


Einsatz eines Online-Methanol-Messsystems zur Regelung von Zulaufatzkultur-Fermentationen

Eric Schumbera, Malte Schmüser, Daniel Hinderer, Konstantin Schlegel und Percy Kampeis*

DOI: 10.1002/cite.201900156

 This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Zur Optimierung von Zulaufatzkultur-Fermentationen von methylotrophen Organismen wird eine Online-Messmethode vorgestellt, mit der die Methanol-Konzentration im Medium während einer Fermentation durch ein Spülgaspervaporations-Prinzip bestimmt werden kann. Im Gegensatz zu anderen Analysemethoden bietet die Messmethode die Möglichkeit, die Substratkonzentration bei Prozessen mit Methanol als zentralem Substrat über eine Regelung auf einem definierten Wert zu halten. Es werden Schwierigkeiten, aber auch deren Überwindung bei der Adaption der Messmethode auf Fermentationsprozesse dargestellt.

Schlagwörter: Bioverfahrenstechnik, Methanol-Analytik, Methylotrophe Organismen, *Pichia pastoris*, Prozessanalytik, Zulaufatzkultur-Fermentationen

Eingegangen: 24. September 2019; *revidiert:* 17. Januar 2020; *akzeptiert:* 02. März 2020

Use of an Online Methanol Measuring System for Controlling Fed-Batch Fermentations

For the optimization of fed-batch fermentations of methylotrophic organisms an online measuring method is presented, with which the methanol concentration in the medium during a fermentation can be determined by a purge gas pervaporation principle. In contrast to other analytical methods, this measuring method offers the possibility of maintaining the substrate concentration at a controlled value in processes with methanol as the central substrate. Difficulties, but also their overcoming in the adaptation of the measuring method to fermentation processes are described.

Keywords: Bioprocess engineering, Fed-batch fermentations, Methanol analytics, Methylotrophic organisms, *Pichia pastoris*, Process analytics

1 Einleitung und Problemstellung

Methylotrophe Organismen, wie z. B. *Pichia pastoris*, besitzen als Expressionssystem zur Herstellung von Proteinen im Labor- oder industriellen Maßstab mehrere Vorteile, die sie von sonst etablierten Organismen, wie z. B. *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* abgrenzen. Durch vorhandene Alkoholoxidasen ist *P. pastoris* in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwenden – und das sogar bei Konzentrationen, die für andere Organismen toxisch wären. *P. pastoris* kann zudem in sehr hohen Zelldichten fermentiert werden. Der Organismus eignet sich deshalb gut für Produktionsprozesse. Gegenüber *E. coli* ist *P. pastoris* als Eukaryot zusätzlich in der Lage, posttranslationale Modifikationen, wie Disulfid-Brücken oder verschiedene Glykolysierungen, durchzuführen [1–3].

Bei Einsatz von Methanol als Substrat, das in zu hohen Konzentrationen auch für einen methylotrophen Organismus zellschädigend ist, muss die Konzentration im Reaktor allerdings genauestens überwacht werden. Etablierte Mess-

methoden beruhen meist auf einer Atline-Messung des filtrierten Fermentationsüberstandes in einer HPLC-Anlage oder auf enzymatischen Messmethoden. Zwar sind solche Analysen sowohl quantitativ als auch qualitativ sehr genau, haben allerdings eine relativ lange Analysendauer, die gerade bei Substraten mit toxischer Wirkung kritisch ist, da die Information über eine Überdosierung erst dann vorliegt, wenn bereits kritische Umgebungsparameter für den Organismus in der Fermentation herrschen [4–7].

Eine Online-Messmethode bietet dagegen eine bessere Alternative für wichtige Prozessgrößen, wie die Substratkonzentration. Eine solche, an Bekanntheit gewinnende Messmethode ist der Einsatz des Spülgaspervaporations-Prinzips zur Quantifizierung von Methanol. Allerdings birgt diese

Eric Schumbera, Malte Schmüser, Daniel Hinderer, Konstantin Schlegel, Prof. Dr.-Ing. Percy Kampeis
p.kampeis@umwelt-campus.de
Hochschule Trier, Umwelt-Campus Birkenfeld, Campusallee,
Geb. 9914, 55768 Neubrück (Nahe), Deutschland.

Messmethode auch einige Schwierigkeiten, die bei der Adaption auf Fermentationsprozesse beachtet werden müssen.

2 Material und Methoden

2.1 Alkoholmesssystem

Als Methanolsensor wurde das Alkoholmesssystem ALCOSENS der Firma Heinrich Frings GmbH & Co. KG bestehend aus einer Messsonde und dem Messverstärker Transmitter NII eingesetzt. Die Sonde basiert auf dem Spülgaspervaporations-Prinzip und taucht in die zu bestimmende Lösung ein. Methanol aus der Flüssigkeit diffundiert durch eine selektive Doppelmembran (Teflon- und Silikonmembran) in einen Kanal im Inneren der Sonde, der mit einem Trägergas mit konstanter Zusammensetzung und Volumenstrom durchströmt wird. Dadurch wird das diffundierte Methanol in den Sondenkopf getragen, wo es auf ein Halbleiter-Messelement aus Zinndioxid trifft, das bei der Anwesenheit von verschiedenen Substanzen, wie z. B. Methanol, seine Leitfähigkeit ändert. Der Widerstand des Halbleiterelements ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten im Spülgas [8]. Die korrekte Funktionalität des Halbleiters ist nur bei einer konstanten Temperatur gegeben, weshalb der Halbleiter durch eine interne elektrische Heizung auf einer Temperatur gehalten wird, die sich aus der thermischen Erwärmung durch den Stromfluss und der Kühlung durch das Spülgas ergibt [8]. Ein elektrisches Abschalten des Sensors bzw. eine Unterbrechung des Spülgasstroms – z. B. zum Zweck einer Regeneration der Halbleiteroberfläche – sind während einer laufenden Messung nicht möglich, aber auch nicht notwendig.

Der Diffusionsstrom des Methanols durch die Membran hängt vom Konzentrationsgradienten zwischen der zu messenden Lösung und dem Spülgas ab. Bei konstanter Methanol-Konzentration in der zu messenden Lösung stellt sich – bedingt durch die beteiligten Stofftransportvorgänge – nach einer Anlaufphase ein Gleichgewicht zwischen dem an- und abtransportierten Methanol im Sensor ein. Jeder Methanol-Konzentration in der Messlösung kann dann eine Methanol-Konzentration im Spülgas am Sensorkopf und damit ein Widerstand am Halbleiterelement zugeordnet werden. Voraussetzung dafür ist, dass Zusammensetzung, Druck und Fluss des Spülgases konstant gehalten werden. Als Spülbzw. Trägergas wurde gefilterte und getrocknete Druckluft verwendet, die mit einer Kompressor-Station SICOLAB 062MF (mit 0,01- μm -Feinfilter und Membrantrockner) der Firma Dürr Technik GmbH & Co. KG erzeugt wird.

