

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung

Robert Puskeiler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktor-Ingenieurs
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Udo Lindemann
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel

Die Dissertation wurde am 17. 06. 2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 27. 07. 2004 angenommen.

Danksagung

Hiermit möchte ich allen Beteiligten für ihre Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit danken:

Univ.-Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz, Ordinarius des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik der TU München für die hervorragende Betreuung des Projekts, den Spielraum bei der Gestaltung der Arbeit und die vielen kleinen Schübe in die richtige Richtung.

Univ.-Prof. Dr. med. Dr.-Ing. habil. Erich Wintermantel für die Übernahme des Korreferats und Univ.-Prof. Dr.-Ing. Udo Lindemann für die Übernahme des Vorsitzes.

Den Mitarbeitern der industriellen Kooperationspartner: Dr.-Ing. Helmut Hertz, Dr.-Ing. Klaus Kaufmann, Dipl. Chem. Sven Mahlstedt (*H+P Labortechnik AG*), Dr. Gernot John, Dr. Christian Krause, Dr. Damian Andrzejewski und Roland Kramer (*Presens GmbH*) sowie Dr.-Ing. Matthias Arnold, Dipl.-Ing. Guido Ertel, Dr.-Ing. Falk Schneider und Dipl.-Phys. Robert Knabe (*DASGIP AG*).

Allen Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der TU München: Irma Einsle, Norbert Werth, Heinz-Karl Zacher, Georg Kojro, Dr.-Ing. Max Greiner, Dr.-Ing. Jürgen Blumenberg, Hendrik Balk, Vera Reimann, Maya Amidjojo, Julia Hiller, Helge Engelking, Bettina Knorr, Holger Pfründer, Jan Havel, Heike Zimmermann, Dr.-Ing. Ezequiel Franco-Lara, Andreas Knepper, Andreas Kusterer und Armin Tiemeyer. Das großartige Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre - auch außerhalb des Instituts - haben ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen Studenten, die durch Diplom-, Bachelor- und Semesterarbeiten, freiwillige Studienpraktika und HiWi-Tätigkeiten einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben: Rüdiger Bauer, Karoline Geipel, Emmanuel Neumann, Pierrick Couturier, LeNa Nguyen, Daniel Kacerovsky, Armin Tiemeyer, Adrien Ducret, Gabi Gebhardt, Janine Dungs, Marie Hoblingre, Arthur Simonnet und Andreas Kusterer.

Vielen Dank für die Korrektur und die Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts: Cécile, Sonja, Holger und Andreas.

Allen, die mir auch privat zur Seite standen, vor allem meinen Eltern, meinem Bruder Christoph, meinen Schwiegereltern Juan-Carlos und Helene mit Familie.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Frau Cécile.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
2. Problemstellung und Zielsetzung	5
3. Theoretischer Hintergrund.....	9
3.1. <i>Escherichia coli</i>	9
3.2. Wachstum von Mikroorganismen	11
3.2.1. Betriebsweisen von mikrobiellen Prozessen	11
3.2.2. Modellierung von Bioprozessen im Labormaßstab	14
3.3. Begasung von Bioreaktoren.....	14
3.3.1. Volumenbegasung	15
3.3.2. Oberflächenbegasung.....	15
3.4. Messung des volumetrischen Sauerstoffübergangskoeffizienten k_La	17
3.4.1. Stationäre Methoden.....	18
3.4.2. Dynamische Messmethoden.....	22
3.4.3. Abschätzung des k_La aus Sauerstoffanalytik	26
3.5. Verfahrenstechnische Charakterisierung von Rührkesselreaktoren	27
3.5.1. Hydrodynamik	27
3.5.2. Leistungseintrag.....	27
3.5.3. Sauerstoffeintrag.....	29
3.6. Parallele Bioreaktorsysteme	35
3.6.1. Parallele Rührkesselreaktoren	35
3.6.2. Schüttelkolben	35
3.6.3. Blasensäulen	39
3.6.4. Mikrotiterplatten	39
3.6.5. Andere Systeme	43

4. Ergebnisse.....	45
4.1. Gesamtkonzept des miniaturisierten Parallelreaktorsystems	45
4.1.1. Bioreaktoren im mL-Maßstab (Miniaturisierung)	45
4.1.2. Reaktionsblock für mL-Bioreaktoren (Parallelisierung)	49
4.1.3. Hardware zur Prozesskontrolle (Automatisierung)	49
4.1.4. Software zur Prozesskontrolle (Automatisierung)	53
4.2. Grundlegende Untersuchungen zur Charakterisierung der	
Sorptionleistung von Rührkesselbioreaktoren	56
4.2.1. Referenzsystem Laborrührkesselreaktor	56
4.2.2. Charakterisierung des fluorometrischen pO_2 -Messsystems.....	58
4.2.3. Charakterisierung der dynamischen Sulfitmethode	58
4.2.4. Diskussion.....	61
4.3. Entwicklung eines Gas-induzierenden Rührsystems für	
mL-Bioreaktoren.....	63
4.3.1. Prototypenserie ‚A‘	63
4.3.2. Prototypenserie ‚B‘	71
4.3.3. Diskussion.....	75
4.4. Gestaltung des Reaktionsblocks	78
4.5. Sterilgasabdeckung	80
4.5.1. Gestaltung der Sterilgasabdeckung	80
4.5.2. Funktionsprüfung (Steriltests)	81
4.6. Pipettierroboter	82
4.6.1. Gesamtanlage	82
4.6.2. Pipettiergenauigkeit des Pipettierroboters.....	83
4.6.3. Diskussion	85
4.7. Atline Prozesskontrolle	86
4.7.1. pH -Messung.....	86
4.7.2. Optische Dichte.....	90
4.7.3. Diskussion.....	92

4.8.	Referenzkultivierungen	92
4.8.1.	Satzkultivierung in der gerührten Blasensäule	92
4.8.2.	Zulaufkultivierung im Laborrührkesselreaktor	93
4.8.3.	Diskussion	95
4.9.	Kultivierungen im mL-Bioreaktor	97
4.9.1.	Rührerprototypenserie ‚A‘	97
4.9.2.	Rührerprototypenserie ‚B‘	99
4.9.3.	Diskussion	109
5.	Zusammenfassung	113
6.	Ausblick	117
7.	Literaturverzeichnis	119
A.	Material und Methoden	131
A.1.	Material	131
A.1.1.	Allgemeines	131
A.1.2.	Laborrührkesselreaktor	133
A.1.3.	Blasensäule	133
A.1.4.	Rührsystem und mL-Bioreaktoren	134
A.1.5.	Reaktionsblöcke.....	137
A.1.6.	Pipettiersystem	137
A.1.7.	Mikrotiterplatten-Waschgerät	138
A.1.8.	Mikrotiterplatten-Photometer.....	139
A.1.9.	Hydroplates.....	140

A.2.	Auslegung des mL-Bioreaktors	140
A.2.1.	Reaktionsvolumen.....	140
A.2.2.	Wärmeübergang	141
A.2.3.	Begasungsart.....	142
A.3.	Software zur Prozesskontrolle.....	144
A.4.	Messmethoden zur k_La -Bestimmung.....	146
A.4.1.	Dynamische Sulfitmethode.....	146
A.4.2.	Stickstoffdesorptionsmethode	147
A.4.3.	Auswertung des k_La	147
A.5.	<i>Atline</i> Analytik (Kultivierung).....	148
A.5.1.	Optische Dichte im Einstrahlphotometer	148
A.5.2.	Optische Dichte im Mikrotiterplatten-Photometer	148
A.5.3.	Bestimmung der Biotrockenmasse.....	148
A.5.4.	<i>pH</i> -Messungen mit <i>Hydroplates</i> im Mikrotiterplatten-Photometer ..	148
A.5.5.	Faseroptische <i>pH</i> -Messung	148
A.5.6.	Faseroptische pO_2 -Messung.....	149
A.5.7.	Enzymatische Metabolitbestimmung.....	149
A.5.8.	Glukosebestimmung	150
A.5.9.	Pipettiergenauigkeit des Laborroboters.....	150
A.6.	Kultivierungen mit <i>Escherichia coli</i>	151
A.6.1.	Chemikalien	151
A.6.2.	Medien	151
A.6.3.	Stammhaltung	152
A.6.4.	Vorkultur.....	152
A.6.5.	Satzkultivierung in der gerührten Blasensäule	152
A.6.6.	Zulaufkultivierung im Laborrührkesselreaktor.....	153
A.6.7.	Zulaufkultivierung im mL-Biorekator Serie ‚B‘.....	153
A.6.8.	Evaluierung der <i>online pH</i> und pO_2 Messung	154
A.6.9.	Evaluierung des Rührerprototypen B4 in einer Zulaufkultivierung..	154

B. Konstruktionszeichnungen	156
C. Gemini-Skript zur Prozesskontrolle.....	158
D. Liquidklassen des Pipettierroboters	170
E. Abkürzungen.....	175

1. Einführung

Die deutsche Biotechnologie-Industrie befindet sich nach enormem Wachstum in den 90er Jahren momentan in einer Konsolidierungsphase. Sowohl der Umsatz (-3 %) und die Ausgaben für Forschungs- und Entwicklung (-11 %) als auch die Zahl der Beschäftigten (-7 %) sanken im Jahr 2002 erstmals im Vergleich zum Vorjahr. Ebenso stand im Jahr 2002 mit 207 Mio. Euro deutlich weniger Risikokapital zur Verfügung als im Vorjahr mit 525 Mio. Euro (Ernst & Young, 2003). Für weiteres Wachstum der deutschen Biotechnologie-Industrie sollten zukünftige Geschäftsmodelle eher auf der Entwicklung von Produktionsprozessen als auf der Entwicklung von Plattform-Technologien aufgebaut werden (Müller, 2002). Das Kernproblem der Bioprozessentwicklung liegt in der zu langen Dauer des Entwicklungszeitraums vom Beginn der Suche nach einem industriell interessanten Biokatalysator bis hin zur Etablierung eines ökonomischen Produktionsprozesses (OECD, 2001).

Die Menge an potentiellen biotechnologischen Produkten steigt dank der rasanten Entwicklung der Biotechnologie in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts stark an. Zu den wichtigsten Fortschritten zählen die Aufklärung der räumlichen Struktur der Desoxyribonukleinsäure (Crick und Watson, 1956) und die Entschlüsselung des genetischen Codes bis zum Jahr 1966 (Nirenberg, 2004). Die Entdeckung der Restriktionsenzyme (Arber und Kuhnlein, 1967; Arber, 1974) bereitete den Weg zur gezielten Veränderung des Erbguts. Die Klonierung und Transformation (Cohen *et al.*, 1973), die Sequenzierung (Maxam und Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977), die Genamplifizierung (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1985), die *directed evolution* von Genen (Arnold und Moore, 1997) und das *metabolic engineering* (Nielsen, 2001) bilden die Basis der Gentechnologie. Seit Etablierung dieser Methoden spricht man von der Ära der modernen Biotechnologie, welche die Herstellung von Biokatalysatoren mit gewünschten Eigenschaften ermöglicht.

Diese Biokatalysatoren umfassen Wildtyp- oder gentechnisch veränderte Ganzzell-Biokatalysatoren und Wildtyp- oder gentechnisch veränderte isolierte Enzyme. Die Einsatzgebiete mit enormem Marktpotential umfassen die Produktion von rekombinanten Proteinen, die Biotransformationen, die Optimierung von Stoffwechselwegen bis hin zum direkten Einsatz von Polypeptiden, Proteinen und Antikörpern als Medikamente.

Die anfangs eher skeptische Haltung innerhalb der Bevölkerung gegenüber gentechnisch veränderten Produkten wandelte sich vor allem durch die interes-

santen Perspektiven zur Behandlung bisher unheilbarer Krankheiten. Der enorme Einsatz der Pharmaindustrie für Forschung und Entwicklung im Bereich Biopharmazeutika zeigt sich in der weltweiten Zulassung von über 100 solcher Wirkstoffe zur medizinischen Anwendung, davon 88 in der Europäischen Union (Walsh, 2003). Der Aufwand zur Entwicklung von Herstellungsprozessen dieser Wirkstoffe ist immens (Weng und deLisi, 2002). Eine Studie über 68 zufällig ausgewählte Wirkstoffe der pharmazeutischen Industrie ergab eine mittlere Prozessentwicklungszeit von 15 Jahren und damit verbundene Kosten von etwa 800 Mio. US-Dollar pro Wirkstoff (DiMasi *et al.*, 2003). Die pharmazeutische Industrie ist weiterhin auf der Suche nach ökonomischen Produktionsprozessen zur Herstellung von immer komplexeren biologisch aktiven chiralen Molekülen. Hierbei gewinnt die Biotransformation mit ganzen Zellen oder isolierten Enzymen aufgrund ihrer hohen Enantio- und Regioselektivität und den vergleichsweise milden Reaktionsbedingungen an kommerziellem Interesse (Huisman und Gray, 2002), da sie eine kostengünstige Alternative zur chemischen Synthese von optisch reinen Feinchemikalien und Pharmazeutika darstellt (Lye *et al.*, 2003). Mehr als 150 Biotransformationsprozesse werden bereits industriell betrieben (Liese *et al.*, 2000).

Die Entwicklung von biotechnologischen Produktionsprozessen umfasst in der Regel drei ineinander greifende Arbeitsschritte: Die Suche nach neuen Biokatalysatoren, deren Charakterisierung und Weiterentwicklung (*primary screening*, Primärauswahl), die Bioprozessentwicklung im Labormaßstab (*secondary screening*, Sekundärauswahl) und das Übertragen der Reaktionsverläufe in den Produktionsmaßstab (Maßstabsvergrößerung).

Aus der Vielfalt an potentiellen Biokatalysatoren werden in der Primärauswahl diejenigen selektiert, welche im Hinblick auf eine gewünschte Produktivität eines Prozesses in die weitere Prozessentwicklung im Labormaßstab einfließen sollen. Die Menge an potentiellen Biokatalysatoren steigt durch den hohen Aufwand zur Sequenzierung unbekannter Gensequenzen, der fortschreitenden Automatisierung der Strukturaufklärung und der sehr effizienten Herstellung von gentechnisch optimierten Enzymen mit enormer Geschwindigkeit. Beispielsweise lieferte allein die Sequenzierung des menschlichen Genoms die Erbinformation für mehr als 35000 Proteine (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Der Abschluss von 164 mikrobiellen Genomprojekten bis Mai 2004 trug zum Anstieg der Datenmenge in der Gendatenbank *Genbank* von 600 Sequenzen im Jahr 1982 auf momentan über 30 Mio. Sequenzen oder mehr als 36 Gigabasenpaare bei (Genbank, 2004). Da bisher nur ein geringer Prozentsatz der existierenden Mikroorganismen überhaupt kultiviert werden kann (Rondon *et al.*, 1999), ist in Zukunft ein weiterer rasanter Anstieg der Datenmenge in Gendatenbanken zu erwarten. Zusätzlich zur Explosion der Menge an verfügbaren Sequenzen können mit gentechnischen Methoden wie *random mutagenesis* und *DNA shuffling* (Stemmer, 1994) Enzyme einer zielgerichteten Evolution (Arnold und Moore, 1997) zur Veränderung ihrer Eigenschaften wie beispielsweise Aktivität, Selektivität oder Substratspezifität

unterworfen werden. Dabei können innerhalb kürzester Zeit mehr als 10^6 Mutanten eines gewünschten Enzyms hergestellt werden. Aus diesen werden die Mutanten mit optimierten Eigenschaften durch Selektion oder Screening herausgefiltert und weiteren Zyklen unterworfen. Die enorm hohe Zahl an möglichen Biokatalysatoren, welche in der Primärauswahl untersucht werden müssen, erfordert ein hochparalleles Reaktionssystem mit hohem Durchsatz. Dabei können zugunsten hoher Parallelität geringerer Sauerstoffeintrag und eine unkontrollierte Prozessführung in Kauf genommen werden.

Die in der Primärauswahl selektierten Biokatalysatoren werden in der anschließenden Sekundärauswahl untersucht. Je mehr Biokatalysatoren in die Sekundärauswahl übernommen werden können, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit einen ökonomischen Prozess entwickeln zu können. Je früher die Sekundärauswahl parallel zur Primärauswahl gestartet wird, umso eher können während der Sekundärauswahl entdeckte, prozesstechnische Einschränkungen in der Primärauswahl berücksichtigt werden. Der Zusammenhang zwischen Reaktionsbedingungen (pH , Temperatur, Medienzusammensetzung, Edukt- und Induktorkonzentration) und mikrobiellem Metabolismus ist jedoch in der Regel nicht mathematisch formulierbar, so dass geeignete Versuchsplanungstechniken eingesetzt werden müssen, um optimale Reaktionsbedingungen zu identifizieren (Weuster-Botz, 2000). Diese Rahmenbedingungen machen deutlich, dass eine enorme Anzahl an Versuchsansätzen durchzuführen ist, um eine erfolgreiche Prozessentwicklung zu ermöglichen. Ein Reaktionssystem für die Sekundärauswahl sollte gleiche Rahmenbedingungen (Sauerstoffeintrag, Leistungseintrag, Kontrollmöglichkeiten) zur Verfügung stellen wie Bioreaktoren des Labor- und Produktionsmaßstabs um eine bestmögliche Maßstabsübertragung zu ermöglichen.

Die enorme Anzahl von Parallelversuchen, welche in der Primärauswahl zur Selektion aussichtsreicher Biokatalysatoren notwendig ist, wird bis heute hauptsächlich in einfachen parallelen Satzreaktoren wie dem Schüttelkolben und der Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen im Labormaßstab im Zuge der Sekundärauswahl wird in der Regel ebenfalls in unkontrollierten Satzreaktoren im Parallelansatz durchgeführt. Der Schüttelkolben und die Mikrotiterplatte sind aufgrund ihrer verfahrenstechnischen Defizite jedoch nur eingeschränkt für die Sekundärauswahl einsetzbar. Andere Parallelsysteme im Milliliter-(mL)-Maßstab mit mehr als 16 parallelen Reaktoren, welche kontrollierte Prozessverläufe im Satz- und Zulaufverfahren unter technischen Bedingungen wie im Rührkesselreaktor des Labor- und Produktionsmaßstabs ermöglichen, sind bis dato nicht verfügbar.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Die Menge potentieller biotechnologischer Produkte steigt dank der Fortschritte der modernen Gentechnik mit beachtlicher Geschwindigkeit. Um das resultierende industrielle Potential ausschöpfen zu können, müssen die industriell verwertbaren Biokatalysatoren gefunden, charakterisiert und in effiziente Produktionsverfahren eingebunden werden.

Bisher werden Parallelansätze in der Primär- und Sekundärauswahl aufgrund der einfachen Handhabung und des geringen apparativen Aufwandes traditionell im Schüttelkolben und neuerdings vermehrt in Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Schüttelkolben ist noch heute der wohl am häufigsten eingesetzte Satzreaktor für mikrobielle Kultivierungen in der Prozessentwicklung (Büchs, 2001a). Die umfassende, verfahrenstechnische Charakterisierung jedoch erfolgte erst während der letzten Jahre. So kann im Schüttelkolben bei entsprechend hohen Schüttelraten und geringem relativen Füllvolumen ein maximaler Sauerstoffübergangskoeffizient $k_L a$ von $0,157 \text{ s}^{-1}$ erzielt werden (Maier, 2002). Auch der Leistungseintrag von bis zu 8 W L^{-1} entspricht üblichen Werten des Laborrührkesselreaktors (Büchs *et al.*, 2000). Der einfachen Handhabbarkeit des Schüttelkolbens stehen gravierende reaktionstechnische Unterschiede im Vergleich zum Rührkesselreaktor des Labor- und Produktionsmaßstabs gegenüber, woraus eine nur eingeschränkte Eignung des Schüttelkolbens als Reaktionssystem in der Sekundärauswahl resultiert. Die entscheidenden reaktionstechnischen Unterschiede umfassen ein weitaus geringeres Verhältnis der maximalen Energiedissipation zum mittleren Leistungseintrag, die im Allgemeinen auf unkontrollierte Satzversuche beschränkte Fahrweise und der nur unzureichende Automatisierungsgrad. Daraus resultiert eine geringere Datendichte bezüglich wichtiger Prozessgrößen. Die reaktionstechnischen Unterschiede führen dazu, dass im Schüttelkolben entwickelte Reaktionsverläufe in der Regel nicht direkt in das Reaktionssystem Rührkesselreaktor übertragen werden können und deshalb weitere zeit- und personalintensive Folgeuntersuchungen in Laborbioreaktoren anfallen.

Um die reaktionstechnischen Defizite des Schüttelkolbens zu überwinden wurde eine diskontinuierliche Dosiertechnik für bis zu 16 parallele Schüttelkolben entwickelt, welche die Kontrolle des pH und die Durchführung von Zulaufverfahren ermöglicht. Die Messung von pH und pO_2 erfolgt durch herkömmliche, sterilisierbare potentiometrische und amperometrische Elektroden (Altenbach-Rehm *et al.*, 1997). Zur Erhöhung des maximalen Sauerstoffeintrags wurden dem Schüttelkol-

ben in der Handhabung äquivalente Blasensäulen entwickelt, welche einen k_La von bis zu $0,16 \text{ s}^{-1}$ ermöglichen (Altenbach-Rehm und Weuster-Botz, 1995). Durch die Integration eines Rührsystems wurde der k_La auf bis zu $0,34 \text{ s}^{-1}$ erhöht (Weuster-Botz *et al.*, 2002). Damit ist dieses Reaktionssystem dem klassischen Rührkesselreaktor bezüglich Leistungseintrag und Sauerstoffübergang ebenbürtig. Eine höhere Datendichte bezüglich Substrat- oder Produktkonzentration wurde durch Etablierung eines diskontinuierlichen, parallelen Probenahme- und Analyse-systems erreicht (Wolfram *et al.*, 2000a; Wolfram *et al.*, 2000b). Ein alternatives Reaktionssystem für diese Dosiertechnik (*Stirrer-pro*, *DASGIP*, Jülich) erzielt einen k_La von $0,11 \text{ s}^{-1}$. Eine weitere Parallelisierung auf mehr als 16 Reaktionsgefäße ist jedoch aufgrund des immensen apparativen Aufwands auf Basis dieser Technologie nur schwer vorstellbar.

Höhere Parallelisierung von bis zu 24, 48, 96 oder gar 384 Ansätzen ist in Mikrotiterplatten möglich und macht dieses Reaktionssystem deshalb besonders für die Primärauswahl interessant. Die Eignung der Mikrotiterplatte als Reaktionssystem für die Sekundärauswahl ist eingeschränkt, da die Mikrotiterplatte dieselben reaktionstechnischen Defizite wie der Schüttelkolben aufweist. Die maximale Schüttelrate ist nach oben begrenzt, da die Reaktionsflüssigkeit sonst über den Rand der Kavitäten austritt. In einer herkömmlichen Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten runden Querschnitts wird so ein Sauerstoffübergangskoeffizient von $0,04 \text{ s}^{-1}$ erzielt. Mikrotiterplatten mit eckigem Querschnitt und $1,8 \text{ mL}$ Nominalvolumen (*Deepwell*-Mikrotiterplatte) können mit Schüttelraten bis zu 800 min^{-1} bewegt werden und erzielen bei $200 \text{ }\mu\text{L}$ Füllvolumen einen maximalen k_La von $0,23 \text{ s}^{-1}$ (Hermann, 2003). Die Einsetzbarkeit der Mikrotiterplatte zur Prozessentwicklung erfordert allerdings den monoseptischen Betrieb und die Reduzierung des Verdunstungsvolumenstroms. Dies wurde beispielsweise durch die Entwicklung eines Gas-durchlässigen *Sandwich-Covers* bewerkstelligt (Duetz und Witholt, 2001). Die Messung von pH und pO_2 ist prinzipiell durch Fluoreszenzsensoren in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte möglich (John, 2001), jedoch muss zum Auslesen dieser Sensoren die Schüttelbewegung unterbrochen und die Mikrotiterplatte in ein Mikrotiterplatten-Photometer gebracht werden. Dadurch findet jedoch kein Sauerstofftransport mehr statt, wodurch eine Anwendung in der Sekundärauswahl eingeschränkt wird. Für die Zudosierung in eine mit einer Sterilbarriere verschlossene Mikrotiterplatte ist noch keine technische Lösung erarbeitet worden.

Weitere Ansätze zur Miniaturisierung von Reaktionssystemen zur Durchführung kontrollierter, paralleler Kultivierungen umfassen einen 2 mL Reaktor mit *online* pH -, pO_2 - und Zelldichtemessung (Kostov *et al.*, 2001) und eine exakt miniaturisierte Kopie eines Standard-Rührkesselreaktors mit 6 mL Reaktionsvolumen der ebenfalls mit *online* Messung für pH , pO_2 und Zelldichte betrieben werden kann (Lamping *et al.*, 2003). Diese Miniaturreaktorsysteme sind entweder durch einen geringeren Sauerstoffeintrag als Bioreaktoren des Labormaßstabs charakterisiert oder scheinen eine massive Parallelisierung auf mehr als 16 Reaktoren nur durch erheblichen apparativen Aufwand zu ermöglichen.

Da moderne Produktionsverfahren mehr und mehr im Zulaufbetrieb gefahren werden und die im Satzreaktor gewonnenen Prozessdaten nicht immer ohne weiteres auf den Maßstab des Labor- bzw. Produktionsreaktors übertragen werden können, sind weitere zeit- und personalintensive sequentielle Versuchsreihen in Bioreaktoren unter kontrollierten, technischen Bedingungen notwendig, um eine effiziente Maßstabsvergrößerung durchführen zu können. Da es bisher nur möglich ist, entweder eine hohe Zahl von einfachen, unkontrollierten Parallelreaktionen in Satzreaktoren durchzuführen oder eine relativ geringe Anzahl von 4 bis 16 Bioreaktoren unter technischen Bedingungen zu betreiben, ist diese Vorgehensweise in der Sekundärauswahl und der Maßstabsvergrößerung um Größenordnungen ineffizienter als die Primärauswahl. Als Folge dessen wird das Potential vieler Biokatalysatoren nicht entdeckt, falsch beurteilt, oder viele potentiell interessante Biokatalysatoren können nicht über frühe Entwicklungsstadien hinaus verfolgt werden. Die unzureichenden Paralleltechniken tragen ihrerseits zu den Entwicklungszeiten biotechnologischer Prozesse von über 10 Jahren bei. Eine bessere Integration der Primär- und Sekundärauswahl sowie der Maßstabsvergrößerung durch besser geeignete Paralleltechniken könnte Prozessentwicklungszeiten erheblich verkürzen.

Da eine Weiterentwicklung bestehender Paralleltechniken an apparative Grenzen stößt, soll im Rahmen dieser Arbeit ein neues Konzept für ein miniaturisiertes Parallelreaktorsystem realisiert werden, welches die Nachteile bestehender Parallelsysteme überwindet. Dieses System soll mit einer möglichst großen Zahl von Bioreaktoren ausgestattet sein, welche automatisiert unter kontrollierten, technischen Reaktionsbedingungen im Parallelansatz betrieben werden können. Ein hoher Automatisierungsgrad bei der Versuchsvorbereitung, -durchführung, sowie Datenaquisition und -auswertung soll zukünftig die Entwicklung von Zulaufverfahren bereits in frühen Entwicklungsstadien eines Prozesses ermöglichen. Ein solches paralleles Miniaturbioreaktorsystem kann den Personal- und Kosteneinsatz pro Versuch erheblich reduzieren, Prozessentwicklungszeiten verkürzen und somit Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung ermöglichen.

Die konkrete Umsetzung dieses Vorhabens soll schrittweise durch Realisierung der folgenden Einzelziele erfolgen:

- Die Initialplanung des Miniaturbioreaktors verlangt nach der Festlegung eines ungefähren Reaktionsvolumens in der Größenordnung Milliliter. Dabei müssen hauptsächlich die gewünschte Reaktionsdauer der Kultivierungen, die notwendige Probenahmefrequenz, das Probevolumen, der Zudosierstrom für Zulaufverfahren und die auftretende Verdunstung abgeschätzt werden.
- Die Auswahl des Reaktortyps und einer Durchmischungsstrategie des Miniaturbioreaktors muss im Hinblick auf eine hohe angestrebte Sauerstoffsorptionsleistung und unter Berücksichtigung des Reaktionsvolumens erfolgen. Um eine große Anzahl von Bioreaktoren mit hoher Reproduzierbarkeit

parallel betreiben zu können ist ein geringer apparativer Aufwand vorteilhaft. Je weniger Einbauten in den Bioreaktor notwendig sind, umso geringer ist die resultierende Variation wichtiger bioverfahrenstechnischer Kenngrößen wie Sauerstoffeintrag, Leistungseintrag und Mischzeit aufgrund der Fertigungstoleranzen der Einzelteile.

- Um die Handhabung einer möglichst großen Zahl von Miniatur-Bioreaktoren des mL-Maßstabs so einfach wie möglich gestalten zu können, muss eine Strategie zur Parallelisierung der einzelnen Bioreaktoren erarbeitet werden.
- Der parallele Betrieb der Bioreaktoren soll unter Aufrechterhaltung monoseptischer Bedingungen für Zellkultivierungen in den einzelnen Bioreaktoren ermöglicht werden. Dies stellt besonders im Hinblick auf den angestrebten hohen Automatisierungsgrad durch automatisierte Probenahme und Zudosierung eine Herausforderung dar.
- Zur Realisierung eines hohen Automatisierungsgrades muss eine technische Lösung gefunden werden, welche durch möglichst geringen apparativen Aufwand die automatisierte Zudosierung und Probenahme ermöglicht.
- Um hohe Zelldichten in Bioreaktoren technischen Maßstabs erzielen zu können ist neben einer ausreichenden Sauerstoffversorgung eine pH -Regelung unabdingbar. Die Ergebnisse der pH -Messung müssen einem geeigneten Regelalgorithmus übermittelt werden. Zur Kontrolle des pH muss die vom Regler ermittelte Stellgröße in eine Zudosierung zu den einzelnen Miniaturbioreaktoren umgesetzt werden können.
- Um weitere Prozessgrößen wie beispielsweise die Zelldichte bestimmen zu können, soll eine automatisiert durchführbare Probenahmestrategie erarbeitet werden. Je nach Anzahl und Art der Analyte muss eine Messtechnik gefunden werden, welche mit dem begrenzt zur Verfügung stehenden Probevolumen Messungen zulässt. Unter Umständen haben diese Messtechniken aufgrund ihres Bedarfs an Probevolumen erneut Einfluss auf das benötigte minimale Reaktionsvolumen des Miniaturbioreaktors.
- Zur Automatisierung der Einzelkomponenten muss entsprechende Prozesssteuerungssoftware zur Verfügung gestellt werden, welche mit allen notwendigen Einzelkomponenten kommunizieren kann. Diese Software muss darüber hinaus die zeitliche Abfolge der anfallenden Arbeitspakete steuern und zur Etablierung einer pH -Regelung pH Arbeitsschritte in Abhängigkeit von externen Messwerten ausführen können.
- Die parallele Vergleichbarkeit der Miniaturbioreaktoren soll durch Kultivierungen mit *Escherichia coli* charakterisiert werden.
- Die Leistungsfähigkeit der parallelen Miniaturbioreaktoren soll anhand der Kultivierung von *E. coli* im Vergleich zu Reaktionssystemen des Labormaßstabs evaluiert werden.

E. coli besitzt einen heterotrophen, fakultativ anaeroben Stoffwechsel. Unter aeroben Bedingungen werden Hexosen metabolisiert, welche durch spezielle Transportmechanismen in die Zelle aufgenommen werden können. Die meist eingesetzte Kohlenstoffquelle Glukose wird über das Phosphoenolpyruvatsystem in die Zelle aufgenommen, phosphoryliert und dann in der Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas Weg) bis hin zum Pyruvat abgebaut (Abbildung 1). Dabei entstehen 2 mol ATP pro mol Glukose unter Bildung von 2 mol NADH. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat weiter im Zitratzyklus (Tricarbonsäurezyklus, Krebszyklus) oxidiert, wobei weitere 4 mol NADH, 1 mol FADH₂ und 1 mol ATP entstehen. Die Reduktionsäquivalente werden weiter durch die oxidative Phosphorylierung zu ATP umgesetzt. Um die Gesamtselektivität an ATP pro oxidiertem Glukose $Y_{ATP,S}$ (Ausbeutekoeffizient) berechnen zu können, ist die Kenntnis des P/O Verhältnisses, d.h. der Menge gebildetem ATP pro reduziertem Sauerstoff notwendig. Je nach verwendetem Elektronentransportsystem in der Mitochondrienmembran werden in der Literatur Werte für das P/O Verhältnis von 2 oder 3 angegeben. Da außerdem die Oxidation der Reduktionsäquivalente bei *E. coli* nicht notwendigerweise mit einer Phosphorylierung gekoppelt ist, können auch Werte bis zu 1 für das P/O Verhältnis auftreten. Deshalb ist lediglich eine Abschätzung des Maximalwertes der ATP-Selektivität pro oxidiertem Glukose möglich. Für ein P/O Verhältnis von 2 errechnet sich eine ATP-Selektivität von 26 mol ATP pro mol Glukose (Kayser, 1999).

Liegt Glukoseüberschuss vor, werden Enzyme des Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung allosterisch gehemmt, so dass gebildetes Pyruvat nicht stöchiometrisch in diesen Stoffwechselwegen umgesetzt werden kann. Selbst unter Glukoselimitierung führen sehr hohe Substrataufnahmeraten von *E. coli* zu einer Überlastung der Kapazität des zentralen Kohlenstoffmetabolismus. Je nach verwendetem Medium kann so eine kritische Wachstumsrate μ_{crit} definiert werden, bei deren Überschreitung Nebenprodukte gebildet werden. In Komplexmedien setzt bei *E. coli* die Acetatbildung bereits ab einer Wachstumsrate von 0,20 h⁻¹ ein, in definierten Medien ab einer Wachstumsrate von 0,35 h⁻¹. Unter Sauerstoffmangel können gebildete Reduktionsäquivalente nicht oxidiert werden. Die resultierende Hemmung des Zitratzyklus führt zur Akkumulierung von Pyruvat, welches durch Säuregärung abgebaut wird. Dabei wird hauptsächlich Acetat, aber auch Laktat, Ethanol, Formiat und Succinat gebildet (Riesenberg *et al.*, 1991b). Der Ausbeutekoeffizient $Y_{Ac,S}$ kann bei Kultivierungen im Satzverfahren in Komplexmedien bis zu 0,4 g g⁻¹ betragen (Guardia und Calvo, 2001). Gebildetes Acetat wird nach Verbrauch der Hauptkohlenstoffquelle wieder aufgenommen, wobei die Wachstumsrate auf Acetat bis zu 0,63 h⁻¹ erreichen kann. Hohe Acetatkonzentrationen von über 6 g L⁻¹ hemmen das Wachstum, Konzentrationen über 2,4 g L⁻¹ die Produktbildung (Jensen und Carlsen, 1990), so dass dies durch geeignete Prozessführung verhindert werden sollte. Dazu müsste die Konzentration der Kohlenstoffquelle geregelt werden. Da bislang keine zufrieden stellende, sterilisierbare *online*-Messtechnik für Glukose verfügbar ist, wurden andere

Techniken vorgeschlagen um die Nebenproduktbildung zu verhindern. Eine Technik basiert auf der intermittierenden Unterbrechung der Zudosierung und gleichzeitigem Messen der Sauerstoffkonzentration nach Zugabe eines definierten Glukosepulses. Aus der Zeit, die die vorhandene Biomasse zur Verstoffwechslung der zudosierten Glukose benötigt, kann die aktuelle Glukoseaufnahmerate bestimmt und eine neue Zudosierrate berechnet und eingestellt werden (Oh *et al.*, 1998). Eine zweite Variante ist die Aufprägung von transient niedrigerer mit anschließender erhöhter Glukosezufuhr verglichen mit der eingestellten Ausgangszudosierrate während eines Zulaufprozesses. Reagiert die Gelöstsaurestoffkonzentration auf beide Veränderungen der Glukosezufuhr, kann der zentrale Kohlenstoffmetabolismus noch höhere Substrataufnahmeraten erzielen. Fällt die Gelöstsaurestoffkonzentration nach erneuter, transient erhöhter Zudosierrate nicht mehr ab, ist die maximale Sauerstoffaufnahmerate (*OUR*) der vorhandenen Biomasse erreicht und Nebenproduktbildung setzt ein. Da nur eine qualitative Änderung des Verhaltens der vorhandenen Biomasse bestimmt wird, ist bei dieser Regelstrategie kein Vorwissen über kritische Wachstumsraten notwendig, ab der die Nebenproduktbildung einsetzt (Akesson *et al.*, 1999; Akesson *et al.*, 2000).

E. coli B-Stämme akkumulieren weniger NADH und bilden somit weniger Acetat (Bermejo *et al.*, 1998). Grund hierfür scheint eine aktive Isozitatlyase des Glyoxylatweges zu sein, welche verhindert, dass der aufgenommene Kohlenstoff komplett durch den Zitratzyklus geschleust werden muss (van de Walle und Shiloach, 1998).

Die Verwendung von alternativen Kohlenstoffquellen kann direkt zu einer geringeren Aufnahmerate der Kohlenstoffquelle in die Zelle führen. Dadurch tritt keine oder nur eine geringere Überlastung des zentralen Kohlenstoffwechsels auf. Dies ist beispielsweise für Fruktose, Glycerin und Fumarat bekannt (Holms, 1996; Dilsen *et al.*, 2001).

