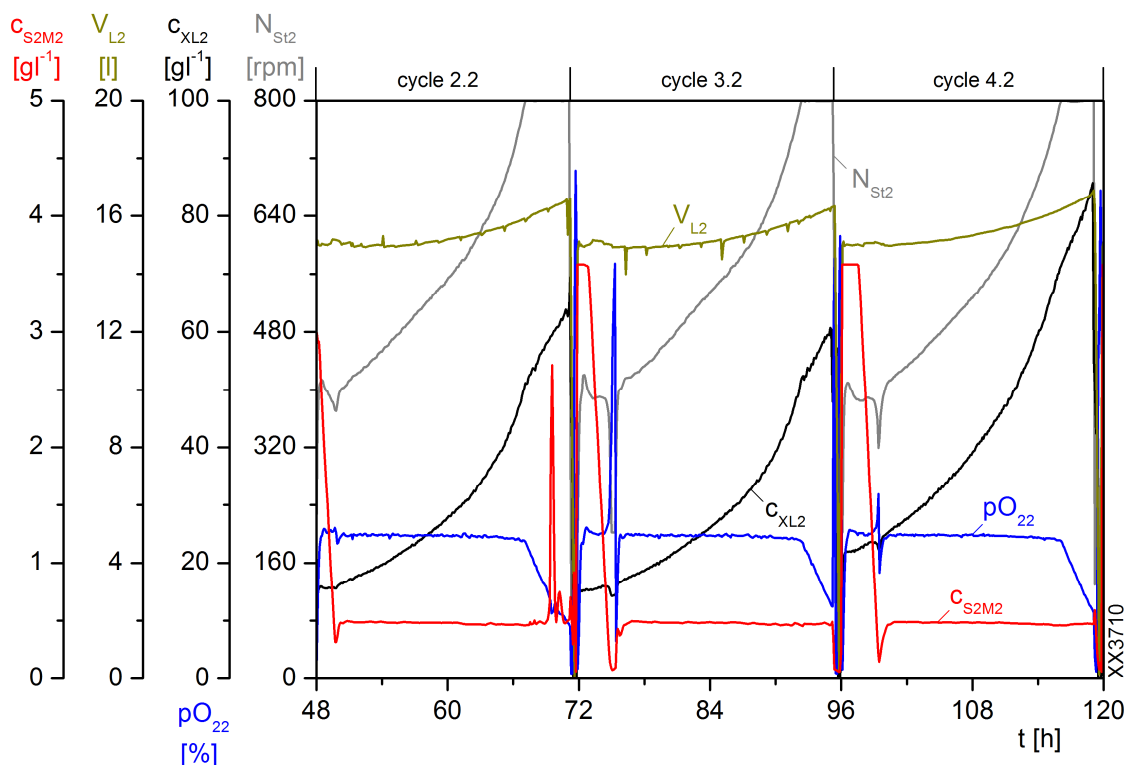


Abb. 9.8: Drei Zyklen einer Produktionskultivierung, die neben weiteren für die Erstellung eines Produktionsmodells genutzt wurden

Die zur Modellbildung verwendete Kultivierung beinhaltet zwanzig jeweils 24 stündige Zyklen, in denen Daten von fünfzehn Variablen vorliegen. Bei der Betrachtung der Verläufe dieser Variablen fielen bei acht Zyklen Abweichungen auf. Diese Abweichungen lagen haupt-

sächlich bei falsch eingestellten Sollwerten während der Initialisierung eines neuen Zyklus oder bei Fehlern in Messsystemen.

Zur Modellbildung wurden daraufhin zwölf Zyklen verwendet. Die verbliebenen acht Zyklen werden nachfolgend zum Testen des Modells verwendet. Werden die acht Testzyklen als Abweichung erkannt, so ist das erstellte Modell zum Prozessmonitoring geeignet.

Die für die Modellierung zur Verfügung stehenden fünfzehn Variablen sind in Tab. 9.8 aufgelistet. Der Reaktorüberdruck p_{G2} und die Begasungsrate F_{nAIR2} wurden zentriert, alle anderen Variablen wurden autoskaliert.

Tab. 9.8: Variablen der X Matrix für Modell XX3710

Variable	N_{St2}	p_{O22}	c_{S2M2}	$c_{XLturb2}$	F_{nAIR2}	F_{R22}	p_{G2}	pH_2
Einheit	[rpm]	[%]	[g ^l ⁻¹]	[g ^l ⁻¹]	[lmin ⁻¹]	[lh ⁻¹]	[mbar]	[-]
Variable	E_{L2}	ϑ_{DJ2}	ϑ_{L2}	V_{L2}	x_{O22}	m_{R22}	m_{T22}	
Einheit	[AU]	[°C]	[°C]	[l]	[-]	[g]	[g]	

Die Zentrierung gegenüber der Autoskalierung für die Variablen p_{G2} und F_{nAIR2} wurde aufgrund der in Kapitel 9.2 erläuterten Gründe durchgeführt. Die Daten der Produktionszyklen wurde wie bei der Modellierung der Zellanzucht in eine für die Software SIMCA P⁺ auswertbare Form gebracht und ein Modell aus Hauptkomponenten und Ladungen erstellt.

Der Verlauf der zwölf Zyklen wurde in einem Modell mit vier Hauptkomponenten zusammengefasst. Die Güte der Modellierung ist in Tab. 9.9 gezeigt.

Tab. 9.9: Ergebnis des Modells für die Produktion

A	R²X	R²X_{cum}	R²Y	R²Y_{cum}	Q²Y	Q²Y_{cum}
a₁	0.632	0.632	0.965	0.965	0.965	0.965
a₂	0.060	0.692	0.012	0.977	0.329	0.976
a₃	0.040	0.733	0.004	0.981	0.182	0.981
a₄	0.067	0.799	0.001	0.982	0.055	0.982

Nach der Bildung der vier Hauptkomponenten kann die Variation in X zu 80 % beschrieben werden. Die Güte der Anpassung an Y sowie die Güte der Vorhersagbarkeit von Y beträgt jeweils 98 %.

Über das Hinzufügen des Toleranzbandes mit plus/minus drei Standardabweichungen zu jeder Hauptkomponente können vier Goldene Batches erstellt werden, mit denen der Produktionsprozess analysiert und beurteilt werden kann. Wie bereits angekündigt, können die acht Zyklen der Produktionskultivierung, bei denen bereits Abweichungen festgestellt wurden, zur Validierung des Modells genutzt werden.

In Abb. 9.9 sind die Verläufe der ersten Hauptkomponente der acht Zyklen über dem Goldenen Batch der ersten Hauptkomponente dargestellt.