Durch Messen des Widerstandes des Halbleiterelements mittels des Transmitters NII kann der Methanolgehalt letztendlich in ein regelungstechnisch nutzbares Signal umgewandelt werden. Der Transmitter NII fungiert außerdem als Analog-Digital-Wandler und überträgt das Messsignal zur Weiterverarbeitung in digitaler Form an einen PC. Hier wurde das Signal von einem Skript mit der Programmier-

software MATLAB in einem Intervall von 5 s eingelesen und in eine Methanol-Konzentration umgerechnet.

Da der Transport von Methanol durch die Membran auf einer Diffusion beruht und daher temperaturabhängig ist, muss die Temperatur der Messlösungen konstant gehalten werden. Zudem muss die Kalibrierung bei gleicher (Fermentations-)Temperatur durchgeführt werden. Wenn es nicht möglich ist, bei der Kalibrierung die Messtemperatur einzustellen, oder wenn sich während der Fermentation die Mediumstemperatur ändert, so gibt es die Möglichkeit, den gemessenen Widerstand R_{raw} per Temperaturkompensationsfaktor F_T auf einen kompensierten Widerstand R_{komp} gemäß Gl. (1) umzurechnen [8].

$$R_{\text{komp}} = \left((T_{\text{raw}} - T_{\text{komp}}) \frac{F_T}{100} + 1 \right) R_{\text{raw}} \quad (1)$$

mit T_{raw} = aktuelle Temperatur [K], T_{komp} = Bezugstemperatur (i.d.R. Kalibriertemperatur) [K], F_T = Temperaturkompensationsfaktor [K^{-1}], R_{raw} = aktueller Widerstand [Ω], R_{komp} = kompensierter Widerstand [Ω].

Die Umrechnung des gemessenen Widerstandes R_{raw} (ohne Temperaturkompensation, d. h. $F_T = 0$ bzw. $R_{\text{komp}} = R_{\text{raw}}$) bzw. des kompensierten Widerstandes R_{komp} in eine Methanol-Konzentration c_{MeOH} basiert gemäß Gl. (2) auf einer empirischen Potenzfunktion mit drei unbekanntem Konstanten (K_1 , K_2 und K_3) [8]. Zur Berechnung eines Methanolgehalts aus dem Messsignal der Sonde müssen diese Konstanten in einer vorausgehenden Kalibrierung mit Standardlösungen bekannter Methanol-Konzentration ermittelt werden.

$$c_{\text{MeOH}} = K_3 + K_2 (R_{\text{komp}})^{K_1} \quad (2)$$

mit c_{MeOH} = Methanol-Konzentration [g L^{-1}], K_3 = empirischer Faktor [g L^{-1}], K_2 = empirischer Faktor [$\text{g L}^{-1} \Omega^{-K_1}$], K_1 = empirischer Faktor [-], R_{komp} = kompensierter Widerstand [Ω].

2.2 Herstellung der Standardlösungen

Für die Kalibrierung des Alkoholmesssystems werden Standardlösungen benötigt. Die Herstellung einer Stammlösung zur Herstellung der Standards ist ein entscheidender Schritt, der essenziell für die Genauigkeit der Messmethode ist. Um Volumenfehler bei der Methanol-Zugabe zu umgehen, wurde eine definierte Masse an Methanol in einen Messkolben mit Wasser überführt und dann verdünnt. Durch das Vorlegen von Wasser wird die sonst auftretende Verdampfung von Methanol verhindert, die zu merklichen Fehlern in der Methanol-Konzentration führen kann. Trotz dieser Maßnahme sollte auf eine schnelle Handhabung geachtet werden. Aus der Stammlösung wurden nun mithilfe einer klassischen Verdünnungsreihe die Standards im Konzentrationsbereich von 0,1 g L^{-1} bis 5 g L^{-1} hergestellt.

2.3 Bioreaktorsystem

Das eingesetzte Reaktorsystem besteht aus einem Glasreaktor ($V = 5\text{ L}$) und einer digitalen Steuerungseinheit (DCU, *digital controlling unit*) der Firma Sartorius BBI Systems GmbH. Die Steuereinheit übernimmt die Rolle eines Zwischenglieds zwischen der Hardware (eingebaute Sonden, Pumpen, Massendurchflussregler, etc.) und einem PC mit der Steuerungssoftware MFCS/win. Zusätzlich ist auf dem PC ein OPC-Server (*open platform communications*) installiert, mit dem ein Datenaustausch zwischen MFCS/win und anderen Programmen, wie z. B. MATLAB, realisiert werden kann. An die DCU ist eine Schlauchpumpe 120U/DV der Firma Watson-Marlow GmbH für die Zuführung von Methanol angeschlossen.

2.4 Zulaufsatzkultur-Fermentationen

Zulaufsatzkultur-Fermentationen wurden mit dem *P. pastoris*-Stamm *GS115* durchgeführt, der den Vektor *pPIC9eGFP6xHis* trägt. Der Vektor ist sowohl mit einem Gen für die Produktion des grün fluoreszierenden Proteins eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) inkl. eines HIS₆-Tags ausgestattet, als auch einem Promoter, der die Proteinproduktion erst bei Anwesenheit von Methanol induziert. Zur Durchführung des angestrebten Zulaufsatzkultur-Verfahrens muss berücksichtigt werden, dass die vorgelagerte Satzkultur nicht mit Methanol als Substrat durchgeführt werden kann. Der Grund liegt darin, dass die Methanolmenge, die zur Bildung der gewünschten Biomasse im Startmedium der Satzkultur vorgelegt werden müsste, so groß ist, dass Methanol bereits toxisch auf den Organismus wirkt. Daher wird die vorgelagerte Satzkulturphase mit Glycerin als Substrat durchgeführt, das *P. pastoris* ebenfalls verstoffwechseln kann [4–7]. Die Produktion des Zielproteins eGFP erfolgt daher erst in der Feeding-Phase mit Zuführung von Methanol [9–12].

Zur Kultivierung wurde das Medium FM22 („*Fermentor Medium 22*“) [3, 13] verwendet. Gegenüber der Literatur wurde es in seiner Zusammensetzung etwas verändert und bestand aus folgenden Komponenten pro Liter: 40 g Glycerin, 40,8 g KH₂PO₄, 8,2 g MgSO₄·7H₂O, 5,3 g (NH₄)₂SO₄, 4,3 g K₂SO₄, 2,94 g Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 0,7 g CaSO₄·2H₂O, 8 mL PTM4-Spurenelementlösung und 4 mL Biotin-Lösung. Die Biotin-Lösung hatte eine Konzentration von 0,1 g L⁻¹. Die PTM4-Spurenelementlösung („*Pichia Trace Minerals 4*“) [13] war aus folgenden Komponenten pro Liter zusammengesetzt: 22 g FeSO₄·7H₂O, 7 g ZnCl₂, 3 g MnSO₄·H₂O, 2,0 g CuSO₄·5H₂O, 0,5 g CaSO₄·2H₂O, 0,5 g CoCl₂, 0,2 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0,08 g NaI, 0,02 g H₃BO₃ und 1 mL konz. H₂SO₄.