3.2. Wachstum von Mikroorganismen

3.2.1. Betriebsweisen von mikrobiellen Prozessen

Grundlegend werden bei Zellkultivierungen die Betriebsweisen Satz-, Zulauf- und kontinuierliche Kultivierung unterschieden. In der Satzkultivierung (*Batch*) wird nach Vorlage des Mediums und des Biokatalysators im Reaktor kein weiteres Substrat zu- oder abgeführt. Während des Betriebs werden lediglich Titrationsmittel zur *pH*-Kontrolle nachdosiert und Sauerstoff mit dem Prozessgas zugeführt. Im Verlauf des Prozesses kann eine charakteristische Wachstumskurve experimentell beobachtet werden (Abbildung 2). Nach der Adaptationsphase (*lag*-Phase) nimmt

die Zellkonzentration zu. Am Ende der Übergangsphase erreichen die Mikroorganismen ihre maximale Wachstumsrate μ_{\max} , welche sie über die Dauer der exponentiellen Wachstumsphase aufrechterhalten. Die Wachstumsrate ist definiert als:

$$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt} \quad (1)$$

Die Modellvorstellungen des limitierenden Substrates umfasst die Annahmen, dass alle restlichen Substrate in nicht-limitierender Menge vorhanden sind und dass keine weiteren Inhibierungen auftreten. Ist dies der Fall, geht das Wachstum in die Substratlimitierungsphase über. Während dieser Phase sinkt die Wachstumsrate bis schließlich kein Zellwachstum mehr feststellbar ist. Nach dieser so genannten stationären Phase nimmt die Zellmasse während der Absterbephase ab.

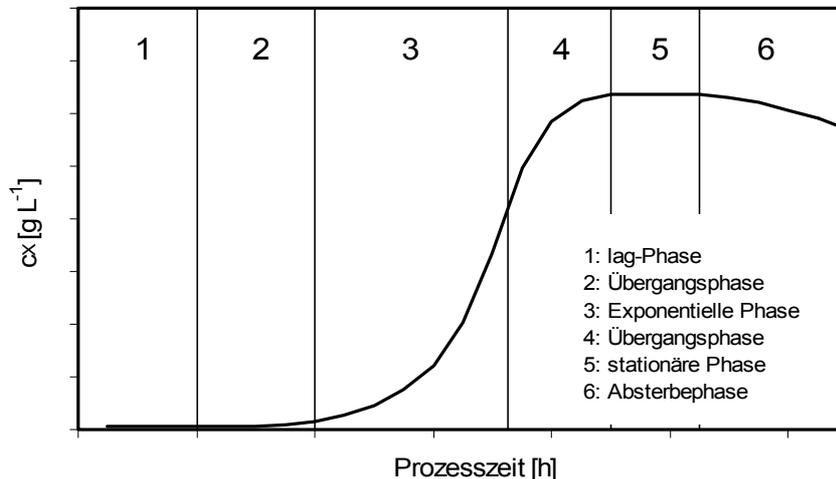


Abbildung 2: Wachstum von Zellen im Satzverfahren.

Das Wachstum während der exponentiellen Wachstumsphase und der Substratlimitierungsphase kann mit Hilfe des formalkinetischen Ansatzes nach Monod (1949) beschrieben werden. Die Wachstumsrate wird als Funktion der Konzentration des limitierenden Substrats c_S definiert.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \quad (2)$$

Entspricht die Substratkonzentration c_S der Sättigungskonzentration K_S beträgt die Wachstumsrate μ die Hälfte von μ_{\max} . Analog zur Wachstumsrate kann die spezifische Substrataufnahmerate und die spezifische Sauerstoffaufnahmerate (Tabelle 1) definiert werden. Diese Raten setzen sich in der Regel aus dem Verbrauch für das Zellwachstum $q_{S,\mu}$, $q_{O,\mu}$ und für den Erhaltungsstoffwechsel m_S zusammen.

Durch Definition von Ertragskoeffizienten Y_{ij} und unter Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels können die Aufnahmeraten analog zu Tabelle 1 definiert werden. Auf die Produktbildung wird im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen.

Tabelle 1: Definition der Wachstumsrate, Aufnahmeraten für Substrat und Sauerstoff, Formalkinetische Ansätze und Definition der Ertragskoeffizienten für Substrat und Sauerstoff.

	Wachstum	Substrat- aufnahme	Sauerstoff- aufnahme
Rate	$\mu \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_x}{dt}$	$q_s \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_s}{dt}$	$q_o \equiv \frac{1}{c_x} \cdot \frac{dc_o}{dt}$
Formalkinetik	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s}$	$q_{s,\mu} = \frac{\mu}{Y_{XS,\mu}}$	$q_{o,\mu} = \frac{\mu}{Y_{XO,\mu}}$
Berücksichtigung von m_s	$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s} - m_s \cdot Y_{XS,\mu}$	$q_s = \frac{\mu}{Y_{XS,\mu}} + m_s$	
Ertragskoeffizient	$Y_{XS,\mu} = \frac{dc_x}{dc_s}$		$Y_{XO,\mu} = \frac{dc_x}{dc_o}$

Im Zulaufverfahren (*fed-batch*) werden im Prozessverlauf Substrate nachdosiert, wodurch das Reaktionsvolumen ansteigt. Durch geeignete Prozessführung kann so eine Substratlimitierung erzielt und die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten durch Sauerstofflimitierung oder Überlastung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus verhindert werden. Durch Einsatz einer geringeren Substratausgangskonzentration im vorangehenden Satzverfahren wird die Nebenproduktbildung ebenfalls reduziert. Unter Berücksichtigung dieser Rahmenbedingungen können so höhere Biomassekonzentrationen erreicht werden, wodurch die Kosten für die Versuchsvorbereitung (*upstream processing*) und die Produktisolierung (*downstream processing*) verringert werden. Werden Zelldichten von über 100 g L^{-1} erreicht, spricht man von Hochzelldichte-Kultivierung. Um solche hohen Biomassekonzentrationen beispielsweise mit *E. coli* zu erreichen, muss die Nebenproduktbildung durch eine geeignete Prozessführung vermieden werden. Dazu werden definierte Mineralmedien benutzt und die Kultivierungstemperatur herabgesetzt. Die Zudosierate wird begrenzt um durch Reduzierung der Wachstumsrate die Überlastung des zentralen Kohlenstoffmetabolismus zu verhindern. Die maximale Sauerstoffeintragsrate (*OTR*) im Bioreaktor wird durch Erhöhung des Sauerstoffanteils in der Zuluft oder durch Aufprägen eines Überdrucks gesteigert. Um eine Stickstofflimitierung zu verhindern wird oftmals Ammoniumhydroxid als Titrationsmittel eingesetzt (Lee, 1996; Riesenberg und Guthke, 1999). Bei hohen Zelldichten wird durch Nachdosierung von Phosphat, Ammonium und Thiamin eine Limitierung verhindert. Mit Glukose bzw. Glycerol als Kohlenstoffquelle wurden in einem Laborbioreaktor mit 5 L Nominalvolumen durch

exponentielle Zulaufverfahren Biotrockenmassekonzentrationen von 128 bzw. 148 g L⁻¹ *E. coli* erreicht (Korz *et al.*, 1995).

Im kontinuierlichen Betrieb werden im Prozessverlauf Substrate nachdosiert und gleichzeitig ein äquivalenter Volumenstrom des Reaktionsmediums entnommen. Dadurch kann sich ein Fließgleichgewicht einstellen, welches durch zeitinvariante Reaktionsgeschwindigkeiten und Konzentrationen im Reaktor gekennzeichnet ist.

3.2.2. Modellierung von Bioprocessen im Labormaßstab

Im Reaktionssystem des ‚idealen Rührkesselreaktors‘ wird angenommen, dass die Konzentrationen aller Reaktionskomponenten c_i , die physiko-chemischen Eigenschaften (Temperatur T , Druck p , pH) und die Reaktionsgeschwindigkeiten r_i räumlich konstant sind. Basierend auf dieser Annahme, lässt sich für jede Reaktionskomponente eine Massenbilanz formulieren.

$$V \cdot \frac{dc_i}{dt} = c_{i0} \cdot \dot{V}_{In} - c_i \cdot \dot{V}_{Out} + r_i \cdot c_x \cdot V \quad (3)$$

Für den Satz-, den Zulauf- und den kontinuierlich betriebenen Reaktor können unter Vernachlässigung der Produktbildung die in Tabelle 2 genannten Modellgleichungen formuliert werden.

Tabelle 2: Modellgleichungen zur Beschreibung des Volumen-, Biomassen- und Substratkonzentrationsverlaufs für den Satz-, den Zulauf- und den kontinuierlich betriebenen Reaktor.

	Satzreaktor	Zulaufreaktor	Kontinuierlicher Reaktor
$\frac{dV}{dt} =$	0	\dot{V}_{In}	0
$\frac{dc_x}{dt} =$	$\mu \cdot c_x$	$-\frac{\dot{V}_{In}}{V} \cdot c_x + \mu \cdot c_x$	$-\frac{\dot{V}_{In}}{V} \cdot c_x + \mu \cdot c_x$
$\frac{dc_s}{dt} =$	$-q_s \cdot c_x$	$(c_{s0} - c_s) \cdot \frac{\dot{V}_{In}}{V} - q_s \cdot c_x$	$(c_{s0} - c_s) \cdot \frac{\dot{V}_{In}}{V} - q_s \cdot c_x$

3.3. Begasung von Bioreaktoren

Bei aeroben Prozessen ist die Begasung der Flüssigphase eine der wichtigsten verfahrenstechnischen Operationen, da eine ausreichende Versorgung der Organismen mit Sauerstoff und Entfernung von Kohlendioxid aus der Flüssigphase sichergestellt werden muss. Sauerstoff muss aufgrund seiner geringen Löslichkeit in typischen Kultivierungsmedien von 6 - 8 mg L⁻¹ (Schumpe *et al.*,

1982; Schumpe 1993) ständig nachgeliefert werden. Ziel der Begasung des Kultivierungsmediums ist in der Regel die Intensivierung des Stofftransports zwischen dispergierter Gasphase und kontinuierlicher Flüssigphase. Dies kann durch Vergrößerung der Phasengrenzfläche a und des Stofftransportkoeffizienten k_L erzielt werden, welche vom volumenbezogenen Leistungseintrag des Rührsystems $P V^{-1}$ und der im Reaktor vorliegenden Gasleerrohrgeschwindigkeit u_G beeinflusst werden. Die Gasleerrohrgeschwindigkeit u_G repräsentiert den auf die Reaktorquerschnittsfläche A_T bezogenen Gasdurchsatz \dot{V}_G .

$$u_G = \frac{\dot{V}_G}{A_T} \quad (4)$$

Der Gasdurchsatz wird oft als Gasvolumen pro Flüssigvolumen pro Minute (*volume per volume per minute*, vvm) angegeben.

Zur Auslegung eines effizienten Begasungssystems müssen die Eigenschaften des Mediums in Bezug auf Schaumbildung, die maximal zulässige Scherbeanspruchung der enthaltenen Biokatalysatoren, der geforderte Sauerstoffeintrag, die gewünschte Gasausnutzung und das Verweilzeitverhalten der Gasphase berücksichtigt werden (Meusel, 1988).

3.3.1. Volumenbegasung

In volumenbegasteten Rührkesselreaktoren wird der eingeleitete Gasstrom beim Eintritt in den Reaktor durch einen Gasverteiler in Form von Primärblasen dispergiert. Daraufhin kann eine weitere Dispergierung durch hohe lokale Energiedissipation in unmittelbarer Nähe der Rührorgane erfolgen. Im Verlauf des Strömungswegs tritt eine Veränderung der Blasengröße durch Koaleszenz, Sauerstoffeintrag und Änderung des hydrostatischen Drucks auf. Die örtlich vorhandene Blasengröße ist folglich eine Funktion der Blasenbildung, Dispergierung und Koaleszenz (Liepe, 1994a).

3.3.2. Oberflächenbegasung

In oberflächenbegasteten Systemen wird kein Gasstrom in die Flüssigphase eingeleitet. Der Stoffübergang findet entweder nur an der Oberfläche statt oder das Rührsystem ist in der Lage, Gasblasen in die Flüssigphase einzutragen.

In Behältern ohne Strömungsbrecher wird die Flüssigkeit durch einen zentrisch angebrachten Rührer in Rotation versetzt. Durch Zentrifugalkräfte wird die Flüssigkeitsoberfläche zu einer Trombe verformt, welche bereits eine größere Stoffaustauschfläche zur Verfügung stellt. Bei genügend hoher Drehzahl kann diese Trombe das Rührorgan erreichen, wodurch Gas in die Flüssigkeit eingetragen wird (Liepe, 1994b). Der größte Teil des eingetragenen Gases tritt aufgrund der hohen Zentrifugalkräfte in unmittelbarer Nähe des Rührorgans wieder aus der

Flüssigkeit aus, so dass nur ein eingeschränkter Gasdurchsatz erreicht wird (Zlokarnik, 1999).

Werden Strömungsbrecher in den Reaktor eingebracht, wird die Trombenbildung weitgehend oder gänzlich unterdrückt. Bei hohem Bewehrungsgrad besitzt die Flüssigkeit eine scheinbar glatte Oberfläche, welche jedoch durch das fortwährende Abprallen der Strömung an den Strömungsbrechern hochgradig turbulent ist. Die starke Oberflächenturbulenz führt zur Bildung von strudelartigen Wirbeln an der Oberfläche der Flüssigkeit, aus welchen sich Gasblasen ablösen (Patwardhan und Joshi, 1998). Dieses Phänomen tritt ab einer kritischen Rührerumfangsgeschwindigkeit auf, welche für 4-Blatt- und Schaufelrührer verschiedener Geometrien bei $0,6 - 1,8 \text{ m s}^{-1}$, bei Schrägblatt- und Schraubenrührern bei $2,2 - 5 \text{ m s}^{-1}$ liegt. Führen die Drehzahlen, die für diese Rührerumfangsgeschwindigkeit notwendig sind, noch nicht zu einer vollturbulenten Strömung, erhöht sich die notwendige kritische Umfangsgeschwindigkeit $v_{Tip,crit}$ (Liepe, 1994b).

Die Gas-induzierende Oberflächenbegasung kann durch einen 2-stufigen Mechanismus beschrieben werden. Zuerst werden Gasblasen von der freien Flüssigkeitsoberfläche in die Flüssigphase eingetragen. Im zweiten Schritt werden die Gasblasen durch das Rührorgan in der Flüssigkeit dispergiert (Patwardhan und Joshi, 1998; Saravanan und Joshi, 1995). Um den Gaseintrag von der freien

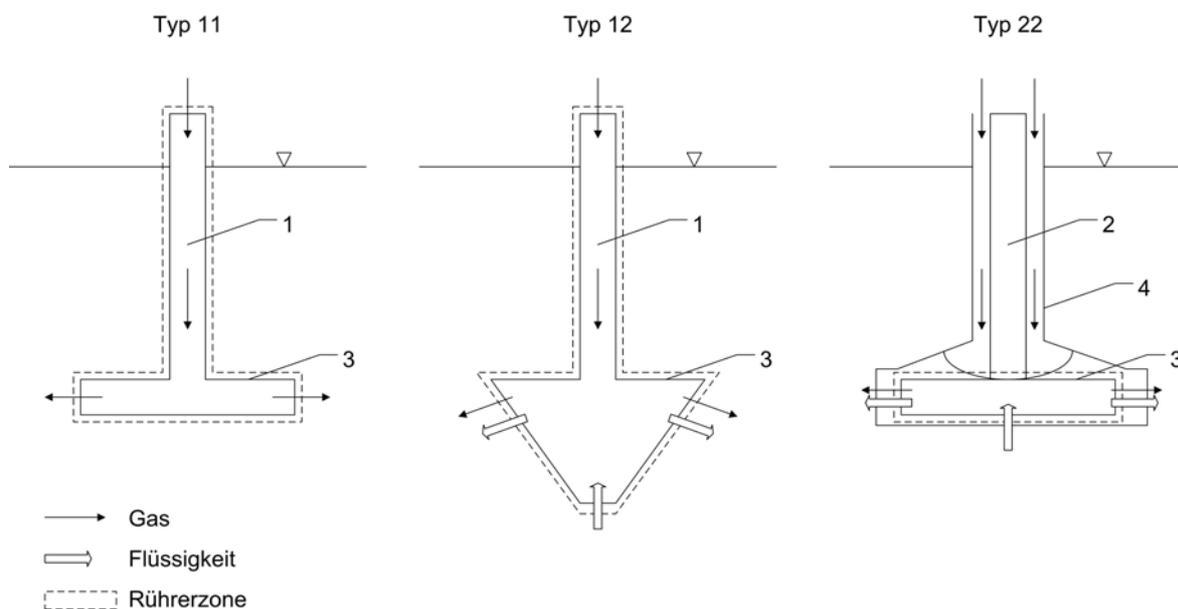


Abbildung 3: Typen Gas-induzierender Rührsysteme nach Patwardhan *et al.* (1999). 1: Hohlachse. 2: Achse aus Vollmaterial. 3: Rührorgan. 4: Leitrohr.

Flüssigkeitsoberfläche zur Begasung auszunutzen, wurden spezielle Rührorgane entwickelt (Patwardhan und Joshi, 1999). Gas-induzierende Hohlrührer erzielen hohen Gasdurchsatz ohne auf Strömungsbrecher angewiesen zu sein. Diese

Rührer sind durch eine Einphasenströmung am Eingang und am Ausgang des Rührorgans charakterisiert und werden deshalb auch als Typ 11 bezeichnet (Abbildung 3). Hinter dem rotierenden Rührsystem entsteht ein Unterdruck, welcher Gaseintrag ermöglicht, sobald er den hydrostatischen Druck der Flüssigkeitssäule übersteigt. Gas-induzierende Rührorgane des Typs 12 sind durch eine Einphasenströmung am Eingang des Rührers, und eine Zweiphasenströmung am Ausgang des Rührers charakterisiert. Das Gas wird über eine Hohlachse ins Zentrum des Rührers gesaugt. Der Typ 22 der Gas-induzierenden Rührorgane ist schließlich ebenfalls durch eine Zweiphasenströmung am Eingang des Rührorgans charakterisiert. Diese Gruppe Rührorgane wird ohne Hohlachse aber mit Leitrohr betrieben, so dass ebenfalls Gas von der Oberfläche bis zum Zentrum des Rührorgans gesaugt werden kann. Die Zweiphasenströmung am Eingang entsteht, ohne dass ein hohles Rührorgan notwendig ist.

Der Effekt der Oberflächenbegasung auf den k_La variiert stark mit der Reaktorgröße. Fuchs und Ryu (1971) bestimmten den k_La in Bioreaktoren von 1 - 51000 L mit variierendem Gasdurchsatz. Ausgehend von konstantem k_La in Bioreaktoren verschiedener Größe wurde der Anteil des aus reiner Oberflächenbegasung resultierenden k_La am gesamten k_La berechnet. Dieser Anteil kann bei Reaktoren mit einem Volumen von weniger als 200 L über 50 % betragen, wohingegen in Reaktoren über 550 L der Anteil stets weniger als 5 % betrug. Bisherige Untersuchungen wurden in Rührkesselreaktoren mit Durchmessern ab 0,16 – 0,68 m, also Mindestreaktionsvolumina von 5 L durchgeführt. Ein Rührsystem mit zwei unabhängig voneinander angetriebenen Rührorganen erreichte einen k_La von $0,24 \text{ s}^{-1}$ bei einer Drehzahl von 2400 min^{-1} (Matsumura *et al.*, 1982). Die optimale Platzierung des Gas-induzierenden Rührorgans kann sogar zu höherem k_La führen als Volumenbegasung mit Gasleerrohrgeschwindigkeiten unter $6 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$ (Wu, 1995).

3.4. Messung des volumetrischen Sauerstoffübergangskoeffizienten k_La

Der Sauerstofftransport stellt in aeroben Prozessen die essentielle Einflussgröße auf die Produktionskapazität eines Bioreaktors dar. Grund dafür ist die sehr geringe Löslichkeit von Sauerstoff in den zum Einsatz kommenden wässrigen Medien, welche relativ hohe Konzentrationen an Salzen und Nährstoffen enthalten. Demgegenüber steht eine sehr hohe Sauerstoffaufnahme der Mikroorganismen bei hohen Zelldichten. Da der Sauerstoffeintrag in der Mehrzahl der Fälle die limitierende Größe eines aeroben Prozesses darstellen kann, muss diese Größe bei der Auslegung eines Bioreaktors oder zur Maßstabsvergrößerung eines Prozesses korrekt in Abhängigkeit der eingestellten Betriebsbedingungen

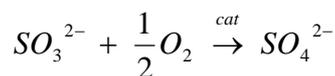
abgeschätzt werden können. Die Messmethoden zur Bestimmung des $k_L a$ werden in stationäre und dynamische Methoden unterteilt.

3.4.1. Stationäre Methoden

Stationäre Methoden erzielen durch konstanten Sauerstoffverbrauch eine konstante Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase. Das System befindet sich im Fließgleichgewicht, weshalb weder die Ansprechzeit der Sauerstoffelektrode noch die Kinetik der Gasphasenmischung berücksichtigt werden muss.

Klassische Sulfitmethode

Die erstmals von Cooper *et al.* (1944) beschriebene Methode wird auch als klassische Sulfitoxidationsmethode bezeichnet. Das Fließgleichgewicht wird durch die Oxidation von Sulfit zu Sulfat in Präsenz eines Metallionenkatalysators (Cu^{2+} oder Co^{2+}) in einer begasten Flüssigkeit erzielt.



Die Sauerstoffbilanz im flüssigseitigen Grenzfilm mit überlagerter chemischer Reaktion kann numerisch gelöst werden. In der Literatur wird folgende Näherung zur Bestimmung der Sauerstoffeintragsrate OTR als Funktion der Ha -Zahl und des treibenden, flüssigseitigen Sauerstoffkonzentrationsgefälles $c_o^* - c_o$ verwendet:

$$OTR = \sqrt{1 + Ha^2} \cdot k_L a \cdot (c_o^* - c_o) \quad (5)$$

Die Ha -Zahl gibt das Verhältnis aus chemischer Reaktionsgeschwindigkeit und Geschwindigkeit des Stofftransports wieder. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Reaktionsordnung m und dem Diffusionskoeffizienten D_o . Der Stofftransport ist abhängig vom Stofftransportkoeffizient k_L .

$$Ha = \frac{\sqrt{\frac{2}{m+1} \cdot k_m \cdot c_o^{*m-1} \cdot D_o}}{k_L} \quad (6)$$

Dabei ist die chemische Reaktionsbeschleunigung definiert als:

$$E_{chem} = \sqrt{1 + Ha^2} \quad (7)$$

Die Größe der Ha -Zahl kann durch Variation der Katalysatorkonzentration eingestellt werden. Die Ha -Zahl definiert den jeweiligen Reaktionsbereich und führt zur Vereinfachung der Bestimmungsgleichung. Zur Bestimmung des $k_L a$ aus der Sauerstoffeintragsrate muss eine genügend geringe Reaktionsgeschwindigkeit der Sulfitoxidation eingestellt werden, damit diese im Kern der Flüssigphase und nicht in der Grenzschicht stattfindet. Dies ist für eine Ha -Zahl von kleiner als 0,3

gewährleistet. Der maximale Fehler durch die chemische Reaktionsbeschleunigung liegt dann unter 4,4 %.

Die klassische Sulfitmethode sieht nach einer vorgegebenen Belüftungszeit die jodometrische Bestimmung der Restkonzentration Sulfit in Lösung vor. Aus der verbrauchten Sulfitkonzentration c_{Sulfit} und der Reaktionszeit t kann unter Berücksichtigung der Stöchiometrie der Sulfitoxidation die Sauerstoffeintragsrate OTR berechnet werden.

$$OTR = \frac{c_{\text{Sulfit}} \cdot \nu_{O_2}}{t \cdot \nu_{\text{Sulfit}}} \quad (8)$$

Aus der Sauerstoffeintragsrate wird meist unter Annahme einer vernachlässigbaren Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit c_O mit Gleichung 9 der $k_L a$ berechnet.

$$k_L a = \frac{OTR}{c_O^* - c_O} \sim \frac{OTR}{c_O^*} \quad (9)$$

Die Vernachlässigung von c_O ist allerdings nur dann haltbar, wenn die chemische Reaktion signifikant schneller als der Stofftransport abläuft (Lara-Marquez *et al.*, 1994):

$$\frac{k_m \cdot c_O^{*m-1}}{k_L a} > 10 \quad (10)$$

Diese Randbedingung begrenzt den maximal bestimmbaren $k_L a$. Bei höherem $k_L a$ kann die von der Katalysatorkonzentration abhängige Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase nicht mehr vernachlässigt werden (Maier *et al.*, 2001a). In Bioreaktoren mit entsprechender Messtechnik kann sie experimentell bestimmt werden oder mit bekannter Reaktionskinetik für Ha kleiner 0,3 berechnet werden:

$$c_O = \left(\frac{OTR}{k_m} \right)^{\frac{1}{m}} \quad (11)$$

Aus der vorliegenden Sauerstoffeintragsrate kann mit Gleichung 12 die maximale Sauerstoffeintragsrate berechnet werden.

$$OTR_{\text{max}} = OTR \cdot \frac{c_O^*}{c_O^* - c_O} \quad (12)$$

Alternativ zur Bestimmung der verbrauchten Sulfitmenge und Reaktionszeit kann mittels Abgasanalytik die Sauerstoffeintragsrate aus den Gasvolumenströmen \dot{V}_G und dem Molanteil Sauerstoff $y_{O,G}$ am Eingang und Ausgang des Reaktors berechnet werden, wenn das Reaktionsvolumen V_L und das Volumen des idealen Gases V_M in Gleichung 13 eingesetzt werden.

$$OTR = \frac{\dot{n}_{O_2}}{V_L} = \frac{\dot{V}_{G,In} \cdot y_{O_2,G,In} - \dot{V}_{G,Out} \cdot y_{O_2,G,Out}}{V_L \cdot V_M} \quad (13)$$

Dadurch verringert sich die notwendige Zeit der Bestimmung des $k_L a$ erheblich, da nach Einstellung des Gleichgewichts direkt der $k_L a$ berechnet werden kann.

Irrtümlich zu hoch gewählte Katalysatorkonzentrationen führen zu einer chemischen Reaktionsbeschleunigung. Dadurch bleibt der Sauerstoffverbrauch nicht auf die Kernphase der Lösung begrenzt, sondern findet auch im Grenzfilm statt. Der dadurch größere Konzentrationsgradient im Grenzfilm führt zu höherem Stoffübergang und damit zu überhöhtem $k_L a$. Besonders kritisch bei der Einstellung von Katalysatorkonzentrationen im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-5} M erweisen sich Verunreinigungen im verwendeten Wasser und Sulfit (Linek und Vacek, 1981; Simonnet, 2003).

Begasung mit Luft führt vor allem bei hohem Leistungseintrag zur Unterschätzung des realen $k_L a$. Die Abweichungen können ein Vielfaches von 100 % erreichen (Havelka *et al.*, 1998). Diese Abweichungen bei hohem Leistungseintrag sind eine Folge des *small bubble* Effekts (Linek *et al.*, 1989). Bei hohem Leistungseintrag entstehen an Orten maximaler lokaler Energiedissipationsdichte sehr kleine Blasen. Diese besitzen hohe Verweilzeiten und erreichen schnell das Diffusionsgleichgewicht. Sie tragen somit nicht mehr zur Aufsättigung des Mediums mit Sauerstoff bei, sondern agieren als Sauerstoffsенke da sie hauptsächlich Stickstoff enthalten. Blasen unterschiedlicher Größe sind folglich durch unterschiedlichen Sauerstoffpartialdruck charakterisiert, wodurch die Annahme des ideal durchmischten Reaktors nicht aufrechterhalten werden kann.

Der *small bubble* Effekt kann durch Belüftung mit reinem Sauerstoff umgangen werden. Da keine anderen Gase am Stofftransport beteiligt sind, ist die Annahme des uniformen Sauerstoffpartialdrucks in der Flüssigphase während der Messung erfüllt. Starke Sauerstoffabsorptionsraten aufgrund des sehr hohen treibenden Konzentrationsgefälles führen jedoch zu starkem Schrumpfen der Gasblasen, wodurch die Stoffaustauschfläche verringert wird. Weder die relativ hohe Verweilzeit der kleinen Gasblasen noch die Verringerung der Stoffaustauschfläche werden üblicherweise bei der Modellierung der Stoffübergangsfläche a berücksichtigt, wodurch der wahre $k_L a$ unterschätzt wird (Gaddis, 1999).

In Reaktionsgefäßen ohne Gasgehalt wie beispielsweise dem Schüttelkolben und der Mikrotiterplatte kann kein *small bubble* Effekt auftreten, so dass theoretisch mit Luft- und Sauerstoffbegasung korrekte Werte erzielt werden. Das Fehlen einer dispergierten Gasphase in diesen Reaktionssystemen wird als ideale Voraussetzung zur Anwendung der stationären Sulfitmethode angesehen (Büchs, 2001a).

Variante der Sulfitoxidationsmethode

In Reaktionsgefäßen mit kleinem Volumen wie beispielsweise Schüttelkolben und Mikrotiterplatten steht weder genügend Volumen für eine jodometrische Rücktitration zur Verfügung, noch sind diese Reaktionssysteme mit *online* Messtechnik für *pH* und *pO₂* bzw. Abgasanalytik ausgestattet. Um die stationäre Sulfitoxidationsmethode dennoch anwenden zu können, wurde folgende Variante vorgeschlagen. Durch Zusatz eines Indikators kann die Zeitdauer der stöchiometrischen Oxidation des Sulfits gemessen werden. Dazu wird der Farbumschlag des Indikators durch Überwachung der Reaktion mit einer Digitalkamera dokumentiert (Hermann *et al.*, 2001). Der $k_L a$ wird analog zur klassischen Sulfitmethode berechnet (Gleichung 8).

Stationäre Sulfit-Zudosier-Methode

Für Reaktionsbedingungen welche durch hohe Sauerstoffabsorptionsraten charakterisiert sind, entwickelten Imai *et al.* (1987) die stationäre Sulfit-Zudosier-Methode um den Einfluss der Verringerung der Stoffaustauschfläche durch Schrumpfen der dispergierten Gasblasen zu verringern. Durch Zudosierung einer Sulfitlösung der Konzentration c_F mit dem Volumenstrom \dot{V}_F kann die Gelöstsauerstoffkonzentration auf einen beliebigen Wert nahe 100 % Sättigung eingestellt werden. Die daraus resultierenden geringeren Sauerstoffabsorptionsraten verhindern ein Schrumpfen der Blasen und daraus resultierenden geringeren $k_L a$ (Gogate und Pandit, 1999). Außerdem reduziert geringer Gas- und Sulfitverbrauch die Kosten pro Messung, was vor allem für Reaktoren im Kubikmeter-Maßstab eine erhebliche Rolle spielt. Der $k_L a$ wird aus dem Gleichgewicht aus Sauerstoffeintrag und Sulfitverbrauch unter Berücksichtigung der Stöchiometrie der Reaktion, dem Reaktionsvolumen V_L und der sich einstellenden Sauerstoffkonzentration $c_{O,eq}$ berechnet.

$$k_L a = \frac{\dot{V}_{F,SO_3} \cdot c_{F,SO_3} \cdot \nu_{O_2}}{V_L \cdot (c_{O,init} - c_{O,eq}) \cdot \nu_{SO_3^{2-}}} \quad (14)$$

Die Co^{2+} Katalysatorkonzentration und die Konzentration der Sulfitlösung werden so gewählt, dass keine chemische Reaktionsbeschleunigung auftritt. Für gegebene Katalysatorkonzentrationen von 10^{-7} - 3×10^{-6} M $CoSO_4$ berechnen die Autoren eine maximale Sulfitkonzentration im Medium von 5,5 mM. Bei Verwendung einer 100 mM Na_2SO_3 Zudosierlösung wurde für einen Bereich von 5×10^{-7} - 2×10^{-6} M gezeigt, dass die Katalysatorkonzentration keinen Einfluss auf den ermittelten $k_L a$ hat. Zwar hängt die Sulfitoxidationsgeschwindigkeit von der Katalysatorkonzentration ab, der erreichte Gleichgewichtswert der Sauerstoffkonzentration, der zur Berechnung des $k_L a$ herangezogen wird, ist jedoch konstant. Solange im Gleichgewichtszustand die Sulfitkonzentration unterhalb des Grenzwerts der chemischen Reaktionsbeschleunigung bleibt, ist eine chemische Reaktionsbeschleunigung unabhängig von der verwendeten Katalysatorkonzentration ausgeschlossen.

Das Dosieren einer 0,5 M Na₂SO₃ Lösung mit einem Volumenstrom, welcher eine Gleichgewichtssauerstoffsättigung von 90 - 95 % bewirkte, führte zu 10 - 20-fach geringeren Sauerstoffabsorptionsraten im Vergleich zur stationären Sulfitmethode. Dadurch kommt es nicht zum Schrumpfen der Blasen, wodurch die Annahme der ideal durchmischten Gasphase aufrechterhalten werden kann (Linek *et al.*, 1993). Die geringen Absorptionsraten verhindern ebenfalls eine Sauerstoffverarmung der Gasphase, so dass mit dem Sauerstoffpartialdruck das treibende Konzentrationsgefälle berechnet werden kann. Auch ohne Abgasanalytik kann so die Dauer eines Experiments auf wenige Minuten reduziert werden. Durch Belüftung mit reinem Sauerstoff wurde in einem 18 L Bioreaktor der k_La bestimmt, welcher bis zu 0,8 s⁻¹ mit den Werten der dynamischen Druckmethode übereinstimmt (Linek *et al.*, 1989). Wird die Sulfit-Zudosier-Methode bei Co²⁺-Konzentrationen von 10⁻⁶ M mit Luft durchgeführt tritt der *small bubble* Effekt auf. Für Leistungseinträge von über 1 W L⁻¹ bzw. einem k_La von über 0,1 s⁻¹ wurden die Werte der dynamischen Druckmethode um bis zu 55 % unterschätzt (Linek *et al.*, 1990).

3.4.2. Dynamische Messmethoden

Dynamische k_La -Messmethoden beruhen auf der Messung der zeitlichen Änderung der Gelöstsauerstoffkonzentration c_O in einem belüfteten Reaktor nach Aufprägung einer Änderung der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase. Der Konzentrationssprung wird physikalisch durch Stickstoffdesorption, Vakuumdesorption oder Druckänderung bzw. chemisch durch Zugabe einer Sauerstoffzehrenden Chemikalie und einem Katalysator erreicht. Aufgrund der Dynamik der Messungen müssen Annahmen bezüglich der Hydrodynamik der Gas- und Flüssigphase und der Dynamik der Sauerstoffanreicherung in der dispergierten Gasphase beim Durchströmen des Reaktors getroffen werden.

Im einfachsten Fall wird ein ideal rückvermischter Reaktor angenommen, d.h. Gas- und Flüssigphase weisen an jedem Ort des Reaktors gleiche Sauerstoffkonzentration auf. Des Weiteren wird ideale Rückvermischung postuliert, d.h. der Sauerstoffpartialdruck pO_2 der Gasphase bleibt beim Durchströmen der Flüssigphase nahezu unverändert gleich dem Sauerstoffpartialdruck im Abgas. An jedem Ort des Reaktors wird folglich das gleiche treibende Konzentrationsgefälle Δc_O angenommen.

$$\Delta c_O = c_{O,Out}^* - c_O \quad (15)$$

Ist ein adäquates Modell der Gasphasenmischung gefunden, kann der k_La aus der Aufsättigungskurve des dynamischen Experiments bestimmt werden. Mit Hilfe einer Minimierung der Fehlerquadratsumme mit nicht-linearer Regression werden verschiedene Parameter der Bilanzgleichung geschätzt, um den vom Modell berechneten Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration an die gemessene Aufsättigungskurve eines Experimentes anzupassen. Im einfachsten Fall wird unter

Annahme idealer Rückvermischung der Flüssig- und Gasphase die Sauerstoffmassenbilanz in der Flüssigphase verwendet.

$$\frac{c_O^* - c_O(t)}{c_O^* - c_O(0)} = e^{-tk_L a} \quad (16)$$

Diese Gleichung kann verwendet werden, wenn die Ansprechzeit t_E viel kleiner als der Reziprokwert des größten zu bestimmenden $k_L a$ ($t_E \ll k_L a^{-1}$) ist. Besitzt die Sauerstoffelektrode eine Ansprechzeit t_E im Bereich des Kehrwerts des größten zu bestimmenden $k_L a$ muss die Ansprechzeit berücksichtigt werden, da sonst der wahre $k_L a$ unterschätzt werden würde (Gaddis, 1999). Resultierende Fehler steigen mit größerem $k_L a$ und höherer Ansprechzeit der Elektrode an (Merchuk *et al.*, 1990). Das Einführen eines Verzögerungsglieds erster Ordnung (Fuchs und Ryu, 1971) erlaubt meist die Abbildung des Ansprechverhaltens von Sauerstoffelektroden (Dang *et al.*, 1977).

$$\frac{dc_E}{dt} = \frac{1}{t_E} \cdot (c_O - c_E) \quad (17)$$

Damit ergibt sich (Fuchs und Ryu, 1971; Wodick, 1972):

$$\frac{c_O^* - c_O(t)}{c_O^* - c_O(0)} = \left(\frac{1}{1 - t_E \cdot k_L a} \right) \cdot \left(e^{-tk_L a} - t_E k_L a \cdot e^{-\frac{t}{t_E}} \right) \quad (18)$$

Die Prozessbefragung zieht in der Regel erst nach einer kurzen *lag*-Phase eine Änderung der Sauerstoffkonzentration nach sich. Diese darf nicht fälschlicherweise in der Antwortzeit der Elektrode aufgehen, da sonst die Überschätzung der Elektrodenantwortzeit t_E zur Überschätzung des $k_L a$ führt. Üblich ist das Einführen einer Zeitachsenverschiebung Δt als unabhängigen zusätzlichen Parameter, welcher ebenfalls durch Minimierung der Fehlerquadratsumme durch nicht-lineare Regression geschätzt wird (Linek, 1987):

$$\frac{c_O^* - c_O(t)}{c_O^* - c_O(0)} = \left(\frac{1}{1 - t_E \cdot k_L a} \right) \cdot \left(e^{-(t-\Delta t)k_L a} - t_E k_L a \cdot e^{-\frac{(t-\Delta t)}{t_E}} \right) \quad (19)$$

Dynamische Stickstoffdesorptionsmethode

Die Durchführung der klassischen dynamischen Stickstoffdesorptionsmethode sieht nach Desorption mit Stickstoff eine sofortige Umstellung auf Sauerstoff- oder Luftbegasung vor. Dadurch enthält die Flüssigphase während der Aufsättigung Gasblasen unterschiedlicher Größe und Partialdrücke der Gase Stickstoff und Sauerstoff. Folglich kann nicht mehr von einer uniformen Sauerstoffkonzentration in der dispergierten Gasphase ausgegangen werden. Eine korrekte Vorhersage über das Koaleszenzverhalten zwischen bereits vorhandenen Stickstoffblasen und neu eingetragenen Luft- bzw. Sauerstoffblasen ist ebenfalls nicht möglich.