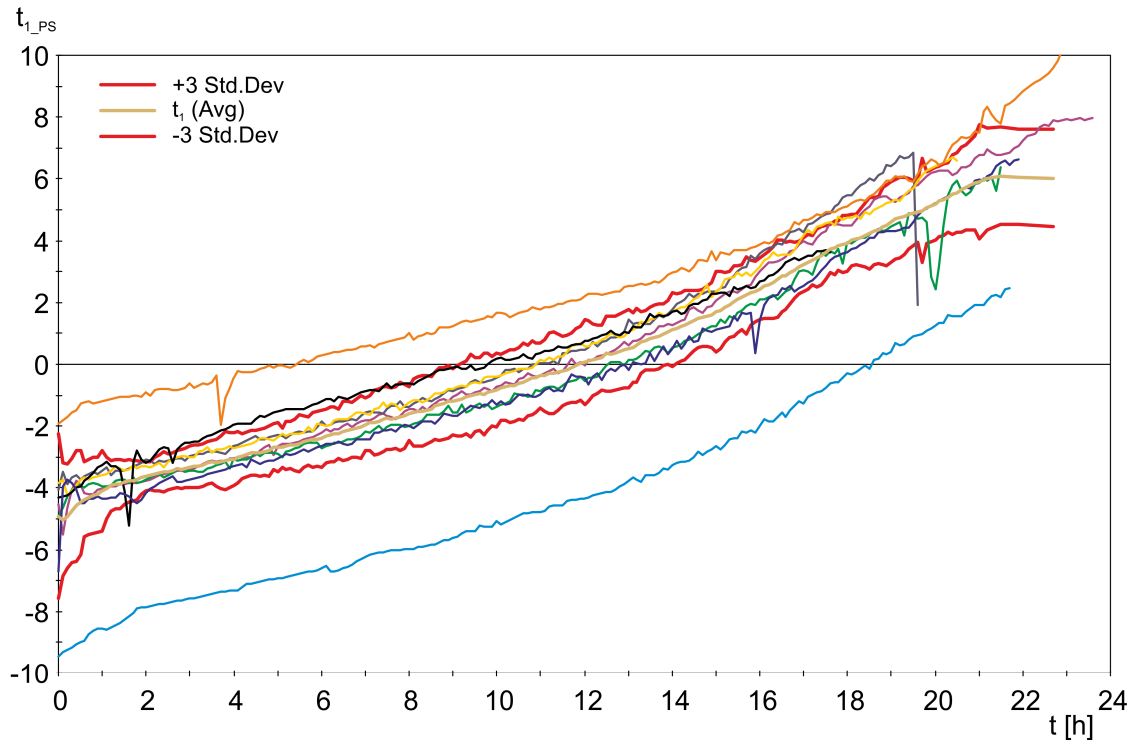


Abb. 9.9: Goldener Batch der ersten Hauptkomponente mit Werten von acht Validierungszyklen

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Hauptkomponentenwerte zweier Zyklen stark vom mittleren Verlauf der ersten Hauptkomponente abweichen. Ein Zyklus weist zu niedrige Werte und ein anderer Zyklus zu hohe Werte für t_1 auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei den beiden stark abweichenden Zyklen andere Sollwerte für den pH-Wert vorgegeben waren. Der pH-Sollwert für die modellbildenden Zyklen lag bei 5.5. Die Sollwerte für den pH-Wert bei den abweichenden Zyklen lagen bei 5.0 bzw. 6.0.

Die anderen sechs Zyklen liegen zum größten Teil innerhalb des Toleranzbandes. Bei genauerer Betrachtung sowie durch Einbeziehung der drei weiteren Goldenen Batches für die zweite bis vierte Hauptkomponente wurden sieben der acht Validierungszyklen als abweichend identifiziert.

Eine Abweichung ist auf einen Reglerausfall zurückzuführen, welcher zu einer kurzen Sauerstofflimitierung geführt hat. Zwei weitere Abweichungen entstanden durch einen jeweils zu starken Temperaturanstieg am Ende des Zyklus. Zudem gab es kurze Anstiege des pH-Wertes bzw. der Methankonzentration. Damit hat das Modell auch nicht dauerhafte, kurzfristige Abweichungen identifizieren können.

Durch die Einbeziehung weiterer Zyklen aus künftigen Kultivierungen wird eine Verbesserung des Modells erreicht werden, sodass abweichende Zyklen eindeutig erkannt werden. Damit können Abweichungen mit einem Golden Batch Monitoring im Vergleich zur klassischen Beobachtung der einzelnen Variablen mindestens genauso schnell erkannt

werden, mit dem Vorteil, dass nur wenige Hauptkomponentenverläufe beobachtet werden müssen.

Auf einen abweichenden Validierungszyklus (XX3710_3) soll im Nachfolgenden näher eingegangen werden, um das Potenzial der Golden Batch-Analyse aufzuzeigen. Der Verlauf der ersten Hauptkomponente dieses Zyklus ist in Abb. 9.10 gezeigt.

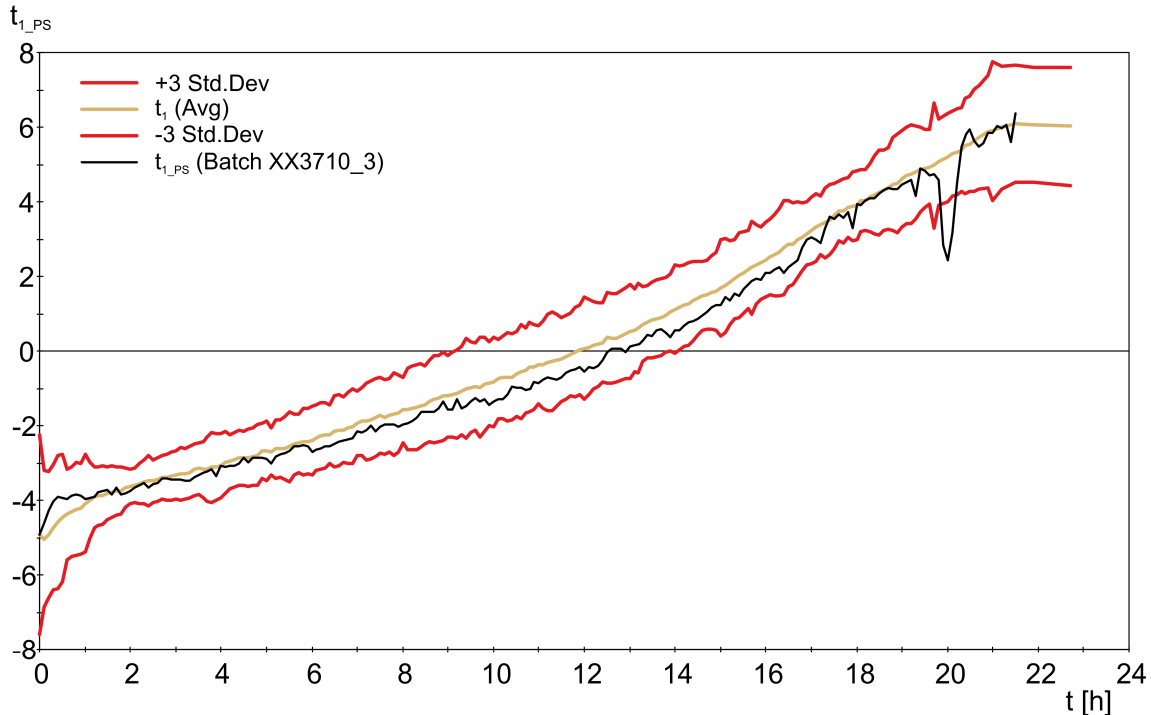


Abb. 9.10: Goldener Batch des Produktionsmodells mit Verlauf der ersten Hauptkomponente des Validierungszyklus XX3710_3

Bei $t = 20$ h hat die erste Hauptkomponente deutlich erkennbar den Goldenen Batch verlassen. Zur Ergründung der Ursache auf der Ebene der Eingangsvariablen wird ein Contribution Plot erstellt. Dieser stellt Abweichungen von allen Eingangsvariablen dar. Dabei bezieht sich der Wert der Abweichung auf die Differenz zwischen dem untersuchten Zyklus zu dem Mittelwert der Variablenwerte aus den zwölf modellbildenden Zyklen.