Die Fermentation erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 30 °C und einer konstanten Rührerdrehzahl von 800 min⁻¹. Im Reaktorkessel wurden 2,7 L Medium vorgelegt. Zur Inokulation wurden 300 mL einer Vorkultur mit

einer optischen Dichte von $OD_{600} = 7$ verwendet. Der pH-Wert wurde mittels einer Regelung auf pH = 5,5 gehalten. Ammoniakwasser (25 %ig) und Phosphorsäure (0,4 mol L⁻¹) wurden dazu als Base bzw. Säure verwendet. In der Satzkultur-Phase wurde eine Begasungsrate von 1 vvm eingestellt. In der Feeding-Phase wurde die Konzentration an gelöstem Sauerstoff mit einer Regelung, die zuerst den Luftvolumenstrom (auf maximal 10 L min⁻¹) erhöht und bei Bedarf reinen Sauerstoff in die Zuluft einmischt, auf einem Wert $pO_2 \geq 25\%$ gehalten. Als Feed-Medium diente 99,9 %iges Methanol.

2.5 HPLC-Analytik

Zur Überprüfung der Online-Messwerte, die mit dem Alkoholmesssystem bestimmt wurden, diente eine HPLC-Analytik. Bei diesem, nur atline durchführbaren Verfahren werden die Mediumsbestandteile einer filtrierten Fermenterprobe vor der Detektion chromatographisch getrennt, wodurch der Methanolgehalt ohne Einflüsse von sonstigen Substanzen bestimmt werden kann. Es wurde eine Ligandenaustausch-Chromatographie mit einer Reprigel H+-Säule der Firma Dr. Maisch GmbH mit Wasser als Eluent durchgeführt. Die Säule wurde in einem Säulenofen K7 der Firma Techlab GmbH auf 25 °C temperiert. Als HPLC-Anlage kam eine Gerätekombination SCL-10AVP / LC-10AD mit einem Brechungsindex-Detektor RID-10A der Firma Shimadzu Europa GmbH zum Einsatz. Die quantitative Analyse erfolgte über die Ermittlung der Peakflächen, die mit der Software Clarity 7.1 der Firma DataApex durchgeführt wurde.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ansprechzeit des Methanolsensors

Das Messverfahren nach dem Spülgaspervaporations-Prinzip hat in der Praxis einige zu beachtende Eigenschaften. Der Weg des Methanols durch die Doppelmembran bis zum Sondenkopf bringt eine für eine Online-Messsonde relativ lange Ansprechzeit mit sich. Zur besseren Charakterisierung des Messsystems wurden die Zeitkonstanten des Ansprechverhaltens des Sensors außerhalb eines Fermentationssystems bestimmt. Diese Zeitkonstanten charakterisieren das Verhalten des Sensors und zeigen beim Umgang mit dem Sensor, welche Wartezeiten bis zu einer Signalkonstanz, z. B. bei einer Kalibrierung, einzuhalten sind und wie eine Regelung aufgebaut werden kann.

Der Transportweg des Methanols und der allgemeine Aufbau der Sonde lässt sowohl eine Totzeit vermuten als auch ein Messsignal in Form einer exponentiellen Kurve (proportionales Übertragungsverhalten mit einer Verzögerung 1. Ordnung bzw. PT1-Glied) bei einem Sprung der Methanol-Konzentration in der Messlösung. Unter der

zugehörigen Zeitkonstanten T_{63} versteht man die Zeit, die vergeht, bis 63,2 % des Endwertes erreicht sind. Theoretisch erreicht eine Exponentialkurve ihren Endwert erst nach unendlich langer Zeit, praktisch aber mit guter Näherung schon nach $5T_{63}$. Die Zeit $5T_{63}$ wäre demnach abzuwarten, bis ein Messwert bestimmt werden kann.

Abb. 1 zeigt eine der ermittelten Kurven des Ansprechverhaltens bei einem schlagartigen Eintauchen des Sensors in eine Methanollösung mit einer Konzentration von 5 g L^{-1} . Neben der zu erwartenden Totzeit ($T_t = 50 \text{ s}$) zeigt die Kurve ein sehr träges Signal mit einer Zeitkonstanten von $T_{63} = 215 \text{ s}$ ($= 3,6 \text{ min}$). Damit ist die Zeitspanne bis zur endgültigen Einstellung einer konstanten Methanol-Konzentration im Trägergas am Sensorkopf und damit bis zur Einstellung eines konstanten Messsignals sehr hoch. Wie Abb. 1 zu entnehmen ist, wird der Signalendwert ab dem Zeitpunkt $5T_{63}$ ($= 18 \text{ min}$) erreicht. Eine 20-minütige Mindestwartezeit wurde demnach bis zum Erreichen der Signalkonstanz in Kalibrierungen festgelegt.

Abb. 1 zeigt aber auch, dass nicht das einfache exponentielle Verhalten eines PT1-Glieds vorliegt, sondern ein sigmoidaler Verlauf (proportionales Übertragungsverhalten mit einer Verzögerung 2. Ordnung bzw. PT2-Glied). Dieser Verlauf der Antwortfunktion legt nahe, dass es wahrscheinlich zu Rückvermischungen des Trägergases im Strömungskanal kommt. Hinzu kommen weitere, zeitabhängige Gleichgewichtsprozesse, wie z. B. die Einstellung unterschiedlicher Sättigungen der Membran mit Methanol abhängig von der jeweiligen Methanol-Konzentration in der Messlösung. In der Regelungstechnik werden bei einem solchen Verlauf statt der Zeitkonstanten T_{63} zwei Zeitkonstanten zur Charakterisierung verwendet (s. Abb. 1):

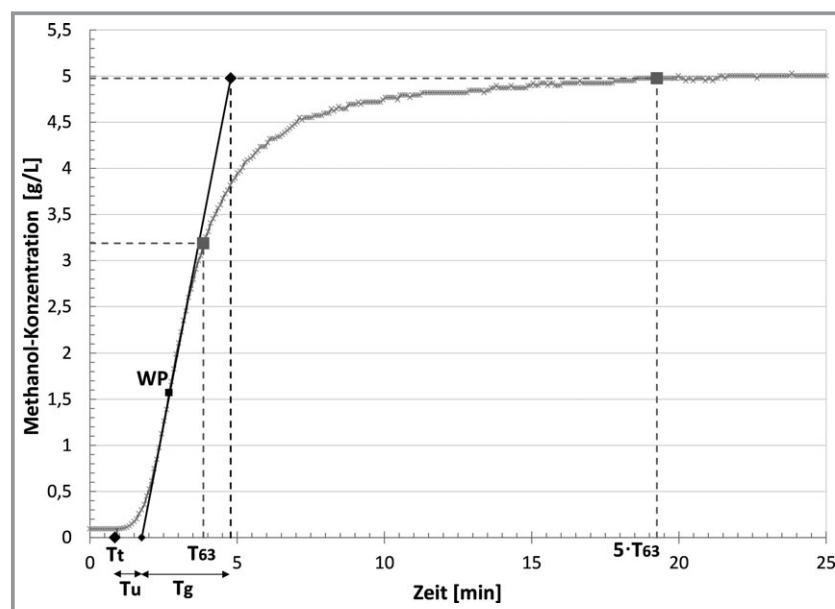


Abbildung 1. Antwort des Sensorsystems auf eine Sprungfunktion in der Methanol-Konzentration von 0 g L^{-1} auf 5 g L^{-1} zum Zeitpunkt $t = 0$ mit Wendepunkt (WP), angelegter Tangente und Zeitkonstanten T_t , T_{63} , $5T_{63}$, T_u und T_g .