In koaleszierenden Medien in Bioreaktoren mit einfachem Rührorgan wird jedoch trotzdem korrekter $k_L a$ gemessen (Linek *et al.*, 1996). Die interne Mischung der Gasblasen aufgrund häufig auftretender Blasenkoaleszenz scheint ausreichend, um die Annahme der uniformen Sauerstoffkonzentration in der Gasphase aufrechterhalten zu können.

Unter nicht-koaleszierenden Bedingungen in Bioreaktoren mit einfachem Rührorgan liefert die dynamische Stickstoffdesorptionsmethode innerhalb des gesamten Bereichs des eingestellten Leistungseintrags zu geringen $k_L a$. Des Weiteren zeigt sich bei steigendem Leistungseintrag das durch den *small bubble* Effekt hervorgerufene scheinbare $k_L a$ -Maximum (Linek *et al.*, 1991).

Variante der dynamischen Stickstoffdesorptionsmethode

Zur Umgehung der Problematik der unzureichenden Modellierung der Gasphasenmischung in nicht-koaleszierenden Medien nach sofortigem Umschalten von Stickstoff auf Luft oder Sauerstoff wurde eine Variante der dynamischen Methode vorgeschlagen (Linek *et al.*, 1987; Nocentini, 1990). Vor der Umstellung der Begasung auf Luft oder Sauerstoff wird das Rührorgan gestoppt, damit bereits vorhandene Gasblasen entweichen und somit der Gasgehalt der Flüssigphase auf Null reduziert wird. Nach erneutem Start der Belüftung und der Durchmischung beginnt die Aufsättigung folglich mit einer Flüssigphase ohne Gasgehalt. Das dynamische Verhalten der Vergrößerung der Stoffaustauschfläche a muss im Modell der Gasphasenmischung berücksichtigt werden. Ein linearer Ansatz liefert bereits zufrieden stellende Näherungen. Die Beteiligung von Stickstoff an der Reaktion führt wiederum zum *small bubble* Effekt, so dass Korrelationen nach Cooper *et al.* (1944) nur bis zu einem gewissen Wert des Leistungseintrags sinnvoll sind. Wird auf Stickstoff verzichtet und die Flüssigphase durch Vakuumdesorption entgast, wird in koaleszierenden und nicht-koaleszierenden Medien ein $k_L a$ gemessen, welcher über den gesamten Bereich des Leistungseintrags mit der Korrelationsgleichung nach Cooper *et al.* (1944) genähert werden kann. Der *small bubble* Effekt ist weitestgehend unterdrückt.

Allerdings ist der gemessene $k_L a$ noch immer geringer als der $k_L a$ der als korrekt angesehenen dynamischen Druckmethode. Die Ursache ist in dem noch nicht abgeschlossenen Aufbau des Gleichgewichtsgasgehalts bzw. der Blasengrößenverteilung bei Beendigung der Aufsättigungsphase zu finden. Trotz Berücksichtigung der Dynamik des Gasgehalts während der Aufsättigung wird somit aufgrund der geringen Stoffaustauschfläche ein zu niedriger $k_L a$ erzielt. Diese Erklärung konnte experimentell verifiziert werden, indem nach Vakuumdesorption und Starten der Begasung nach gewissen Wartezeiten im Bereich von bis zu zwei Minuten die dynamische Druckmethode durchgeführt wurde. Ohne Wartezeit wurde der $k_L a$ der dynamischen Methode reproduziert. Bei Wartezeiten im Bereich von bis zu 20 Sekunden wurde stetig steigender $k_L a$ bestimmt. Weitere Erhöhung der Wartezeit führte zu keiner weiteren Steigung des $k_L a$. Folglich

benötigt die Einstellung des Gleichgewichts des Gasgehalts und der Blasengrößenverteilung länger als die von der Variante der dynamischen Stickstoffdesorptionsmethode aufgezeichnete Aufsättigungskurve (Linek *et al.*, 1989).

Dynamische Sulfitmethode

Die dynamische Sulfitmethode bedient sich der katalysierten Sulfitoxidation zum Entfernen des in der Flüssigphase gelösten Sauerstoffs (Linek *et al.*, 1987; Havelka *et al.*, 1998). Zu Beginn der Aufsättigungsphase muss die vorher zugegebene Menge Sulfit stöchiometrisch verbraucht sein, damit die Aufsättigungsphase nicht durch eine parallel ablaufende Sulfitoxidation verfälscht wird. Dazu wird der stöchiometrische Verbrauch des eingesetzten Sulfits bei einer Katalysatorkonzentration von 10^{-3} M CoSO_4 durch Absorptionsmessung des Reaktionsmediums in einem Beipass bei $\lambda = 220$ nm und durch Leitfähigkeit des Mediums im Reaktor detektiert. Ab dem Zeitpunkt des stöchiometrischen Verbrauchs des Sulfits wird aus der Aufsättigungskurve der k_La bestimmt. Für eine Katalysatorkonzentration von 10^{-3} M CoSO_4 liefert die dynamische Sulfitmethode mit Sauerstoffbegasung der dynamischen Druckmethode äquivalente Werte. Verwendung von Luft zur Belüftung führt bei hohem Leistungseintrag zu einer Unterschätzung des k_La aufgrund des *small bubble* Effekts.

Dynamische Druckmethode

Bei dieser Methode wird der k_La aus dem Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration nach Aufprägen eines Drucksprunges von ca. 20 % des Ausgangsdrucks auf die Flüssigphase bestimmt (Linek *et al.*, 1989). Dabei muss in Vorversuchen sichergestellt werden, dass das Messverhalten und die Messgenauigkeit der Sauerstoffsonde druckunempfindlich sind. Der Sprung sollte vom niedrigeren zum höheren Druck erfolgen, da eine Verringerung des Drucks zu spontaner Blasenbildung in der Flüssigphase führt und die daraus resultierende größere Stoffaustauschfläche den k_La erhöhen würde. In nicht-koaleszierenden Medien wurde bei geringem k_La von 0,001 – 0,01 durch Druckverringern bis zu 4-fach höherer k_La gemessen als bei Druckerhöhung. Ab einem k_La von $0,5 \text{ s}^{-1}$ wurde ein k_La gleicher Größe unabhängig von der Richtung des Drucksprungs bestimmt (Linek *et al.*, 1994). Der Drucksprung führt zu einer simultanen Änderung des $p\text{O}_2$ in allen Gasblasen unabhängig vom Durchmischungsgrad der Gasphase. Demzufolge können Fehler bei der Modellierung der Gasphasenmischung ausgeschlossen werden. Die Methode liefert deshalb nahezu übereinstimmenden k_La für Sauerstoff und Luftbegasung. Der Fehler mit Luftbegasung liegt für k_La -Werte unter $0,2 \text{ s}^{-1}$ unter 7 % und erreicht selbst bei einem k_La von 1 s^{-1} nur 25 % (Linek *et al.*, 1993).

Die dynamische Druckmethode ist aufgrund des relativ geringen finanziellen Aufwands pro Messung vor allem für Bioreaktoren großen Maßstabs interessant. Mit Hilfe der dynamischen Druckmethode scheint es außerdem möglich, Korrelationsbeziehungen nach Cooper *et al.* (1944) mit gleichen Parametern für Reaktoren unterschiedlichen Maßstabs und Geometrie zu erhalten. Zwei Korrelationsbeziehungen für Bioreaktoren mit Reaktionsvolumina von 18 L und 1000 L weichen für nicht-koaleszierende Bedingungen nur um 2 % voneinander ab (Linek *et al.*, 1994). Korrekter $k_L a$ in Reaktoren unterschiedlicher Größe bei gleicher Gasleerrohrgeschwindigkeit scheint somit allein eine Funktion des Leistungseintrags zu sein. Dies würde der Theorie der lokalen isotropen Turbulenz von Kolmogorov entsprechen, welche postuliert, dass der $k_L a$ ausschließlich durch Mikromischung der Flüssigkeit, d.h. der lokalen Energiedissipationsdichte beeinflusst wird (Kawase und Moo-Young, 1990).

3.4.3. Abschätzung des $k_L a$ aus Sauerstoffanalytik

Wird der Molanteil Sauerstoff y_O in Zu- und Abluft bestimmt, kann durch eine Massenbilanz die Sauerstoffaufnahme der gesamten vorhandenen Biomasse mit Hilfe des Gasvolumenstroms \dot{V}_G , des Molvolumens des idealen Gases V_M , der Molmasse Sauerstoff M_O und des Reaktionsvolumens V_R berechnet werden.

$$OUR = \frac{(y_{O,In} - y_{O,Out}) \cdot \dot{V}_G \cdot M_O}{V_M \cdot V_R} \quad (20)$$

Mit einer berechneten maximalen Sauerstofflöslichkeit c_{O^*} des jeweiligen Mediums kann unter Vernachlässigung der Änderung der Gelöstsauerstoffkonzentration mit der Zeit der $k_L a$ abgeschätzt werden (Gleichung 21).

$$k_L a = \frac{OUR}{c_{O,Out}^* - c_O} \quad (21)$$

Wird darüber hinaus die Sauerstoffanreicherung des Prozessgases vernachlässigt wenn keine Messtechnik zur Bestimmung des Sauerstoffanteils im Abgas zur Verfügung steht ($y_{O,Out} = y_{O,In}$), vereinfacht sich diese Gleichung zu:

$$k_L a = \frac{OUR}{c_{O,In}^* \cdot \left(1 - \frac{pO_2}{pO_{2,In}}\right)} \quad (22)$$

Durch Bestimmung der Sauerstoffaufnahme aus dem pO_2 -Abfall nach Stoppen der Begasung des Bioreaktors kann somit ebenfalls der $k_L a$ abgeschätzt werden. Die Bestimmung ist aufgrund der fehlerbehafteten Bestimmung der Sauerstoffaufnahme ungenauer. Darüber hinaus wird durch diese $k_L a$ -Abschätzung ein minimaler $k_L a$ bestimmt, da durch die Vernachlässigung der Sauerstoffanreicherung des Prozessgases der Nenner überschätzt wird.

3.5. Verfahrenstechnische Charakterisierung von Rührkesselreaktoren

3.5.1. Hydrodynamik

Durch die Bewegung der Rührorgane mit dem Durchmesser d_I mit einer Drehzahl n bildet sich eine Strömung in der Flüssigphase mit der Viskosität ν aus, welche durch die Reynoldszahl (Re) charakterisiert wird. Diese Kennzahl repräsentiert ein Maß für den Turbulenzgrad der Flüssigkeit.

$$Re \equiv \frac{n \cdot d_I^2}{\nu} \quad (23)$$

Eventuell vorhandene Einbauten wie Strömungsbrecher, Messsonden oder Wärmetauscher setzen der tangentialen Strömung einen Widerstand entgegen, welcher proportional zur Fläche der Einbauten senkrecht zur Umfangsrichtung mit der Breite b_B und der Höhe h_B und zum Widerstandsbeiwert c_w ist. Diese Größen werden mit dem Durchmesser des Reaktors d_T und der Anzahl Strömungsbrecher N_B in der Bewehrungskennzahl BW zusammengefasst (Liepe, 1994b). Diese Kennzahl ist damit ein Maß für den Strömungswiderstand der Einbauten.

$$BW = c_w \cdot N_B \cdot \frac{b_B \cdot h_B}{d_T^2} \quad (24)$$

Durch steigende Bewehrung wird die Trombenbildung unterdrückt, die Turbulenz intensiviert und damit der Leistungseintrag des Rührsystems gesteigert. Der vollständig bewehrte Zustand wird ab $BW \cong 0,2 - 0,28$ erreicht.

Im turbulenten Strömungsbereich, welcher für verschiedene Rührertypen im Rührkessel ab Re von ungefähr 10^4 vorliegt, wird die kinetische Energie der Strömung an immer kleinere Turbulenzelemente weitergeleitet. Diese Energieübertragung ist von der Viskosität der Flüssigkeit unabhängig. Bei Wirbeln mit einem bestimmten kritischen Durchmesser wird die Energie schließlich aufgrund dominierender Viskositätskräfte komplett in Wärme umgewandelt (Zlokarnik, 1999).

Die Rührerumfangsgeschwindigkeit v_{Tip} ergibt sich aus dem Durchmesser des Rührorgans d_I und der Drehzahl n :

$$v_{Tip} = d_I \cdot \pi \cdot n \quad (25)$$

3.5.2. Leistungseintrag

Unbegastetes System

Der mechanische Leistungseintrag in einen Rührkesselreaktor erfolgt durch die Bewegung der Rührorgane. Der Energieeintrag durch Blasenbildung und isother-

me Expansion der Gasblasen beim Aufsteigen im Reaktor ist in der Regel gegenüber dem mechanischen Leistungseintrag zu vernachlässigen.

Der Leistungseintrag eines gegebenen Rührsystems unter definierten Bedingungen (Reaktordurchmesser, Füllhöhe, Anzahl und Anordnung der Rührorgane, Anzahl und Größe eventueller Einbauten) hängt vom Rührerdurchmesser, der Drehzahl, der Dichte und der kinematischen Viskosität der Flüssigkeit ab. Entsprechend den Gesetzen der Ähnlichkeitstheorie (Dimensionsanalyse) kann die Anzahl der Einflussparameter auf den Leistungseintrag auf zwei dimensionslose Kennzahlen reduziert werden, nämlich die Ne - und die Re -Zahl. Im unbegasten Reaktor ist die Ne -Zahl nur von der Geometrie des Rührsystems und der Re -Zahl abhängig.

$$Ne = f(Re) \quad (26)$$

Diese Abhängigkeit wird in der so genannten Leistungscharakteristik dargestellt. Zur Bestimmung des Leistungseintrags einer bestimmten Reaktorgeometrie wird für eine Re -Zahl aus der Leistungscharakteristik die entsprechende Ne -Zahl ermittelt und mit Gleichung 27 die Leistung im unbegasten Reaktor P_0 mit Hilfe der Dichte ρ , der Drehzahl n und dem Rührerdurchmesser d_I berechnet.

$$P_0 = Ne_0 \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d_I^5 \quad (27)$$

Im turbulenten Strömungsfeld ist die Ne -Zahl im unbegasten Reaktor konstant und lediglich vom Rührertyp und der Einbaugeometrie abhängig (Zlokarnik, 1999).

Begastes System

Im begasten Reaktor sinkt der Leistungseintrag bei konstanter Re -Zahl mit steigendem Gasgehalt ε_G der Flüssigphase ab. Der Gasgehalt ist definiert als der Anteil des Gasvolumens V_G am Gesamtvolumen im begasten Zustand $V_0 + V_G$.

$$\varepsilon_G = \frac{V_G}{V_0 + V_G} \quad (28)$$

Der Gaseintrag führt zu einem schlagartigen Abfall der Ne -Zahl, der nur auftritt, wenn die gerührte Flüssigkeit in Kontakt mit einer Gasphase steht. Deshalb kann der niedrigere Leistungseintrag eindeutig dem beginnenden Eintrag von Gasblasen in die Flüssigkeit zugeschrieben werden. Das Sinken des Leistungseintrags ist unabhängig davon, ob der Gaseintrag über einen Gasverteiler oder über Oberflächenbegasung erfolgt. Im begasten Reaktor ist die Ne -Zahl somit eine Funktion der Gasdurchsatzkennzahl Q , der Re -Zahl und der Fr -Zahl.

$$Ne = f(Q, Re, Fr) \quad (29)$$

$$Q = \frac{\dot{V}_G}{n \cdot d_I^3} \quad (30)$$

$$Fr = \frac{n^2 \cdot d_I}{g} \quad (31)$$

Bei selbst-ansaugenden Rührsystemen führt eine Steigerung der Drehzahl zunächst nicht zu Blaseneintrag, so dass der Leistungseintrag analog zu unbegas-ten Systemen beschrieben werden kann. Sobald durch steigende Rührerdrehzahl Blaseneintrag erfolgt, sinkt die Ne -Zahl. Auf diese Weise kann die kritische Rührergeschwindigkeit n_{crit} , welche den Beginn des Blaseneintrags charakterisiert, aus einem doppelt-logarithmischen Diagramm der Leistung über der Drehzahl abgelesen werden. Die kritische Rührergeschwindigkeit entspricht der Geschwin-digkeit, an der die Gerade ihre Steigung ändert (Sawant und Joshi, 1979).

3.5.3. Sauerstoffeintrag

Nach der gebräuchlichen Vorstellung des Filmmodells befinden sich beiderseits der Phasengrenzfläche laminare Grenzschichten in denen rein diffusiver Stoff-transport erfolgt. Die Sauerstoffstromdichte \dot{J}_O durch die gasseitige Grenzschicht hängt vom gasseitigen Stoffübergangskoeffizienten k_G und dem treibenden Konzentrationsgefälle zwischen dem Kern der Gasblase $c_{O,G}$ und der gasseitigen Phasengrenzfläche $c_{O,G}^*$ ab (Abbildung 4).

$$\dot{J}_O = k_G \cdot (c_{O,G} - c_{O,G}^*) \quad (32)$$

An der Phasengrenzfläche wird thermodynamisches Gleichgewicht zwischen der gasseitigen und der flüssigseitigen Sauerstoffkonzentration angenommen. Auf der

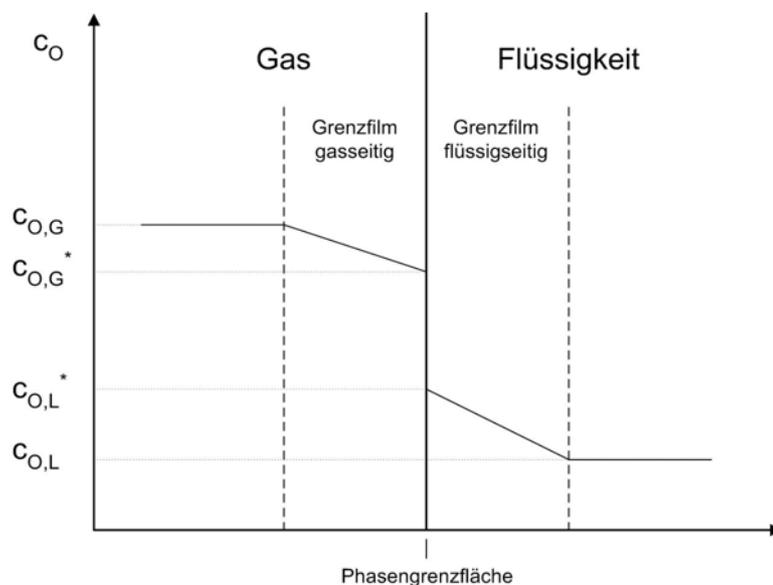


Abbildung 4: Verlauf der Sauerstoffkonzentration an der Pha-sengrenzfläche nach dem Filmmodell.

Flüssigkeitsseite hängt die Sauerstoffstromdichte durch die Grenzschicht, analog zur Gasseite, vom Stoffübergangskoeffizienten k_L und dem treibenden Konzentrationsgefälle ($c_{O,L}^* - c_{O,L}$) ab. Da der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Luft um mehr als drei Größenordnungen höher ist als in wässrigen Lösungen, kann der gasseitige Stofftransportwiderstand bei Umgebungsbedingungen vernachlässigt werden.

Um lokale Unterschiede des treibenden Konzentrationsgefälles im Bioreaktor erfassen zu können, wird bei der Berechnung der gesamten Sauerstoffstromdichte über das gesamte Reaktionsvolumen gemittelt. Die Sauerstoffstromdichte bezogen auf das Reaktionsvolumen, die so genannte Sauerstoffeintragsrate OTR , kann somit als Funktion des flüssigseitigen Stoffübergangskoeffizienten k_L , der volumenbezogenen Stoffaustauschfläche a und des mittleren treibenden flüssigseitigen Konzentrationsgefälles $\Delta c_{O,L}$ formuliert werden:

$$OTR = \frac{j_o}{V_R} = k_L a \cdot \Delta c_{O,L} \quad (33)$$

$$\Delta c_{O,L} = \frac{1}{V} \cdot \int (c_{O,L}^* - c_{O,L}) \cdot dV \quad (34)$$

Da die Sauerstoffkonzentration in einem ganz bestimmten Gas- und Flüssigvolumen im Reaktor nicht bestimmt werden kann, müssen Modelle für die Gasphasenströmung verwendet werden. Rührkesselreaktoren des Labormaßstabs werden in der Regel als ideal durchmischt angesehen.

$$\Delta c_{O,L} = (c_{O,L}^* - c_{O,L}) \quad (35)$$

Die flüssigseitige Gelöstsauerstoffkonzentration $c_{O,L}^*$ wird in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks der Gasphase durch das Henry-Gesetz beschrieben.

$$c_{O,L}^* = K_H(T) \cdot p_O \quad (36)$$

Der Sauerstoffpartialdruck p_O kann unter der Voraussetzung der idealen Durchmischung gleich der im Abgas gesetzt werden. Mit Hilfe des Dalton'schen Gesetzes erhält man schließlich folgenden Zusammenhang zur Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration:

$$p_O = p \cdot y_O \quad (37)$$

$$c_{O,L}^* = K_H(T) \cdot p \cdot y_O \quad (38)$$

Die Abhängigkeit der Gelöstsauerstoffkonzentration $c_{O,L}^*$ von der Temperatur kann durch Korrelationsgleichungen berücksichtigt werden (Crueger und Crueger, 1989; Wilhelm *et al.*, 1977).

$$c_{O,L}^* = \frac{468}{31,6 + T} \quad (39)$$

$$c_{O,L}^* = 14,16 - 0,394 \cdot T + 0,007714 \cdot T^2 - 0,0000646 \cdot T^3 \quad (40)$$

Soll die Verringerung der Sauerstofflöslichkeit durch Zusätze von Elektrolyten und organischen Substanzen in Kultivierungsmedien berücksichtigt werden, kann der Henrykoeffizient nach Gleichung 41 angepasst werden (Schumpe, 1993). Für Elektrolyte sind die Aussalzparameter H_i , für organische Substanzen die Löslichkeitsparameter K_j tabelliert.

$$\log\left(\frac{K_{H,0}}{K_H}\right) = \sum_i H_i \cdot I_i + \sum_j K_j \cdot c_{n,j} \quad (41)$$

Die Ionenstärke des Mediums ist definiert als die Summe der Ionenstärken der Einzelkomponenten.

$$I_{Ges} = \frac{1}{2} \cdot \sum_i c_i \cdot z_i^2 \quad (42)$$

Die Temperaturabhängigkeit der Henrykonstante kann mit folgender Korrelationsgleichung berücksichtigt werden (Ducommun *et al.*, 2000). Die Temperatur ist in Grad Celsius anzugeben.

$$\frac{1}{K_H} = 1,385 - 2,635 \cdot 10^{-2} \cdot (T - 20) + 4,288 \cdot 10^{-4} \cdot (T - 20)^2 \quad (43)$$

Korrelationen

Um Prozesse einer erfolgreichen Maßstabsvergrößerung unterwerfen zu können bzw. Bioreaktoren auslegen zu können, werden Korrelationsbeziehungen zwischen dem $k_L a$ und den ihn hauptsächlich beeinflussenden Prozessparametern aufgestellt. Diese sollten über mehrere Größenordnungen des Reaktionsvolumens geometrisch ähnlicher Reaktoren anwendbar und mit möglichst geringen Fehlern behaftet sein. Zahlreiche Korrelationsbeziehungen der Literatur für Einfach- und Mehrfachrührsysteme sind jedoch für ähnliche Reaktorsysteme mit Abweichungen von mehreren 100 % behaftet.

Cooper *et al.* (1944) definierte den volumenbezogenen Leistungseintrag $P V^{-1}$ und die Gasleerrohrgeschwindigkeit u_G als Haupteinflussgrößen auf den $k_L a$ in volumenbegasteten Rührkesselreaktoren. Er schlug eine Korrelation vor, in der α der Exponent des Leistungseintrags und β der Exponent der Gasleerrohrgeschwindigkeit bedeutet.

$$k_L a = C \cdot \left(\frac{P}{V_L}\right)^\alpha u_G^\beta \quad (44)$$

In Tabelle 3 sind die Parameter der Korrelation nach Cooper (1944) für eine Vielzahl verschiedener Reaktorgrößen und Messmethoden, jeweils für koaleszente und nicht-koaleszente Bedingungen, d.h. in destilliertem Wasser bzw. in einer Elektrolyt haltigen Lösung, aufgelistet. Nicht alle Autoren verwenden SI-Einheiten

zur Erstellung ihrer Korrelationsgleichungen, was den Vergleich auf Basis der reinen Zahlenwerte unmöglich macht. Die Koeffizienten C , α und β der Korrelationen variieren außerdem aufgrund der unterschiedlichen Durchführung der $k_L a$ -Bestimmungen, der unterschiedlichen Messmethoden, der variierenden Reaktor-geometrie und der fehlerhaft durchgeführten Messungen.

Tabelle 3: Parameter der Korrelationsgleichung von Cooper (1944) für verschiedene Messmethoden und Reaktorgrößen. C = Koaleszente Bedingungen. NC = nicht-koaleszente Bedingungen. SDM = Stickstoffdesorptionsmethode. DPM = dynamische Druckmethode. SFM = Sulfit-Zudosier-Methode. DSM = dynamische Sulfitmethode.

	V_R , [L]	d_T , [m]	u_G [cm s ⁻¹]	$C \cdot 10^3$	α	β	Autor (Jahr)	Methode
C	18	0,29	0,49	4,95	0,593	0,4	Linek <i>et al.</i> , 1987	SDM
NC	18	0,29	0,49	1,35	0,946	0,4		
C	18	0,29	0,49	3,84	0,654	0,4	Linek <i>et al.</i> , 1989	DPM, SFM
NC	18	0,29	0,49	0,311	1,24	0,4		
C	17	0,228	0,86	12,206	0,566	0,47	Gagnon <i>et al.</i> , 1998	
C	17	0,228	0,86	9,192	0,6	0,503		
C	1000	1	0,49	1,76	0,762	0,4	Linek <i>et al.</i> , 1994	DPM
NC	1000	1	0,49	0,416	1,21	0,4		
C	2-2600		1,40	26	0,4	0,5	van't Riet, 1979	Klass. Sulfit,
NC	2-4400		0,50	2	0,7	0,2		SDM
C	5,125	0,19	0,196	2,04	0,68	0,58	Arjunwadkar <i>et al.</i> , 1998	SDM
NC	5,125	0,19	0,196	3,96	0,82	0,38		
NC	5	0,165	0,80	1	3,5	0,74	Imai <i>et al.</i> , 1987	SFM
NC	500	0,75	1,13	1	3,5	0,74		
NC	3000	1,15	1,20	1	3,5	0,74		
NC	10000	1,8	1,30	1	3,5	0,74		
C	19,16	0,29	0,48	0,757	0,591	-	Havelka <i>et al.</i> , 1998	DSM
NC	19,16	0,29	0,48	0,0586	1,2	-		
C	39,2	0,19	2,30	15	0,59	0,55	Nocentini <i>et al.</i> , 1993	SDM
C	39,2	0,19	2,30	5,5	0,62	0,4		
C	20,8	0,19	1,22	6,46	0,675	0,494	Linek <i>et al.</i> , 1996	DPM
NC	20,8	0,19	1,22	0,129	1,32	0,331		
C	20,8	0,19	1,22	8,61	0,637	0,54		
NC	20,8	0,19	1,22	0,525	1,17	0,459		
C	15	0,19	0,88	1,06	0,67	0,56	Wu, 1995	SFM
C	12,95	0,19	0,76	2,38	0,58	0,7	Wu <i>et al.</i> , 1998	SFM
C	12,95	0,19	0,76	1,65	0,66	0,59		

NC	0,2	0,06	0,30	110	0,06	0,73	Weuster-Botz <i>et al.</i> , 2002	SDM
NC	0,2	0,06	0,30	184	0,08	0,58		SDM
NC	8	0,228	0,49	82540	0,756	0,81	Moresi und Patete, 1988	Klass. Sulfit
NC	30	0,315	0,62	82540	0,756	0,81		
NC	80	0,525	0,69	82540	0,756	0,81		
NC	1000	1	1,17	82540	0,756	0,81		
C	125	0,43	1,80	21,8	0,5	0,6	Bouaifi <i>et al.</i> , 2001	DSM
C	20,8	0,19	1,22	17,7	0,58	0,588	Moucha <i>et al.</i> , 1995	DPM
C	20,8	0,19	1,22	14,6	0,611	0,554		
NC	20,8	0,19	1,22	2,52	1,03	0,554		
NC	20,8	0,19	1,22	0,579	1,2	0,439		
NC	37	0,3	0,88	1,52	1,29	0,48	Maier <i>et al.</i> , 2001a	Klass. Sulfit

Haupteinflussfaktor auf die Konstanten der Korrelationsgleichung ist die Messmethode (Abbildung 5). Vergleiche der Korrelationsbeziehungen welche mit verschiedenen Messmethoden gewonnen wurde zeigen vor allem für höheren Leistungseintrag deutliche Abweichungen des $k_L a$ von bis zu mehreren 100 %. Die dynamische Druckmethode liefert korrekten $k_L a$ für koaleszierende, nicht-koaleszierende und viskose Medien, da weder eine unzureichende Mischung der Gasphase noch die Zusammensetzung des Prozessgases Einfluss auf den erhaltenen $k_L a$ haben. Die Fehler anderer Messmethoden werden deshalb meist als Abweichung von der dynamischen Druckmethode angegeben. Die korrekt durchgeführte klassische, stationäre Sulfitmethode (Cooper *et al.*, 1944) liefert einen $k_L a$, welcher der dynamischen Druckmethode äquivalent ist (Maier *et al.*, 2001a). Die Sulfit-Zudosier-Methode vermeidet hohe Sauerstoffabsorptionsraten durch kontinuierliches Zufüttern von Sulfit (Imai *et al.*, 1987) und erzielt ebenfalls einen der DPM äquivalente $k_L a$. Mit Sauerstoffbegasung wird durch die Sulfit-Zudosier-Methode ein korrekter $k_L a$ erzielt. Mit Luftbegasung werden ab einem Leistungseintrag von etwa 1 W L^{-1} , was einem $k_L a \sim 0,1 \text{ s}^{-1}$ entspricht, der $k_L a$ der dynamischen Druckmethode bis zu 55 % unterschätzt (Linek *et al.*, 1989).

Dynamische Methoden scheitern meist an den Annahmen bezüglich der Mischung der Gasphase. Der zur Bestimmung des $k_L a$ notwendige Sprung der Sauerstoffkonzentration in der im Reaktionsmedium dispergierten Gasphase unterliegt einer zeitlichen Verzögerung und erfolgt nicht homogen im gesamten Reaktor. Weder die Annahme des ideal durchmischten Reaktors, noch ein Gasphasenverhalten analog des Modells der Rohrströmung können die Mischung der Gasphase zufrieden stellend abbilden. Dies gilt vor allem für Medien mit hoher Ionenstärke, in denen eine interne Mischung der Gasphase durch Koaleszenz weitgehend ausgeschlossen ist. Aufgrund der Überschätzung des treibenden Konzentrations-

gefälltes wird ein zu geringer $k_L a$ bestimmt. Der ab hohen Leistungseintragungswerten auftretende *small bubble* Effekt führt zu einer weiteren Unterschätzung des $k_L a$ (Dang *et al.*, 1977; Linek *et al.*, 1991). Der Wert des Leistungseintrags, ab dem der $k_L a$ signifikant unterschätzt wird, sinkt mit steigendem Reaktorvolumen von etwa 1 W L^{-1} in Reaktoren des Labormaßstabs bis zu etwa $0,2 \text{ W L}^{-1}$ bei Reaktoren mit mehreren Kubikmetern Reaktionsvolumen (Linek *et al.*, 1987).

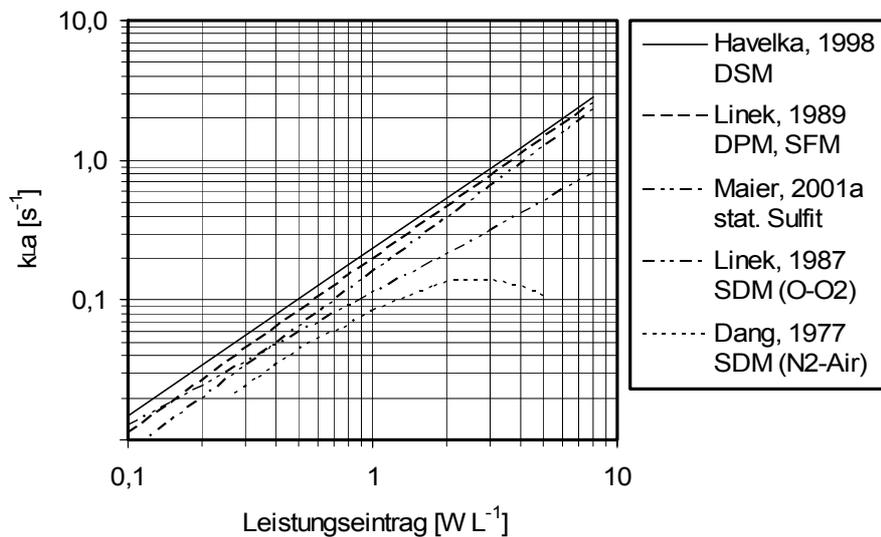


Abbildung 5: $k_L a$ im Rührkesselreaktor als Funktion des Leistungseintrags aus der Literatur. DSM = dynamische Sulfitmethode mit Sauerstoffbegasung, DPM = dynamische Druckmethode, SFM = stationäre Sulfit-Zudosier-Methode, stat. Sulfit = stationäre Sulfitmethode, SDM (O-O₂) = Variante der dynamische Stickstoffdesorptionsmethode mit Vakuumdesorption und Sauerstoffbegasung. SDM (N₂-AIR) = Stickstoffdesorptionsmethode.

Mit der dynamischen Methode Technik ‚B‘ wird nach Vakuumdesorption des physikalisch gelösten Sauerstoffs, Berücksichtigung der Kinetik des Aufbaus des Gasgehalts und Begasung mit Sauerstoff ein $k_L a$ erhalten, welcher mit Gleichung (44) zum Leistungseintrag korreliert werden können. Diese scheinbar korrekten $k_L a$ -Werte liegen jedoch trotzdem um bis zu 50 % unter den Werten, welche mit der dynamischen Druckmethode und Sulfit-Zudosier-Methode erzielt werden. Wird vor Durchführung der dynamischen Druckmethode ebenfalls desorbiert und die Begasung gestartet, werden die Werte der Stickstoffdesorptionsmethode exakt reproduziert. Ursache für die gemessenen Unterschiede im $k_L a$ ist demnach der während der Aufsättigung des Mediums stetig ansteigende Gasgehalt. Bei hohem $k_L a$ ist nach Abschluss der Aufsättigung der maximale Gasgehalt und damit das Gleichgewicht der Blasengrößenverteilung noch nicht erreicht, wodurch trotz der Berücksichtigung des Aufbaus des Gasgehalts eine zu geringe Stoffaustauschfläche zur Bestimmung von zu geringem $k_L a$ führt (Linek *et al.*, 1989).

Die dynamische Sulfitmethode reproduziert bei Sauerstoffbegasung und Sicherstellung des stöchiometrischen Sulfitverbrauchs zu Beginn der Aufsättigung den

k_La welcher mit der dynamischen Druckmethode erzielt wurde (Havelka *et al.*, 1998). Somit ist die dynamische Sulfitmethode die einzige dynamische Methode, welche unter Annahme des ideal durchmischten Reaktors der dynamischen Druckmethode äquivalenten k_La liefert.

3.6. Parallele Bioreaktorsysteme

3.6.1. Parallele Rührkesselreaktoren

Um mehr als einen Rührkesselreaktor gleichzeitig betreiben zu können, wurden parallele Rührkesselinheiten mit vollständiger individueller Mess- und Regeltechnik entwickelt. Kommerziell erhältlich sind Parallelreaktorsysteme mit vier oder sechs Rührkesselreaktoren mit einem Volumen von über 0,2 L (*Sixfors*, *Infors AG*; *Biostat Q*, *Sartorius BBI*). Über diese Systeme sind keine Angaben zu bioverfahrenstechnisch wichtigen Prozessgrößen wie beispielsweise Sauerstoff- und Leistungseintrag verfügbar. Die in diesen Reaktionssystemen gewonnenen Prozessdaten sollten gut auf größere Rührkesselreaktoren übertragbar sein. Der Kapital-, Personal- und Zeitaufwand ist jedoch außerordentlich hoch, wenn mehrere dieser Parallelreaktoreinheiten zur Bioprozessentwicklung eingesetzt werden müssen.