Der Contribution Plot zur ersten Hauptkomponente des Validierungszyklus zum Zeitpunkt $t = 20$ h ist in Abb. 9.11 gezeigt.

Große Abweichungen sind bei der Methanolkonzentration c_{S2M2} sowie bei der Methanol-Zufüterraterate F_{R22} zu erkennen. Die Abweichung der Zufüterraterate begründet sich darauf, dass während der Produktion die Methanolkonzentration geregelt wird und die Zufüterraterate die Stellgröße darstellt. Eine positive Abweichung der Methanolkonzentration, also ein zu hoher Wert, bewirkt durch die Regelung eine geringe Zufüterraterate und somit eine negative Abweichung.

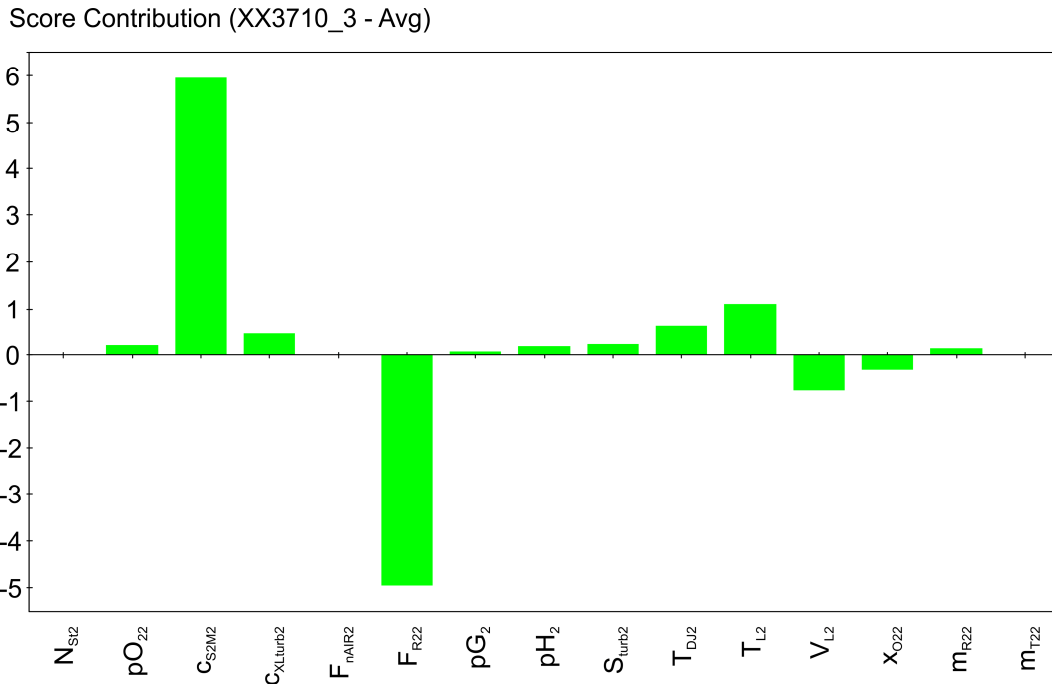


Abb. 9.11: Contribution Plot der ersten Hauptkomponente des Validierungszyklus bei $t = 20$ h
 Um die Ursache einer Abweichung näher zu untersuchen, kann ein Variable Plot erstellt werden. In Abb. 9.12 ist der Variable Plot der Methanolkonzentration für den untersuchten Zyklus dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Methanolkonzentration bei $t = 20$ h stark ansteigt und Werte über 2 gl^{-1} annimmt.

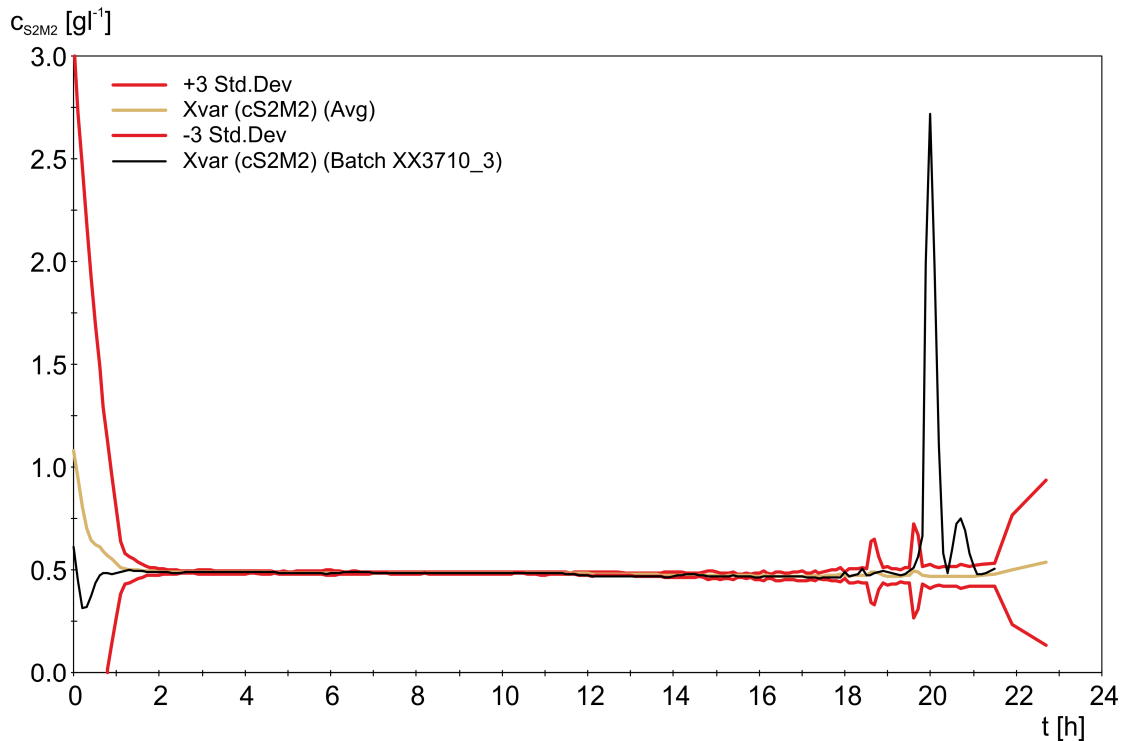


Abb. 9.12: Variable Plot für die Methanolkonzentration des Validierungszyklus XX3710_3
 Eine mögliche Ursache wäre eine vorherige Zugabe einer größeren Menge an Methanol in den Produktionsreaktor. Da dies ausgeschlossen werden konnte, wurde weiter nach der Ursache geforscht und schließlich bei der Messtechnik gefunden. Die Methanoldmessung erfolgt

über die Verbrennung der Abluft mit Wasserstoff und deren Analyse mit einem Flammenionisationsdetektor. Da das Wasserstoffreservoir zum Zeitpunkt $t = 20$ h erschöpft war, lieferte der Detektor falsche Messwerte und es entstand der Eindruck einer zu hohen Methanolkonzentration im Reaktor.