Die Verzugszeit ($T_u = 50 \text{ s} = 0,84 \text{ min}$) und die Ausgleichszeit ($T_g = 181 \text{ s} = 3,02 \text{ min}$).

3.2 6-Punkt-Kalibrierung des Methanolsensors mit Standardlösungen

Zur Kalibrierung des Sensors müssen die empirischen Konstanten K_1 , K_2 und K_3 der Potenzfunktion (vgl. Gl. (2)) gefunden werden, mit denen das jeweilige Messsignal mit der zugehörigen Methanol-Konzentration korreliert werden kann. Für diese Kalibrierung wurden sechs Standardlösungen mit verschiedenen Methanol-Konzentrationen ($0,1 \text{ g L}^{-1}$ – 5 g L^{-1}) verwendet. Die Sonde wird in die temperierten Standardlösungen getaucht.

Nach Erreichen der Signalkonstanz (mind. $5T_{63}$) wurde der gemessene Widerstand des Halbleiters gegen die Methanol-Konzentration der Standardlösung aufgetragen. Die empirischen Konstanten der potenzförmigen Kalibrierkurve können nun so lange angepasst werden, bis die Abweichungen zwischen der Kalibrierkurve und den Messwerten das kleinste Fehlerquadrat aufweisen (s. Abb. 2 links, Methode 1). Aufgrund des hyperbelförmigen Verlaufs der Kalibrierfunktion kommt es bei diesem Vorgehen allerdings zu größeren relativen Fehlern bei der Bestimmung von niedrigen Methanol-Konzentrationen (s. Abb. 2 rechts, Methode 1).

Wie hoch die Methanol-Konzentration im Medium sein darf, ist vom jeweiligen Mikroorganismus abhängig. Toleriert der Mikroorganismus nur geringe Methanol-Konzentrationen, so kommt es bereits bei kleinen Überschreitungen eines entsprechenden Grenzwerts (bzw. Sollwerts in der

Fermentation) zu Inhibierungen. Umgekehrt sind auch größere absolute Überschreitungen eines entsprechenden Grenz- bzw. Sollwerts akzeptierbar, wenn der Organismus höhere Methanol-Konzentrationen verträgt. Um den Sollwert bei Bedarf auch bei niedrigen Konzentrationen mit einer Regelung (vgl. Abschn. 3.5) sicher in einem akzeptablen Konzentrationsbereich halten zu können, ist ein kleiner relativer Messfehler anzustreben. Dies bedeutet, dass das Messsystem besser auf einen möglichst kleinen relativen Fehler als auf einen kleinen absoluten Fehler kalibriert werden sollte. Eine Verbesserung der Kalibrierung kann daher dadurch erreicht werden, dass statt der Fehlerquadratsumme des absoluten Fehlers die Fehlerquadratsumme des prozentualen Fehlers minimiert wird (s. Gl. (3)).

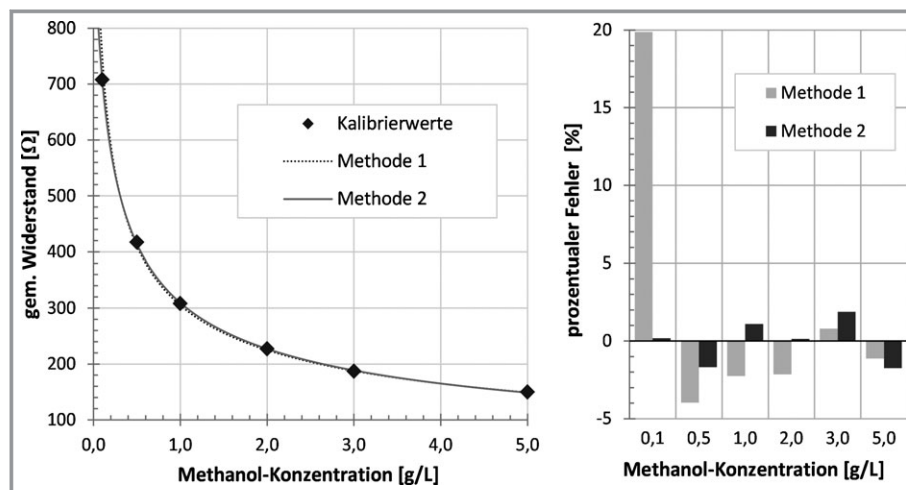


Abbildung 2. Kalibrierkurven aus Minimierung der Fehlerquadratsumme des absoluten Fehlers (links, Methode 1) und Minimierung der Fehlerquadratsumme des prozentualen Fehlers (links, Methode 2) sowie die prozentualen Fehler bei Methode 1 bzw. Methode 2 (rechts).

$$\sum_i \left(\frac{c_{\text{MeOH},i} - c_{\text{MeOH},i}^{\text{Std}}}{c_{\text{MeOH},i}^{\text{Std}}} \cdot 100 \right)^2 \stackrel{!}{=} \min \quad (3)$$

mit $c_{\text{MeOH},i}$ = mit Kalibrierfunktion errechnete Methanol-Konzentration, $c_{\text{MeOH},i}^{\text{Std}}$ = Methanol-Konzentration der Standardlösung.

Rein visuell unterscheidet sich die Kalibrierkurve aus dem prozentualen Fehler (Abb. 2 links, Methode 2) kaum von derjenigen aus dem absoluten Fehler (Abb. 2 links, Methode 1). Im Konzentrationsbereich von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ und 5 g L^{-1} konnten durch die Verwendung der Fehlerquadratsumme des prozentualen Fehlers und deren Minimierung relative Genauigkeitsfehler von maximal $\pm 2 \%$ ermittelt werden (Abb. 2 rechts, Methode 2).

Eine weitere Fragestellung ist die der Reproduzierbarkeit der Kalibrierungen. Tab. 1 zeigt Kalibrierwerte K_1 , K_2 und K_3 , die an fünf aufeinander folgenden Tagen aus den gemessenen Widerständen der Sonde errechnet wurden. Zwischen

Tabelle 1. Kalibrierparameter K_1 , K_2 und K_3 bei fünf aufeinanderfolgenden, durch Autoklavivorgänge voneinander getrennten Kalibrierungen.

	K_1 [-]	K_2 [$\text{g L}^{-1} \Omega^{-K_1}$]	K_3 [g L^{-1}]
Kalibrierung 1	-2,131	1 090 109	-0,213
Kalibrierung 2	-2,159	1 070 248	-0,214
Kalibrierung 3	-2,136	1 038 509	-0,208
Kalibrierung 4	-2,155	1 027 666	-0,207
Kalibrierung 5	-2,135	966 452	-0,214
Mittelwert	-2,143	abfallende Werte	-0,211
Standardabweichung	0,011		0,003
Variationskoeffizient [%]	0,53		1,45

den Kalibrierungen lag jeweils ein Sterilisationsvorgang im Autoklaven. Der Vergleich der fünf Kalibrierungen macht deutlich, dass die Kalibrierwerte K_1 und K_3 reproduzierbar sind. Beide zeigen zwischen den Kalibriervorgängen nur geringe Variationskoeffizienten von unter 1,5 %.