Ein weiteres kommerziell erhältliches Reaktionssystem im Maßstab von bis zu 300 mL bedient sich gerührter, volumenbegaster Glasgefäße, welche bis zu 16-fach parallel in temperierbaren Wasserbädern betrieben werden können. Der k_La des Reaktionssystems wurde mit der Stickstoffdesorptionsmethode bestimmt. Bei Begasung durch ein Hohlrohr bzw. eine Sinterglasfritte wurden für eine Drehzahl von 1000 min^{-1} und einer Belüftungsrate von $2,67 \text{ min}^{-1}$ ein maximaler k_La von $0,06 \text{ s}^{-1}$ und $0,11 \text{ s}^{-1}$ erhalten (*Stirrer-pro*, *DASGIP*).

3.6.2. Schüttelkolben

Der Schüttelkolben ist der klassische Parallelreaktor der Bioprozessentwicklung zur manuellen Durchführung von Satzversuchen im Labormaßstab. Er wurde 1933 erstmals zu parallelen Stoffwechseluntersuchungen eingesetzt und ist noch heute der wohl am häufigsten eingesetzte Satzreaktor für mikrobielle Kultivierungen (Büchs, 2001a). Schüttelkolben werden auf Schüttelablaren montiert und in Inkubatoren bei vorgegebener Temperatur mit einer bestimmten Schüttelfrequenz in eine Rotationsbewegung gegebener Exzentrizität versetzt. Durch die Bewegung des Reaktionsgefäßes erfolgt eine Durchmischung des Reaktionsmediums. Die Handhabung des Schüttelkolbens ist sehr einfach und zu seinem Betrieb ist nur sehr geringer apparativer Aufwand notwendig.

Von Nachteil sind die gravierenden reaktionstechnischen Unterschiede des Schüttelkolbens im Vergleich zum Rührkesselreaktor. Der für viele biochemische Reaktionen notwendige Sauerstoff wird aus der Gasphase in das Reaktionsmedium über Oberflächenbegasung eingetragen. Die von Flüssigkeit benetzte Oberfläche des Schüttelkolbens trägt mehr zur Gesamtstoffaustauschfläche bei als die Oberfläche der Flüssigkeit selbst. Hoher Sauerstoffeintrag in einen Schüttelkolben ist dann möglich, wenn ein sehr großes Oberfläche / Volumenverhältnis eingestellt wird. Das bedeutet, Schüttelkolben müssen mit sehr wenig Reaktionsmedium bei möglichst großer Exzentrizität und Schüttelfrequenz betrieben werden. Schüttelkolben mit Strömungsbrechern erreichen prinzipiell höhere Stoffübergangsraten. Da die Strömungsbrecher meist manuell angebracht werden, resultieren unterschiedliche hydrodynamische Bedingungen, so dass der $k_L a$ verschiedener Kolben bei gleicher Schüttelrate und Exzentrizität nur wenig reproduzierbar ist. Im Extremfall befindet sich die Flüssigphase außer-Phase, d.h. kann der Rotationsbewegung des Kolbens nicht mehr folgen. Die vorliegenden chaotischen Strömungszustände sind kaum modellierbar, so dass andere Einflüsse auf die Hydrodynamik davon überdeckt werden (Büchs *et al.*, 2001b).

Tabelle 4: Korrelationen zur Abschätzung des Leistungseintrags und des Sauerstoffübergangskoeffizienten im Schüttelkolben.

Bedingungen	Näherung	Referenz
$V_{nom} = 250 \text{ mL}$ $V_L = 4 - 20 \% V_{flask}$ $n = 50 - 275 \text{ min}^{-1}$ $e = 2,5 - 5 \text{ cm}$	$OTR \sim n^{0,84} \cdot V_L^{-0,84} \cdot d_{flask}^{-1,25} \cdot e^{0,27}$	Maier und Büchs, 2001b
$V_{nom} = 50 - 1000 \text{ mL}$ $V_L = 4 - 20 \% V_{flask}$ $n = 50 - 475 \text{ min}^{-1}$ $e = 2,5 - 5 \text{ cm}$	$k_L a = C \cdot n^{1,16} \cdot V_L^{-0,83} \cdot d_{flask}^{1,92} \cdot e^{0,38}$ $C = 6,67 \cdot 10^{-6}$	Maier, 2002
$V_{nom} = 10 - 2000 \text{ mL}$ $V_L = 4 - 20 \% V_{flask}$ $n = 80 - 380 \text{ min}^{-1}$ $e = 2,5 - 5 \text{ cm}$	$\frac{P}{V_L} = C \cdot \rho \cdot \frac{n^3 \cdot d^4}{V_L^{2/3}} \cdot Re'^{-0,2}$ $C = 1,94$ $Re' = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta}$	Büchs <i>et al.</i> , 2000

Zur *online* Bestimmung der Sauerstoffeintragsrate in Schüttelkolben wurde eine spezielle Messapparatur entwickelt (Anderlei und Büchs, 2001; Anderlei *et al.*, 2004). Während einer Kultivierung wird intermittierend der Schüttelkolben gasdicht verschlossen und aus der Abnahme des Sauerstoffgehalts im Kopfgasraum die Sauerstoffeintragsrate berechnet. In einem 250 mL Schüttelkolben wurden Sauerstoffeintragsraten von bis zu $40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei einer Schüttelfrequenz von

275 min^{-1} erreicht. Dies entspricht einem $k_L a$ von bis zu $0,06 \text{ s}^{-1}$ (Maier und Büchs, 2001b). Die experimentellen Daten wurden durch eine Modellgleichung mit einer Prädiktionsgenauigkeit von $\pm 20 \%$ abgebildet (Tabelle 4). Die Proportionalität der Sauerstoffeintragsrate zum Kolbendurchmesser mit dem Exponenten $-1,25$ ist nur erfüllt, wenn das relative Füllvolumen konstant bleibt.

Die bisher umfassendste Charakterisierung des Sauerstoffeintrags in Schüttelkolben wurde mit der stationären Sulfitmethode durchgeführt (Tabelle 4). Dabei wurden verschiedene Kolbengrößen von 50 - 1000 mL Nominalvolumen V_{nom} , relative Füllvolumina V_L von 4 - 20 %, Exzentrizitäten e von 1,25 - 10 cm und Schüttelfrequenzen n bis 500 min^{-1} untersucht. Der höchste $k_L a$ wurde in einem 50 mL Schüttelkolben mit 2 mL Füllvolumen bei 450 min^{-1} und einer Exzentrizität von 7 cm zu $0,157 \text{ s}^{-1}$ bestimmt (Maier, 2002). Die Näherungsgleichung für alle Kolbengrößen bildet die real gemessenen $k_L a$ -Werte mit einer Prädiktionsgenauigkeit von $\pm 30 \%$ ab. Die Näherungsgleichungen der einzelnen Kolbengrößen sind für eine Exzentrizität von 5 cm und ein relatives Füllvolumen von 4 % in Abbildung 6 dargestellt.

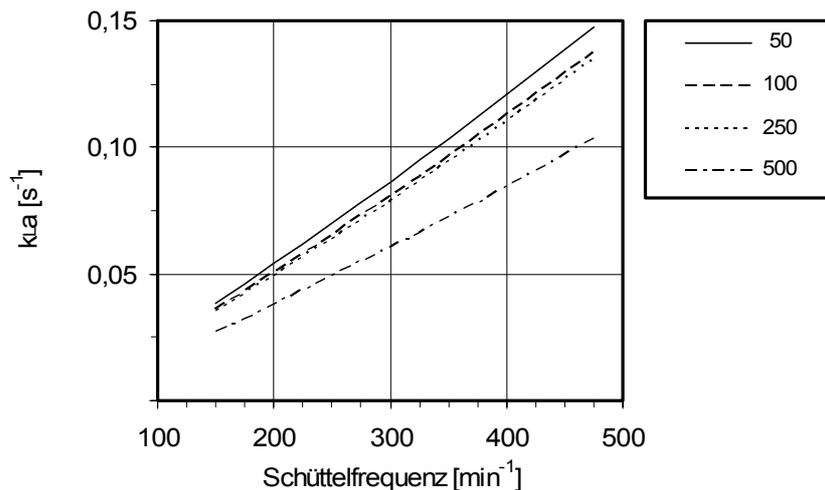


Abbildung 6: Näherung der Sauerstoffübergangskoeffizienten $k_L a$ über der Schüttelfrequenz von Schüttelkolben mit 50, 100, 250 und 500 mL Nominalvolumen bei einem relativen Füllvolumen von 4 % des Nominalvolumens und einer Exzentrizität der Schüttelbewegung von 5 cm (Maier, 2002).

Eine optische Messung des pO_2 wird durch Einkleben eines Sensors in den Schüttelkolben möglich, welcher *ex-situ* durch eine Glasfaser ausgelesen wird. Unter Berücksichtigung der Ansprechzeit des Sensors von $t_{E,63\%} = 30$ Sekunden wurden mit der Stickstoffdesorptionsmethode für 250 mL Schüttelkolben mit und ohne Strömungsbrecher ein $k_L a$ von $0,008$ bzw. $0,016 \text{ s}^{-1}$ bestimmt (Gupta und Rao, 2003).

Der Leistungseintrag in einen Schüttelkolben erfolgt durch die Reibung der Flüssigkeit an der Innenwand des rotierenden Reaktionsgefäßes. Daraus ergibt

sich im Vergleich zum Rührkesselreaktor ein weitaus geringeres Verhältnis der maximalen Energiedissipation zum mittleren Leistungseintrag. Ein mit einem Drehmomentsensor ausgestatteter Schüttelinkubator wird zum einen mit Kolben mit Flüssigkeit betrieben. Zum anderen wird den Kolben Agar zugesetzt um die Rotation des Kolbeninhalts zu verhindern. Die Differenz des Drehmoments der beiden Ansätze erlaubt die Berechnung des Leistungseintrags in die Flüssigkeit (Büchs *et al.*, 2000). Die experimentellen Daten wurden durch eine Modellgleichung mit einer Abweichung von +/- 30 % abgebildet (Tabelle 4).

Die Prozessführung ist im klassischen Schüttelkolben auf Satzverfahren begrenzt, da keine automatisierte Zudosierung möglich ist. Aufgrund der notwendigen, kontinuierlichen Bewegung der Schüttelkolben zur Aufrechterhaltung des Sauerstofftransports ist eine automatisierte Probenahme apparativ bisher nicht realisiert worden. Dies führt zu einer in der Regel geringen Datendichte in Bezug auf wichtige Prozessgrößen wie beispielsweise Substrat- oder Produktkonzentration. Während einer Schüttelkolbenkultur besteht keine Möglichkeit der Kontrolle wichtiger bioverfahrenstechnischer Prozessgrößen wie beispielsweise pH oder pO_2 .

Die beschriebenen reaktionstechnischen Unterschiede zwischen Schüttelkolben und Rührkesselreaktor führen dazu, dass Reaktionsverläufe in den meisten Fällen nicht direkt vom Reaktionssystem Schüttelkolben in das Reaktionssystem Rührkesselreaktor übertragen werden können und damit in der Bioprozessentwicklung zusätzliche personal- und zeitintensive sequentielle Experimente in Laborbioreaktoren erforderlich sind.

Der parallele Betrieb von bis zu 16 Schüttelkolben in einem Inkubator mit intermittierender Substratdosierung, paralleler pH -Kontrolle und pO_2 -Messung überwindet einige der Nachteile des klassischen Schüttelkolbens. Die Messung des pH und des pO_2 in der Flüssigphase erfolgen mit herkömmlichen, sterilisierbaren pH - und pO_2 -Elektroden. Die zur Regelung des pH notwendige Zudosierung von Titrationmitteln wird über ein 16-fach Ventilsystem und eine Spritzenpumpe realisiert. Die Zudosierung erfolgt intermittierend mit einer Spritzenpumpe in bis zu 16 Reaktionsgefäße oder kontinuierlich mit Hilfe von 16 Schlauchpumpen. Dieses Dosiersystem kann ebenfalls zur Realisierung von Zulaufverfahren eingesetzt werden. In einem intermittierenden Zulaufverfahren mit *E. coli* in einem Komplexmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle wurde mit pH -Regelung in 12 h Prozesszeit in 9 parallelen Schüttelkolben eine mittlere Biotrockenmassekonzentration von $5,1 \pm 0,64 \text{ g L}^{-1}$ erreicht (Weuster-Botz *et al.*, 2001a). Eine weitere Parallelisierung auf Basis dieser Technologie scheint nur mit erheblichem apparativem Aufwand realisierbar.

3.6.3. Blasensäulen

Zur Verbesserung des Sauerstoffeintrags bei höheren Reaktionsvolumina wurden dem Schüttelkolben in der Handhabung äquivalente Miniatur-Blasensäulen mit einem Arbeitsvolumen von 100 - 200 mL entwickelt (Altenbach-Rehm und Weuster-Botz, 1995; Altenbach-Rehm *et al.*, 1997; Altenbach-Rehm *et al.*, 1999). Die Gaszufuhr erfolgt über eine Sinterglasfritte am Boden des Gefäßes. Die somit etablierte Volumenbegasung wurde mit der Stickstoffdesorptionsmethode durch Sauerstoffübergangskoeffizienten von bis zu $0,16 \text{ s}^{-1}$ charakterisiert (Weuster-Botz *et al.*, 2001b). Der Leistungseintrag in eine Blasensäule entspricht der Summe aus der Energie zur Blasenbildung und der notwendigen Arbeit zur Expansion der Blasen beim Aufsteigen in der Flüssigkeit. Mit einem theoretischen Modell wurde der Leistungseintrag in die Miniatur-Blasensäule zu unter $0,1 \text{ W L}^{-1}$ abgeschätzt. Dieser Wert liegt weit unter den Leistungseintragswerten welche in Schüttelkolben realisiert werden können. In einem Satzverfahren mit *pH*-Regelung wurde in einem Medium mit 50 g L^{-1} Glycerin und 15 g L^{-1} Hefeextrakt eine Biotrockenmasse von $12,5 \text{ g L}^{-1}$ *Staphylococcus carnosus* erreicht (Dilsen *et al.*, 2001).

Die normalerweise geringe Datendichte wichtiger Prozessgrößen wie beispielsweise Substrat- oder Produktkonzentration wurde durch Etablierung eines parallelen Probenahme- und Analysensystems erhöht (Wolfram *et al.*, 2000a; Wolfram *et al.*, 2000b). Hierzu wird mit Hilfe von Hohlfaserdialysemembranen in der Flüssigphase des Reaktors im *Stop-Flow* Prinzip diffusiv eine Reaktorprobe in einen Akzeptormedienstrom entnommen. Die Integration von Enzym-Biosensoren in den Akzeptormedienstrom erlaubt die Messung gewünschter Medienkomponenten, wie beispielsweise Glukose oder Laktat, für welche Enzymsensoren erhältlich sind. Sowohl mit Hilfe eines Proportional-Integral-Differential-(PID)-Reglers als auch eines parameteradaptiven Reglers konnte die Substratkonzentration von *E. coli* Kultivierungen auf 1 bzw. 5 g L^{-1} Glukose geregelt werden (Wolfram, 2002).

Durch Einbau eines Rührwerks in die Miniatur-Blasensäulen wurde der Leistungseintrag auf bis zu $0,77 \text{ W L}^{-1}$ bei einer Drehzahl von 900 min^{-1} gesteigert. Die Leistungsaufnahme wurde experimentell durch die elektrische Leistungsaufnahme des Motors bestimmt. Mit einer 1-fach Rushton-Turbine bzw. einem 1-fach Schrägblattrührer wurde ein $k_L a$ von $0,28$ bzw. $0,34 \text{ s}^{-1}$ erzielt (Weuster-Botz *et al.*, 2002). Die $k_L a$ -Bestimmungen wurden erneut mit der Stickstoffdesorptionsmethode durchgeführt.

3.6.4. Mikrotiterplatten

Die Mikrotiterplatte bietet durch die hohe Anzahl an Kavitäten einen hohen Parallelisierungsgrad. Mikrotiterplatten mit 24, 48, 96 oder mehr Vertiefungen werden zur Kultivierung von Zellen verwendet, weisen jedoch in noch stärkerem Maße dieselben reaktionstechnischen Restriktionen wie Schüttelkolben auf (Duetz *et al.*, 2000). Das Erreichen von hohen Sauerstoffeintragsraten ist nur möglich,

wenn ein hohes Oberfläche / Volumenverhältnis eingestellt wird. Dazu muss ein geringes Volumen pro Kavität der Mikrotiterplatte vorgelegt werden. Durch die Rotationsbewegung der Mikrotiterplatte im Inkubationsschüttler bildet sich ab der Überwindung der Oberflächenspannung der Flüssigkeit eine Trombe aus. Dies ist bei üblichen Schüttelraten von 300 min^{-1} bei einer Exzentrizität von 25 mm und $200 \mu\text{L}$ Füllvolumen in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten nicht der Fall. Deshalb kann keine Erhöhung der Sauerstoffeintragsrate festgestellt werden. Die Messungen der Sauerstoffeintragsrate wurden mit der stationären Sulfitmethode bei einer Katalysatorkonzentration von 10^{-7} M CoSO_4 durchgeführt. Die Reaktionsordnung der Sulfitoxidation bezüglich Sauerstoffs wurde zu 1 bestimmt (Hermann *et al.*, 2003). Schüttelraten über 300 min^{-1} und die Erhöhung der Exzentrizität der Schüttelbewegung ermöglichen die Steigerung der Sauerstoffeintragsrate. Für eine herkömmliche Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten runden Querschnitts mit $200 \mu\text{L}$ Füllvolumen ergibt sich unabhängig von der Exzentrizität der Schüttelbewegung für eine bestimmte maximale Schüttelfrequenz eine maximale Sauerstoffeintragsrate von $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, was einem k_La von etwa $0,045 \text{ s}^{-1}$ entspricht. Die maximale Schüttelfrequenz ist nach oben begrenzt, da eine weitere Erhöhung der Schüttelrate zum Flüssigkeitsaustritt über den Rand der Kavitäten führen würde. *Deepwell*-Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten und rundem Querschnitt erlauben höhere Schüttelfrequenz bis zu 800 min^{-1} bei $200 \mu\text{L}$ Füllvolumen, ohne dass Flüssigkeit über den Rand der Kavitäten austritt. Dabei wird eine Sauerstoffeintragsrate von $100 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($k_La \sim 0,15 \text{ s}^{-1}$) erreicht (Abbildung 7). Ab einer Schüttelrate von 700 min^{-1} rotiert die gesamte Flüssigkeit

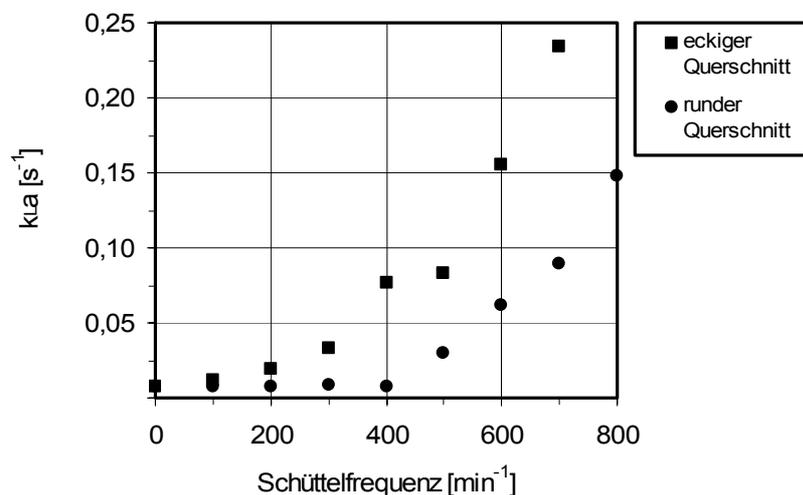


Abbildung 7: Sauerstoffübergangskoeffizienten k_La für verschiedene Schüttelfrequenzen von *Deepwell*-Mikrotiterplatten mit eckigem und rundem Querschnitt bei einem Füllvolumen von $200 \mu\text{L}$ und einer Exzentrizität der Schüttelbewegung von 2,5 cm (Hermann *et al.*, 2003).

an der Wand der Kavität, so dass der Boden unbenetzt bleibt. Eine *Deepwell*-Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten und eckigem Querschnitt erlaubt bei 25 mm

Exzentrizität und 200 μL Füllvolumen eine maximale Schüttelrate von 700 min^{-1} wobei ein maximale Sauerstoffeintragsrate von $150 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($k_L a \sim 0,23 \text{ s}^{-1}$) erreicht wird. Bereits ab 400 min^{-1} ist der Boden der Kavität nicht mehr mit Flüssigkeit benetzt. Der Sauerstoffeintrag in hydrophilisierte Kavitäten ist bei gleichen Bedingungen größer als in hydrophobe Kavitäten von beispielsweise Mikrotiterplatten aus Polypropylen. Letztere können jedoch bis zu einer höheren Schüttelfrequenz betrieben werden bevor Flüssigkeit austritt, so dass letztendlich ebenso hohe Sauerstoffeintragsraten erreicht werden.

Werden Biotransformationen unter Sauerstoffverbrauch in Mikrotiterplatten durchgeführt, wie beispielsweise die Ganzzellbiotransformation von Bicyclo[3.2.0]hept-2en-6-one zu den entsprechenden regioisomeren Laktonen durch das Enzym Cyclohexanon Monooxygenase, kann aus dem Sauerstofflimitierten Bereich der Umsatzkinetik die maximale Sauerstoffeintragsrate abgeschätzt werden (Doig *et al.*, 2002). Da der eingetragene Sauerstoff ebenfalls zur Oxidation von Glycerol verwendet werden kann, ist die maximale Sauerstoffeintragsrate möglicherweise bis zu 6,91-fach höher als er auf Basis der Laktonbildung ermittelt wird. Wird kein Glycerin oxidiert, ergibt sich ein minimaler OTR. Eine *Deepwell*-Mikrotiterplatte mit rundem Querschnitt bei 200 μL Füllvolumen und 1000 min^{-1} , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 3 mm Exzentrizität erreicht nach dieser Abschätzung eine Sauerstoffeintragsrate von 21 - $145 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Bei gleichen Bedingungen erreicht eine *Deepwell*-Mikrotiterplatte mit eckigem Querschnitt eine Sauerstoffeintragsrate von 56 - $390 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Für 300 min^{-1} und einer Exzentrizität von 3 mm ergeben die Schätzungen Werte von $12,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Die Inkubation von *Pichia pastoris* für 3 Tage bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ in 2 mL definiertem Salzmedium und 20 g L^{-1} Glukose als Kohlenstoffquelle führte zur Bildung von über 50 OD_{600} -Einheiten Biomasse. Als Reaktionssystem diente eine *Deepwell*-Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten mit rundem Querschnitt, welche bei 500 min^{-1} geschüttelt wurde (Boettner *et al.*, 2002).

Der Sauerstoffeintrag in ein geschütteltes Reaktionssystem bestehend aus sechs zylindrischen Kavitäten mit 7 mL Reaktionsinhalt wurde für 600 min^{-1} und 3 mm Exzentrizität ohne Angabe der Messmethode zu $0,005 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. *Saccharopolyspora erythraea* erreichte in einem komplexen Medium mit 30 g L^{-1} Glukose eine Biomassekonzentration von 7 g L^{-1} nach 40 h Inkubation bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ (Elmahdi *et al.*, 2003).

Als Problem der Verwendung von Mikrotiterplatten als geschüttelte Bioreaktoren erweist sich die Verdunstung, da der relative Verdunstungsvolumenstrom durch das sehr große Oberflächen / Volumenverhältnis und dem geringen Reaktionsvolumen von unter 1,5 mL sehr viel größer ist als beispielsweise im Schüttelkolben oder Rührkesselreaktor. Wird eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten rundem Querschnitts mit 200 μL Füllvolumen bei 170 min^{-1} und 3 mm Exzentrizität bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt, verdunsten $2,9 \mu\text{L h}^{-1}$, bei 1020 min^{-1} und 1 mm Exzentrizität

4,6 $\mu\text{L h}^{-1}$. Daraus berechnet sich eine Gesamtverdunstung einer Kultivierung über 24 h von 35 % bzw. 55 % des Ausgangsvolumens (John *et al.*, 2003).

Dieser Nachteil wurde durch die Entwicklung eines gasdurchlässigen *Sandwich-Cover* überwunden, der auf eine Standard *Deepwell*-Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten aufgesetzt werden kann (*System Duetz, Kühner AG*). Die Sterilabdeckung besteht aus einer 8 mm dicken Silikonschicht welche über jeder Kavität mit einer 1,5 mm durchmessenden Öffnung versehen ist um Gasaustausch zu ermöglichen. Zur Vermeidung von Kontaminationen ist eine zweite Schicht aus Watte mit einer Höhe von 2 mm eingebracht. Die Verdunstung liegt bei 300 min^{-1} und 750 μL Reaktionsvolumen bei einer Luftfeuchtigkeit von 40 - 60 % unter 10 μL pro Tag (Duetz und Witholt, 2001). Die Verdunstungsrate wird folglich um mindestens den Faktor 5 reduziert. Die maximale Sauerstoffeintragsrate wurde aus der Sauerstofflimitierten Wachstumsphase von *Pseudomonas putida* bei 300 min^{-1} , einer Exzentrizität von 50 mm und 500 μL Reaktionsvolumen zu $38 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ abgeschätzt und durch Messungen mit der stationären Sulfitmethode bei einer Katalysatorkonzentration von 10^{-7} M CoSO_4 verifiziert. Dabei wurde die Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Kopfgasraum einer gasdicht verschlossenen Kavität mit einer Miniatursauerstoffsonde gemessen. Nach 23 h Kultivierung wurden in einem Glukose Minimalmedium 9 g L^{-1} Biomasse erzeugt (Duetz *et al.*, 2000). Der filamentöse Pilz *Streptomyces lividans* erreichte in diesem Reaktionssystem nach 15 Tagen eine Biomasse von $9,5 \text{ g L}^{-1}$ in einem Maltose-Mineralmedium. *Streptomyces coelicolor* A3(2) erreichte im gleichen Medium $8,1 \text{ g L}^{-1}$ (Minas *et al.*, 2000).

Die Messung von pH (John, 2001) und pO_2 (John *et al.*, 2003) in Mikrotiterplatten ist durch Fluoreszenzintensitäts-Sensoren möglich (*Hydroplate, Oxoplate, Pre-sens*). Dazu werden Fluorophore in einer organischen Matrix am Boden der Kavitäten immobilisiert und mit Hilfe eines handelsüblichen Fluorometers ausgelesen. Der Betrieb im Fluorometer bringt zwei Probleme mit sich. Einerseits muss zur Messung der Sauerstoffkonzentration die Schüttelbewegung unterbrochen werden, wodurch der Sauerstoffeintrag gestoppt wird. Andererseits erlauben handelsübliche Fluorometer lediglich geringe Schüttelraten und Exzentrizitäten. Der $k_L a$ einer orbital geschüttelten Mikrotiterplatte mit rundem Querschnitt wurde bei 170 min^{-1} , einer Exzentrizität von 3 mm und einem Füllvolumen von 100 μL zu $0,0028 - 0,011 \text{ s}^{-1}$ bestimmt (John *et al.*, 2003). Gemessen wurde mit der dynamischen Sulfitmethode ohne Katalysator und Disulfit als Sauerstoffverbraucher. In einem umgebauten Fluorometer (*Fluoroskan, Ascent*) konnten Schüttelraten von bis zu 1020 min^{-1} bei 1 mm Exzentrizität eingestellt werden. Für diese Betriebsbedingungen ist die Bestimmung des $k_L a$ nicht mehr möglich, da die Aufsättigung der Flüssigphase schneller erfolgt als die Datenerfassung des Photometers. Ausgehend von Biomassekonzentration und Daten der Sauerstoffaufnahme, welche in einem Bioreaktor ermittelt wurden, wurde der $k_L a$ der Mikrotiterplatte bei 1020 min^{-1} auf $0,036 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt. Um höhere Sauerstoffeintragsraten zu erhalten müssten höhere Schüttelraten und Mikrotiterplatten mit 2 mL Füllvolumen

und eckigem Querschnitt verwendet werden, welche bisher nicht in handelsüblichen Photometern vermessen werden können. Eine technische Lösung zur Etablierung einer Zudosiertechnik für Mikrotiterplatten wurde bisher nicht erarbeitet. In Anbetracht der Notwendigkeit des Verschlusses der Mikrotiterplatte zur Erhaltung monoseptischer Bedingungen und zur Reduzierung der Verdunstung scheint dies problematisch.

3.6.5. Andere Systeme

Ein miniaturisierter Bioreaktor wurde für Zellkultivierungen im Weltall entwickelt (Walther *et al.*, 1994). Der Reaktor mit 3 mL Arbeitsvolumen wird über Begasungsmembranen diffusiv mit Sauerstoff versorgt. Aus der angegebenen Sauerstoffeintragsrate von $0,24 \text{ mmol h}^{-1}$ Sauerstoff lässt sich ein $k_L a$ von $0,02 \text{ s}^{-1}$ abschätzen. Die Durchmischung mit einem Magnetrührer bei 400 min^{-1} erzielte Mischzeiten von unter einer Sekunde. Ein Zulaufverfahren wurde durch eine piezo-elektrische Mikropumpe ermöglicht. Die pH -Messung erfolgte mittels eines Ionen-selektiven Feldeffekttransistors (ISFET-Sensor), die pH Kontrolle durch elektro-chemische Spaltung von Wasser. Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erreichte nach 24 h eine Zelldichte von 6 OD_{600} -Einheiten.

Kostov *et al.* (2001) verwendeten eine gerührte Polystyrol-Küvette mit 2 mL Reaktionsvolumen als Bioreaktor um die Anwendbarkeit von photometrischen und fluorometrischen Messtechniken zur Analytik in Kultivierungen zu demonstrieren. Der pH wurde durch Anregung von in der Flüssigphase gelöstem 1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfon-säure tri-Natrium Salz (HPTS) gemessen. Der pO_2 wurde durch Messung der Phasenverschiebung eines auf Ruthenium basierenden Sensors bestimmt, welcher an der Innenwand der Küvette befestigt ist. Die optische Dichte wird durch Streuung eines Lichtsignals einer Photodiode *in-situ* bestimmt. Eine Kultivierung von *E. coli* mit Luftbegasung bei einer Belüftungsrate von 2 min^{-1} bei 300 min^{-1} , $25 \text{ }^\circ\text{C}$ erzielte eine Biomassekonzentration von 6 OD_{600} -Einheiten. Der $k_L a$ wurde mit $0,0058 \text{ s}^{-1}$ ohne Angabe der Messmethode genannt.

Um höhere Sauerstoffübergangskoeffizienten in gerührten Miniaturbioreaktoren zu erreichen, wurde ein Bioreaktor mit 16 mm Durchmesser und drei Rushton-Turbinen mit 7 mm Durchmesser entwickelt (Lamping *et al.*, 2003; Shamlou *et al.*, 2003). Der Antrieb erfolgt über einen Elektromotor, welcher Drehzahlen von bis zu 15000 min^{-1} ermöglicht. Der Reaktor ist ebenfalls mit faseroptischen Sonden zur Bestimmung des pH mittels im Reaktionsmedium gelöstem HPTS, des pO_2 mittels eines auf einer optischen Faser immobilisierten Ruthenium-Komplexes und der optischen Dichte mittels Trübungsmessung ausgestattet. Der Leistungseintrag, die spezifische Stoffaustauschfläche a und der $k_L a$ wurden mittels *computational fluid dynamic* (CFD) Simulation abgeschätzt. Bei reiner Oberflächenbegasung wurde ein $k_L a$ von unter $0,01 \text{ s}^{-1}$ mit der dynamischen Stickstoffdesorptionsmethode gemessen. Mit aktivierter Volumenbegasung bei 1 min^{-1} ergab sich bei einem

Leistungseintrag von $1,19 \text{ W L}^{-1}$ ein $k_L a$ von $0,036 \text{ s}^{-1}$. Dieser $k_L a$ wurde für Vergleichskultivierungen ebenfalls durch Begasung mit 1 min^{-1} und einer Drehzahl von 530 min^{-1} in einem 20 L Bioreaktor eingestellt. Bestimmungen des $k_L a$ mit der Stickstoffdesorptionsmethode im mL-Bioreaktor ergaben einen maximalen $k_L a$ von $0,11 \text{ s}^{-1}$ bei einem Leistungseintrag von 4 W L^{-1} . Ein Vergleich der $k_L a$ -Abhängigkeit vom Leistungseintrag mit dem 20 L Rührkesselreaktor zeigt einen gleichen Trend jedoch Abweichungen von bis zu 40% . Für einen eingestellten $k_L a$ von $0,036 \text{ s}^{-1}$ wurde bei einer Kultivierung von *E. coli* im mL-Bioreaktor und im Reaktor des Litermaßstabs in einem definierten Medium mit 10 g L^{-1} Glukosekonzentration innerhalb 4 h bei 37 °C ohne *pH*-Kontrolle eine Biomassekonzentration von $1,6 \text{ g L}^{-1}$ bei vergleichbarem Verlauf erzielt. Die konstruktive Ausführung des Bioreaktors mit Elektromotor und Probenahmerohr dürfte erhebliche Schwierigkeiten bei der Parallelisierung dieses Reaktionssystems mit sich bringen.

Eine alternative Begasungsstrategie entwickelten Maharbiz *et al.* (2004). Sauerstoff wird durch Elektrolyse erzeugt und über eine Silikonmembran in das Reaktionsmedium eingetragen, wobei maximale Sauerstoffeintragsraten von $40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erreicht werden ($k_L a \sim 0,06 \text{ s}^{-1}$). Als Reaktorsystem wurden einzelne Reihen mit acht Kavitäten von konventionellen Mikrotiterplatten mit $300 \mu\text{L}$ Nominalvolumen verwendet. Diese werden bei 175 min^{-1} geschüttelt. Jede Kavität enthielt eine Stahlkugel mit $1,5 \text{ mm}$ Durchmesser um die Aggregation von Gasblasen an der Silikonmembran zu verhindern. Durch Einbindung von Thermistoren kann jedes einzelne Gefäß mit einer Genauigkeit von $\pm 2 \text{ °C}$ temperiert werden. Die Messung des *pH* wird über ISFET-Sensoren realisiert. Die optische Dichte wird durch Licht-emittierende Dioden (LED) und Photodioden *in-situ* gemessen. Ein linearer Zusammenhang zwischen Sensorantwort und Konzentration der Kalibrierlösung war bis zu einer OD_{600} von 4 gegeben. Die *pH* Kontrolle erfolgt ebenfalls elektrolytisch. Bisher ist ein Ansäuern des Mediums durch Erzeugung von Kohlendioxid realisiert. Erste Kultivierungen mit *E. coli* erzielten optische Dichten OD_{600} von $2,4$. Die Realisierung einer Zudosierstrategie für die Durchführung von Zulaufverfahren ist bisher nicht erfolgt.

4. Ergebnisse

4.1. Gesamtkonzept des miniaturisierten Parallelreaktorsystems

Um Entwicklungszeiten von technisch realisierbaren und wirtschaftlichen biotechnologischen Prozessen zu verkürzen, müssen effizientere Paralleltechniken für die Primär- und Sekundärauswahl sowie die Maßstabsvergrößerung zur Verfügung gestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ein neues Konzept für ein automatisiertes, miniaturisiertes Parallelreaktorsystem entwickelt werden, welches eine drastische Verringerung des Zeit- und Personalaufwands pro durchgeführten Versuch ermöglicht, um in Zukunft die Bioprozessentwicklung im Hochdurchsatz durchführen zu können.

4.1.1. Bioreaktoren im mL-Maßstab (Miniaturisierung)

Die Abschätzung eines sinnvollen Reaktionsvolumens für miniaturisierte Bioreaktoren im Bereich weniger Milliliter erfolgte unter Berücksichtigung der Verdunstung, des Volumenverlusts durch Probenahme und einem minimal vorhandenen Endvolumens nach einer vorgegebenen Kultivierungsdauer im Satzbetrieb. Soll eine Kultivierung mit einer Prozessdauer von 24 h bei einer Belüftungsrate von 1 min^{-1} trockener Zuluft, einer Probenahme von $20 \mu\text{L h}^{-1}$ noch ein Endvolumen von mehr als 80 % des Ausgangsvolumens besitzen, muss das Ausgangsvolumen mindestens 3,5 mL betragen. Der für diese Abschätzung notwendige Verdunstungsvolumenstrom wurde mit Gleichung 47 (Anhang A) berechnet. Längere Prozesszeiten, wie sie bei langsam wachsenden Organismen auftreten, bedingen folglich höhere Ausgangsvolumina. Aufgrund des starken Einflusses der Verdunstung, bei angenommener vollständiger Aufsättigung der trockenen Zuluft mit Wasserdampf, muss unter Umständen der Ausgleich des Verdunstungsverlusts bzw. die vorherige Aufsättigung des Prozessgases mit Wasserdampf in Betracht gezogen werden.

In Zulaufverfahren, welche in der Regel durch höhere Kultivierungszeiten charakterisiert sind, wird der Volumenverlust durch Verdunstung sukzessive durch Zudosierung von Zudosierlösung ausgeglichen. Die variable Einstellung der Konzentration der Zudosierlösung ermöglicht die Zugabe einer gewünschten Menge des Lösungsmittels Wasser zum Verdunstungsausgleich. Die Auswahl einer Zudosierstrategie muss unter Berücksichtigung der minimal notwendigen Zudosiermenge zu Beginn eines Zulaufverfahrens erfolgen. Die minimal mögliche

Dosiermenge kann somit wiederum Auswirkungen auf das minimale Reaktionsvolumen haben.