Nach dem sofortigen Auffüllen des Wasserstoffreservoirs wurden wieder korrekte Messwerte aufgezeichnet, wie in Abb. 9.12 zu erkennen ist. Auch die Werte der ersten Hauptkomponente verliefen nach der Wiederherstellung der Messtechnik laut Abb. 9.10 wieder im Goldenen Batch. Eine lang anhaltende Prozessabweichung konnte somit abgewendet werden.

Der Fehler in der Messtechnik wurde in dem Zyklus XX3710_3 schnell entdeckt, da der Verlauf der Methanolkonzentration ständig beobachtet wurde. Hätte eine Beobachtung z. B. nur auf den Variablen c_{XL} und pO_2 statt gefunden, wäre der Fehler vermutlich erst viel später aufgefallen. Das Potential des Prozessmonitoring bzw. der Golden Batch-Analyse im Online-Betrieb besteht in der ständigen Beobachtung aller relevanter Kultivierungsparameter. Es entfällt die visuelle Beobachtung der vielen aufgezeichneten Variablen auf deren korrekten Verlauf und wird ersetzt durch die Beobachtung des Verlaufs der wenigen Hauptkomponenten.

Die Analyse von Zyklen über den Verlauf der Hauptkomponenten, den Goldenen Batches, ist daher eine effektive Möglichkeit zur Prozesskontrolle. Zudem bietet diese eine schnelle Fehlererkennung, um lang anhaltende Prozessabweichungen zu vermeiden und somit die Ausschussrate, also die Anzahl an nicht zu verwendenden Zyklen bezogen auf alle Zyklen, zu senken. Die Möglichkeit, Zyklen miteinander zu vergleichen und zu bewerten bzw. gegen Parameter oder nicht kontrollierbare Einflüsse zu untersuchen, besteht ebenfalls, wird aber nicht weiter beschrieben.

10 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit, die Verbesserung von Produktionsprozessen zur Herstellung rekombinanter Proteine, konnte auf unterschiedliche Art und Weisen dargestellt werden. Am Beispiel der Herstellung einer Lipase B aus *Candida antarctica* mit der Hefe *Pichia pastoris* wurde gezeigt, dass eine Prozessverbesserung bzw. Prozessoptimierung bei der Ausrüstung des Prozesses mit hinreichender Messtechnik und Analysensystemen beginnt.

Nur wenn die Zustände in den Teilanlagen jederzeit bekannt sind, kann ggf. in den Prozess eingegriffen bzw. dieser korrigiert werden. Zudem ermöglicht die Messtechnik, wie in dieser Arbeit beschrieben, die Realisierung ausgeklügelter Prozessführungsstrategien.

Ein Ansatz, um standardmäßige Batch /Fed-Batch Prozesse für *Pichia pastoris* in die Richtung einer kontinuierlichen Prozessführung zu lenken, wurde mit der sequenziell/parallelen Auslegung der CALB Produktion mit zwei Bioreaktoren gezeigt.

Dazu ist ein leistungsstarkes Automatisierungssystem, wie das industriell eingesetzte SIMATIC PCS 7 erforderlich sowie eine starke Vernetzung von verschiedenen Automatisierungssysteme und Anlagensteuerungen, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Eine detaillierte und fein abgestimmte Automatisierung der Prozesse sichert einen reproduzierbaren, stabilen und definierten Prozess.

Die Optimierung der Prozesse auf biochemischer Ebene ist eine weitere Option der Prozessverbesserung. Es wurde gezeigt, dass die Methanolkonzentration in dem untersuchten Wertebereich keinen signifikanten Einfluss auf die Produktivität ausübt. Durch die Identifizierung optimaler Sollwerte für die Kultivierungstemperatur und den pH-Wert wurde die Produktivität um 60 % gesteigert. Dieses Ergebnis wurde allerdings nicht experimentell bestätigt.

Die Beobachtung und Analyse des Prozesses über die multivariate Analyse bzw. Auswertung aller zur Verfügung stehenden Kultivierungsdaten sichert die Reproduzierbarkeit und steigert das Verständnis der komplexen Zusammenhänge in einem Bioprozess. Zudem ermöglicht die multivariate Analyse eine Online-Beobachtung der Prozesse und somit ein schnelles Eingreifen bei Prozessabweichungen.

Die Einbindung der Downstreamoperationen nach dem Upstream in einen Integrierten Bioprozess wurde in dieser Arbeit beschrieben aber nicht näher spezifiziert. Die enge Vernetzung vom Up- und Downstream ermöglicht die Anpassung der Downstreamoperationen an aktuell vorliegende Bedingungen im Upstream und trägt somit ebenfalls zur Verbesserung des Gesamtprozesses bei.

11 Anhang

11.1 Verwendete Medien

Für die Kultivierung von *Pichia pastoris* wurde ein definiertes Salzmedium (FM22) verwendet. Die Zusammensetzung des Mediums sowie die verwendeten Stammlösungen sind in Tab. 11.1, Tab. 11.2 und Tab. 11.3 aufgeführt.

Tab. 11.1: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Komponente	Konzentration [gl ⁻¹]			
	Vorkulturmedium	Batchmedium	Refreshmedium ED10	Refreshmedium C30
C ₃ H ₈ O ₃	30	47.6	43.6	0
KH ₂ PO ₄	25.7	12.85	12.85	12.85
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	2.5	2.5	2.5
K ₂ SO ₄	8.6	4.3	4.3	4.3
CaSO ₄ * 2 H ₂ O	1.4	0.7	0.7	0.7
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	16.4	8.2	8.2	8.2
Na ₃ -citrate * 2 H ₂ O	5.9	2.9	2.9	2.9
Stammlösung	Zugabe [ml ⁻¹]			
Biotin	8	8	8	8
PTM4	4	4	4	4

Tab. 11.2: Zusammensetzung der PTM4 Stammlösung

Komponente	Konzentration
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	2.0 gl ⁻¹
NaI	0.080 gl ⁻¹
MnSO ₄ * H ₂ O	3.0 gl ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.20 gl ⁻¹
H ₃ BO ₃	0.020 gl ⁻¹
CaSO ₄ * 2H ₂ O	0.50 gl ⁻¹
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.50 gl ⁻¹
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	7.0 gl ⁻¹
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	22.0 gl ⁻¹
H ₂ SO ₄	1.0 ml

Tab. 11.3: Zusammensetzung der Biotin Stammlösung

Komponente	Konzentration
C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.20 gl ⁻¹

Der Ansatz des Mediums erfolgt in Glasflaschen bzw. Edelstahltanks. Zunächst werden die Salze gelöst und die Kohlenstoffquelle Glycerol hinzugegeben. Dann wird die Lösung im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisiert. Die sterilfiltrierten Stammlösungen werden über einen sterilen Zugang im Anschluss an die Sterilisation zu der abgekühlten Lösung gegeben.