Bei dem Kalibrierwert K_2 fällt dagegen auf, dass er von Kalibriervorgang zu Kalibriervorgang immer weiter abfällt. Ursache dafür sind die Autoklavivorgänge, die zu einer Alterung der beiden Membranen führen. Der Einfluss einer thermischen oder chemischen Beanspruchung der Doppelmembran auf den K_2 -Wert konnte bei Vorversuchen auch

beobachtet werden. Vor jedem Einsatz des Methanolsensors muss dieser daher neu kalibriert werden.

3.3 Querempfindlichkeit des Methanolsensors

Der Halbleiter im Kopf des Methanolsensors ist nicht nur gegen Methanol sensitiv. Dem Methanol ähnliche Moleküle, wie z. B. Ethanol, gelangen auch durch die Doppelmembran und verändern ebenfalls den Widerstand des Halbleiters [8]. Grundvoraussetzung für die exakte Messung ist keine oder eine vernachlässigbar kleine Störung der Messung durch zusätzliche Substanzen, die während einer Fermentation vorliegen. Auch wenn die beschriebene selektive Doppelmembran eine Diffusion von störenden Substanzen verhindern soll, ist mit der Diffusion auch anderer Bestandteile des Fermentationsmediums durch die Doppelmembran zu rechnen. Deshalb wurde die Querempfindlichkeit des Sensors in der Praxis überprüft.

Getestet wurden dabei die Anwesenheit von Essigsäure, Ammoniak und Ethanol im Fermentationsmedium. Essigsäure (Acetat) und Ammoniak (Ammonium) sind zentrale Stoffwechselprodukte in vielen mikrobiellen Fermentationen – so auch in den durchgeführten Fermentationen mit *P. pastoris* – und deshalb von großer Bedeutung. Als zusätzlicher „Positiv“-Vergleich wurde Ethanol gewählt, das aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zu Methanol eine starke Querempfindlichkeit bewirken sollte.

Um einen Effekt der Substanzen zu testen, wurde dem Reaktor – in dem sich der Methanolsensor bei laufendem Betrieb unter konstanten Bedingungen befindet – eine gewisse Menge der drei zu testenden Substanzen zugegeben und das resultierende Messsignal des auf Methanol kalibrierten Sensors (s. Abschn. 3.2) ausgewertet. Dabei wurden die Zugabemengen so berechnet, dass die Endkonzentrationen aller Substanzen bei 6 g L^{-1} lagen.

Abb. 3 zeigt die Konzentrationsverläufe nach der Zugabe. Wenn die selektive Doppelmembran theoretisch optimal funktionieren würde, sollte der Sensor keine Änderung seines Widerstandswerts zeigen, da es sich nicht um Methanol handelt. Wie zu erwarten, unterscheidet der Sensor aber z. B. nicht zwischen Methanol und Ethanol, weswegen Abb. 3 deutlich zeigt, dass Ethanol einen ähnlichen Effekt auf das Messsignal hat wie Methanol. Demgegenüber lässt sich bei Zugabe von Ammoniak und Acetat günstiger Weise kaum ein Effekt erkennen. Trotzdem ist mit Querempfindlichkeiten bei Messungen in Fermentationsbrühen zu rechnen.

3.4 1-Punkt-Nachkalibrierung zur Kompensation von Alterungs- und Mediumseffekten

Sowohl die Doppelmembran als auch der Halbleiter-Widerstand sind – wie in den Abschn. 3.2 und 3.3 dargestellt wurde – Komponenten, die Alterungseffekte (verursacht durch thermische oder chemische Einflüsse) bzw. Querempfindlichkeiten aufweisen. Die Doppelmembran wird insbesondere bei der Sterilisation im Autoklaven oder bei der *Sterilisation-in-place* (SIP) beansprucht und verändert dadurch ihre Eigenschaften [8]. Als Konsequenz muss vor jeder Nutzung der Sonde eine Neukalibrierung durchgeführt werden. Da die Kalibrierung mit Standardlösungen nur vor einer Sterilisation möglich ist, kann nicht verhindert werden, dass die Güte der Kalibrierung nach der Dampfsterilisation geringer ausfällt. Es wird im Folgenden eine 1-Punkt-Nachkalibrierung untersucht, die nach der Sterilisation stattfindet und dadurch eventuelle Alterungseffekte kompensiert. Gleichzeitig ist es dadurch auch möglich, Effekte des

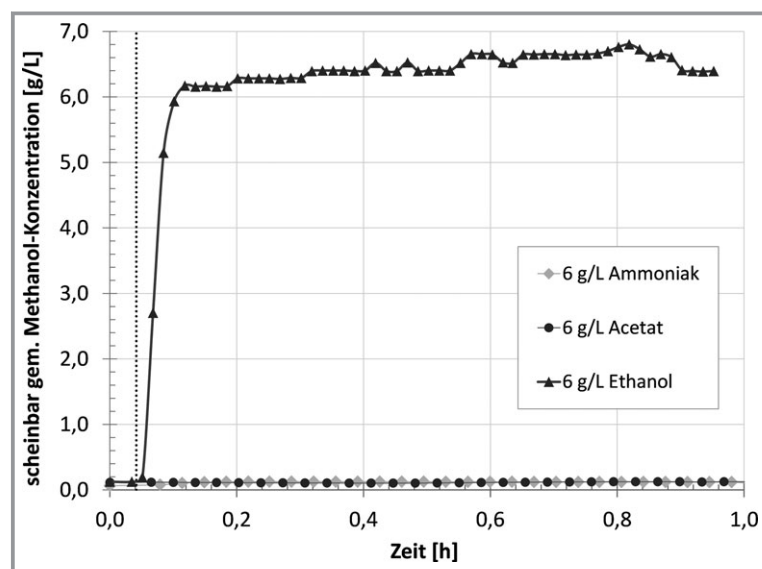


Abbildung 3. Scheinbar gemessene Methanol-Konzentration nach schlagartiger Zugabe einer Ammoniak-, einer Acetat- bzw. einer Ethanol-Lösung (Zugabezeitpunkt $t = 0,042$ h).

Mediums auf die Membranen, die eventuell durch unbestimmte Substanzen auftreten, oder Querempfindlichkeiten am Halbleitersensor zu kompensieren. Zur Durchführung der 1-Punkt-Nachkalibrierung wird eine zusätzliche, unabhängige Analysenmethode benötigt. Die Wahl fällt dabei vorzugsweise auf eine HPLC-Analytik.

Bei der 1-Punkt-Nachkalibrierung wird sich die notwendige Adaptionszeit des Organismus an das Methanol zunutze gemacht. Bevor merklich Methanol vom Organismus durch die Alkoholoxidasen abgebaut werden kann, braucht der Organismus Zeit, um seinen Stoffwechsel umzustellen und die dazu benötigten Enzyme herzustellen. Bei dem verwendeten Stamm *P. pastoris* GS115 beträgt die Zeit bis zum merklichen Abbau von Methanol ca. 1 h nach erstmaligem Kontakt mit Methanol. Diese Zeitspanne ist lang genug, um die HPLC-Analytik durchzuführen, da die Atline-Messung per HPLC in der in Abschn. 2.5 beschriebenen Ausführung eine Analysenzeit von ca. 20 min besitzt.