Eine Abschätzung bezüglich des Wärmeübergangs aus einem Flüssigvolumen von 5 mL durch eine Gefäßwand mit einer Wärmeaustauschfläche von 10 cm² unter Berücksichtigung des Leistungseintrags durch ein Rührsystem und der Wärmeproduktion der Biomasse ergeben notwendige Temperaturgefälle von unter 1 °C um den Reaktorinhalt auf 37 °C zu temperieren (Gleichungen 48 - 50, Anhang A). Der Wärmeübergang sollte aufgrund der großen Oberfläche / Volumenverhältnis kein Problem darstellen.

Mit einem Ausgangsvolumen von 5 mL wurden Abschätzungen bezüglich der Auswahl des Reaktortyps, der Durchmischungsstrategie und der Begasungsart angestellt. Im mL-Maßstab kann das Prinzip Rührkesselreaktor angestrebt werden, da dieser sich im Labor- und Produktionsmaßstabs als Standardreaktor durchgesetzt hat. Soll auf bewegte Teile verzichtet werden, kann im Hinblick auf hohen Sauerstoffeintrag die Blasensäule eine interessante Alternative darstellen. Möglicherweise kann aufgrund des hohen Oberfläche / Volumenverhältnisses im mL-Maßstab die Begasung per Diffusionsmembran erfolgen.

Um per Begasung über eine Diffusionsmembran einen k_La im Bereich des Labormaßstabs erreichen zu können, muss das Verhältnis aus Oberfläche der Begasungsmembran und Reaktionsvolumen sehr groß sein. Abschätzungen unter Berücksichtigung der Permeabilität einer typischen Begasungsmembran aus Silikon und einem typischen Gesamtstoffübergangskoeffizienten ergeben eine notwendige Membranfläche von 126,6 cm² um in einem Reaktionsvolumen von 5 mL einen k_La von 0,1 s⁻¹ zu erzielen (Gleichungen 52 - 56, Anhang A). Dies ist apparativ nicht zu bewerkstelligen. Des Weiteren müsste zusätzlich ein Rührorgan integriert werden um einen Leistungseintrag im Bereich von über 1 W L⁻¹ erzielen zu können. Die Begasung per Diffusion kommt somit nicht in Betracht.

Die Ausführung des mL-Bioreaktors als Blasensäule erfordert die dichte Einpassung eines statischen Begasers im Reaktor. Um hohen k_La zu erzielen, sollte dieses möglichst geringe Porendurchmesser aufweisen. Des Weiteren müsste in allen Parallelreaktoren exakt die gleiche Begasungsrate in einem Volumenbereich von wenigen Volumen pro Volumen pro Minute eingestellt werden können. Im angestrebten Reaktionsvolumenbereich von 5 mL entspricht eine Belüftungsrate von 0,5 - 5 min⁻¹ Volumenströmen von 0,15 - 1,5 L h⁻¹. Die parallele Einstellung von Volumenströmen dieser Größenordnung ist nur durch sehr kostspielige Mess- und Regeltechnik zu realisieren. Gegen das Blasensäulenprinzip spricht weiterhin der relativ geringe realisierbare Leistungseintrag welcher proportional zur Belüftungsrate ist. Abschätzungen mit Gleichung 57 - 63 (Anhang A) ergeben, dass ein Leistungseintrag von 1 W L⁻¹ in einem Reaktionsvolumen von 5 mL in einem Gefäß mit 15,5 mm Durchmesser eine Belüftungsrate von 52,1 min⁻¹ erfordert. Auch das Blasensäulenprinzip wird aufgrund der genannten Nachteile verworfen.

Die Übertragung des Begasungsprinzips technischer Rührkesselreaktoren in den mL-Bioreaktor erscheint ebenfalls ungünstig, da hohe Kosten für eine Regelung des Zugasstroms entstünden und ein enormer apparativer Aufwand zur Integration eines Begasungsorgans in die Miniaturbioreaktoren notwendig wäre, um exakt dieselbe Gasleerohrgeschwindigkeit in allen parallelen Reaktoren zu erzeugen.

Aufgrund des im angestrebten Größenmaßstab hohen Oberfläche / Volumenverhältnis der Reaktionsgefäße besteht allerdings prinzipiell die Möglichkeit, auf die Primärdispersierung der Gasphase zu verzichten und einen Gaseintrag über die Oberfläche durch ein Gas-induzierendes Rührorgan zu realisieren. Dadurch kann außerdem das Begasungsorgan als zusätzliches Bauteil eingespart werden. Ein geeignetes Rührorgan müsste eine starke axiale Strömung von der Flüssigkeitsoberfläche zum Boden des Reaktionsgefäßes erzeugen, um das Einsaugen der umgebenden Gasphase zu ermöglichen. Die effektive Dispersierung eingesaugter Gasblasen in der Flüssigphase sowie die Freisetzung der mit Sauerstoff abgereicherten Gasblasen an der Flüssigkeitsoberfläche müssen bewerkstelligt werden.

Aufgrund dieser Betrachtungen soll der mL-Bioreaktor als Rührkesselreaktor mit einem Gas-induzierenden Rührorgan entwickelt werden. Der Antrieb der Rührorgane durch individuelle Motoren ist sehr aufwändig und apparativ nur schwer zu realisieren. Eleganter sind magnetische Parallelantriebe, wie sie in Reaktionsblöcken für chemische Synthesen eingesetzt werden (*Carousel, Radleys; RS5000, Stemcorp; Variomag, H+P Labortechnik*). Kommerziell verfügbare Parallelantriebe erreichen maximale Drehzahlen von 2000 min^{-1} .

Das Einsaugen von Gasblasen von der Flüssigkeitsoberfläche beginnt in Rührkesselreaktoren des Labor- und Technikumsmaßstab je nach Rührorgan bei einer kritischen Rührerumfangsgeschwindigkeit $u_{Tip} = 0,6 - 2,2 \text{ m s}^{-1}$. Um die Obergrenze dieses Bereichs mit einem Rührorgan für den mL-Maßstab zu erreichen, sind Drehzahl und Durchmesser des Rührorgans gewissen Randbedingungen unterworfen (Abbildung 8A). Unter der Voraussetzung, dass das Einsaugen von Gasblasen im angestrebten Maßstab ab denen im Labormaßstab festgestellten Grenzwerten erfolgt, muss bei einer Drehzahl von 2000 min^{-1} ein Mindestdurchmesser von 10,5 mm eingehalten werden, um Blaseneintrag zu ermöglichen.

Führt die jeweilige Drehzahl bei einem gegebenen Rührerdurchmesser nicht zur vollständig turbulenten Strömung, sind noch höhere Rührerumfangsgeschwindigkeiten notwendig, um Gaseintrag zu realisieren. In Rührkesselreaktoren wird eine vollständig turbulente Strömung ab einer kritischen *Re*-Zahl von etwa 10^4 erreicht. Um diese mit einem Rührorgan im mL-Maßstab zu erhalten, muss in einem Newton'schen Medium mit wasserähnlicher Viskosität der Durchmesser bei einer Drehzahl von 2000 min^{-1} mindestens 14,5 mm betragen (Abbildung 8B). Um ausreichend hohen Leistungseintrag erzielen zu können, muss das Rührsystem im mL-Maßstab durch eine ausreichende *Ne*-Zahl gekennzeichnet sein. Ein Rührsystem mit 14,5 mm Durchmesser muss bei 2000 min^{-1} in einem vollständig bewehrten Behälter durch eine *Ne*-Zahl größer 2 charakterisiert sein, um einen

Leistungseintrag von 10 W L^{-1} zu ermöglichen (Abbildung 8C). Für eine maximale Drehzahl von 2000 min^{-1} ist somit ein Rührorgan mit einem möglichst großen Durchmesser vorteilhaft, um eine hohe Rührerumfangsgeschwindigkeit, Re -Zahl und hohen Leistungseintrag erzielen zu können.

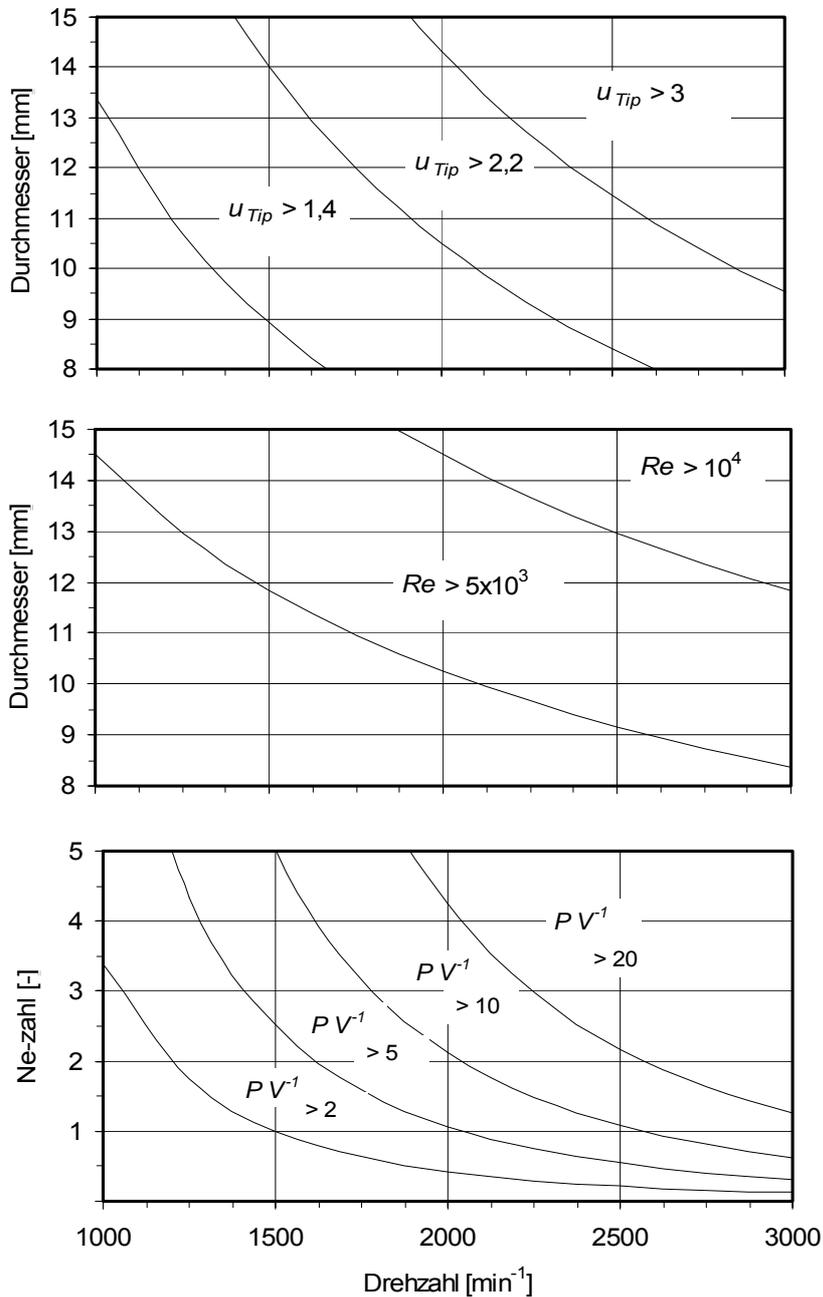


Abbildung 8: Parameterstudie zur Dimensionierung eines Rührorgans im mL-Maßstab. (A) Einfluss der Drehzahl und des Durchmessers des Rührorgans auf die Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{Tip} [m s^{-1}]. (B) Einfluss der Drehzahl und des Durchmessers des Rührorgans auf die Re -Zahl. (C) Einfluss der Drehzahl und der Ne -Zahl des Rührorgans auf den Leistungseintrag $P V^{-1}$ [W L^{-1}].

Der Betrieb eines Rührorgans mit Kontakt zum Boden eines mL-Bioreaktors, wie es in den Reaktionsblöcken für chemische Synthesen der Fall ist, könnte sich

aufgrund der Scherkräfte im Flüssigkeitsfilm zwischen Rührorgan und Boden des Gefäßes negativ auf die Viabilität der Zellen auswirken. Vorteilhafter ist der schwebende Betrieb des Rührorgans in der Flüssigphase. Um dies zu bewerkstelligen, sollen magnetisch-induktive Antriebe eingesetzt werden. Indem die Elektromagnetpole nicht unterhalb, sondern um das Reaktionsgefäß herum positioniert werden, kann ein Rührorgan in beliebiger Höhe im Reaktionsmedium schweben.

Der mL-Bioreaktor soll so gestaltet werden, dass eine Ausstattung mit fluorometrischen Sensoren für pH und pO_2 am Boden des Gefäßes möglich ist, welche faseroptisch, nicht-invasiv ausgelesen werden können.

4.1.2. Reaktionsblock für mL-Bioreaktoren (Parallelisierung)

Um die Handhabung der parallelen mL-Bioreaktoren erleichtern zu können, werden mehrere Bioreaktoren durch Integration der Reaktionsgefäße in einen Reaktionsblock als Einheit zur Verfügung gestellt. Dabei wird der Reaktionsblock so gestaltet, dass eine parallele, opto-elektronische Ausleseeinheit (Sensorblock) unter die mL-Bioreaktoren platziert werden kann, um die fluorometrischen Sensoren auslesen zu können. Die Integration der Bioreaktoren in einen Reaktionsblock erfordert die Entwicklung einer Sterilbarriere in Form eines Deckels zur Gewährleistung des monoseptischen Betriebs des Reaktionsblocks. Ein in diesen Deckel eingebrachtes Sterilfilter müsste neben der mechanischen Barriere für Kontaminanten jedoch gute Stofftransporteigenschaften besitzen, um eine Sauerstofflimitierung in den Bioreaktoren zu vermeiden. Darüber hinaus müsste solch ein Sterilfilter als Septum ausgeführt sein, da sonst keine automatisierte Probenahme realisiert werden kann. Die Gasdurchlässigkeit von Septen, welche meist auf Silikonbasis hergestellt werden, ist jedoch unzureichend. Um dennoch das Eindringen von Kontaminanten ausschließen zu können, soll eine Sterilabdeckung mit zentraler Gaseinspeisung über ein Sterilfilter entwickelt werden, welche das sterile Gas individuell in den Kopfraum der einzelnen Reaktoren leitet. Von dort aus kann es vom Rührsystem in die Flüssigphase eingesaugt werden oder über einen Gasauslass im Deckel in die Umgebung entweichen. Der konvektive Luftstrom durch den Gasauslass mit ausreichender Länge soll im Betrieb, bei ausreichender Gasleerrohrgeschwindigkeit, den Eintrag von Fremdkeimen aus der Umgebungsluft verhindern. Der Gasauslass kann somit gleichzeitig als Zugang zu den einzelnen mL-Bioreaktoren dienen.

4.1.3. Hardware zur Prozesskontrolle (Automatisierung)

Ein bisheriges Hindernis der Parallelisierung von Miniatur-Bioreaktoren war die Verwendung von individuellen Messsonden und Dosierleitungen für jedes Substrat oder Korrekturmittel in jedem Reaktionsgefäß. Dieses „1 Reaktor – 1 Sensor – 1 Aktor“ Prinzip führt zu beachtlichem apparativen und finanziellen Aufwand und

wurde bisher nur für Parallelsysteme mit vier (*Biostat Q*, *Braun Biotech*) oder sechs Reaktionsgefäßen etabliert (*Sixfors*, *Infors*). Das Einsparen von Aktoren durch das „n Reaktoren – n Sensoren – 1 Aktor“ Prinzip reduziert den apparativen Aufwand und ist in Reaktionssystemen mit bis zu 16 Reaktoren verwirklicht worden (*Profors*, *Infors*; *Fed-batch Pro*, *DASGIP*).

Ein geeignetes Werkzeug zur Parallelisierung von mehr als 16 Bioreaktoren mit dem Prinzip „n Reaktoren – n Sensoren – 1 Aktor“ oder weitere apparative Vereinfachung durch das Prinzip „n Reaktoren – 1 Sensor – 1 Aktor“ wäre ein Pipettierroboter bzw. könnte mit dessen Hilfe erzielt werden. Diese haben sich aufgrund ihrer Vielseitigkeit in der Entwicklung von Substanzbibliotheken, beim Hoch-Durchsatz-Screening nach pharmakologisch aktiven Substanzen, zur Genomanalyse, zur Proteomanalyse und für Toxizitätstests bewährt. Außerdem wird mit Pipettierrobotern die chemische und biochemische Routineanalytik inklusive Probenvor- und -aufarbeitung automatisiert (Abbildung 9).

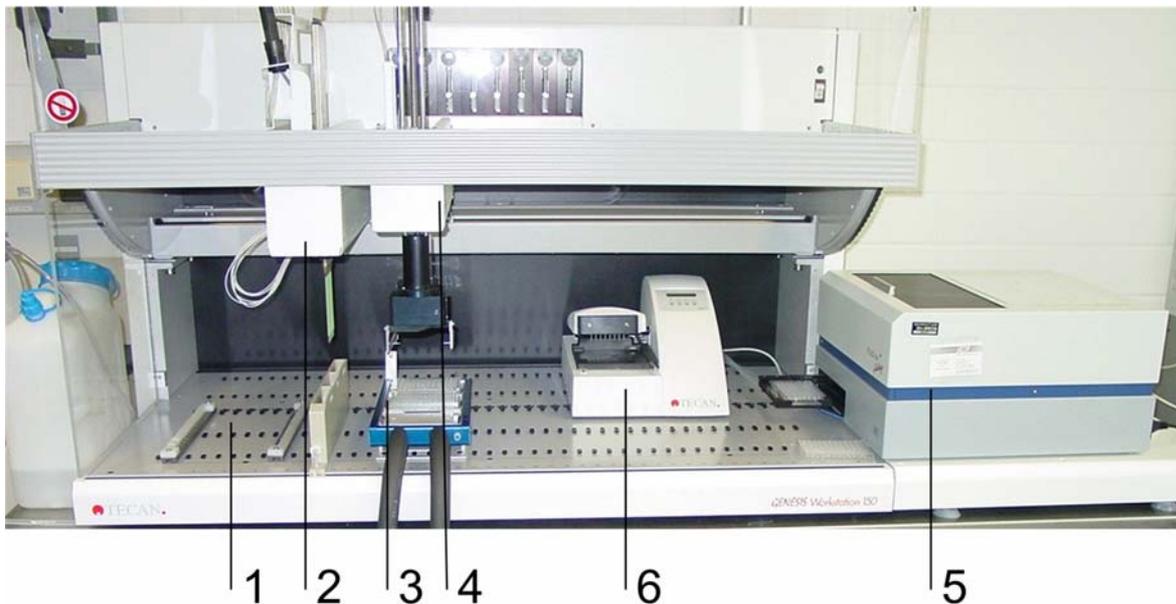


Abbildung 9: Aufbau der Anlage zur Prozesskontrolle und *atline* Analytik von Kultivierungen im mL-Bioreaktor. (1) Platz für Reaktionsblock mit mL-Bioreaktoren auf dem Arbeitstisch des Pipettierroboters. (2) Pipettierarm des Laborroboters. (3) Mikrotiterplatten-Kühlstation. (4) Greifarm des Pipettierroboters für Mikrotiterplatten. (5) Mikrotiterplatten-Photometer außerhalb des Arbeitstisch Arbeitstisch des Pipettierroboters. (6) Mikrotiterplatten-Waschgerät auf dem des Pipettierroboters.

Hauptaufgaben eines Pipettierroboters zur Kontrolle der parallelen Kultivierung von Mikroorganismen sind die Entnahme von Reaktorproben zur weitergehenden *atline* Analytik sowie die intermittierende Dosierung von Titrationsmitteln, Medien, Induktionsmitteln und Eduktlösungen in einzelne Bioreaktoren.

Ein Pipettierroboter mit acht parallelen, individuell steuerbaren Dosierstrecken kann jeweils acht Bioreaktoren parallel versorgen, so dass Parallelreaktorsysteme

mit einem Vielfachen von acht Bioreaktoren zeiteffektiv intermittierend bedient werden können. Die Geschwindigkeit der Armbewegungen und der Dosierschritte eines Pipettierroboters limitieren dabei maßgeblich die maximale Anzahl paralleler Bioreaktoren in Abhängigkeit der notwendigen maximalen Zeitspanne zwischen zwei Dosiervorgängen in denselben mL-Bioreaktor. Das minimale Dosiervolumen und die erzielbare Dosiergenauigkeit beeinflussen das Reaktionsvolumen des mL-Bioreaktors. Soll beispielsweise eine Kultivierung von *E. coli* mit einer Biotrockenmasse von 5 g L^{-1} in 5 mL Reaktionsvolumen mit einem exponentiellen Zudosierprofil und festgelegter Wachstumsrate von $0,17 \text{ h}^{-1}$ betrieben werden, wäre zu Beginn ein Zudosierstrom von $9,1 \text{ mg h}^{-1}$ Glukose notwendig (Korz, 1995; Abbildung 10). Bei einer Ausgangskonzentration der Zudosierlösung von 500 g L^{-1} und einer intermittierenden Zudosierung mit einer Frequenz von 30 h^{-1} müssten während 3 Stunden weniger als $1 \text{ }\mu\text{L}$ pro Dosierschritt zugegeben werden. Dieses Volumen könnte durch eine geringere Dosierfrequenz oder niedrigere Ausgangskonzentration der Zudosierlösung erhöht werden.

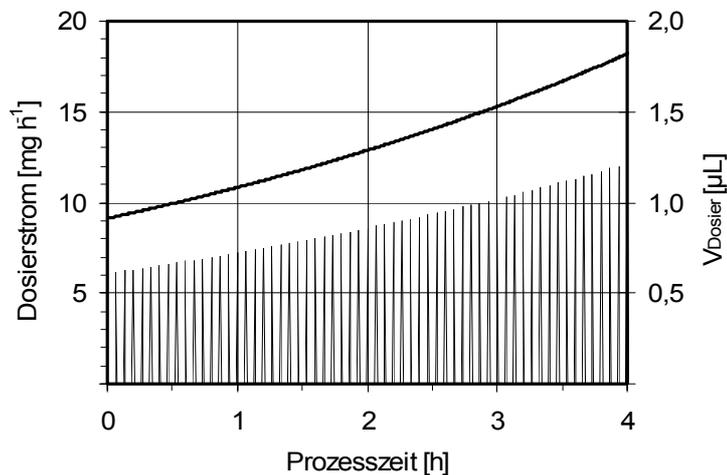


Abbildung 10: Berechneter Dosierstrom (durchgezogene Linie) in einen mL-Bioreaktor bei einer Dosierfrequenz von 30 h^{-1} mit einer Zudosierlösung mit 500 g L^{-1} um einer *E. coli* Kultivierung mit einer Biomassekonzentration von 5 g L^{-1} exponentielles Wachstum mit $\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$ zu ermöglichen. Gestrichelte Linie = V_{Dosier} .

Die Parallelisierung von mL-Bioreaktoren stellt weiterhin hohe Anforderungen an die Analytik, welche dem gewünschten Miniaturisierungsgrad angepasst sein muss. Die Bestimmung des *pH* zur Etablierung einer *pH*-Regelung ist absolut notwendig, um hohe Zelldichten zu erreichen. Um auf unterschiedliches Wachstum in den einzelnen mL-Bioreaktoren reagieren zu können, muss die *pH*-Messung in jedem mL-Bioreaktor individuell erfolgen. Die Verwendung von einzelnen *pH*-Sensoren, wie beispielsweise sterilisierbaren *pH*-Einstabmessketten ist aufgrund der geringen Standzeiten dieser Elektroden nicht ökonomisch. Auch die Verwendung von kostengünstigen *pH*-ISFET-Sensoren ist aufgrund der

zusätzlich erforderlichen Referenzelektroden und der fehlenden Sterilisierbarkeit praktisch nicht möglich.

Optimal ist eine nicht-invasive optische Messtechnik, wie sie bereits in Schüttelkolben (*Fluorometrix*) und Mikrotiterplatten (*Hydroplate* und *Sensordish, Presens*) eingesetzt wird. Die Systeme für Schüttelkolben können prinzipiell auch in anderen Reaktionsgefäßen eingesetzt werden. Sie benötigen jedoch pro Messstrecke ein individuelles Detektionssystem. Kommerziell erhältliche, parallele Detektionssysteme existieren bisher nicht. Die Mikrotiterplatten stellen einen hohen Parallelitätsgrad zur Verfügung, müssen jedoch in Mikrotiterplatten-Photometern ausgelesen werden. Der *pH* muss folglich in entnommenen Reaktorproben bestimmt werden (*Hydroplate, Presens*). Am Boden der Kavitäten dieser Mikrotiterplatten befindet sich ein *pH* Sensor, der in einem entsprechend ausgestatteten Fluorometer ausgelesen werden kann. Problem bei der Etablierung einer *pH*-Regelung ist hierbei die weitaus geringere Datendichte im Vergleich zu einer *online* Messung. Da ein Probenahmevolumen von mindestens 20 µL zur *pH*-Messung vom Hersteller empfohlen wird, stehen unter Berücksichtigung des Gesamtreaktionsvolumens voraussichtlich nur wenige Messwerte pro Stunde zur Verfügung.

Die Bestimmung der Biotrockenmasse in den einzelnen mL-Bioreaktoren kann durch eine Abschätzung über Trübungsmessung erfolgen. Die Integration einer definierten Lichtdurchgangsstrecke in jedem einzelnen Reaktor und Anbringung von photometrischer Messtechnik schränkt den Messbereich durch die fehlende Probenvorverdünnung stark ein. Geeigneter scheint die *ex-situ* Bestimmung der optischen Dichte der Reaktorproben in einem externen Mikrotiterplatten-Photometer. Um eine zufrieden stellende Biomasseabschätzung durchführen zu können, ist dafür unter Umständen eine Vorverdünnung der Reaktorprobe durch den Pipettierroboter notwendig. Dazu müsste die Proben-Mikrotiterplatte jedoch dem Photometer entnommen und nach Zudosierung des Verdünnungsmittels wieder zugeführt werden. Um den Pipettierroboter zu entlasten, soll ein Photometer mit integrierten Dosierpumpen verwendet werden, welches eine automatische Injektion von Flüssigkeiten in die Mikrotiterplatte im Messschacht des Photometers ermöglicht. Dieses Analytikkonzept erfordert die Messung von Absorption und Fluoreszenz, so dass ein kombiniertes Mikrotiterplatten-Photometer für beide Messprinzipien eingesetzt werden muss.

Um Zellwachstum in bereits entnommenen Reaktorproben weitestgehend zu unterbinden, soll der Pipettierroboter mit einer Kühlvorrichtung für Mikrotiterplatten ausgestattet werden. Um die Menge an notwendigen Mikrotiterplatten zur Probenahme während des Prozessablaufs zu minimieren, soll die Wiederverwendung der Proben-Mikrotiterplatten ermöglicht werden. Dazu könnte eine bereits befüllte Mikrotiterplatte nach den Messungen im Mikrotiterplatten-Photometer zu einem Mikrotiterplatten-Waschgerät transportiert, dort gereinigt und zur erneuten Nutzung wieder auf der Kühlvorrichtung für Mikrotiterplatten bereitgestellt werden.

Durch Verwendung von mehreren Proben-Mikrotiterplatten könnte der Analytikzyklus parallel zu notwendigen Zudosierschritten ablaufen. Während die erste Mikrotiterplatte im Photometer vermessen und anschließend im Mikrotiterplatten-Waschgerät gereinigt wird, befüllt der Pipettierroboter eine weitere Mikrotiterplatte. Sobald diese mit allen Proben gefüllt ist, wird sie zum Photometer

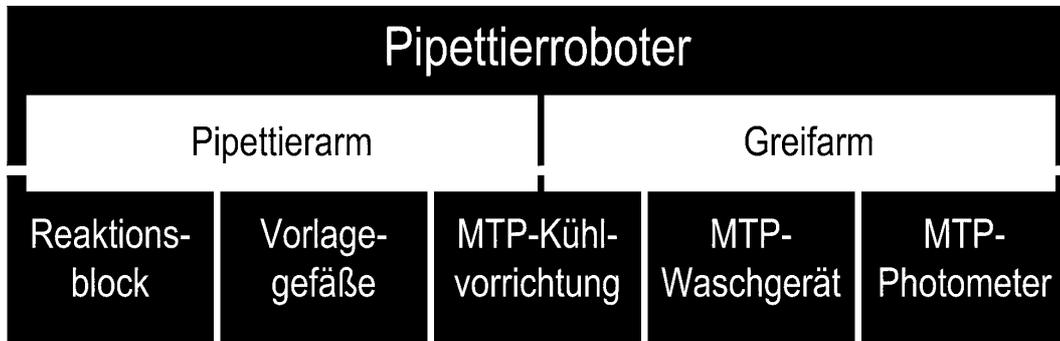


Abbildung 11: Hardware zur Prozesskontrolle und *atline* Analytik. Ein Pipettierroboter mit integriertem Greifarm für Mikrotiterplatten kann zur Zudosierung aus Vorlagegefäßen in die Bioreaktoren im Reaktionsblock sowie zur Probenahme aus den Bioreaktoren im Reaktionsblock in eine Mikrotiterplatte auf der Kühlvorrichtung eingesetzt werden. Der Greifarm kann den Transport der Mikrotiterplatten zur *atline* Analytik in ein Mikrotiterplatten-Photometer und zur Säuberung in ein Mikrotiterplatten-Waschgerät durchführen.

transportiert und danach durch eine gesäuberte Mikrotiterplatte ersetzt. Um Mikrotiterplatten vom Pipettierroboter zum Mikrotiterplatten-Photometer und Mikrotiterplatten-Waschgerät transportieren zu können, kann entweder ein unabhängiger Transportroboter oder ein im Pipettierroboter integrierter Greifarm eingesetzt werden (Abbildung 11).

4.1.4. Software zur Prozesskontrolle (Automatisierung)

Die Verwendung einer geringeren Anzahl Aktoren als Reaktoren führt dazu, dass eine intermittierende Arbeitsweise angewendet werden muss. Die vom Pipettierarm des Roboters durchzuführenden Arbeitsschritte können in einen

	A	B	C	D	E	F
1	1	9	17	25	33	41
2	2	10	18	26	34	42
3	3	11	19	27	35	43
4	4	12	20	28	36	44
5	5	13	21	29	37	45
6	6	14	22	30	38	46
7	7	15	23	31	39	47
8	8	16	24	32	40	48

Abbildung 12: Nummerierung der Bioreaktorplätze im Reaktionsblock bestehend aus 6 Spalten und 8 Zeilen.

Zudosierschritt und einen Probenahmeschritt unterteilt werden. Der Zudosierschritt umfasst die Dosierung von Medium und Korrekturmitteln durch die parallel verfügbaren Dosierstrecken. Der Probenahmeschritt umfasst die Probenahme aus einem Bioreaktor pro Dosierstrecke. Zur Planung des Ablaufs der verschiedenen Schritte werden die Bioreaktoren innerhalb eines Arrays aus sechs Spalten und acht Zeilen nummeriert (Abbildung 12).

Eine sequentielle Vorgehensweise bei der Kontrolle der Bioreaktoren bedeutet, dass ein Zudosier- und Probenahmeschritt nacheinander für je einen Reaktor pro Dosierstrecke (1 - 8, 9 - 16, usw.) durchgeführt wird, bevor die nächste Spalte Reaktoren bearbeitet wird (Abbildung 13). Dies führt zwar zu einem relativ großen Zeittakt zwischen zwei Zudosier- oder Probenahmeschritten für denselben Reaktor von im Bereich von 10 Minuten, jedoch kann die Verschleppung von Keimen zwischen einzelnen mL-Bioreaktoren durch eine effiziente Desinfektion der Pipettieradeln zwischen den einzelnen Dosierschritten garantiert werden. Diese Dosierschritte umfassen lediglich eine Flüssigkeitsaufnahme in den Vorlagegefäßen und eine Flüssigkeitsabgabe in einer Spalte mL-Bioreaktoren (*Singlepipetting*).

Arbeitsschritte		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	...	
Zudosieren	A	■														
	B															
	C															
	D															
	E															
	F															
Probenahme	A															
	B															
	C															
	D															
	E															
	F															
Analytik																

Abbildung 13: Planung des zeitlichen Ablaufs der Arbeitsschritte bei sequentieller Vorgehensweise. Durchgehende Balken entsprechen einem Sterilisiervorgang. Die Abfolge der Arbeitsschritte verläuft von links nach rechts. Die Buchstaben in Spalte 2 geben die Reaktorspalten an. Die Analytik umfasst Bewegungen von Mikrotiterplatten, das Waschen der Mikrotiterplatten und die Messung im Mikrotiterplatten-Photometer.

Zu kürzerem Zeittakt zwischen zwei äquivalenten Dosierschritten pro mL-Bioreaktor führt eine interkalierte Vorgehensweise (Abbildung 14). Dazu werden die Zudosierschritte je Flüssigkeit für alle Reaktoren durch Multipipettieren (*Multipipetting*) durchgeführt, d.h. nach einer Flüssigkeitsaufnahme erfolgen mehrere Flüssigkeitsabgaben in verschiedenen Spalten mL-Bioreaktoren. Die Dosiernadeln müssen nicht in das Reaktionsmedium eintauchen, sondern geben die Flüssigkeitsmenge aus der Luft ab, wodurch Sterilisiervorgänge der Pipettieradeln eingespart werden können. Nach dem Abarbeiten aller Zudosierschritte für

alle Reaktoren wird ein Probenahmeschritt für eine Gruppe von Reaktoren (1 - 8) durchgeführt. Daraufhin folgt ein Zudosierschritt aller Flüssigkeiten für alle Reaktoren, bevor aus der nächsten Gruppe Reaktoren (9 - 16) eine Probe gezogen wird. Diese Vorgehensweise verkürzt das Zeitintervall zwischen zwei Zudosierschritten auf etwa 3 Minuten auf Kosten des Zeitintervalls zwischen zwei Probenahmeschritten einer Gruppe von Reaktoren.

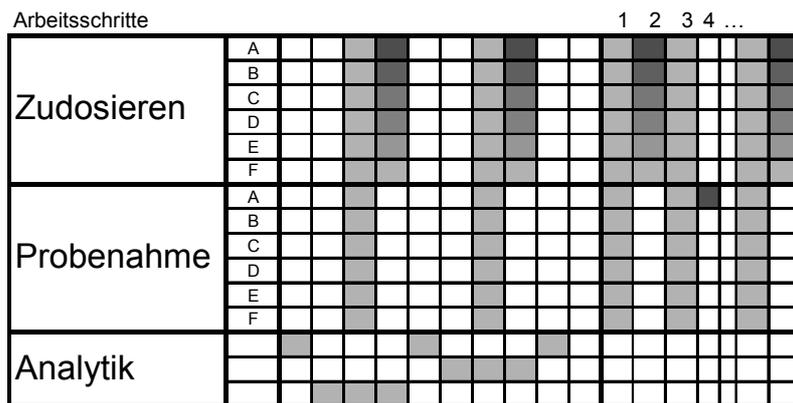
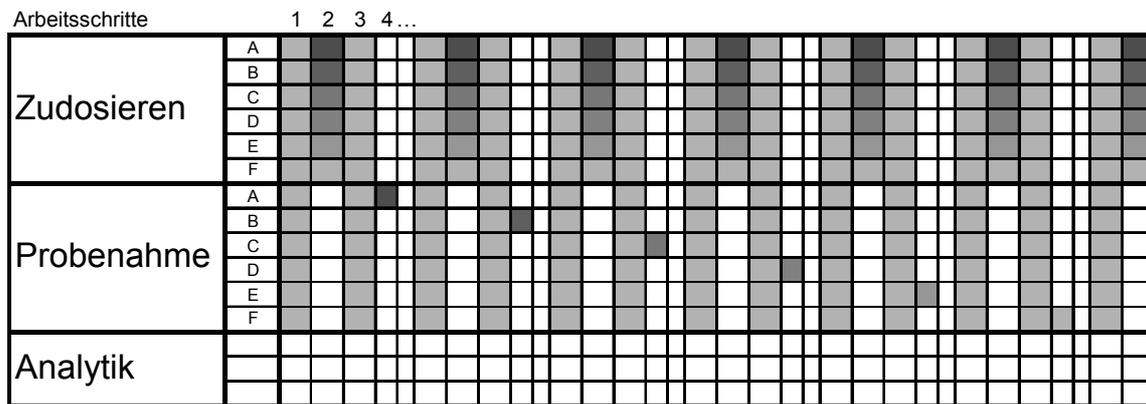


Abbildung 14: Planung des zeitlichen Ablaufs der Arbeitsschritte bei interkalierter Vorgehensweise. Die Abfolge der Arbeitsschritte verläuft von links nach rechts. Die Buchstaben in Spalte 2 geben die Reaktorspalten an. Die Analytik umfasst Bewegungen von Mikrotiterplatten, das Waschen der Mikrotiterplatten und die Messung im Mikrotiterplatten-Photometer.

Jeweils nach der Probenahme wird während eines Pipettierschritts Titrationsmittel zur *pH*-Kontrolle zugegeben. Da die Software von Pipettierrobotern lediglich Steuerung des Geräts nach vorgegebenen Programmen ermöglicht, kann a priori keine Regelung des *pH* erfolgen. Die dafür notwendige Datenübergabe der Messungen des Mikrotiterplatten-Photometers wird mit *LabView*-Programmen realisiert, welche aus der Steuersoftware des Pipettierroboters aufgerufen werden.