Zur Titration und zur Vermeidung bzw. Verringerung der Schaumbildung werden im Zellanzuchtreaktor sowie im Produktionsreaktor die in Tab. 11.4 aufgeführten Vorlagen verwendet.

Tab. 11.4: Zusammensetzung der Titrationsvorlagen und Antischaummittel

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
T ₁	H ₃ SO ₄	2 mol ⁻¹
T ₂	NH ₃	12.5 %
AF	Struktol [®] J 673	unverdünnt

11.2 Reagenzien der Analytik

In Tab. 11.5 und Tab. 11.6 sind die verwendeten Einsatzstoffe und Konzentrationen zur Atline- bzw. Offline-Analytik aufgeführt. Bei Angabe eines pH-Wertes wurde dieser mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

Tab. 11.5: Reagenzien und Konzentrationen zur Atline-Analytik

	Bezeichnung	Komponente	Konzentration	pH
pH Stat	Substrat	Tributyrin	5 %	/
		Gummi arabicum	2 %	/
	Titrationmittel	NaOH	0.1 mol ⁻¹	/
HPLC	Citratpuffer (Laufpuffer)	C ₆ H ₈ O ₇	0.02 mol ⁻¹	3
	Acetatpuffer (Elutionspuffer 1)	CH ₃ COOH	0.03 mol ⁻¹	5.5
	Acetatpuffer (Elutionspuffer 2)	CH ₃ COOH	0.03 mol ⁻¹	5.5
		NaCl	1 mol ⁻¹	/

Tab. 11.6: Reagenzien und Konzentrationen zur Offline-Analytik

Messwert	Reagenz Bezeichnung	Komponente	Konzentration	pH
Enzymaktivität	Substrat	para-Nitrophenylacetat	0.02 mol ⁻¹	/
	Phosphatpuffer	CH ₃ COOH	0.05 mol ⁻¹	7.4
Glycerolkonzentration	Schwefelsäure (Laufpuffer)	H ₂ SO ₄	0.025 mol ⁻¹	/
Gesamtprotein-konzentration	Reaktionslösung	Quick Start [™] Bradford Dye Reagent	unverdünnt	/
	Standards	Quick Start [™] Bovine γ -Globulin	12.5 - 200 mg ⁻¹	/

12 Literatur

- Anastassiadis S, Rehm H (2006): Continuous gluconic acid production by the yeast-like *Aureobasidium pullulans* in a cascading operation of two bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 541–548
- Anderson EM, Larsson KM, Kirk O (1998): One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida Antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatal Biotransformation* 16: 181–204
- Andualema B, Gessesse A (2012): Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology* 11: 100–118
- Berglund P, Hult K (2000): Biocatalytic Synthesis of Enantiopure Compounds Using Lipases. In: Patel RN (ed) *Stereoselective biocatalysis*. M. Dekker, New York, pp 633–657
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254
- Brereton RG (2002): An introduction to chemometrics. Data analysis for the laboratory and chemical plant. Wiley, New York, Chichester
- Bro R, Kjeldahl K, Smilde AK, Kiers HAL (2008): Cross-validation of component models: A critical look at current methods. *Anal Bioanal Chem* 390: 1241–1251
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002): Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 329–332
- Cereghino JL, Cregg JM (2000): Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 45–66
- Chang CC, Ryu DDY, Park CS, Kim J, Ogrydziak DM (1998): Recombinant bioprocess optimization for heterologous protein production using two-stage, cyclic fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49: 531–537
- Cornelissen G (2004): Integrierte Bioprozessentwicklung zur Herstellung pharmakologischer wirksamer Proteine mit *Pichia pastoris*. VDI-Verl., Düsseldorf
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA (1989): Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 9: 1316–1323
- Cregg JM (2007): *Pichia* protocols, 2nd edn. Humana Press, Totowa, N.J
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993): Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol* 11: 905–910
- Czitrom V (1999): One-Factor-at-a-Time versus Designed Experiments. *The American Statistician* 53: 126–131
- Danzer K, Hobert H, Fischbacher C, Jagemann K (2000): *Chemometrik. Grundlagen und Anwendungen*. Springer, Berlin
- DIN (2008): *Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Beuth
- Eastment H (1982): Cross-validatory choice of the number of components from a principal component. *Technometrics*

-
- Egli T, Dijken JP, Veenhuis M, Harder W, Fiechter A (1980): Methanol metabolism in yeasts: Regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Arch. Microbiol.* 124-124: 115–121
- Eiden F, Wichmann R (1993): Verfahrenstechnische Optimierung eines biotechnologischen Produktionsprozesses mit Hilfe einer getrennt geregelten, zweistufigen Kaskade. *Chemie Ingenieur Technik* 65: 1126–1127
- Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikström C, Wold S (2006): Multi- and megavariate data analysis, 2nd edn. Umetrics AB, Umea
- Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Trygg J, Wikström C, Wold S (2006): Multi- and megavariate data analysis, Part 2, Advanced Applications and Method Extensions. Umetrics AB, Umea
- Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wikström C, Wold S (2008): Design of experiments. Principles and applications. Umetrics Academy, Umeå (Sweden)
- Frank IE (1990): A nonlinear PLS model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 8: 109–119
- Fricke J, Pohlmann K, Tatge F, Lang R, Faber B, Luttmann R (2011): A multi-bioreactor system for optimal production of malaria vaccines with *Pichia pastoris*. *Biotechnol J (Biotechnology Journal)* 6: 437–451
- Fricke J, Pohlmann K, Jonescheit NA, Ellert A, Joksch B, Luttmann R (2013): Designing a fully automated multi-bioreactor plant for fast DoE optimization of pharmaceutical protein production. *Biotechnology Journal* 8: 738–747
- Geladi P (1986): Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* 185: 1–17
- Ghosalkar A, Sahai V, Srivastava A (2008): Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production. *Bioresource Technology* 99, 7906–7910
- Golub GH, van Loan CF (1996): Matrix computations, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Gupta R, Rathi P, Bradoo S (2003): Lipase Mediated Upgradation of Dietary Fats and Oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43: 635–644
- Haaland PD (1989): Experimental design in biotechnology. Marcel Dekker, New York
- Hamaker KH, Johnson DC, Bellucci JJ, Apgar KR, Soslow S, Gercke JC, Menzo DJ, Ton C (2011): Design of a novel automated methanol feed system for pilot-scale fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Progress* 27: 657–667
- Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006): Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235–251
- Hasan F, Shah AA, Javed S, Hameed A (2010): Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology* 9: 4836–4844
- Heiss A, Kreuz A (2007): Brot für die Salinenarbeiter - das Keltenbrot von Bad Nauheim aus archäobotanischer Sicht. Untersuchung zur latènezeitlichen Ernährung in Bad Nauheim, Wetteraukreis. In: Archäologischen und Paläontologischen Denkmalpflege Landesamtes für Denkmalpflege Hessen ES (ed) *Hessen Archäologie 2006. Jahrbuch für Archäologie und Paläontologie in Hessen*. K. Theiss, Stuttgart
- Hertwig K, Martens L (2007): Chemische Verfahrenstechnik: Berechnung, Auslegung und Betrieb chemischer Reaktoren, Oldenbourg Verlag, Berlin
-