Der Verlauf des Fermentationsprozesses wurde so angepasst, dass die 1-Punkt-Nachkalibrierung aufgrund der oben beschriebenen Zeitspannen möglich ist: Zu Beginn der Zulauf-Phase (Feeding-Phase) der Fermentation wird eine gewünschte Menge Methanol – analog dem Standard-Additionsverfahren in der Analytik (*Spiken*) – schlagartig zugegeben. Nach einer kurzen Zeitspanne, die sicher stellen soll, dass das Methanol im Medium gleichmäßig verteilt wurde, wird eine Probe für die Atline-Messung per HPLC gezogen und damit die Methanol-Konzentration $c_{\text{MeOH,HPLC}}$ im Reaktor ermittelt. Gleichzeitig wird der Widerstand des Halbleiterelements des ALCOSENS-Sensors $R_{\text{MeOH,Spike}}$ bestimmt. Bei der Bestimmung des Widerstandes wird bis zur Signalkonstanz (mind. $5T_{63}$, vgl. Abb. 1) gewartet, allerdings auf keinen Fall länger als 1 h (bei dem verwendeten Organismus), da sonst der Methanolabbau einsetzt und der Widerstandswert nicht mehr die zugeführte Methanollmenge widerspiegelt.

Sowohl Alterungseffekte der Membran als auch unbestimmte Komponenten des Fermentationsmediums haben – wie oben bereits dargestellt – fast ausschließlich Einfluss auf den Kalibrierparameter K_2 . Eine korrigierte Kalibrierkurve entsteht demzufolge aus der 6-Punkt-Kalibrierkurve, indem der empirische Faktor K_2 aus Gl. (2) so angepasst wird, dass die korrigierte Kalibrierkurve durch das Wertepaar $c_{\text{MeOH,HPLC}}/R_{\text{MeOH,Spike}}$ verläuft (s. Abb. 4). Der korrigierte K_2 -Wert bildet zusammen mit den unveränderten Werten von K_1 und K_3 die Konstanten der finalen Kalibrierkurve. Das Verfahren der 1-Punkt-Nachkalibrierung wird hinsichtlich seiner Wirksamkeit bei realen Fermentationsprozessen im Folgenden näher bewertet.

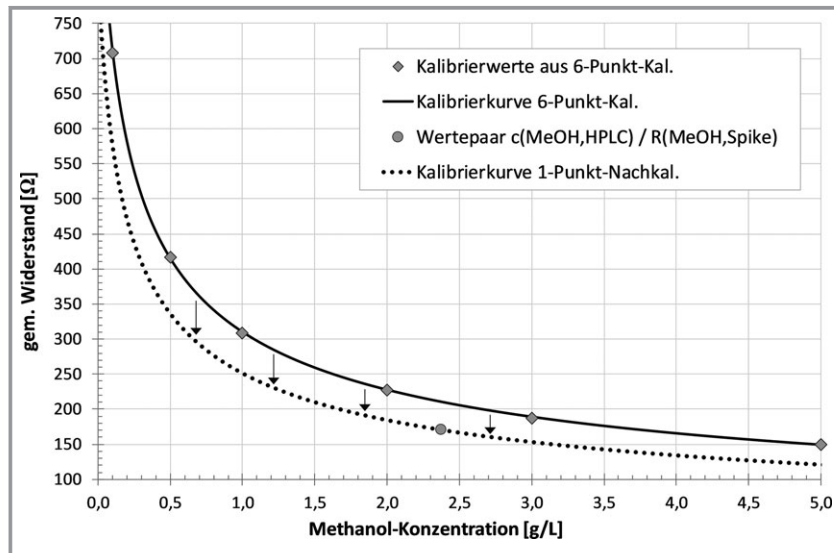


Abbildung 4. Korrektur der 6-Punkt-Kalibrierung mittels der 1-Punkt-Nachkalibrierung.

3.5 Einsatz der Messmethode in einem Fermentationssystem mit PID-Regelung

Das Sensorsystem soll bei Zulaufsatzkultur-Fermentationen von *P. pastoris* als zentrales Element der Prozessführung in der Feeding-Phase eingesetzt werden. Dazu wird aufbauend auf dem Sensor ein PID-Regler entwickelt, der die Steuerung der Substratzugabe übernimmt. Die Methanolsonde taucht während der Fermentation in das Medium ein, misst so einen Widerstandswert R_{raw} und gibt diesen über den Transmitter NII und eine RS-232-Schnittstelle an ein MATLAB-Skript (Methanol-Skript, s. Abb. 5) weiter, in dem das Signal entsprechend Abschn. 2.1 in eine Methanol-Konzentration umgerechnet wird. Die berechnete Methanol-Konzentration wird auf dem OPC-Server zwischengespeichert.

Auf der Grundlage dieser Konzentrationsbestimmung wurde der PID-Regler mit einem weiteren MATLAB-Skript realisiert. Entsprechend den Grundlagen der Mess- und Regelungstechnik wird aus den gemessenen Methanol-Konzentrationen, den Regelparametern (K_P , K_I und K_D) und einem Sollwert für die Methanol-Konzentration ein Volumenstrom ($F_{R,PID}$) in der Feeding-Phase

berechnet, mit dem Methanol von der Vorlage in den Reaktor gepumpt wird. Abb. 5 zeigt schematisch die Hardware-Komponenten und ihre Verknüpfungen sowie die Software-Komponenten und den Datenfluss.

Die Regelparameter und der Sollwert werden vor Nutzung des Reglers vom Anwender vorgegeben. Während die Regelparameter empirisch ermittelt wurden, kann der Sollwert nach Belieben gewählt werden. Außerdem liest das MATLAB-Skript automatisch die aktuelle Methanol-Konzentration c_{MeOH} aus dem OPC-Server ein. Mit diesen Daten berechnet das PID-Regler-Skript sekundlich einen Volumenstrom $F_{R,PID}$ in mL h^{-1} , der über den OPC-Server, die Software MFCS/win und die DCU des Bioreaktors schließlich an eine angeschlossene Schlauchpumpe weitergegeben wird. Diese pumpt dann 99,9%iges Methanol mit diesem Volumenstrom in den Reaktor.