4.2. Grundlegende Untersuchungen zur Charakterisierung der Sorptionsleistung von Rührkesselbioreaktoren

4.2.1. Referenzsystem Laborrührkesselreaktor

Ein Laborrührkesselreaktor mit 3 L Reaktionsvolumen wurde als Referenzsystem bezüglich seiner Sauerstoffsorptionsleistung vermessen, um eine auf experimentellen Daten basierende Zielvorgabe für die Entwicklung des Gas-induzierenden Rührsystems im mL-Maßstab zu erhalten. Durch Vermessung des Laborrührkesselreaktors mit verschiedenen k_La -Bestimmungsmethoden sollen Literaturangaben bezüglich der Korrektheit der Methoden verifiziert werden.

Für die Drehzahlen 500, 750, 1000, 1250 und 1500 min^{-1} wurde mit der dynamischen Sulfitmethode mit Sauerstoff- und Luftbegasung und der Stickstoffdesorptionsmethode mit Luftbegasung bei einer Belüftungsrate von 1 min^{-1} der k_La in 0,5 M Na_2SO_4 bestimmt. Die $p\text{O}_2$ Messung erfolgte mit einer Optode deren Ansprechzeit vorab zu 2,25 s bestimmt wurde. Zum Vergleich ist der aus Abgasanalytikdaten abgeschätzte k_La einer durchgeführten Satzkultivierung mit *E. coli* im Mineralmedium mit Luftbegasung abgebildet (Abbildung 15).

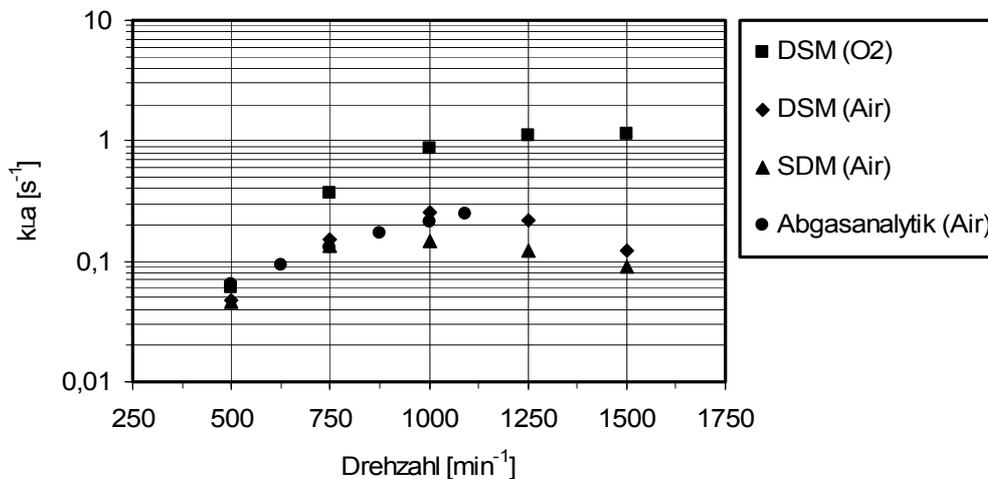


Abbildung 15: k_La bei steigender Drehzahl im Laborrührkesselreaktor. Gemessen wurde mit der dynamischen Sulfitmethode (DSM) mit Sauerstoff- und Luftbegasung (Air) und der Stickstoffdesorptionsmethode (SDM). Zusätzlich aufgetragen ist der k_La aus Daten der Abgasanalytik einer Satzkultivierung (Abgasanalytik). Die Belüftungsrate betrug 1 min^{-1} .

Die dynamische Sulfitmethode mit Sauerstoffbegasung liefert bis zu 1000 min^{-1} stetig ansteigende Werte. Weitere Steigerung der Drehzahl führt zu stagnierendem k_La im Bereich von 1 s^{-1} . Die Standardabweichung liegt bei Drehzahlen bis 750 min^{-1} unter 20 %, bei höheren Drehzahlen bei bis zu 50 %. Die beiden Messmethoden mit Luftbegasung sind durchwegs durch Standardabweichungen

unter 8 % gekennzeichnet und zeigen bis zu 1000 min^{-1} deutlich niedrigere Werte als die dynamische Sulfitmethode mit Sauerstoffbegasung. Ab 1000 min^{-1} wird ein sinkender k_La ermittelt. Der maximal ermittelte k_La für 1000 min^{-1} der dynamischen Sulfitmethode liegt bei $0,259 \text{ s}^{-1}$, der Stickstoffdesorptionsmethode bei $0,149 \text{ s}^{-1}$. Die Differenz zu den Werten der dynamischen Sulfitmethode mit Sauerstoffbegasung steigt mit zunehmender Drehzahl. Der k_La der Stickstoffdesorptionsmethode liegt unter dem der dynamischen Sulfitmethode. Der abgeschätzte k_La aus den Abgasdaten einer Satzkultivierung von *E. coli* im Mineralmedium mit Luftbegasung liegt zwischen dem der dynamischen Sulfitmethode und der SDM mit Luftbegasung. Bis zur maximal erreichten Drehzahl während der Satzkultivierung von 1080 min^{-1} wurde kein Sinken des k_La festgestellt.

Abbildung 16 zeigt den Vergleich des k_La für die beiden Belüftungsraten 0,28 und 1 min^{-1} . Um von der Belüftungsrate unabhängige Werte vergleichen zu können, ist

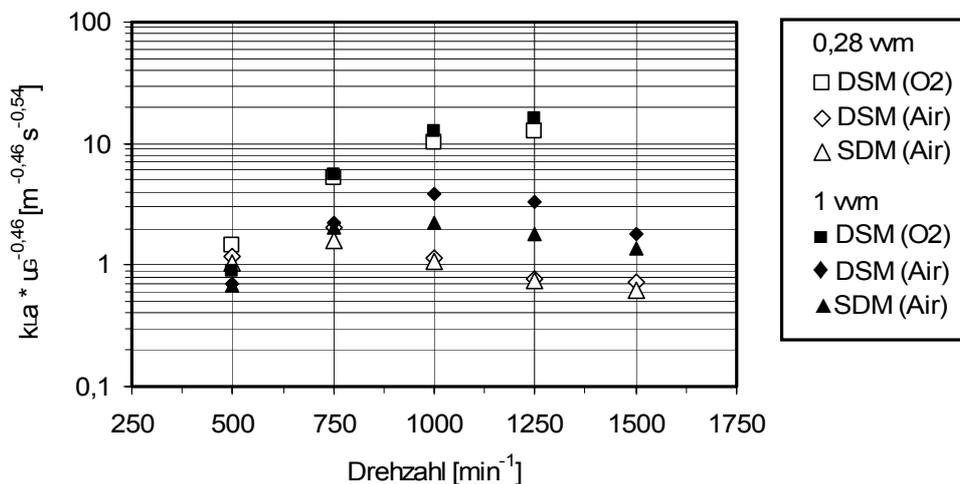


Abbildung 16: Zur Gasleerrohrgeschwindigkeit u_G referenzierter k_La über der Drehzahl im Laborrührkesselreaktor. Gemessen wurde mit der dynamischen Sulfitmethode (DSM) mit Sauerstoff- und Luftbegasung (Air) und der Stickstoffdesorptionsmethode (DSM).

der Quotient aus k_La und Gasleerrohrgeschwindigkeit mit dem Exponenten 0,46 aufgetragen. Der Exponent 0,46 stammt aus Korrelationen der Literatur, welche mit der korrekten dynamischen Druckmethode ermittelt wurden (Linek *et al.*, 1996; Moucha *et al.*, 1995). Wiederum ergeben sich für die dynamische Sulfitmethode mit Sauerstoffbegasung stetig ansteigenden k_La , wohingegen die Methoden mit Luftbegasung einen ähnlichen gekrümmten Kurvenverlauf zeigen wie in Abbildung 15. Die Standardabweichungen der Dreifachbestimmung der dynamischen Sulfitmethode und der Stickstoffdesorptionsmethode mit Luftbegasung liegen unter 8 % und sind deshalb im Graphen nicht abgebildet. Für die niedrigere Belüftungsrate $0,28 \text{ min}^{-1}$ liegt das Maximum des ermittelten k_La mit den Methoden

mit Luftbegasung bei einer Drehzahl von 750 min^{-1} . Die dynamische Sulfitmethode erzielte einen k_La von $0,077 \text{ s}^{-1}$, die Stickstoffdesorptionsmethode einen k_La von $0,06 \text{ s}^{-1}$. Für die höhere Belüftungsrate von 1 min^{-1} verschiebt sich dieses Maximum zu einer Drehzahl von 1000 min^{-1} .

4.2.2. Charakterisierung des fluorometrischen pO_2 -Messsystems

Aufgrund der geringen Dimensionen, der nicht notwendigen Polarisierung und des nicht vorhandenen Verbrauchs von Sauerstoff zur pO_2 -Messung wurde die faseroptische Messtechnik ausgewählt, welche den pO_2 basierend auf der Messung der Fluoreszenz-Abklingzeit von pO_2 -sensitiven Fluorophoren bestimmt (*MicroxTX*, *Presens*). Ein trocken gelagerter Nadelsensor des faseroptischen Messsystems *MicroxTX* zeigt bei Inbetriebnahme eine auf etwa 10 Minuten begrenzte Drift zu höheren Werten, so dass bei allen Messungen eine Einlaufzeit von 10 Minuten respektiert wurde (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Ansprechzeiten der verwendeten Optoden lagen durchwegs im Bereich von $t_E \sim 2,2 - 3,0 \text{ s}$. Somit ist ein k_La bis zum Reziprokwert der Ansprechzeit $t_E^{-1} \sim 0,33 - 0,45 \text{ s}^{-1}$ mit ausreichender Genauigkeit bestimmbar.

4.2.3. Charakterisierung der dynamischen Sulfitmethode

Da in Bioreaktoren des mL-Maßstabs zu wenig Reaktionsvolumen vorhanden ist, um in einem externen Medienkreislauf den stöchiometrischen Verbrauch des zugegebenen Sulfits per Absorptionsmessung nachzuweisen, wurde der Einfluss der Katalysatorkonzentration auf den k_La ermittelt.

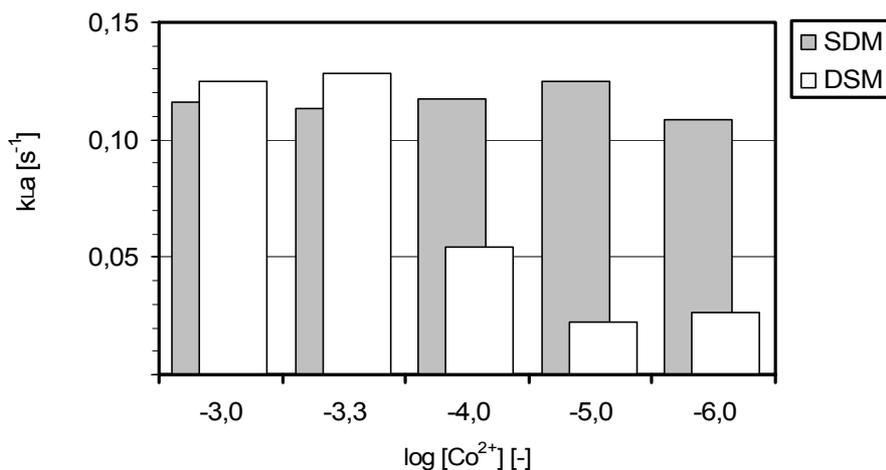


Abbildung 17: k_La in Abhängigkeit der Katalysatorkonzentration $CoSO_4$. Vergleich der Messwerte mit der Stickstoffdesorptionsmethode (SDM) und der dynamischen Sulfitmethode (DSM) im mL-Bioreaktor.

Mit einem Rührorganprototypen wurden bei 2200 min^{-1} in jeweils 5 mL 0,5 M Na_2SO_4 Bestimmungen mit der Stickstoffdesorptionsmethode und der dynamischen Sulfitmethode für ansteigende Katalysatorkonzentrationen durchgeführt. Die Sauerstoffmessung erfolgte mit einer Optode, deren Ansprechzeit zu 2,95 s bestimmt wurde. Mit der Stickstoffdesorptionsmethode wird unabhängig von der Katalysatorkonzentration ein im Rahmen der Messgenauigkeit konstanter k_La von $0,118 \text{ s}^{-1} \pm 0,008 \text{ s}^{-1}$ bestimmt (Abbildung 17).

Die Messungen mit der dynamischen Sulfitmethode zeigen deutlich, dass mit Katalysatorkonzentrationen unter $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ein niedrigerer k_La bestimmt wird. Dieses Ergebnis wurde im Laborrührkesselreaktor bei einer Drehzahl von 900 min^{-1} und 1 min^{-1} Luftbegasung bei einem Reaktionsvolumen von 3 L 0,5 M Na_2SO_4 verifiziert. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde mit einer sterilisierbaren $p\text{O}_2$ -Sonde gemessen, deren Ansprechzeit zu 11,6 s experimentell bestimmt

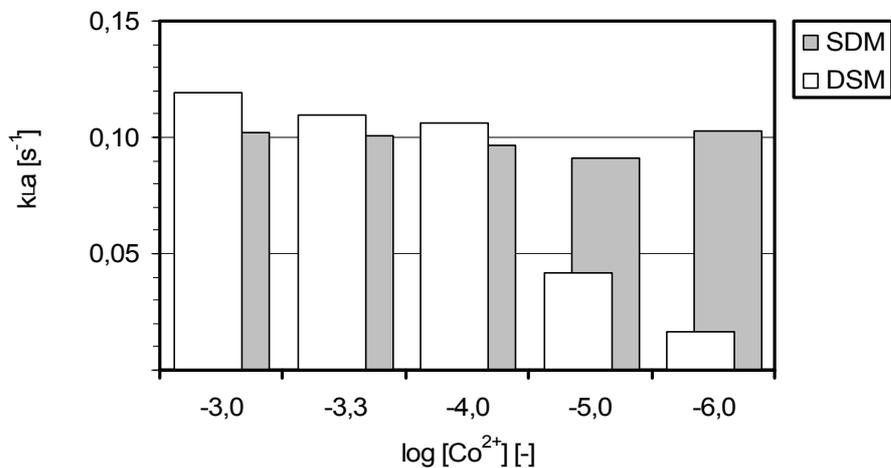


Abbildung 18: k_La in Abhängigkeit der Katalysatorkonzentration CoSO_4 . Vergleich der Messwerte mit der Stickstoffdesorptionsmethode (SDM) und der dynamischen Sulfitmethode (DSM) im Laborrührkesselreaktor.

wurde. Die Stickstoffdesorptionsmethode liefert wiederum einen nahezu konstanten k_La von $0,098 \text{ s}^{-1} \pm 0,004 \text{ s}^{-1}$ unabhängig von der Katalysatorkonzentration (Abbildung 18). Die dynamische Sulfitmethode zeigt wiederum fallenden k_La für geringere Katalysatorkonzentrationen. Der Einfluss der Katalysatorkonzentration auf den mit der dynamischen Sulfitmethode bestimmten k_La im mL-Maßstab wurde reproduziert.

Bereits ab 10^{-4} M Katalysator ergeben sich zur Stickstoffdesorptionsmethode vergleichbare Werte. Ebenfalls ist der k_La für 10^{-6} M nicht größer als der für 10^{-5} M Katalysator. Dies ist sehr wahrscheinlich auf Rückstände im Rührkessel zurückzuführen, welche ebenfalls katalytische Wirkung auf die Sulfitoxidation haben.

Die pO_2 -Signalverläufe der Aufsättigungskurven (Abbildung 19) der Messungen bei unterschiedlicher Katalysatorkonzentration im mL-Bioreaktor zeigen deutlich, dass die Oxidation bei 10^{-6} M Katalysatorkonzentration wesentlich schneller abläuft als bei 10^{-5} M. Untersuchungen bezüglich der Reaktionsordnungen der

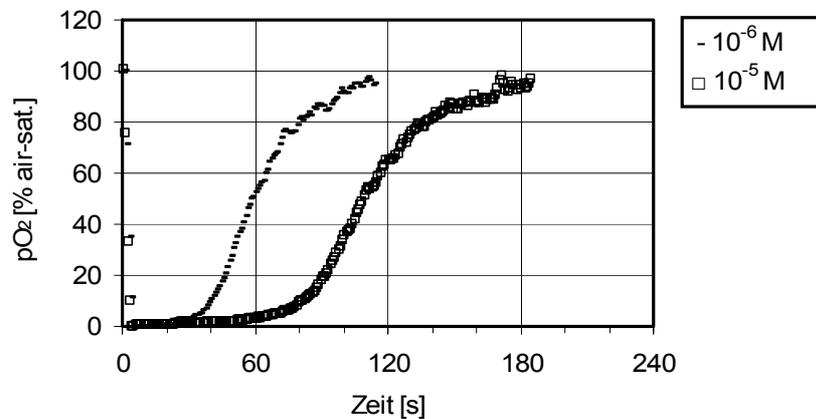


Abbildung 19: pO_2 -Verlauf bei Messungen mit der dynamischen Sulfitmethode bei unterschiedlicher Katalysatorkonzentration im mL-Bioreaktor unter gleichen Bedingungen. Die Sulfitzugabe erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$.

Sulfitoxidation zeigen (Hermann *et al.*, 2003), dass sich zwischen diesen beiden Konzentrationen die Reaktionsordnung bezüglich der Katalysatorkonzentration von 1 nach 2 ändert. Damit wurde gezeigt, dass die geringe Reaktionsordnung der Sulfitoxidation bezüglich Sauerstoff für Katalysatorkonzentrationen von unter 5×10^{-4} M zu einer während der Aufsättigung fortlaufenden Sulfitoxidation führt. Der daraus resultierende, langsamere pO_2 -Anstieg führt zur Bestimmung eines geringeren $k_L a$.

Um den Nachweis einer abgeschlossenen Sulfitoxidation erbringen zu können, kann das Pufferpotential von Sulfit ausgenutzt werden. Sowohl die Zugabe als auch der stöchiometrische Verbrauch von Sulfit in ungepufferter wässriger Lösung lässt sich an einem Sprung des pH erkennen. Bei Zugabe von Sulfit zum Laborrührkesselreaktor steigt der pH sprunghaft an (Abbildung 20). Bei geringer Katalysatorkonzentration von 10^{-6} M $CoSO_4$ fällt der pH langsam und während der Aufsättigung des Mediums auf den Gleichgewichtswert ab.

Ab genügend großer Katalysatorkonzentration von 5×10^{-4} M fällt der pH vor einem erneuten Anstieg des pO_2 auf den Gleichgewichtswert zurück. Das Sulfit ist folglich stöchiometrisch umgesetzt worden. Die dynamische Sulfitmethode kann ab einer Konzentration von 5×10^{-4} M zur Charakterisierung von Rührsystemen des mL-Maßstabs eingesetzt werden.

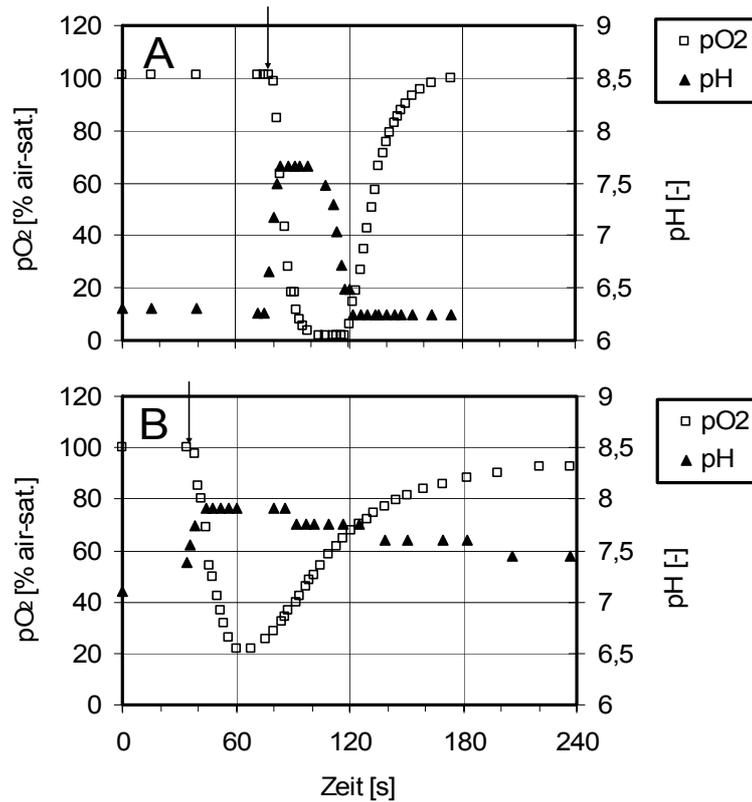


Abbildung 20: Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 und des pH während der dynamischen Sulfitmethode (DSM) bei (A) 5×10^{-4} M und (B) 10^{-6} M Katalysatorkonzentration $CoSO_4$ im Laborrührkesselreaktor. Die Sulfitzugabe ist durch den Pfeil angezeigt.

4.2.4. Diskussion

Die dynamische Sulfitmethode mit Sauerstoffbegasung liefert der als korrekt anerkannten dynamischen Druckmethode äquivalenten $k_L a$ (Havelka *et al.*, 1998), welche proportional zum Leistungseintrag bzw. der Rührerdrehzahl steigen. Dies wird von den Versuchen bestätigt. Ab einem $k_L a$ im Bereich des Reziprokwerts der Ansprechzeit der Optode ist ein starker Einfluss auf die Messergebnisse zu erwarten. Die hier eingesetzte Optode lässt diesen Einfluss folglich ab einem $k_L a$ von $0,45 \text{ s}^{-1}$ erwarten. Die Messwerte im Referenzsystem Laborrührkessel stagnieren bei einem $k_L a$ um $0,8 \text{ s}^{-1}$. Die Verwendung von reinem Sauerstoff führt zudem zu einem pO_2 von bis zu 475 % Luftsättigung. Die Signalschwankungen in diesem Grenzbereich der Optode erklären die sehr hohen Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen. Aufgrund des Einflusses der Ansprechzeit und der Messung im Grenzbereich der Optode sind folglich Messwerte ab $0,8 \text{ s}^{-1}$ wenig vertrauenswürdig.

Der *small bubble* Effekt wird von beiden Methoden mit Luftbegasung durch geringere Messwerte, ein scheinbares $k_L a$ -Maximum und fallendem $k_L a$ bei hohen

Drehzahlen aufgezeigt. Der *small bubble* Effekt ist bei der dynamischen Sulfitmethode weitaus weniger ausgeprägt als bei der Stickstoffdesorptionsmethode. Dies resultiert aus dem geringeren Stickstoffanteil im Prozessgas. Durch Erhöhung der Belüftungsrate kann dem *small bubble* Effekt entgegengewirkt werden. Das scheinbare k_{La} -Maximum verschiebt sich zu höheren Drehzahlen, da die *small bubbles* effizienter aus dem Reaktionsmedium ausgetrieben werden. Um hohen k_{La} mit Luftbegasung zu erreichen macht die Steigerung der Drehzahl folglich nur Sinn, wenn die Belüftungsrate simultan erhöht wird.

Der aus den Daten der Abgasanalytik abgeschätzte k_{La} liegt im Bereich der Werte der Bestimmungsmethoden mit Luftbegasung. Folglich tritt auch während Kultivierungen ein *small bubble* Effekt auf. Ein scheinbares k_{La} -Maximum konnte aufgrund der nicht ausreichend hohen Drehzahl am Ende des Satzverfahrens nicht verifiziert werden. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass auch diese Begleiterscheinung des *small bubble* Effekts in Kultivierungen auftritt. Somit ist es fraglich, ob, wie in der Literatur üblich, wirklich von einem scheinbaren k_{La} -Maximum gesprochen werden sollte, da dieser k_{La} in Kultivierungen bei gleicher Zusammensetzung des Prozessgases wirklich vorliegt. Der in der Literatur als scheinbar bezeichnete k_{La} ist der Wert, welche aufgrund der Definition des k_{La} physikalisch nicht korrekt, sondern unter Einfluss von Stickstoff im Prozessgas ermittelt wurde.

Um die Auslegung eines Prozesses mit Luftbegasung durchführen zu können, werden folglich die Ergebnisse von k_{La} -Messungen mit Methoden mit Luftbegasung benötigt. Dieser k_{La} liegt für den Rührkesselreaktor im Bereich $0,15 \text{ s}^{-1}$ (Stickstoffdesorptionsmethode) bis $0,26 \text{ s}^{-1}$ (dynamische Sulfitmethode). Dieser Bereich des k_{La} wird als Zielvorgabe für die Entwicklung des Gas-induzierenden Rührsystems für mL-Bioreaktoren herangezogen.

Bisher wurde die dynamische Sulfitmethode lediglich im Labormaßstab mit einer Katalysatorkonzentration von 10^{-3} M mit gleichzeitiger experimenteller Überprüfung des stöchiometrischen Umsatzes des Sulfits vor Beginn der Aufsättigung der Flüssigphase durchgeführt (Havelka *et al.*, 1998). Die hier ermittelten Daten zeigen, dass zwischen 10^{-5} M und 10^{-6} M eine Änderung der Reaktionsordnung der Sulfitoxidation bezüglich der Katalysatorkonzentration erfolgt. Dies wird in der Literatur bestätigt (Hermann *et al.*, 2003). Die Katalysatorkonzentration muss sicherstellen, dass die Sulfitoxidation ausreichend schnell erfolgt, um zu verhindern, dass eine simultan zur Aufsättigung erfolgende Sulfitoxidation zu scheinbar geringerem k_{La} führt. Diese Konzentration wurde durch Variation der Katalysatorkonzentration zu $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ bestimmt. Eine Verifizierung des stöchiometrischen Verbrauchs des Sulfits wurde somit als nicht notwendig erachtet.

4.3. Entwicklung eines Gas-induzierenden Rührsystems für mL-Bioreaktoren

4.3.1. Prototypenserie ‚A‘

In bewehrten Rührkesselreaktoren des Labor- und Produktionsmaßstabs setzt Gaseintrag von der Oberfläche bei Verwendung von Scheiben- und Schrägblattrührern ab einer Mindestrührerumfangsgeschwindigkeit $v_{Tip,crit}$ ein. Da eine hohe Re -Zahl die notwendige Rührerumfangsgeschwindigkeit zur Initiierung des Gaseintrags von der Oberfläche herabsetzt, ist es vorteilhaft, den Durchmesser der Rührsysteme zu maximieren. Ein größerer Strömungswiderstand eines Rührkörpers führt zu erhöhter Turbulenz und damit größerem volumenbezogenen Leistungseintrag, wodurch eine geringere Rührerumfangsgeschwindigkeit ausreichen würde, um Blaseneintrag zu ermöglichen.

Die Prototypen A1 und A2 (Abbildung 21) wurden im unbewehrten Reaktionsgefäß mit 15,5 mm Innendurchmesser mit Flüssigkeitslagerung (Abbildung 22A) betrieben. Die Einbettung von Permanentmagneten erlaubt das Erreichen maximaler Drehzahlen bis 2600 min^{-1} . Hohe Drehzahlen führen zur Ausbildung tieferer Tromben, welche bis in den Bereich der Rotationsebene des Rührers reichen. Trotz der hohen Drehzahlen erzielt keines der Rührsysteme Gaseintrag in die Flüssigphase. Der höchste gemessene k_{La} liegt unter $0,02 \text{ s}^{-1}$ (Ergebnisse nicht dargestellt). Im unbewehrten System rotiert die Flüssigphase wie ein starrer Körper mit annähernd der gleichen Rotationsgeschwindigkeit wie das Rührorgan. Folglich wird nur geringe Turbulenz erzeugt und der Leistungseintrag in die Flüssigphase ist gering. Der größere Strömungswiderstand des Rührsystems A2 führt nicht zu einer signifikanten Steigerung des k_{La} .

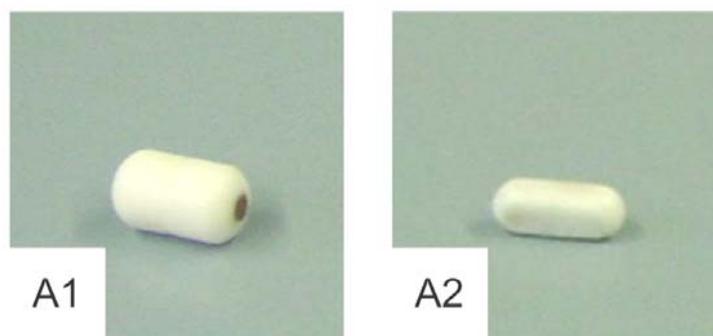


Abbildung 21: Rührorgane A1 und A2 der Prototypenserie ‚A‘.

Der Betrieb ohne Lagerung auf einer Achse führt bei allen Prototypen zu einer Abnutzung des Rührkörpers und der Innenwand des mL-Bioreaktors. Nach 12-stündigem Betrieb wurden Teflonspäne in der Flüssigphase beobachtet. Bei hohen Drehzahlen wurde außerdem ein unregelmäßiger Lauf der Rührorgane

festgestellt, welcher sich durch kurzes Entkoppeln des Rührorgans aus dem Magnetfeld bemerkbar macht. Als Folge des erneuten Einkoppelns in die Rotation

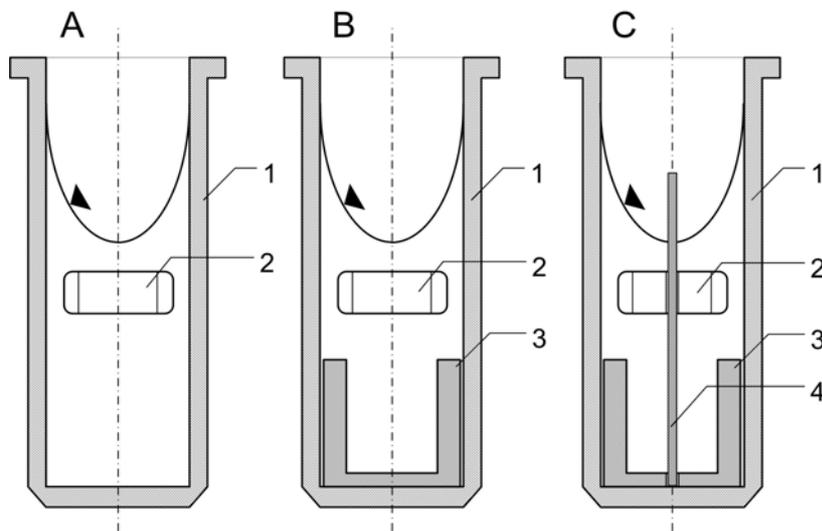


Abbildung 22: Betrieb der Rührorganprototypen der Serie ‚A‘. (A) Ungelagerter Betrieb ohne Bewehrung. (B) Ungelagerter Betrieb mit Bewehrung. (C) Gelagerter Betrieb auf einer starren Achse mit Bewehrung. 1: mL-Bioreaktor. 2: Rührorgan. 3: Strömungsbrecher. 4: Achse.

des Magnetfelds werden in unregelmäßigen Zeitabständen Flüssigkeitströpfchen aus der Flüssigphase ausgeworfen. Dieser Volumenverlust ist durch seine stochastische Natur nicht kalkulierbar.

Durch Anbringen von Bohrungen im Zentrum der Rührorgane wurde der gelagerte Betrieb der Rührorgane auf einer Achse ermöglicht (Abbildung 22C). Die Abnutzung der Rührorgane und mL-Bioreaktoren wurde verhindert, der unkontrollierte Volumenverlust deutlich reduziert.

Im bewehrten System (Abbildung 22B) erzielen die Prototypen A1 - A2 bei maximaler Drehzahl nur dann Gaseintrag, wenn die Distanz zwischen Strömungsbrecher und Rührorgan möglichst gering und gleichzeitig die Flüssigkeitsoberfläche auf Höhe der Rotationsebene des Rührsystems lokalisiert ist. Der sehr geringe Blaseneintrag entsteht aufgrund der hohen induzierten Scherkräfte an der Phasengrenzfläche. Die erzeugten Blasen werden in der Unterdruckzone hinter den Strömungsbrechern in die Flüssigphase eingesaugt. Der Großteil der gebildeten Gasblasen wird jedoch bereits vor Erreichen des folgenden Strömungsbrechers wieder an der Oberfläche freigesetzt. Nur sehr wenige Blasen dringen in die Zone unter dem Rührsystem ein. Der Betrieb im bewehrten mL-Bioreaktor wurde durch nicht signifikante Erhöhung des $k_L a$ charakterisiert (Abbildung 28).

Die Rührorgane A3 und A4 wurden so gestaltet, dass am Außenumfang angebrachte Schrägen analog zu Schrägblattrührern eine axiale Strömung ins Innere der Flüssigkeit erzeugen. Der Betrieb erfolgte mit Achslagerung (Abbildung 22C).

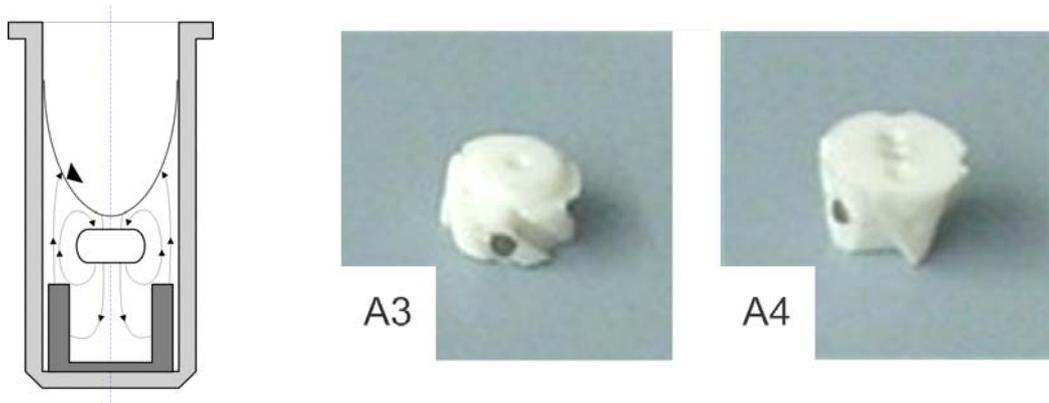


Abbildung 23: Rührorgane A3 und A4 der Prototypenserie ‚A.‘

Gaseintrag kann zwar visuell festgestellt werden, jedoch führt dieser ebenfalls nicht zu visuell charakterisierbarem Gasgehalt. Ein maximaler $k_L a$ von $0,10 \text{ s}^{-1}$ wurde für das Rührsystem A4 erhalten.

Um das Einsaugen erzeugter Gasblasen in die Flüssigphase zu optimieren, wurden weitere Prototypen A5 und A6 gefertigt (Abbildung 24).

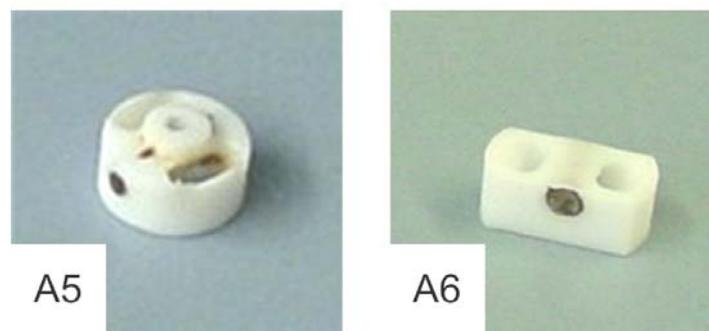


Abbildung 24: Rührorgane A5 und A6 der Prototypenserie ‚A.‘

Diese fördern im Betrieb aufgrund eingebrachter, gegenüber der Vertikalen geneigter Kanäle die Flüssigkeit radial nach außen und erzeugen dabei eine Ringströmung (Abbildung 25).

Im bewehrten mL-Bioreaktor erreicht der Prototyp A5 einen $k_L a$ von $0,15 \text{ s}^{-1}$. Der Blaseneintrag kann visuell nachgewiesen werden. Die induzierte radiale Strömung führt zu einem starken Sog am Außenradius ins Innere der Flüssigkeit. Am Außenradius werden außerdem durch die starken Scherkräfte an der Phasengrenzfläche Blasen gebildet und ins Innere der Flüssigkeit gesaugt.

Wird Prototyp A5 um 180 Grad gedreht betrieben entspricht seine Pumpaktivität dem Typ 11 eines Gas-induzierenden Rührsystems. Ab einer kritischen Rührerumfangsgeschwindigkeit wäre somit auch im unbewehrten Reaktionsgefäß mit Blaseneintrag zu rechnen. Dies konnte visuell jedoch nicht bestätigt werden. Ohne Bewehrung wird nur ein $k_L a$ unter $0,02 \text{ s}^{-1}$ erreicht.

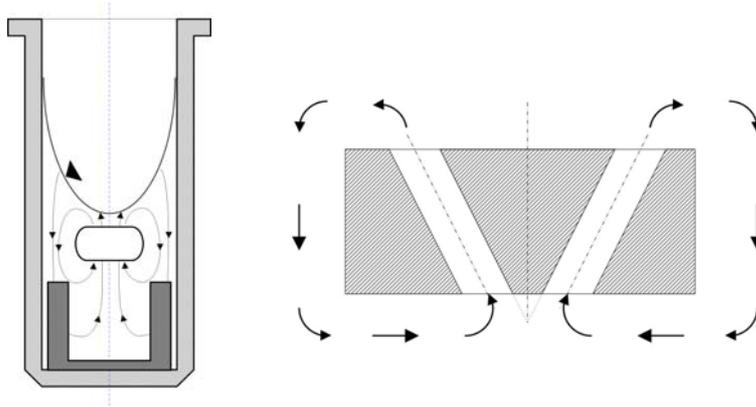


Abbildung 25: Pumpprinzip der Rührorganprototypen A5, A6 und A10. Geneigte Kanäle fördern die Flüssigkeit im Betrieb radial nach außen, wodurch eine Ringströmung induziert wird.