- Hoaglin DC, Welsch RE (1978): The Hat Matrix in Regression and ANOVA. *The American Statistician* 32: 17–22
- Holst B, Lunde C, Lages F, Oliveira R, Lucas C, Kielland-Brandt MC (2000): GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 37: 108–124
- Hotelling H (1933): Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of Educational Psychology* 24: 417–441
- Hotelling H (1931): The Generalization of Student's Ratio. *Ann. Math. Statist* 2: 360–378
- Invitrogen (ed) pPICZa A, B and C. *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin and purification of secreted, recombinant proteins
- Ito T, Kikuta H, Nagamori E, Honda H, Ogino H, Ishikawa H, Kobayashi T (2001): Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91: 245–250
- Jackson JE (1991): A user's guide to principal components. Wiley, New York [u.a.]
- Jaeger K (1998): Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 16: 396–403
- Jan Christoph Pfeffer (2008): The Lipases from *Candida antarctica*: Cloning, Expression and their Application in the Synthesis of Structured Lipids. Dissertation, Stuttgart
- Jenzsch M, Gnoth S, Beck M, Kleinschmidt M, Simutis R, Lübbert A (2006): Open-loop control of the biomass concentration within the growth phase of recombinant protein production processes. *Journal of Biotechnology* 127: 84–94
- Jolliffe IT (2002): Principal component analysis, 2nd edn. Springer, New York
- Kaiser C (2010): Methoden zur Prozessüberwachung und Modellierung von Herstellungsprozessen rekombinanter Proteine mit *Escherichia coli*. Dissertation, Hannover
- Kapoor M, Gupta MN (2012): Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* 47: 555–569
- Kleppmann W (2013): Versuchsplanung: Produkte und Prozesse optimieren. Hanser Verlag, München
- Kolb M, Bahr A, Hippich S, Schulz W (1993): Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 mit Hilfe eines Programms / Calculation of Detection Limit, Identification Limit and Determination Limit according to DIN 32645 with the Aid of a Computer Programs. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 21: 308–311
- Kowalski BR (ed) (1984): Chemometrics, mathematics and statistics in chemistry. D. Reidel; Sold and distributed in the U.S.A. and Canada by Kluwer Academic, Dordrecht, Boston, Hingham, MA, U.S.A
- Krainer F, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O, Glieder A (2012): Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories*, 11:22
- Kreis W, Reinhard E (1990): Two-stage cultivation of *Digitalis lanata* cells: semicontinuous production of deacetyllanatoside C in 20-litre airlift bioreactors. *Journal of Biotechnology* 16: 123–135
- Krzanowski WJ (1988): Principles of multivariate analysis. A user's perspective. Clarendon Pr, Oxford

- Krzanowski WJ, Kline P (1995): Cross-Validation for Choosing the Number of Important Components in Principal Component Analysis. *Multivariate Behavioral Research* 30: 149–165
- Küberl A, Schneider J, Thallinger GG, Anderl I, Wibberg D, Hajek T, Jaenicke S, Brinkrolf K, Goesmann A, Szczepanowski R, Pühler A, Schwab H, Glieder A, Pichler H (2011): High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *Journal of Biotechnology* 154: 312–320
- Li P, Anumanthan A, Gao X, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, Renugopalakrishnan V (2007): Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* 142: 105–124
- Li H, Sethuraman N, Stadheim T, Zha D, Prinz B, Ballew N, Bobrowicz P, Choi B, Cook W, Cukan M, Houston-Cummings N, Davidson R, Gong B, Hamilton S, Hoopes J, Jiang Y, Kim N, Mansfield R, Nett J, Rios S, Strawbridge R, Wildt S, Gerngross T (2006): Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* 24, 210 - 215
- Lin H, Kim T, Xiong F, Yang X (2007): Enhancing the Production of Fc Fusion Protein in Fed-Batch Fermentation of *Pichia pastoris* by Design of Experiments. *Biotechnol Progress* 23: 621–625
- Lindfield GR, Penny JET (2012): Numerical methods. Using MATLAB, 3rd edn. Academic Press, Amsterdam , Boston
- Loegering K, Luttmann R (2010): Optimization of Recombinant Enzyme Production with *Pichia pastoris* in an Integrated Industrial Scale-Down Production Plant. IFAC-PapersOnLine. <http://www.ifac-papersonline.net/Detailed/42642.html>
- Loegering K, Mueller C, Voss J, Wagenfuehrer C, Zahn D, Bertelsen H, Scheffler U, Luttmann R (2011): An integrated scale-down plant for optimal recombinant enzyme production by *Pichia pastoris*. *Biotechnol J* 6: 428–436
- Lögering K, Müller C, Luttmann R (2010): Entwicklung vollautomatischer Integrierter Bioprozesse in einer industriekompatiblen Pilotanlage zur Herstellung heterologer Enzyme mit Hefen, BMBF Forschungsbericht (FKZ: 0315167), Hannover
- Luttmann R (2002): Dynamic models of bioreaction processes, Vorlesungsskript
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM (2005): Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270
- MacGregor J, Cinar A (2012): Monitoring, fault diagnosis, fault-tolerant control and optimization: Data driven methods. *Computers and Chemical Engineering* 47, 111–120
- Martens S, Borchert S, Faber BW, Cornelissen G, Luttmann R (2011): Fully automated production of potential Malaria vaccines with *Pichia pastoris* in integrated processing. *Eng. Life Sci.* 11: 429–435
- Masse L, Kennedy K, Chou S (2001): The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76: 629–635
- Maugard T, Rejasse B, Legoy M (2002): Synthesis of Water-Soluble Retinol Derivatives by Enzymatic Method. *Biotechnol. Prog.* 18: 424–428
- Modigell M, Schumacher M, Claassen PAM (2007): Hyvolution – Entwicklung eines zweistufigen Bioprozesses zur Produktion von Wasserstoff aus Biomasse. *Chemie Ingenieur Technik* 79: 637–641