Abb. 6 zeigt exemplarisch den Verlauf der Methanol-Konzentration während einer Fermentation A. Ziel war es, herauszufinden, ob die oben beschriebenen Handhabungen (6-Punkt-Kalibrierung mit 1-Punkt-Nachkalibrierung) zum

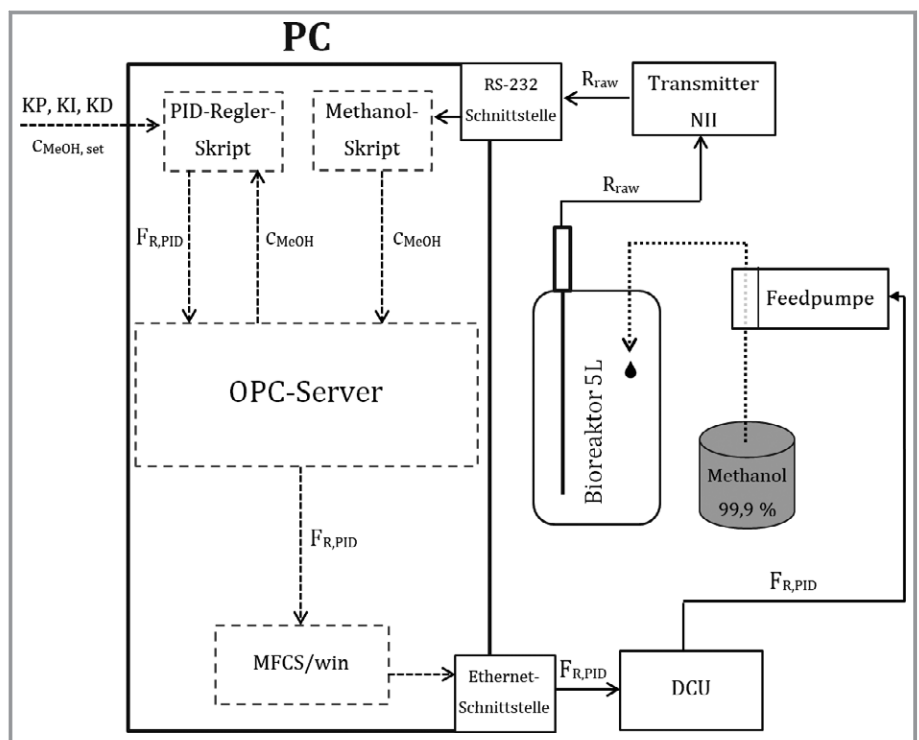


Abbildung 5. Schematischer Aufbau und Datenfluss des PID-Reglers im Fermentationssystem inkl. Methanol-Messsystem (durchgezogene Felder = Hardware-Komponenten, gestrichelte Felder = Software-Komponenten, durchgezogene Linien = echte Kabel, gestrichelte Linien = virtuelle Verbindungen zwischen Programmen, gepunktete Linien = Schläuche).

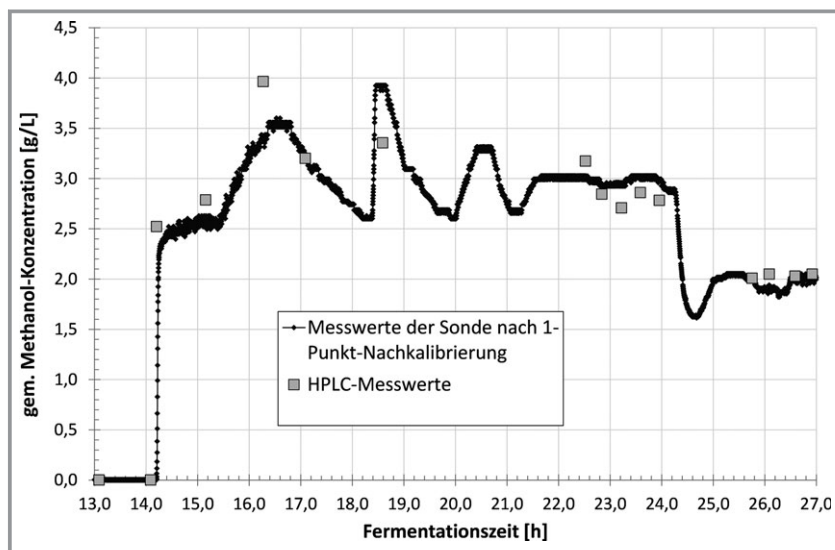


Abbildung 6. Verlauf der Methanol-Konzentration aus Fermentation A mit K_2 -Wert nach der 1-Punkt-Nachkalibrierung sowie Messpunkte aus der HPLC-Analytik (Start der PID-Regelung bei $t = 14,2$ h).

gewünschten Ergebnis führen und ob der PID-Regler (Hardware- und Software-Verknüpfungen) funktioniert. Geeignete Start-PID-Parameter wurden zuvor empirisch ermittelt ($KP = 5$; $KI = 0,3$; $KD = 15$), aber während des Prozesses optimiert. Dargestellt in Abb. 6 sind die Methanol-Konzentrationen, die aus den Widerstandsmessungen und der Kalibrierfunktion nach der 1-Punkt-Nachkalibrierung errechnet wurden. Zusätzlich sind Offline-Messwerte eingezeichnet, die mittels HPLC (vgl. Abschn. 2.5) bestimmt wurden. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Methanol-Konzentrationen, die mit dem Methanolsensor bestimmt wurden, und denjenigen, die mittels HPLC bestimmt wurden. Einflüsse, die durch Komponenten des Fermentationsmediums bedingt werden oder aus Alterungsprozessen entstehen, konnten mit der 1-Punkt-Nachkalibrierung also erfolgreich kompensiert werden. Die Zusammensetzung des Mediums hinsichtlich störender Substanzen am Methanolsensor scheint sich mit fortlaufender Fermentationsdauer zudem nicht merklich zu verändern, da die Kurve der Messwerte auch nach über 11 h (Fermentationszeit = 25,8 h) noch die Werte der HPLC-Bestimmung widerspiegelt.

Ein wichtiges Kriterium eines funktionierenden Reglers ist ein gutes Regelverhalten, das sich durch eine stabile Regelung ohne bleibende Regelabweichung auszeichnet. Im Laufe der Fermentation A konnten die Regelparameter verbessert werden ($KP = 20$; $KI = 0,8$; $KD = 50$). Mit ihnen wurde eine weitere Fermentation B durchgeführt, in der die PID-Parameter und der Sollwert ($3,5 \text{ g L}^{-1}$, gestrichelte Linie) während

der kompletten Feeding-Phase unverändert blieben (Abb. 7).

Um den Regler zu entlasten, wurde dabei zu Beginn der Feeding-Phase eine bestimmte Menge Methanol manuell zugegeben, um die Ist-Konzentration dem Sollwert anzugleichen. Erst dann wurde die Regelung bei einer Fermentationszeit von 16,0 h aktiviert. Dadurch beginnt der Regler ohne maßgebliche Regelabweichung, was das Verhalten des Reglers verbessert.

Innerhalb der ersten drei Stunden nach dem Start der PID-Regelung sind noch deutlich sichtbare Abweichungen zum Sollwert zu verzeichnen. Dies ist hauptsächlich auf den zu diesem Zeitpunkt noch sehr langsamen Abbau von Methanol durch die geringe Biomassekonzentration von *P. pastoris* zurückzuführen. Nach drei Stunden (Fermentationszeit = 19 h) ist die Regelung weitaus

ruhiger und die Methanol-Konzentration deshalb äußerst konstant. Zwar gibt es ein deutlich erkennbares periodisches Schwanken, das allerdings hinsichtlich der Genauigkeit des gesamten Versuchsaufbaus so gut wie vernachlässigbar ist. Um den Sollwert der Methanol-Konzentration konstant zu halten, muss der Regler den Feed-Volumenstrom an das (exponentielle) Wachstum des Organismus anpassen (Abb. 8). Analog den Schwankungen in der Methanol-Konzentration zeigen sich auch im Feed-Volumenstrom zu Beginn starke Schwankungen. Danach stabilisiert er sich und nimmt zwar einen etwas treppenförmigen aber insgesamt exponentiell steigenden Verlauf an.