Die Kombination der Strömungsinduktion durch Pumpkanäle analog des Prototypen A5 mit einem größeren Strömungswiderstand des Rührkörpers resultierte im Rührerprototypen A6. Dieser erzielte einen $k_L a$ von $0,24 \text{ s}^{-1}$.

Der Prototyp A7 (Abbildung 26) erzeugt zwei entgegen gesetzt verlaufende Ringströmungen in der Flüssigkeit. Die obere Pumpaktivität entspricht dem um



Abbildung 26: Rührorgan A7 der Prototypenserie ‚A‘.

180 Grad gedrehten Prototypen A5 (Abbildung 27). Angebrachte Schrägen am unteren Grundkörper ermöglichen eine geringere Distanz zwischen Strömungsbrecher und Rührorgan. Die Auswurfkanäle der unteren Pumpe wurden direkt vor denen der oberen Kanäle platziert, um durch den entstehenden Unterdruck vor

den oberen Kanälen Gaseintrag zu optimieren. Ohne Bewehrung wird jedoch wiederum kein Blaseneintrag ermöglicht. Am Auswurf der Pumpen sind zwar Gasblasen zu erkennen, diese können jedoch aufgrund der unzureichenden

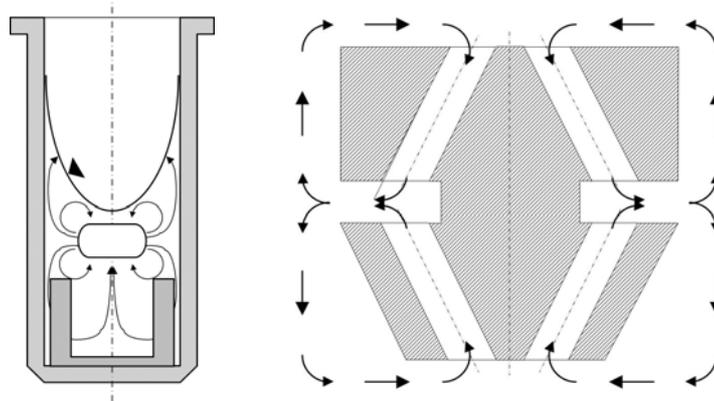


Abbildung 27: Pumpprinzip der Rührorganprototypen A7, A8 und A9. Geneigte Kanäle fördern die Flüssigkeit im Betrieb radial nach außen, wodurch eine doppelte Ringströmung induziert wird.

Druckdifferenz nicht abgelöst und in die Flüssigkeit eingetragen werden. Die von der unteren Pumpe erzeugte Strömung ist folglich nicht in der Lage, einen Unterdruck zu erzeugen, welcher den in der Depressionszone der Strömungsbrecher ersetzen kann. Im bewehrten Reaktor wird Gaseintrag ermöglicht und ein maximaler $k_L a$ von $0,17 \text{ s}^{-1}$ wird erzielt.

Abbildung 28 fasst den erzielten $k_L a$ der Prototypen A1 - A7 der Serie ‚A‘ zusammen.

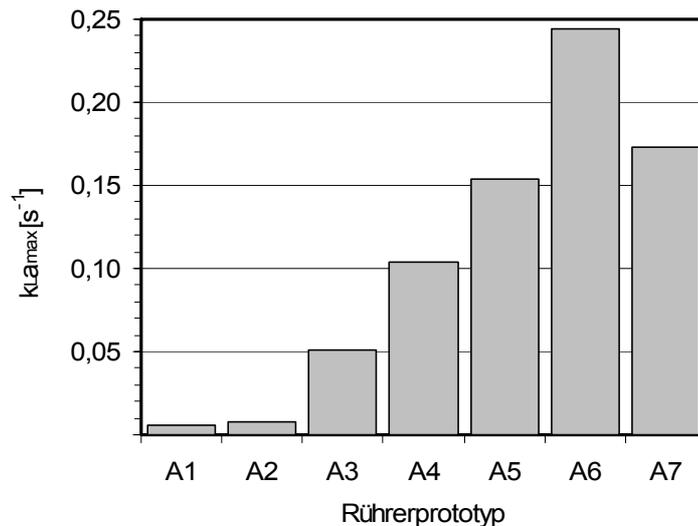


Abbildung 28: Maximal erzielter $k_L a$ der Rührsysteme der Prototypenserie ‚A‘ unter optimalen Bedingungen im bewehrten mL-Bioreaktor mit 15,5 mm Innendurchmesser.

Gasaustauschlimitierung

Eine wesentliche Voraussetzung eines Rührorgans für den Einsatz in Zulaufverfahren ist die Aufrechterhaltung der Gaseintragseigenschaften über einen großen Volumenbereich. Tabelle 5 zeigt die Abnahme des k_La bei optimalen Bedingungen nach Erhöhung des Ausgangsvolumens um 20 %.

Tabelle 5: Maximaler k_La und Minderung des k_La bei Erhöhung des Reaktionsvolumens um 20 %.

Rührorgan	Maximaler k_La [s ⁻¹]	k_La - Minderung
A1	< 0,01	14 %
A2	< 0,01	-
A3	0,05	48 %
A4	0,10	17 %
A5	0,15	82 %
A6	0,24	95 %
A7	0,17	19 %

Die Rührorgane A1, A4 und A7 sind durch eine k_La -Minderung von unter 20 % charakterisiert. Da der k_La eine volumenbezogene Größe ist, legt dies die Vermutung nahe, dass ein in etwa konstanter Sauerstoffeintrag für beide Volumina stattfindet. Für Rührer A2 wurde die Bestimmung aufgrund seines sehr geringen k_La nicht durchgeführt. Die Rührorgane A3 und A5 zeigen deutliche Verluste in der Sauerstoffsorptionsleistung von 48 % bzw. 82 %. Der Prototyp A6 zeigte bei Erhöhung des Volumens um 20 % einen dramatischen Abfall des k_La auf unter 0,01 s⁻¹. Die Messantwort der k_La -Bestimmung zeigte außerdem keinen erwarteten exponentiellen Verlauf.

Auf Basis des Prototypen A7 wurden weitere Prototypen A8 und A9 entwickelt (Abbildung 29). Die Ansaugbohrungen der oberen Pumpe wurden exzentrisch angeordnet, um einen „pulsierenden Gaseintrag“ durch das abwechselnde Einsaugen von Gas und Flüssigkeit zu realisieren. Wiederum wurden bei hohen Reaktionsvolumina, ähnlich dem Prototypen A6, unerwartete Verläufe der Aufsättigungskurven beobachtet. Durch das Einbringen eines zusätzlichen Strömungsbrechers oberhalb der Rotationsebene des Rührorgans kann die Trombe zudem noch exzentrisch verschoben werden, um den über den Umfang „pulsierenden Gaseintrag“ zu verstärken. Auch dies führte nicht zur gewünschten Verbesserung des k_La der Prototypen.

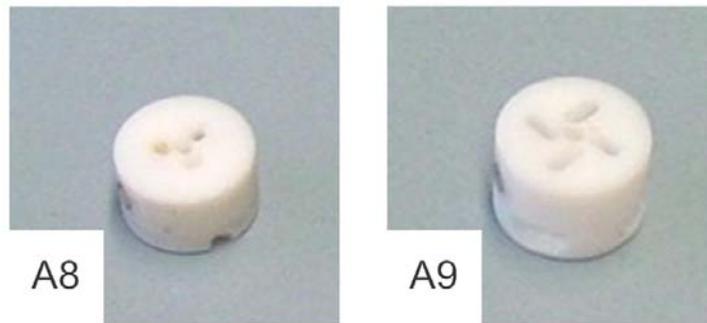


Abbildung 29: Rührorgan A8 und A9 der Prototypenserie ‚A.‘

Der unerwartete Verlauf der Aufsättigungskurven lässt sich wie folgt beschreiben (Abbildung 30). Der pO_2 steigt im gewohnt asymptotischen Verlauf bis auf einen gewissen pO_2 , von dem ab sich allerdings ein annähernd linearer Aufsättigungsverlauf zeigt. Die Auswertung dieses linearen Verlaufs führt zu drastisch geringerem k_La .

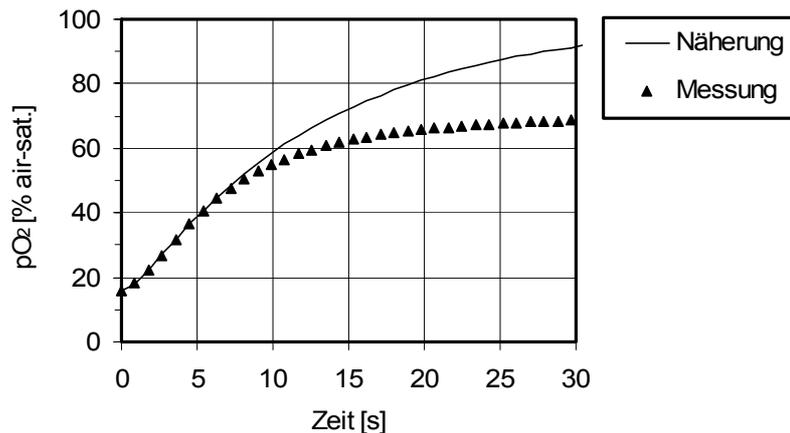


Abbildung 30: Experimentell beobachtete Aufsättigungskurve deren Verlauf auf Gasaustauschlimitierung hinweist. Die Näherungskurve wurde ausgehend von den ersten 9 Messwerten erzeugt.

Ein solcher Kurvenverlauf ist in Abbildung 31 für einen k_La von $0,2 \text{ s}^{-1}$ modelliert (Kurve B). Scheinbar kann in der ersten Phase der Aufsättigung dem realen k_La des Rührorgans entsprechend Sauerstoff von der dispergierten Gasphase in die Flüssigkeit übertragen werden. Ab dem Knick der Aufsättigungskurve scheint der Sauerstoffeintrag nicht mehr vom realen k_La des Rührorgans limitiert, sondern vom Eintrag neuer Gasblasen in die Flüssigkeit. Würde der zu Beginn der Messung in der dispergierten Gasphase vorhandene Sauerstoff ausreichen um eine komplette Aufsättigung der Flüssigphase zu erzielen, würde mit der dynamischen Sulfitmethode ein Kurvenverlauf erzielt werden, als ob keine Gasaustauschlimitie-

nung vorläge (Abbildung 31, Kurve A). Die Gasaustauschlimitierung würde folglich mit der dynamischen Sulfitmethode nicht entdeckt. Im Extremfall des nicht vorhandenen Gasaustauschs würde man bei unzureichendem Gasgehalt zur vollständigen Aufsättigung den Kurvenverlauf C (Abbildung 31) erhalten.

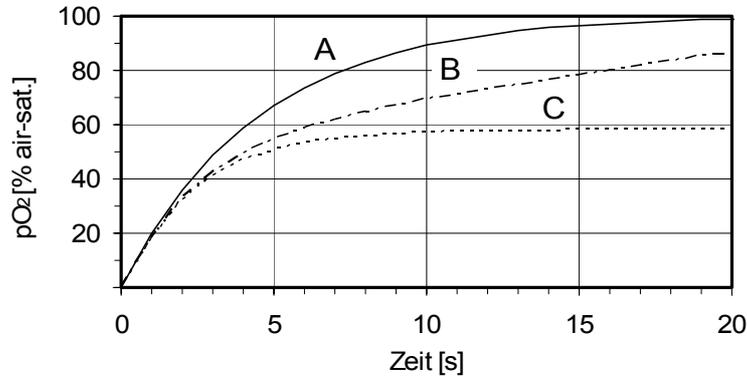


Abbildung 31: Modellierter Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks pO_2 für (A) nicht limitierenden (übliche Grundannahme), (B) limitierenden und (C) nicht vorhandenen Gasaustausch zwischen dispergierter und umgebender Gasphase im Bioreaktor. Dem Modell liegt ein $k_L a$ von $0,2 \text{ s}^{-1}$ zu Grunde. Die Modellkurve für nicht limitierenden Gasaustausch wurde mit konstanter Gelöstsauerstoffkonzentration von 100 % Luftsättigung berechnet. Die Modellkurven für limitierenden und nicht vorhandenen Gasaustausch berücksichtigen die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der dispergierten Gasphase aufgrund des Stofftransports. Es wurde mit einem Anfangsgasgehalt von 6 % und einem Anfangsauerstoffanteil von 21 % gerechnet. Der limitierende Gasaustausch wurde mit 4 \% s^{-1} modelliert.

Die Gasaustauschlimitierung kann dann erkannt werden, wenn zu Beginn der Aufsättigungsphase kein Sauerstoff in der dispergierten Gasphase vorhanden ist. Zur Charakterisierung der Gasaustauschlimitierung bietet sich folglich die Stickstoffdesorptionsmethode an.



Abbildung 32: Rührorgan A10 der Prototypenserie ‚A.‘

Um die Gasaustauschlimitierung zu vermeiden muss dispergierten Gasblasen die Koaleszenz mit der umgebenden Gasphase erleichtert werden. Dazu wurde ein

neuer Prototyp A10 (Abbildung 32) auf Basis des bisher effektivsten Rührorgans A6 konzipiert, welcher in einem mL-Bioreaktor mit einem Durchmesser von 20,0 mm betrieben wurde. Die Vergrößerung des Reaktorquerschnitts und die Einbringung von über die gesamte Länge des Reaktionsgefäßes ausgeführten Strömungsbrechern sollte dispergierten Gasblasen die Koaleszenz mit der Umgebungsgasphase erleichtern und dadurch den Gasaustausch verbessern. Dieses Rührsystem erreichte einen maximalen k_La von $0,152 \text{ s}^{-1}$. Eine Steigerung des Reaktionsvolumens um 20 % reduzierte den k_La um 15 %, eine Steigerung um 50 % reduzierte den k_La um 36 %. Bei allen eingestellten Versuchsbedingungen wurde keine Gasaustauschlimitierung festgestellt. Die Vergrößerung des Reaktorquerschnitts verhindert somit die Gasaustauschlimitierung.

4.3.2. Prototypenserie ‚B‘

Als schwerwiegendstes Problem der Prototypenserie ‚A‘ wurde die Gasaustauschlimitierung identifiziert. Die in der Flüssigphase dispergierten Gasblasen werden aufgrund des vorherrschenden Strömungsfeld am Koaleszieren mit der umgebenden Gasphase gehindert. Die bisher entwickelten Rührsysteme der Serie ‚A‘ gehören dem Typ 22 der Gas-induzierenden Rührorgane an, d.h. sowohl am Eingang als auch am Ausgang der Rührerzone liegt eine Zweiphasenströmung vor. Um eine bessere Koaleszenz der dispergierten Gasblasen mit der Umgebungsgasphase zu ermöglichen wurden weitere Prototypen entwickelt. Diese Prototypen der Serie ‚B‘ entsprechen dem Typ 12 der Gas-induzierenden Rührorgane, um durch die Einphasenströmung am Eingang der Rührerzone eine Rezirkulation der dispergierten Gasphase verhindern zu können. Die Einphasenströmung am Eingang der Rührerzone wird durch Integration einer Hohlachse erreicht (Abbildung 33).

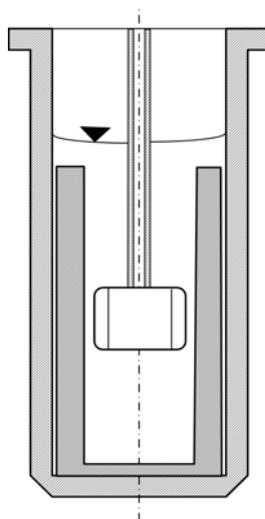


Abbildung 33: Betrieb der Rührorganprototypen der Serie ‚B‘ auf Hohlachse mit Strömungsbrechern, welche über die gesamte Länge des Reaktionsgefäßes ausgeführt sind.

Der Prototyp B1 ist in Abbildung 34 dargestellt. Die Pumpe erzeugt ähnlich dem Konzept des Prototypen A5 eine Ringströmung in der Flüssigphase. Am Eingang des Rührorgans erzeugt diese Strömung einen Unterdruck an den Gasauslassöffnungen, welcher den Blaseneintrag ermöglichen soll. Selbst bei Drehzahlen bis zu 2600 min^{-1} ist jedoch kein Blaseneintrag möglich. Der Sog der Pumpkanäle scheint nicht auszureichen. Durch Einbringen einer Düse in die Ansaugöffnung der Pumpe, welche den Ansaugkanal verengt, wurde schließlich Blaseneintrag ermöglicht. Die daraus resultierende höhere Strömungsgeschwindigkeit scheint den Unterdruck in der Ansaugöffnung soweit zu erhöhen, dass Blaseneintrag ermöglicht wird. Der maximale k_{La} dieses Rührorgans beträgt $0,17 \text{ s}^{-1}$ bei 3000 min^{-1} .



Abbildung 34: Rührorgane B1, B2 und B3 der Prototypenserie ‚B.‘

Ein weiterer Prototyp B2 wurde so konzipiert, dass eine zweigeteilte Ringströmung erzeugt wird (Abbildung 35). Die größere Gesamtfläche der Austrittskanalöffnungen führt zu einem stärkeren Sog am unteren Ende der Hohlachse, wodurch der Eintritt des Gases ins Innere des Rührorgans ermöglicht wird. Das Rührorgan

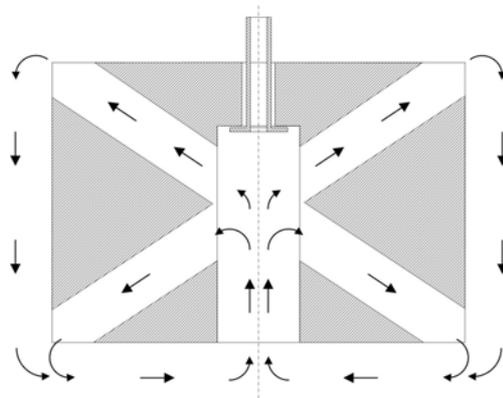


Abbildung 35: Pumpprinzip der Rührorganprototypen B2, B3 und B4.

erreicht eine maximale Drehzahl von 2300 min^{-1} . Der maximale k_{La} dieses Prototyps wurde zu $0,446 \text{ s}^{-1}$ bei 2300 min^{-1} und 8 mL Reaktionsvolumen bestimmt (Abbildung 36).

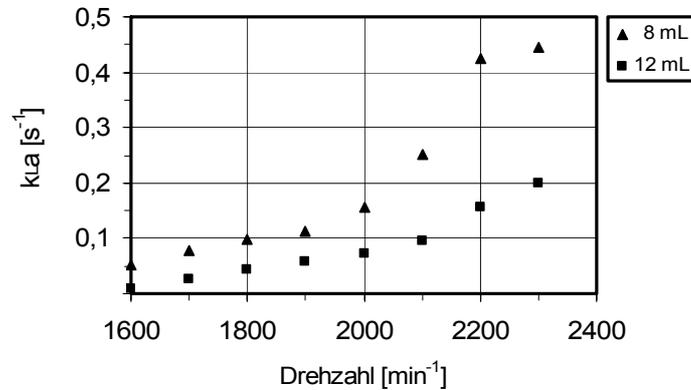


Abbildung 36: k_{La} als Funktion der Drehzahl des Rührorgans B2 für zwei verschiedene Reaktionsvolumina.

Bei 2200 min^{-1} ist Erhöhung des Reaktionsvolumens um 50% von 7 auf $10,5 \text{ mL}$ durch eine Verringerung des k_{La} um 20% auf $0,32 \text{ s}^{-1}$ charakterisiert (Abbildung 37). Bei 2000 min^{-1} führt die gleiche Steigerung im Reaktionsvolumen zu einer Verringerung des k_{La} um 50% auf $0,086 \text{ s}^{-1}$.

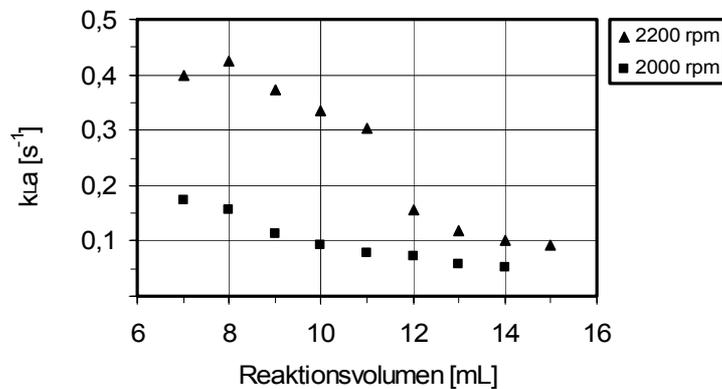


Abbildung 37: k_{La} als Funktion steigender Reaktionsvolumina des Rührorgans B2 bei zwei verschiedenen Drehzahlen.

Der Prototyp B3 wurde als erstes Rührorgan in einer Kleinserie von 8 Stück hergestellt. Die Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung eines Rührorgans dieser Serie steigt mit der Drehzahl an und betrug bis zu 18% (Abbildung 38). Aus der manuell gefertigten Serie wurden zwei Rührorgane ausgewählt, welche augenscheinlich die geringsten Fertigungstoleranzen aufwiesen. Die

Standardabweichungen von Einzelbestimmungen des k_La dieser beiden Rührorgane lagen für alle Drehzahlen unter 7 %.

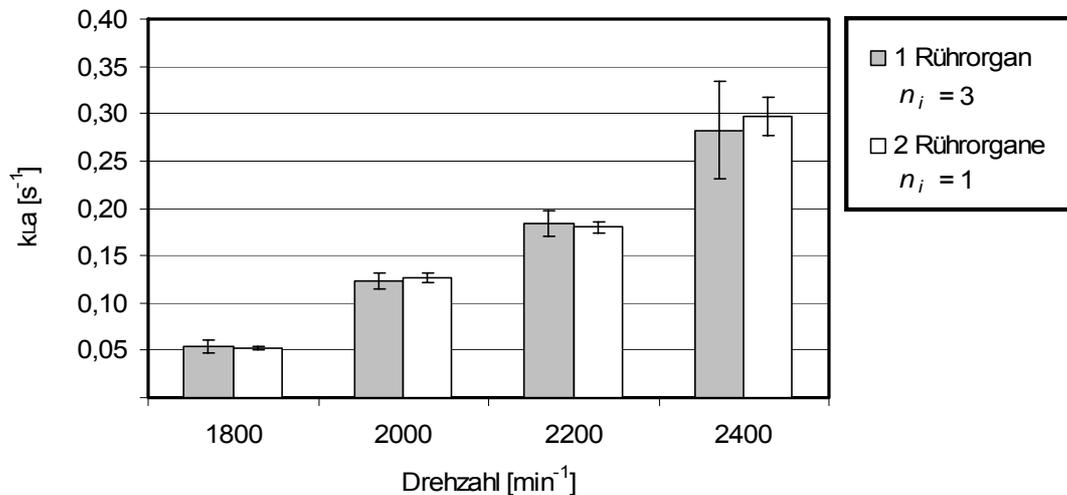


Abbildung 38: k_La des Rührorganprototypen B3 als Funktion steigender Drehzahl. Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung eines Rührorgans (■) mit Einfachbestimmung von zwei verschiedenen, zufällig ausgewählten baugleichen Rührorganen (□).

Der relative Fehler zwischen den verschiedenen Rührorganen liegt für alle Drehzahlen unter 5 %. Die Messmethode bedingt einen größeren Fehler im k_La als bei Messungen mit verschiedenen Rührorganen aus manueller Fertigung erreicht werden.

Rührorgane derselben manuell gefertigten Serie, welche augenscheinlich starke Toleranzen aufwiesen wurden durch Abweichungen der Mittelwerte verschiedener Rührorgane bis 16 % und eine Standardabweichung einer Dreifachbestimmung eines Rührsystems bis 20 % bei Drehzahlen über 2000 min⁻¹ charakterisiert. Die durch die manuelle Fertigung bedingten Toleranzen zeigen eine geringere Auswirkung auf den k_La als die Messmethode. Für die niedrigste Drehzahl 1800 min⁻¹ jedoch lagen die Mittelwerte verschiedener Rührorgane bis zu 50 % auseinander. Größere Fertigungstoleranzen wirken sich bei geringeren Drehzahlen sehr stark auf den k_La aus, da die Toleranzen einen Einfluss auf die Mindestdrehzahl zur Ermöglichung des Blaseneintrags haben.

Der Rührerprototyp B4 (Abbildung 39) wurde mit der gleichen Geometrie bezüglich der Pumpwirkung wie der Rührerprototyp B2 ausgestattet. Zu Erhöhung der maximal erreichbaren Drehzahl wurde die äußere Form so verändert, dass die Integration eines größeren Magnetvolumens möglich war. Zusätzlich wurden diese Magnete in größerem radialen Abstand von der Drehachse und damit näher an



Abbildung 39: Rührorgan B4 der Prototypenserie ‚B.‘

den Polschuhen des umgebenden magnetisch-induktiven Rührsystems positioniert, so dass ein größerer magnetischer Fluss erzielt wird. Diese Änderungen führen zu einer erhöhten maximalen Drehzahl von bis zu 3400 min^{-1} . Der $k_L a$ erreicht ebenfalls Werte über $0,4 \text{ s}^{-1}$ (Abbildung 40).

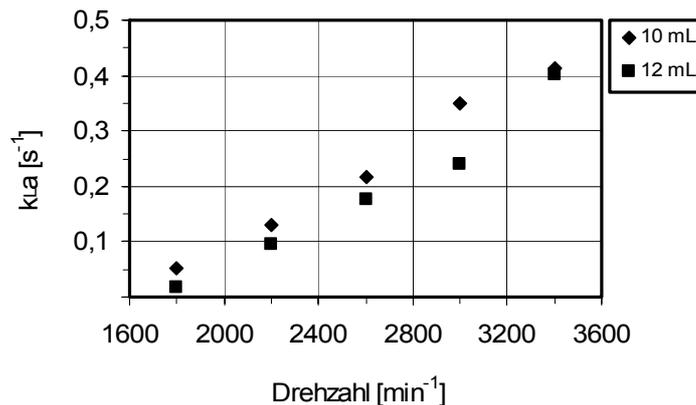


Abbildung 40: $k_L a$ des Rührorgans B4 als Funktion steigender Drehzahl für zwei verschiedene Reaktionsvolumina.

4.3.3. Diskussion

Im unbewehrten System ohne ausreichenden Gaseintrag in die Flüssigphase wird aufgrund der reinen Oberflächenbegasung ein maximaler $k_L a$ nur im Bereich von $0,02 \text{ s}^{-1}$ erreicht. Dies entspricht dem $k_L a$ eines 500 mL Schüttelkolbens mit 50 mL Flüssigvolumen bei 200 min^{-1} (Maier, 2002). Durch Bewehrung konnte zwar das Einreißen von Gasblasen ermöglicht werden, jedoch scheinen die Blasen sofort wieder mit der Flüssigkeitsoberfläche zu koaleszieren, da kein Gasgehalt beobachtet werden konnte. Dies wird auch in größeren Rührkesselreaktoren beobachtet (Zlokarnik, 1999). Die Minimierung der Entfernung zwischen Rührorgan und Strömungsbrecher führt zu Scherkräften, welche Blasenbildung

ermöglichen. Gaseintrag erfordert jedoch zusätzlich eine Strömung ins Innere der Flüssigphase. Das dazu notwendige Strömungsfeld muss vom Rührer induziert werden. Dies gelang durch Integration von Pumpkanälen ins Innere der Rührorgane.

Die Prototypen der Serie ‚A‘, welche Gaseintrag ermöglichen, waren nicht in der Lage, diesen Gaseintrag über einen großen Bereich des Reaktionsvolumens aufrecht zu erhalten. Die festgestellte Gasaustauschlimitierung scheint eine Folge des Einschlusses der dispergierten Gasphase unterhalb der Rotationsebene des Rührsystems aufgrund des großen Rührerdurchmessers im Vergleich zum Durchmesser des mL-Bioreaktors zu sein.

Die Rührer der Prototypenserie ‚B‘ verhindern aufgrund des geringeren Verhältnisses von Rührerdurchmesser zum Durchmesser des mL-Bioreaktors den Einschluss der Gasphase im Reaktor. Sowohl ein effizienter Eintrag von Gasblasen als auch die Koaleszenz der dispergierten Gasphase mit der Flüssigkeitsoberfläche wurde erreicht. Mit den entwickelten Rührorganprototypen B2, B3 und B4 wird ein maximaler k_La von über $0,4 \text{ s}^{-1}$ bei unterschiedlichen Drehzahlen erreicht. Möglicherweise kann durch Änderungen der äußeren Form unter Beibehaltung der Aktivität der Pumpwirkung für eine bestimmte Drehzahl ein gewünschter k_La erzielt werden.

Im Folgenden werden diese Werte des k_La mit Literaturdaten von Gas-induzierenden Rührsystemen des Labormaßstabs verglichen. In einem Rührkesselreaktor des Pilotmaßstabs mit einem Innendurchmesser $d_T = 0,6 \text{ m}$ und einem Gas-induzierenden Rührsystem wurde in 200 L einer $0,09 \text{ M}$ K_2SO_4 Lösung der k_La mit der dynamischen Sulfitmethode und der stationären Sulfitmethode bestimmt. Die dynamische Sulfitmethode lieferte einen maximalen k_La von etwa $0,4 \text{ s}^{-1}$, die stationäre Sulfitmethode von $0,7 \text{ s}^{-1}$ bei einer maximalen Drehzahl von 1200 min^{-1} (Poncin *et al.*, 2002). Die Durchführung der dynamischen Sulfitmethode erfolgte allerdings bei einer Katalysatorkonzentration CoSO_4 von nur 10^{-6} M , so dass die erzielten Werte unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse bei der Charakterisierung der dynamischen Sulfitmethode mit Luftbegasung deutlich zu niedrig liegen müssten. Dies erscheint bei Werten von $0,4 \text{ s}^{-1}$ jedoch äußerst unwahrscheinlich. Da weder die Art der $p\text{O}_2$ Messtechnik noch die Modellgleichung zur Auswertung der Aufsättigungskurven publiziert wurden, können die Daten nicht ausreichend beurteilt werden. Die stationäre Sulfitmethode wurde bei einer Katalysatorkonzentration von $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ durchgeführt, welche im Bereich der als korrekt angesehenen Konzentrationen liegt (Maier *et al.*, 2001a). Die in der Regel empfohlene Überprüfung der Reaktionskinetik um sicher zu stellen, dass im nicht-beschleunigten Bereich gemessen wird, wurde nicht durchgeführt (Linek und Vacek, 1981). Da von anderen Autoren maximale Katalysatorkonzentrationen von 10^{-7} M ermittelt wurden (Hermann *et al.*, 2001), können die Werte bis $0,7 \text{ s}^{-1}$ somit auch nicht zweifelsfrei als Vergleich herangezogen werden. Ein weiterer Bioreaktor mit einem Gas-induzierenden Rührsystem

wurde bei einem Reaktionsvolumen von 30 L bezüglich seiner Sauerstoffsorptionsleistung charakterisiert (Chen *et al.*, 2003). Mit einer Variante der Technik ‚B‘ der dynamischen Methode mit Sauerstoffbegasung, bei der zuerst Stickstoff zur Desorption verwendet und dann durch Evakuierung des Kopfgasraums entfernt wird, wurde ein maximaler $k_L a$ von $0,05 \text{ s}^{-1}$ in Leitungswasser ermittelt. Wiederum fällt ein Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Messbedingungen sowie der Variation einer etablierten $k_L a$ -Messmethode schwer. Zwei Laborbioreaktoren mit einem Reaktionsvolumen von 6,5 L bzw. 22,3 L destilliertem Wasser wurden bezüglich ihrer Oberflächenbegasungseigenschaften mit der Sulfit-Zudosier-Methode vermessen (Wu, 1995). Dabei wurde der 6-Blatt Schaufelrührer an der Flüssigkeitsoberfläche betrieben. Der kleinere Bioreaktor erzielte einen maximalen $k_L a$ von $0,24 \text{ s}^{-1}$ bei einem Leistungseintrag von 8 W L^{-1} , der größere Bioreaktor von $0,32 \text{ s}^{-1}$ bei 9 W L^{-1} . Diese Werte erscheinen für koaleszierende Bedingungen sehr hoch. Da die Sulfit-Zudosier-Methode bei einer Katalysatorkonzentration von 10^{-3} M CoSO_4 durchgeführt wurde, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Reaktionsbeschleunigung zu rechnen, so dass auch diese Ergebnisse nicht als Referenz herangezogen werden können.

Der erzielte $k_L a$ der Gas-induzierenden Rührsysteme kann somit nur mit volumenbegasteten Systemen der Literatur und den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Referenzmessungen unter Berücksichtigung der Messmethode verglichen werden. Der mit der Stickstoffdesorptionsmethode in volumenbegasteten Laborrührkesselreaktor erzielte $k_L a$ erreicht maximal $0,14 \text{ s}^{-1}$ (Dang *et al.*, 1977). Weitere Autoren geben den üblichen Arbeitsbereich von Laborrührkesseln mit $0,1 - 0,3 \text{ s}^{-1}$ (Middleton, 1985) bzw. mit bis $0,2 \text{ s}^{-1}$ an (Weuster-Botz, 1999). Diese Werte werden von den für den mL-Maßstab entwickelten Rührsystemen übertroffen. Auch der im Rahmen dieser Arbeit mit der Stickstoffdesorptionsmethode ermittelte Referenzwert von $0,15 \text{ s}^{-1}$ im Laborrührkesselreaktor liegt unter dem maximalen $k_L a$ von über $0,4 \text{ s}^{-1}$ der entwickelten Gas-induzierenden Rührsysteme im mL-Maßstab.

Im mL-Bioreaktor wurde zudem mit der Stickstoffdesorptionsmethode kein *small bubble* Effekt festgestellt. Zum einen kann dies auf den Drehzahlbereich zurückzuführen sein, der möglicherweise keinen ausreichenden Leistungseintrag ermöglicht um den *small bubble* Effekt zu erhalten. Dies muss keinesfalls bedeuten, dass der Leistungseintrag nicht in gleicher Höhe wie im Labormaßstab auftritt, da Linek *et al.* (1987) für sinkendes Reaktionsvolumen einen höheren Leistungseintrag bestimmte, ab dem der *small bubble* Effekt auftritt. Zum anderen kann der sich für die jeweilige Drehzahl einstellende Gasdurchsatz hoch genug ausfallen um *small bubbles* aus der Flüssigphase auszutreiben.

Auch andere zur Bioprozessentwicklung entwickelte Parallelsysteme wie beispielsweise Blasensäulen (Altenbach-Rehm *et al.*, 1999), Miniaturrührkesselreaktoren (Lamping *et al.*, 2003) und Mikrotiterplatten (Hermann *et al.*, 2003) erzielen geringeren $k_L a$. Da das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Reaktions-

system mL-Bioreaktor zudem mit geringem apparativen und finanziellen Aufwand mit Sauerstoff begast werden kann, liegt die maximal erreichbare Sauerstoffeintragsrate mit Sicherheit in einem Bereich, der zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung ausreichend ist.

4.4. Gestaltung des Reaktionsblocks

Unter Berücksichtigung der Dimensionen eines mL-Bioreaktors und des daraus resultierenden Gesamtgewichts des Reaktionsblocks wurde die Anzahl paralleler mL-Bioreaktoren auf 48 ausgelegt. Abbildung 41 zeigt den entwickelten Reaktionsblock auf dem Arbeitstisch des Pipettierroboters. Der gesamte Block ist 24 cm breit, 31 cm tief und 14 cm hoch. Sein Leergewicht beträgt 8,2 kg.

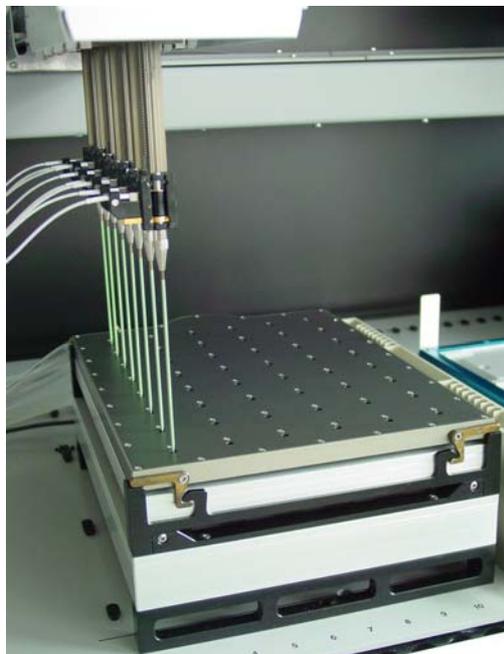


Abbildung 41: Photo des entwickelten Reaktionsblocks für 48 mL-Bioreaktoren auf dem Arbeitstisch des Pipettierroboters.