- Mösch H (2002): Pseudohyphal growth in yeast. In: Osiewacz HD (ed) Molecular biology of fungal development. M. Dekker, New York
- Müller C (2011): Entwicklung eines mehrstufigen Downstreamverfahrens für zellinterne Proteine aus *Pichia pastoris* in Integrierter Prozessführung. Masterthesis, Hamburg
- Olah GA, Goeppert A, Prakash GKS (2009): Beyond oil and gas. The methanol economy, 2nd edn. Wiley-VCH, Weinheim
- optek-Danulat (2011): TOP 5 Biotech Applications
- Otto M (1997): Chemometrie. Statistik und Computereinsatz in der Analytik. VCH, Weinheim
- Pearson K (1901): Mathematical Contributions to the Theory of Evolution. X. Supplement to a Memoir on Skew Variation. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 197: 443–459
- Pereira FB, Guimarães PM, Teixeira JA, Domingues L (2010): Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. Bioresource Technology 101: 7856–7863
- Peuker T (2006): Modellgestützte Verfahren zur Beobachtung und Steuerung bioverfahrenstechnischer Prozesse. VDI-Verl., Düsseldorf
- Pfeffer J, Richter S, Nieveler J, Hansen C, Rhlid RB, Schmid RD, Rusnak M (2006): High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation. Appl Microbiol Biotechnol 72: 931–938
- Prehn F (2013): Effizient tablettiert - OEE-Analyse zeigt Potenziale zur Effizienzsteigerung und Kostenreduzierung bei der Tablettierung auf, P&A Kompendium 2013/2014, S. 105
- Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP (2007): Numerical recipes. The art of scientific computing, 3rd edn. Cambridge University Press, New York
- Qian Z, Lutz S (2005): Improving the Catalytic Activity of *Candida antarctica* Lipase B by Circular Permutation. J. Am. Chem. Soc. 127: 13466–13467
- Rotticci D, Hæffner F, Orrenius C, Norin T, Hult K (1998): Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 5: 267–272
- Rotticci-Mulder JC, Gustavsson M, Holmquist M, Hult K, Martinelle M (2001): Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* Lipase B and Lipase B Fused to a Cellulose-Binding Domain. Protein Expression and Purification 21: 386–392
- Rowe HD (1999): Biotechnology in the textile/clothing industry - a review. J Con Stud Home Econ 23: 53–61
- Rusnak M (2004): Untersuchungen zur enzymatischen Enantiomerentrennung von Glykol-ethern und Etablierung neuer Methoden des synthetischen Shufflings. Dissertation, Stuttgart
- Schmid R (2006): Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik, 2nd edn. Wiley-VCH, Weinheim
- Shlens J (2009): A Tutorial on Principle Component Analysis. Measurement: 52, V. 3.01
- Siemens (2009a): SIMATIC Prozessleitsystem PCS 7. CFC für SIMATIC S7 Funktionshandbuch

- Siemens (2009b): SIMATIC Prozessleitsystem PCS 7. Engineering System (V7.1) Projektierungshandbuch
- Siemens (2009c): PCS 7 on Tour - Basic. Process Control System SIMATIC PCS 7 Version 7.1
- Strang G (1988): Linear algebra and its applications, 3rd edn. Harcourt, Brace, Jovanovich, Publishers, San Diego
- Su C, Chien L, Gomes J, Lin Y, Yu Y, Liou J, Syu R (2011): Factors affecting lipid accumulation by *Nannochloropsis oculata* in a two-stage cultivation process. *J Appl Phycol* 23: 903–908
- Su G, Huang D, Han S, Zheng S, Lin Y (2010): Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 1493–1501
- Takamoto T, Shirasaka H, Uyama H, Kobayashi S (2001): Lipase-Catalyzed Hydrolytic Degradation of Polyurethane in Organic Solvent. *Chem. Lett.*: 492–493
- Teng L, Xiang-bin C, Jin-chun C, Qiong W, Guo-Qiang C (2014): Open and continuous fermentation: Products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnol. J.* 9: 1503–1511
- Tiana Y, Chena L, Kasperskic A (2010): Modelling and simulation of a continuous process with feedback control and pulse feeding, *Computers and Chemical Engineering* 34: 976–984
- Trodler P, Nieveler J, Rusnak M, Schmid RD, Pleiss J (2008): Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 1179: 161–167
- Trodler P, Pleiss J (2008): Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct Biol* 8: 9
- Umetrics AB (2008): User Guide to SIMCA-P+. Version 12, Kinnelon
- Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones T (1994): The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2: 293–308
- Valero F (2013): Bioprocess Engineering of *Pichia pastoris*, an Exciting Host Eukaryotic Cell Expression System. *Protein Engineering - Technology and Application*, Dr. Tomohisa Ogawa (Ed.), ISBN: 978-953-51-1138-2, InTech
- Vicente G, Martínez M, Aracil J (2004): Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource Technology* 92: 297–305
- Voss J (2010): Optimierung einer zweistufigen Prozessführung zur Herstellung rekombinanter Lipasen mittels statistischer Versuchsplanung. Diplomarbeit, Hamburg
- Wagenführer C (2010): Optimierung eines chromatographischen Aufreinigungsprozesses bei der Herstellung von Lipase CALB mit *Pichia pastoris*. Masterthesis, Hamburg
- Wikström C, Albano C, Eriksson L, Fridén H, Johansson E, Nordahl Å, Rännar S, Sandberg M, Kettaneh-Wold N, Wold S (1998): Multivariate process and quality monitoring applied to an electrolysis process. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42: 221–231
- Wilrich PT, Henning H (ed) (1987): Formeln und Tabellen der angewandten mathematischen Statistik, 3rd edn. Springer, Berlin, New York

- Wold S (1992): Nonlinear partial least squares modelling II. Spline inner relation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 14: 71–84
- Wold S, Albano C (1984): Multivariate Data Analysis in Chemistry. In: Kowalski BR (ed) *Chemometrics, mathematics and statistics in chemistry*. D. Reidel; Sold and distributed in the U.S.A. and Canada by Kluwer Academic, Dordrecht, Boston, Hingham, MA, U.S.A., pp 17–95
- Wold S, Esbensen K, Geladi P (1987): Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2: 37–52
- Wold S, Kettaneh-Wold N, Skagerberg B (1989): Nonlinear PLS modeling. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 7: 53–65
- Wold S, Sjöström M, Eriksson L (2001): PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58: 109–130
- Xie J, Yang R, Zhou Q, Du P, Gan R, Ye Q (2013): Efficiencies of Growth and Angiostatin Expression in Cultures of *Pichia pastoris* Fed with Mixed Carbon Sources. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 27 (2) 235–244
- Yin S, Ding S, Xie X, Luo H (2014): A Review on Basic Data-Driven Approaches for Industrial Process Monitoring. *IEEE Transactions on industrial electronics* vol 61, no. 11
- Zahn D (2010): Charakterisierung und Optimierung eines Crossflow-Mikrofiltrationsschrittes in einem Integrierten Bioprozess zur Herstellung rekombinanter Enzyme. Masterthesis, Hamburg
- Zhang A, Luo J, Zhang T, Pan Y, Tan Y, Fu C, Tu F (2009): Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep* 36: 1611–1619
- Zhang N, Suen W, Windsor W, Xiao L, Madison V, Zaks A (2003): Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Engineering Design and Selection* 16: 599–605

LEBENS LAUF

Kai Lögering

M.Sc. Dipl.-Ing. (FH)

PERSÖNLICHES

Geburtstag

4. Mai 1984

Geburtsort

Lingen

STUDIUM

09/2010 – 03/2013

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Promotion und wissenschaftlicher Mitarbeiter im Forschungs-
und Transferzentrum für Bioprocess- und Analysetechnik
(FTZ BPAT),

Promotionsthema: „Automatisierung, Optimierung und Analyse
Integrierter Produktionsprozesse zur Herstellung rekombinanter
Proteine mit *Pichia pastoris*“

09/2008 – 08/2010

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Masterstudium im Studiengang Biotechnology

Masterarbeit „Entwicklung einer selbstoptimierenden
integrierten Scale-down Produktionsanlage zur Herstellung
rekombinanter Lipasen mit *Pichia pastoris*“