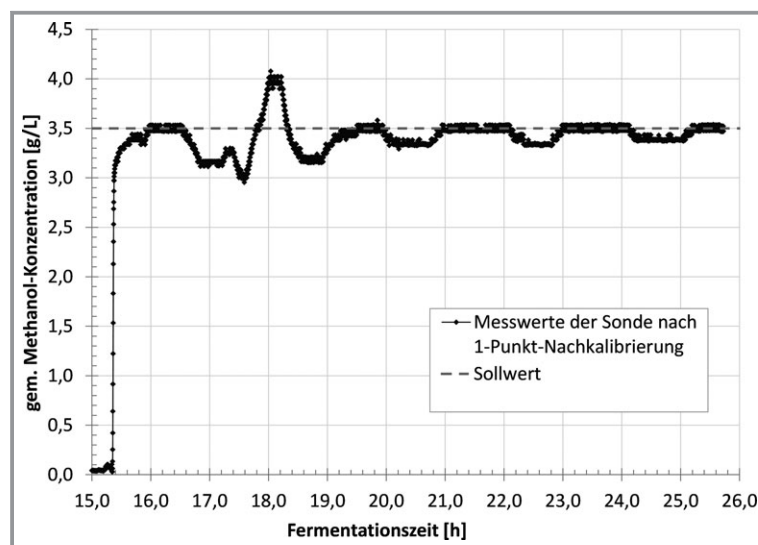


Abbildung 7. Verlauf der Methanol-Konzentration aus Fermentation B (Regelparameter: $KP = 20$; $KI = 0,8$; $KD = 50$, Sollwert: $c_{\text{MeOH}} = 3,5 \text{ g L}^{-1}$, manuelle Methanol-Zugabe bei $t = 15,4$ h, Start der PID-Regelung bei $t = 16,0$ h).

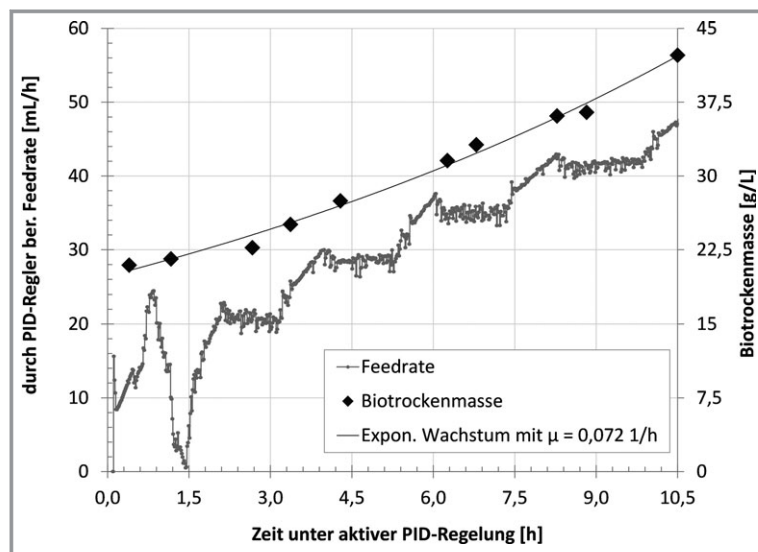


Abbildung 8. Verläufe des durch den PID-Regler eingestellten Feed-Volumenstroms und der Biotrockenmasse von Fermentation B.

Die Biotrockenmasse des Organismus in der Fermentation B wurde mittels Probenahmen bestimmt. Da reines Methanol zugefüttert wurde, verstoffwechselt der Organismus das gesamte zugeführte Volumen. Es entsteht daher keine Verdünnung in der Feeding-Phase. Aus der Biotrockenmasse kann somit sofort das Wachstum abgeleitet werden. Wie Abb. 8 zeigt, verläuft das Wachstum wie gewünscht exponentiell. Die Wachstumsrate konnte mit $\mu = 0,072 \text{ h}^{-1}$ bestimmt werden.

4 Fazit und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass mit der vorgestellten Spülgaspervaporation-Sonde ein geeignetes System zur Messung und Regelung der Methanol-Konzentration in Fermentationen mit methylotrophen Organismen vorliegt, wenn einige Randbedingungen beachtet werden. Mit einem optimierten Verfahren einer 6-Punkt-Kalibrierung mit folgender 1-Punkt-Nachkalibrierung – zur Vermeidung von Störungen durch Alterungseffekte oder Querempfindlichkeiten – konnten Messwerte erzielt werden, die sehr gut mit Werten aus Offline-Messungen mittels HPLC übereinstimmen.

Die Implementation des Sensorsystems und eines PID-Reglers in ein Fermentationssystem konnte trotz der sehr langen Ansprechzeit des Messsystems erfolgreich realisiert werden. Der beschriebene Aufbau ermöglicht nun die Weiterentwicklung von Zulaufsaatzkultur-Verfahren mit methylotrophen Organismen. Durch die weitgehende Automatisierung kann eine Optimierung dieser Prozesse hinsichtlich der Proteinexpression vereinfacht und beschleunigt werden.

Literatur

- [1] G. Cereghino, J. Cereghino, C. Ilgen, J. M. Cregg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13* (4), 329–332. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00330-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00330-0)
- [2] L. B. Trinh, J. N. Phue, J. Shiloach, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82* (4), 438–444. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.10587>
- [3] *Methods in Molecular Biology 389: Pichia Protocols* (Ed: J. M. Cregg), 2nd ed., Humana Press, Totowa, NJ **2006**.
- [4] W. Zhang, J. Sinha, L. A. Smith, M. Inan, M. M. Meagher, *Biotechnol. Process* **2008**, *21* (2), 386–393. DOI: <https://doi.org/10.1021/bp049811n>
- [5] W. Zhang, M. Inan, M. M. Meagher, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2000**, *5* (4), 275–287. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02942184>
- [6] W. Zhang, K. J. Hywood Potter, B. A. Plantz, V. L. Schlegel, L. A. Smith, M. M. Meagher, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30* (4), 210–215. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0035-3>
- [7] W. Zhang, M. A. Bevins, B. A. Plantz, L. A. Smith, M. M. Meagher, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *70* (1), 1–8. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y)
- [8] *Betriebsanleitung Alcosens*, Heinrich Frings GmbH & Co.KG, Köln **2014**.
- [9] G. Cornelissen et al., *Eng. Life Sci.* **2003**, *3* (9), 361–370. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.200300033>
- [10] S.-O. Borchert, T. Voss, F. Schuetzmeier, J. Paul, G. Cornelissen, R. Luttmann, *J. Process Control* **2015**, *35* (1), 113–126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2015.08.006>
- [11] S. Martens, S.-O. Borchert, B. W. Faber, G. Cornelissen, R. Luttmann, *Eng. Life Sci.* **2011**, *11* (4), 429–435. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201000163>
- [12] *Invitrogen – User Guide Pichia Expression Kit*, Life Technologies Inc., Carlsbad, CA **2014**.
- [13] J. Stratton, V. Chiruvolu, M. Meagher, in *Methods in Molecular Biology 103: Pichia Protocols* (Eds: D. R. Higgins, J. M. Cregg), Humana Press, Totowa, NJ **1998**.