09/2004 – 09/2008

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Diplomstudium im Studiengang Biotechnologie

Diplomarbeit „Charakterisierung der Lipase Expression mit
Pichia pastoris und experimentelle Untersuchung zur
Optimierung der Produktion mittels Statistischer Versuchs-
planung“

SCHULBILDUNG

07/1994 – 06/2003

Gymnasium Leoninum in Handrup, Abitur

PRAKTIKA UND LEHRAUFTRÄGE

03/2010 – 01/2012

Lehrauftrag im Fach “Pharmaceutical Biochemical Engineering
Special Course”, Masterstudium Pharmaceutical Biotechnology
an der HAW Hamburg

09/2007 – 01/2008

Praxissemester bei Merck & Co., Inc. in West Point, PA, USA
Automatisierung eines neuen Labors und Untersuchungen
von Prozessparametern zur Optimierung der Proteinfaltung

Veröffentlichungen – Kai Lögering – 2008 bis 2013:

- /1/ Lögering, K.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: Application of DoE – Design of Experiments for Optimal Production of Recombinant Protein with *Pichia pastoris*. Poster auf der BioPerspectives 2008, 7.-9.10.2008, Hannover.
- /2/ Lögering, K.; Fricke, J.; Müller, C.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: Entwicklung eines integrierten Bioprozesses zur Optimierung der Produktion rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris*. Vortrag auf der 27. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen vom 8.-10.09.2009, Mannheim.
- /3/ Lögering, K.; Fricke, J.; Müller, C.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: Entwicklung eines integrierten Bioprozesses zur Optimierung der Produktion rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris*. CIT, 81, No.8, S. 1239, 2009. (DOI: 10.1002/cite.200950390)
- /4/ Lögering, K.; Fricke, J.; Müller, C.; Ellert, A.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: Development of Integrated Bioprocesses for Optimized Production of Recombinant Enzymes with *Pichia pastoris*. Poster auf der ENZYME ENGINEERING XX, September 20-24, 2009, Groningen, the Netherlands.
- /5/ Lögering, K.; Müller, C.; Fricke, J.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: Optimization of Recombinant Enzyme Production with *Pichia pastoris* in a Fully Automated Integrated Scale-down Production Plant. Poster auf der PICHIA2009 - protein expression conference, Oct. 18-21, Tucson, Arizona, USA.
- /6/ Lögering, K.; Müller, C.; Fricke, J.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: Optimization of Recombinant Enzyme Production with *Pichia pastoris* in an Integrated Industrial Scale-down Production Plant. Vortrag auf der CAB2010 – The 11th IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology, July 7-9, 2010, Leuven, Belgium.
- /7/ Loegering, K.; Mueller, C.; Fricke, J.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: Optimization of Recombinant Enzyme Production with *Pichia pastoris* in an Integrated Industrial Scale-down Production Plant. IFAC-PapersOnLine (CAB 2010), Leuven, Belgium, July 7-9, S.293-298, 2010. (DOI: 10.3182/20100707-3-BE-2012.0021)
- /8/ Lögering, K.; Müller, C.; Voß, J.-P.; Fricke, J.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: Automation and Optimization of Recombinant Enzyme Production in an Integrated Bioprocess with *Pichia pastoris*. Vortrag auf dem International Congress on Biocatalysis, August 29 – September 2, 2010, Hamburg, Germany.
- /9/ Lögering, K.; Müller, C.; Voß, J.-P.; Fricke, J.; Luttmann, R.: Development of a Self Optimizing Production Process of Recombinant Enzymes with *Pichia pastoris* in an Integrated Scale-down Production Plant. Vortrag auf der ESBES 2010 – 8th European Symposium on Biochemical Engineering Science, September 5-8, 2010, Bologna, Italy.
- /10/ Loegering, K.; Mueller, C.; Voss, J.-P.; Wagenfuehrer, C.; Zahn, D.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.; Luttmann, R.: An integrated scale-down plant for optimal recombinant enzyme production by *Pichia pastoris*. Biotechnology Journal, Vol.6, iss.4, DOI: 10.1002/biot.201000384

- /11/ Lögering, K., Müller, C., Voss, J.-P., Luttmann, R.: Optimization of Recombinant Enzyme Production with *Pichia pastoris* in an Integrated Scale-down Plant. Vortrag auf der BIODKATALYSE2021 Summer School, July 11-14, 2011, Kiel, Germany.

Beiträge:

- /12/ Luttmann, R.; Hukelmann, E.; Lögering, K.; Poppe, M.; Flothmann, J.; Fricke, J.; Hülsmann, J.: Applications of Mathematical Modeling in Monitoring and Control of Bioreaction Processes. Vortrag auf der European BioPerspectives 2008, 7.-9.10.2008, Hannover.
- /13/ Luttmann, R.; Lögering, K.; Fricke, J.; Ellert A.; Müller, C.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.: Optimal Production of Recombinant Lipases in Integrated High Cell Density Bioprocessing. Poster auf der ACHEMA 2009 vom 11.-15.05.2009, Frankfurt a. M.
- /14/ Luttmann, R.; Lögering, K.; Fricke, J.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.: Process Development for Automated Production of Recombinant Enzymes in Integrated Bioprocessing. Vortrag auf der ACHEMA-Tagung Industrial Biotechnology, Paper 8081, 14.05.2009, Frankfurt a. M.
- /15/ Luttmann, R.; Lögering, K.; Müller, C.; Fricke, J.; Bertelsen, H.-P.; Scheffler, U.: Entwicklung eines Integrierten Bioprozesses zur Optimierung der Produktion rekombinanter Proteine mit *Pichia pastoris*. Vortrag auf dem Cluster-Jahrestreffen BIODKATALYSE2021 am 21.09.2009, Warnemünde.
- /16/ Luttmann, R.; Hukelmann, E.; Lögering, K.; Kazemi, A.; Cornelissen, G.: An Engineering Approach for Mathematical Modeling of Dynamic Protein Expression with *Pichia pastoris*. Poster auf der PICHIA2009 - protein expression conference, Oct. 18-21, Tucson, Arizona, USA.
- /17/ Müller, C.; Lögering, K.; Fricke, J.; Bertelsen, H.-P.; Müller, T.; Luttmann, R.: Development and Start up of a New Designed Scale-down Disk Clarifier SC1. Poster auf der PICHIA2009 - protein expression conference, Oct. 18-21, Tucson, Arizona, USA.
- /18/ Luttmann, R.; Lögering, K.; Fricke, J.; Müller, C.; Lang, R.; Faber, B.: Applications in Design of Experiments for Optimal Production of Recombinant Proteins with *Pichia pastoris*. Vortrag auf der APACT 10 – Advances in Process Analytics and Control Technology, “Process Analysis and Control for Profit” vom 28.–30.04.2010, Manchester, GB.
- /19/ C. Müller, K. Lögering, D. Zahn, C. Wagenführer, R. Luttmann: Optimization of Different Unit Operations in Integrated Bioprocessing for Recombinant Protein Production. Vortrag auf der ECAB-1st European Congress of Applied Biotechnology. 25.-29. September 2011, Berlin.