Im Querschnitt über einen Bioreaktorplatz (Abbildung 42) und im perspektivischen Querschnitt über acht Bioreaktorplätze des Reaktionsblocks (Abbildung 43) sind die Einzelkomponenten abgebildet. Auf einem Standfuß, dessen Höhe genügend Freiraum zur Positionierung eines Sensorblocks garantiert, ist die Antriebseinheit befestigt. Sie enthält die Komponenten des parallelen magnetisch-induktiven Rührantriebs zur Realisierung des schwebenden Betriebs der Rührorgane sowie

einen Wärmetauscher zur Temperierung der Reaktionsmedien in den mL-Bioreaktoren. Die mL-Bioreaktoren sind über Wärmekontakthülsen mit der

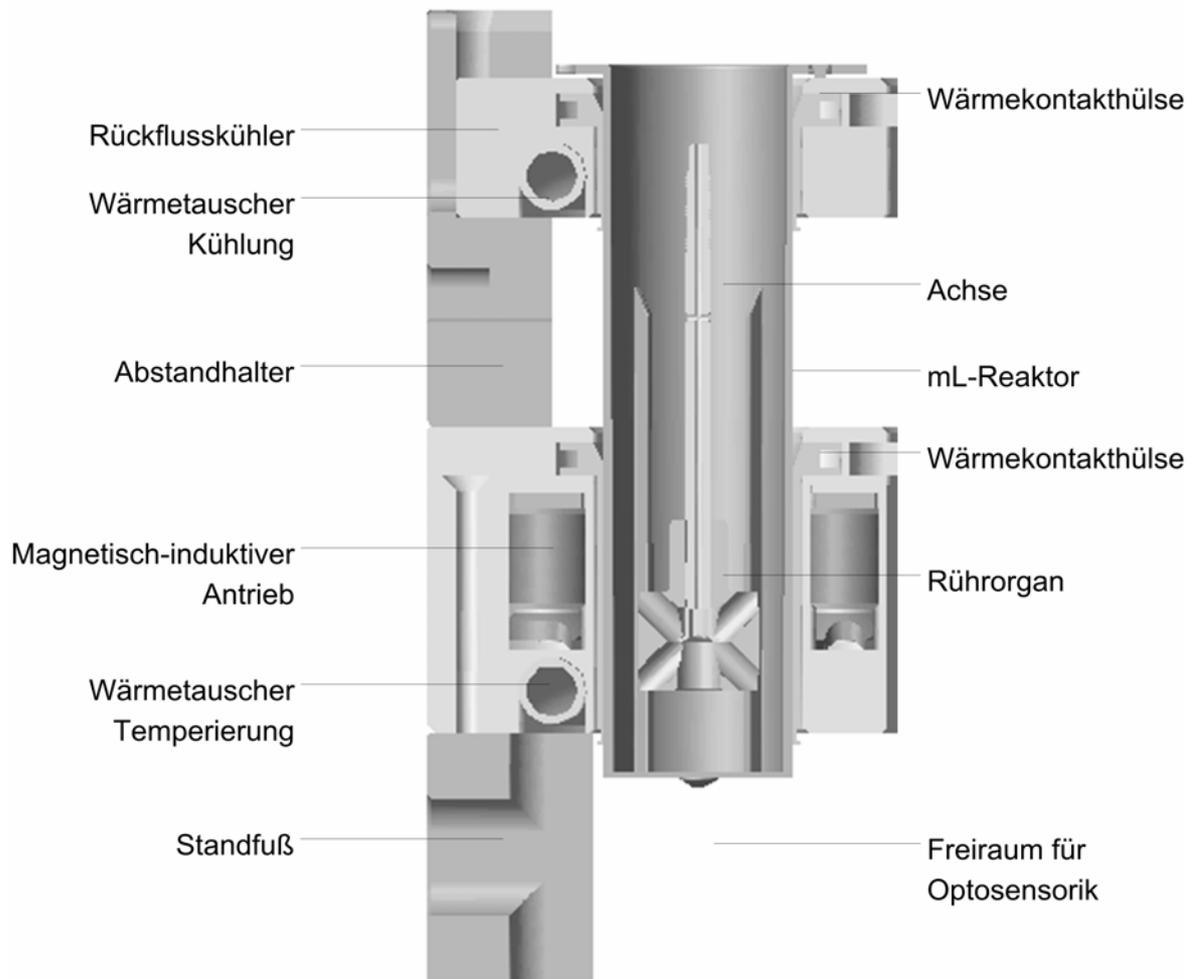


Abbildung 42: Querschnitt über einen Bioreaktorplatz des Reaktionsblocks für 48 mL-Bioreaktoren mit mL-Bioreaktor, Achse und Rührorgan B4 (Zur Verfügung gestellt von H+P Labortechnik).

Antriebseinheit verbunden. Die Differenz zwischen Block- und Reaktionstemperatur beträgt unter Berücksichtigung eines abgeschätzten maximalen mechanischen Leistungseintrags des Rührsystems und unter Vernachlässigung der Reaktionswärme einer Kultivierung unter 1 °C (Gleichungen 48 - 50, Anhang A). Eine reine Temperaturkontrolle basierend auf der Temperatur des Reaktionsblocks ist zur Temperierung der Reaktionsmedien ausreichend. Auf der Antriebseinheit ist ein Abstandhalter befestigt, der den Rückflusskühler so positioniert, dass nach Einbringen der mL-Bioreaktoren die auf den Hohlachsen gelagerten Rührorgane im optimalen Abstand über dem Reaktorboden betrieben werden. Die Achse ist am unteren Ende mit einer Aufweitung versehen, welche das Abgleiten des Rührorgans verhindert. Der Rückflusskühler enthält ebenfalls einen Wärmetau-

scher. Der Wärmeaustausch zwischen dem Kopfraum der mL-Bioreaktoren und dem Rückflusskühler wird erneut durch Wärmekontakthülsen optimiert. Der Betrieb des Rückflusskühlers bei 4 °C führt zu einer gravimetrisch bestimmten Verdunstungsrate von 87 +/- 8 $\mu\text{L h}^{-1}$ in gerührten mL-Bioreaktoren mit 10 mL destilliertem Wasser. Die mL-Bioreaktoren wurden bei 2500 min^{-1} mit dem Rührsystem B4 durchmischt.

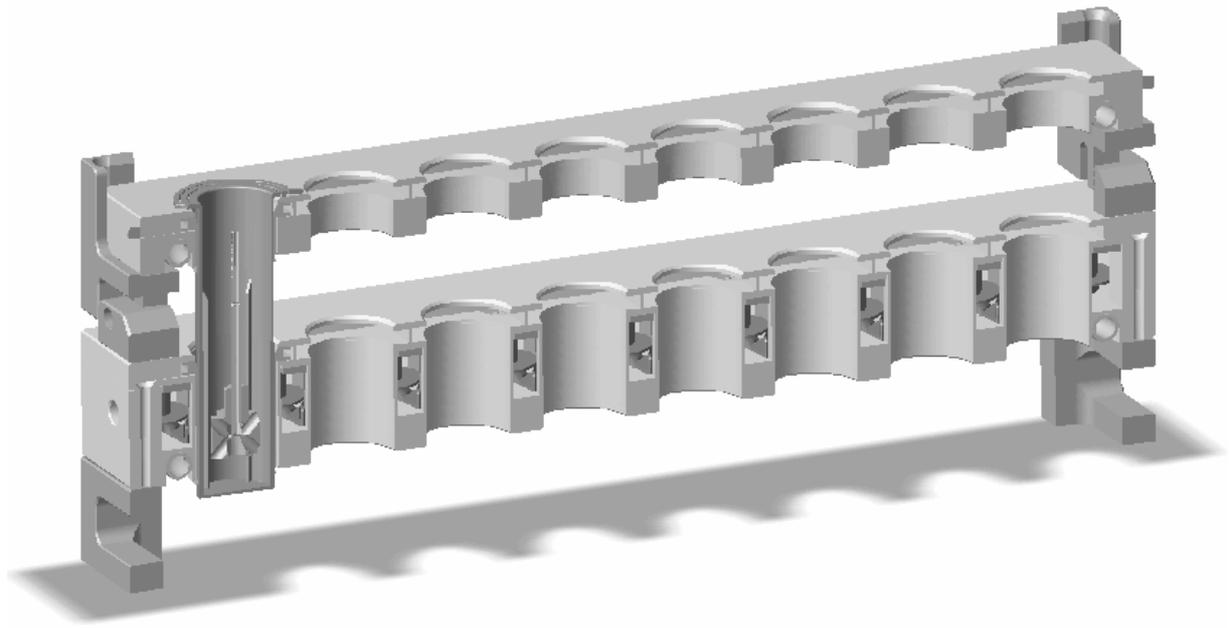


Abbildung 43: Perspektivischer Querschnitt über acht Bioreaktorplätze des Reaktionsblocks für 48 mL-Bioreaktoren. Auf der äußerst linken Position ist ein mL-Bioreaktor mit Achse und Rührorgan B4 abgebildet (Zur Verfügung gestellt von *H+P Labortechnik*).

4.5. Sterilgasabdeckung

4.5.1. Gestaltung der Sterilgasabdeckung

Die Sterilgasabdeckung (Abbildung 44 und Abbildung 45) besitzt ein Leergewicht von 1,9 kg und wird mit dem Reaktionsblock über einen Klemmhebelmechanismus verbunden. Dabei wird die Dichtfläche gegen die Innenkante der Öffnung der mL-Bioreaktoren gepresst. Der aus der Sterilgasabdeckung nach unten in die mL-Bioreaktoren hineinragende Teil ist als Gasverdränger ausgestaltet, so dass das feuchte Abgas an der Gefäßwand entlang geführt wird, bevor es den Kopfgasraum über den Gasauslass verlässt. Dadurch wird die Kondensation an der gekühlten Reaktorwand verstärkt.

Der Gasverdränger enthält ebenfalls den Begasungskanal, durch den das dem Deckel zentral zugeführte, sterile Prozessgas in den mL-Bioreaktor eindringt.

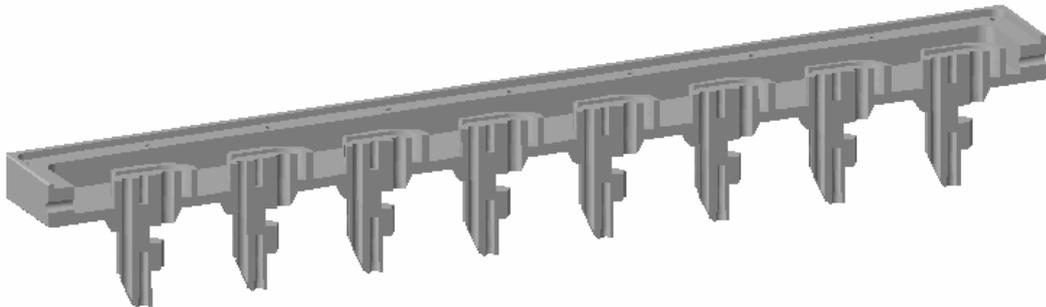


Abbildung 44: Perspektivischer Querschnitt über acht Bioreaktorplätze der offenen Sterilgasabdeckung für 48 mL-Bioreaktoren (Zur Verfügung gestellt von *H+P Labortechnik*).

Außerdem ist eine Zentrierbohrung zur Aufnahme der Achse angebracht. Das entfeuchtete Abgas entweicht schließlich aus dem Kopfgasraum über den Gasauslass, welcher gleichzeitig als Zugang für die Pipettieradeln dient. Bei Begasung stellt sich eine konstante Konvektion aus dem Kopfgasraum in die Umgebungsluft ein.

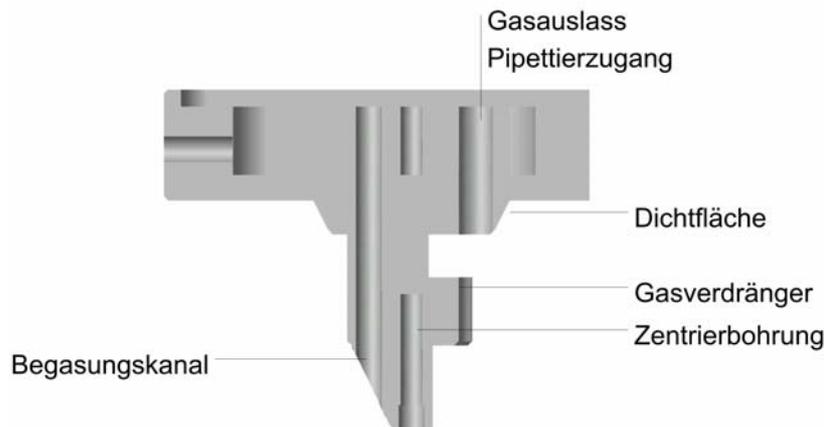


Abbildung 45: Querschnitt über einen Bioreaktorplatz der Sterilgasabdeckung für 48 mL-Bioreaktoren (Zur Verfügung gestellt von *H+P Labortechnik*).

4.5.2. Funktionsprüfung (Steriltests)

Da es sich bei den mL-Bioreaktoren mit Sterilgasabdeckung nicht um ein geschlossenes System handelt, wurde die Aufrechterhaltung steriler Prozessbedingungen gesondert untersucht. Einerseits können Kontaminanten aus der Umgebungsluft durch die Pipettieröffnungen ins Innere der mL-Bioreaktoren

gelangen. Zweitens können sich nach der Desinfektion Keime an die Pipettiernadeln heften, wenn sich diese auf dem Weg von der Waschstation zu den jeweiligen mL-Bioreaktoren befinden. Bei einem folgenden Pipettiervorgang würden diese Keime möglicherweise ins Innere der mL-Bioreaktoren eingeschleppt.

Um die Kontamination durch Keime aus der Umgebungsluft ausschließen zu können, wurden acht Reaktoren mit sterilem LB-Medium bei 30 °C und einem Gasvolumenstrom am Eingang des Sterilgasdeckels von 0,8 L min⁻¹ steriler Luft in herkömmlicher Laboratmosphäre betrieben. Reaktor 8 wurde zu Beginn als positive Kontrolle mit *E. coli* angeimpft. Die Reaktoren 1 - 7 sind nach 96 h Versuchsdauer nicht bewachsen. Die Sterilität dieser Reaktoren wurde durch Ausplattieren von Proben auf Agarplatten und 48 h Inkubation bei 30 °C nachgewiesen. Zur Verifizierung der Medienqualität wurden auch die Reaktoren 1 – 7 nach 72 h mit *E. coli* inokkuliert. Nach weiteren 16 h Inkubation waren die Reaktoren ebenfalls trübe bewachsen. Ein Eindringen von Keimen aus der Umgebungsluft kann somit ausgeschlossen werden.

Das Einschleppen von Keimen aus der Umgebung durch die Pipettiernadeln wurde in einem Sterilttest mit Probenahme geprüft. Nach 12 Probenahmen mit einem Zeitintervall von 2 h wurde nach weiterer Inkubation von 30 h kein Wachstum in den Versuchsansätzen festgestellt. Die Pipettiernadeln haben folglich keine Kontaminanten eingeschleppt.

Das Multipipettieren, d.h. die Flüssigkeitsaufnahme zur Zudosierung zu mehreren Reihen mL-Bioreaktoren nacheinander ohne zwischenzeitliches Sterilisieren der Pipettiernadeln, führte grundsätzlich zur Kreuzkontamination, wenn die Pipettiernadeln zuerst im Kopfraum eines inokkulierten und danach im Kopfraum von sterilen Reaktoren Zudosierlösung abgaben. Dieser Pipettiermodus kann somit nicht angewendet werden.

4.6. Pipettierroboter

4.6.1. Gesamtanlage

Zur automatisierten Durchführung von Kultivierungen im mL-Maßstab wurde der Reaktionsblock (1) auf der Arbeitsfläche des Pipettierroboters integriert (Abbildung 46). Der Pipettierarm (2) des Pipettierroboters führt die Zudosierung und die Probenahme aus den mL-Bioreaktoren durch. Entnommene Proben werden auf einer Mikrotiterplatten-Kühlstation in Proben-Mikrotiterplatten (3) pipettiert. Die Proben-Mikrotiterplatten werden vom Greifarm (4) des Pipettierroboters zum Mikrotiterplatten-Photometer (5) transportiert, in dem *atline* der *pH* und die optische Dichte bestimmt werden. Nach Reinigung in einem Mikrotiterplatten-

Waschgerät (6) wird die Proben-Mikrotiterplatte zur Aufnahme neuer Proben wieder auf der Mikrotiterplatten-Kühlstation bereitgestellt.

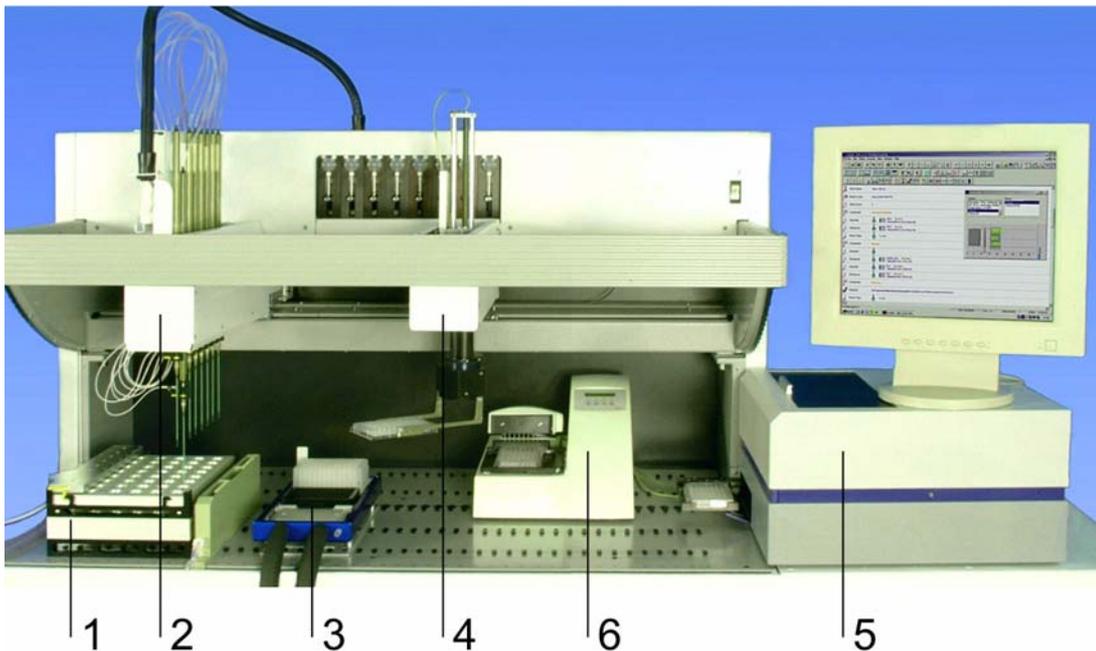


Abbildung 46: Aufbau der Gesamtanlage zur Automatisierung von Parallelkultivierungen im mL-Maßstab. (1) Reaktionsblock. (2) Pipettierarm. (3) Mikrotiterplatten-Kühlstation. (4) Greifarm für Mikrotiterplatten. (5) Mikrotiterplatten-Photometer. (6) Mikrotiterplatten-Waschgerät.

4.6.2. Pipettiergenauigkeit des Pipettierroboters

Als Folge der parallelen Dosierstrategie im mL-Maßstab können die Vorlagegefäße nicht wie bei Kultivierungen im Laborrührkesselreaktor einzeln auf Waagen platziert werden, um die dosierten Mengen an Titrationsmittel und Zudosierlösung *online* zu messen. Deshalb ist eine Evaluierung der Pipettiergenauigkeit des Pipettiersystems für die zum Einsatz kommenden Lösungen notwendig.

Für die Lösungen destilliertes Wasser, 4 M NaOH, Glukose mit Konzentrationen von 250 g L^{-1} und 475 g L^{-1} und Glycerin mit 400 g L^{-1} liegt die Abweichung für Pipettiervolumina ab $1 \mu\text{L}$ unter 4,7 % vom Sollwert (Abbildung 47). Die Glycerinlösung mit einer Konzentration von 600 g L^{-1} lässt sich bei einem Pipettiervolumen von $1 \mu\text{L}$ mit einer Genauigkeit von 7 % pipettieren. Beschränkt man das minimale Pipettiervolumen auf $2 \mu\text{L}$, liegt die Pipettiergenauigkeit aller untersuchten Lösungen außer destilliertem Wasser unter 3,1 %. Die Standardabweichungen der Genauigkeit sinken in der Regel mit steigendem Pipettiervolumen von $1 \mu\text{L}$ auf $10 \mu\text{L}$ von maximal 9,7 % auf Werte unter 2,7 %. Die ebenfalls zur Titration während Kultivierungen eingesetzten NH_4OH Lösungen mit einer Konzentration von 2,5 und 7,5 % (v/v) konnten mit der Standardflüssigkeitsklasse „Wasser“ ohne

weitere Optimierung zufrieden stellend pipettiert werden. Die etablierten Flüssigkeitsklassen und Kalibrierfaktoren sind im Anhang D aufgelistet.

Das Pipettiersystem wird des Weiteren zur Probenahme eingesetzt, so dass ebenfalls die Pipettiergenauigkeit von zellhaltigem Medium evaluiert wurde. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass selbst bei den angestrebten Volumina von 20 - 50 μL das Schlagventil des Pipettierroboters eingesetzt werden muss. Dieses Ventil führt eine Hubbewegung auf den Pipettierschlauch nach Abgabe des Volumens aus, um Tropfen von den Pipettiernadeln abzulösen. Das Ablösen eines

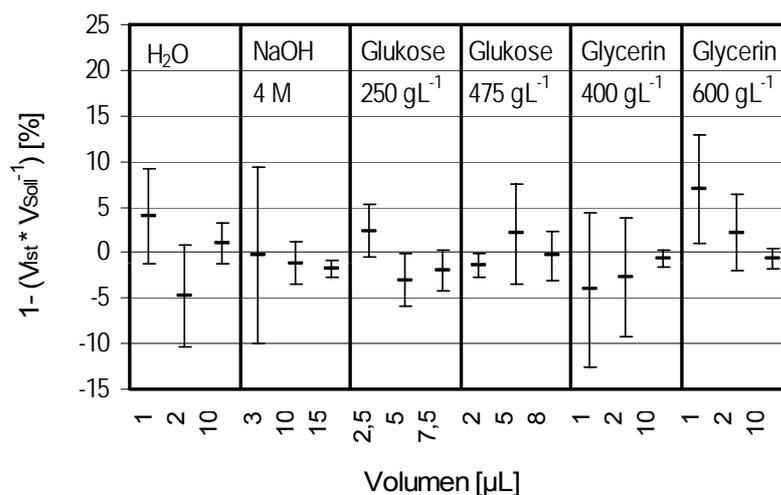


Abbildung 47: Pipettiergenauigkeit für verschiedene Pipettiervolumina verschiedener Lösungen, welche bei Kultivierungen im Mineralmedium zum Einsatz kommen. Angegebene Werte sind Mittelwerte aus je 15 Pipettierschritten pro Pipettierstrecke ($n_i = 120$).

Tropfens von der Pipettiernadel in die Probenahme-Mikrotiterplatte wird zusätzlich durch das so genannte Kontaktpipettieren erleichtert. Dazu wird die Abgabeposition innerhalb der Kavitäten so definiert, dass nach Abgabe des Tropfens aus der Pipettiernadel dieser Kontakt zum Boden der Kavität der Mikrotiterplatte bekommt und daran adsorbiert. Für das Pipettieren der Proben wird zudem auf eine kapazitive Flüssigkeitsdetektion zurückgegriffen, um ein unnötig tiefes Eintauchen der Pipettiernadeln in das Medium zu vermeiden. Durch sehr tiefes Eintauchen würde eine unnötig große Fläche der Außenwand der Pipettiernadeln kontaminiert und dementsprechend die Sterilisierung der Pipettiernadeln zwischen den einzelnen Pipettierschritten erschwert.

Abbildung 48 zeigt die Pipettiergenauigkeit für verschiedene Volumina und Drehzahlen bei der Probenahme aus mL-Bioreaktoren mit 20,0 mm Innendurchmesser, welche vom Rührsystem B2 durchmischt werden. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte für zwei Pipettierstrecken und je sieben Pipettiervorgänge ($n_i = 14$).

Für alle untersuchten Volumina wurde für Drehzahlen des Rührers bis 2200 min^{-1} eine Genauigkeit von über 5,5 % erzielt. Mit steigendem Probenahmevermögen

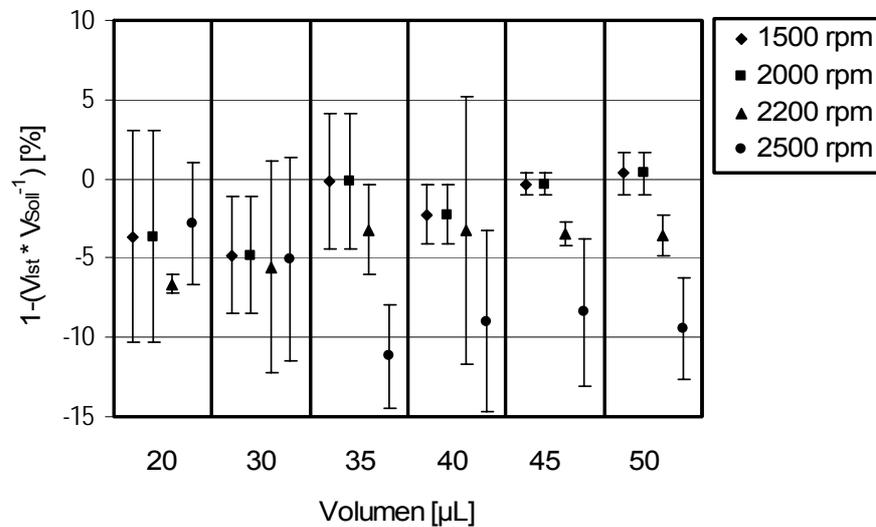


Abbildung 48: Pipettiergenauigkeit bei der Pipettierung von zellhaltigem Medium. Angegebene Werte sind Mittelwerte für zwei Pipettierstrecken und je sieben Pipettiervorgänge ($n_i = 14$).

werden geringere Standardabweichungen ermittelt. Bei der höchsten evaluierten Drehzahl von 2500 min^{-1} wird deutlich weniger pipettiert als bei geringeren Drehzahlen. Die Standardabweichungen verringern sich mit steigendem Volumen nicht.

4.6.3. Diskussion

Laut Herstellerangaben ist für wässrige Lösungen mit dem Pipettierroboter mit der *low volume* Option für ein Pipettiervolumen von $1 \mu\text{L}$ eine Standardabweichung von unter 10 %, bei einem Pipettiervolumen von $10 \mu\text{L}$ eine Standardabweichung von unter 1 % zu erreichen. Diese maximale Standardabweichung bezieht sich auf die Durchführung eines Standardtests, welcher 15 Pipettierschritte pro Pipettierstrecke, also insgesamt 120 Pipettierschritte umfasst. Diese Vorgaben wurden für ein Pipettiervolumen von $1 \mu\text{L}$ experimentell bestätigt. Für $10 \mu\text{L}$ Pipettiervolumen blieb die Standardabweichung allerdings bereits für Wasser bei 2,3 %. Da die Standardabweichungen für die beiden untersuchten Glycerinlösungen bei $10 \mu\text{L}$ Pipettiervolumen unter 1,2 % lagen, scheint der Gerätezustand einen weit größeren Einfluss auf die Pipettiergenauigkeit zu haben, als die Eigenschaften der Lösungen. Eine regelmäßige Wartung und Reinigung der Pipettiernadeln und Pipettierstrecken ist essentiell um gleich bleibend geringe Standardabweichungen der Pipettierschritte zu erzielen.

Der Hersteller garantiert nicht für die Genauigkeit der Pipettierschritte, da diese über eine Kalibrierfunktion in den jeweiligen Liquidklassen in der Gerätesoftware angepasst werden kann. Abweichungen der Pipettiergenauigkeit von unter 5 % konnten in der Regel durch einmaliges Anpassen der Kalibrierfunktion erzielt werden. Bei viskosen Lösungen wie beispielsweise den Glycerinlösungen ist die Abgabegeschwindigkeit erhöht worden, um den Tropfenabriss zu optimieren und dadurch geringere Standardabweichungen zu erzielen. Je nach Gerätenutzung ist jedoch eine Neukalibrierung in regelmäßigen Zeitabständen von maximal drei Monaten empfehlenswert.

Das Pipettieren von zellhaltigem Mineralmedium ist für hohe Volumina und geringe Drehzahlen durch geringe Abweichung vom Sollwert charakterisiert. Jedoch wird bei steigenden Drehzahlen eine höhere Standardabweichung erhalten und deutlich weniger pipettiert. Höchstwahrscheinlich werden bei hohen Drehzahlen durch den resultierenden höheren Gasgehalt und geringeren mittleren Gasblasendurchmesser Gasblasen mit in die Pipettiernadeln aufgezogen. Dort koaleszieren sie mit der Systemluftblase, welche das Pipettiergut von der Systemflüssigkeit trennt. Folglich wird ein geringeres Volumen abgegeben als aufgenommen wurde. Dies bedeutet, dass Gasblasen mit einem Durchmesser existieren, der unter dem Innendurchmesser der Pipettiernadeln von 0,4 mm liegt. Die Pipettierfehler bis zu 10 % werden vermieden, indem ein größeres als das gewünschte Volumen in eine Reihe der Proben-Mikrotiterplatte pipettiert wird. Aus diesen Kavitäten wird anschließend eine Probe ohne Gasgehalt mit geringerem Volumen zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen.

4.7. Atline Prozesskontrolle

4.7.1. pH-Messung

Hydroplates (Presens) sind Standard-Mikrotiterplatten, welche am Boden der Kavitäten immobilisierte Sensoren enthalten. Diese Sensoren bestehen aus einer organischen Matrix, in der Fluorophore gelöst sind. Die Verwendung der *Hydroplate HP96T* mit transparenter organischer Matrix erlaubt transmissive Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in derselben Kavität. Als Folge dessen kann mit dieser Mikrotiterplatte mehr Messinformation pro Probenvolumen generiert werden. Bei transmissiver Messung werden die Fluoreszenzintensitäten des Indikator- und des Referenzfluorophors vom Probenvolumen und der Zellkonzentration der Probe beeinflusst. Das variierende Probenvolumen führt zu nicht vorhersagbaren Streuungs- und Fokussierungseffekten am Meniskus. Die steigende Zellkonzentration führt zur Streuung des Anregungs- und Emissionslichts. Da aufgrund ihrer unterschiedlichen Emissionswellenlängen die Fluoreszenzintensitäten beider Fluorophore nicht gleich beeinflusst werden, ist der Einfluss auf den Quotienten I_{pH}

(Fluoreszenzintensität des Indikators bezogen auf Referenz) nicht vorhersagbar und kann deshalb nicht durch mathematische Operationen oder Referenzmessungen für beispielsweise die Biotrockenmasse korrigiert werden.

Um Fluoreszenzmessungen unabhängig von den Eigenschaften der Lösung durchführen zu können, muss das Anregungslicht von unten in die Kavität eingestrahlt werden und die Emission ebenfalls unter der Kavität ausgelesen werden. Diese Reflexionsmessung ist am verwendeten Photometer nach manueller Umstellung auf ein spezielles Lichtleiterpaar durchführbar. Um eine automatisierte Umschaltung zwischen transmissiven Absorptions- und Reflexions-Fluoreszenzmessungen durchführen zu können, wurde ein per serieller Schnittstelle ansteuerbarer Elektromotor in das Photometer integriert.

Zur Reduzierung der notwendigen Probenmenge wäre es vorteilhaft, die pH -Messung mit möglichst geringem Volumen pro Kavität durchführen zu können. Mit Volumina von 5 μL bis zu dem vom Hersteller empfohlenen Volumen von 200 μL wurden Kalibrierungen durchgeführt (Abbildung 49). Die relative Standardabweichung liegt für alle Volumina unter 4,4 %. Im für *E. coli* Kultivierungen interessanten Bereich von pH 6 - 7 liegen die relativen Standardabweichungen unter 2,8 %.

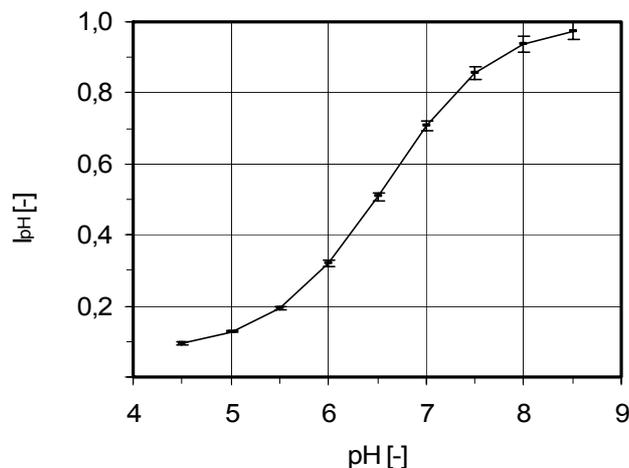


Abbildung 49: Einfluss des Volumens eingesetzter Standardlösung auf die Kalibrierfunktion der *Hydroplate HP96T*. Die referenzierten Fluoreszenzintensitäten I_{pH} sind Mittelwerte aus Kalibrierungen mit den Volumina 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 90 und 200 μL der Standardlösungen. Gemessen wurde je Volumen mit Pufferlösungen der pH -Werte 5,03, 6,00, 6,98 und 8,01.

Bei Mehrfachbestimmungen in unbenutzten, im Dunkeln gelagerter *Hydroplates HP96T* wurden relative Standardabweichungen von unter 0,3 - 1 % gemessen. Bei Einsatz zur *atline* Analytik wird die *Hydroplate HP96T* notwendigerweise dem Tageslicht ausgesetzt und mit einer Frequenz von 1 h^{-1} im Mikrotiterplatten-

Waschgerät gesäubert. Sowohl das Ausbleichen als auch das Ausbluten des Sensors kann somit die pH -Messungen über der Prozesszeit beeinflussen.

Abbildung 50 zeigt den Verlauf der mittleren relativen Standardabweichung (C.V.) von Dreifachbestimmungen des pH für sieben parallele mL-Bioreaktoren während einer Kultivierung von *E. coli*. Die *Hydroplate HP96T* wurde nach jeder Messung

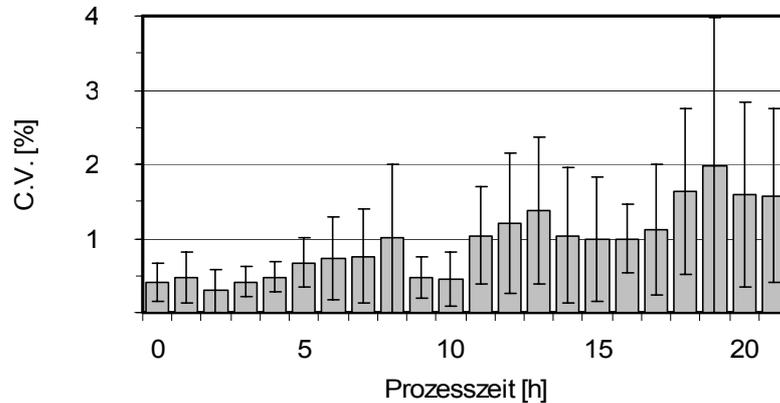


Abbildung 50: Relative Standardabweichung (C.V.) von Dreifachbestimmungen des pH mit der *Hydroplate HP96T* während einer Kultivierung von *E. coli* in sieben parallelen mL-Bioreaktoren.

im Mikrotiterplatten-Waschgerät gesäubert. Innerhalb von 21 Stunden steigt die mittlere relative Standardabweichung von 0,4 % auf 2 % an. Die Fehlerbalken

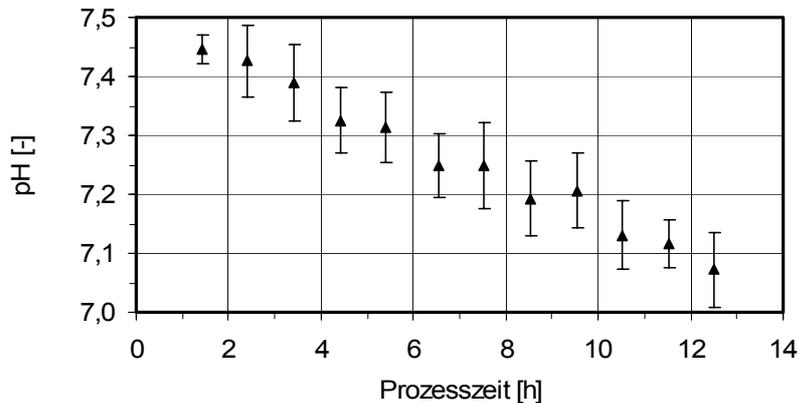


Abbildung 51: pH eines als Kontrolle eingesetzten physiologischen Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4) im Verlauf einer Kultivierung. Messungen erfolgten mit der *Hydroplate HP96T*.

repräsentieren die Standardabweichung der Werte der sieben parallelen mL-Bioreaktoren. Während der Kultivierung wurde ein mL-Bioreaktor zur Kontrolle der pH -Messung mit einem physiologischen Phosphatpuffer (PBS, $pH = 7,4$) gefüllt. Der pH in diesem Reaktor nimmt scheinbar im Verlauf der Messungen ab

(Abbildung 51). Kontrollmessungen mit einer Miniatur-*pH*-Elektrode zeigten einen konstanten *pH* Wert.

Bei längerem Gebrauch werden unter Verwendung der zu Beginn der Kultivierung bestimmten Kalibrierfunktion zu geringe *pH*-Werte gemessen. Eine mögliche Ursache ist das Ausbleichen der Sensoren, welches zu abnehmenden relativen Fluoreszenzintensitäten I_{pH} führt. Mehrfache Kalibrierungen derselben *Hydroplate HP96T* im Verlauf ihrer Nutzungsdauer bestätigen diese Annahme, da die Kalibrierfunktion mit der Nutzungsdauer abflacht (Abbildung 52). Ohne stetige Nachkalibrierung werden folglich mit den steileren Kalibrierfunktionen zu niedrige *pH*-Werte bestimmt.

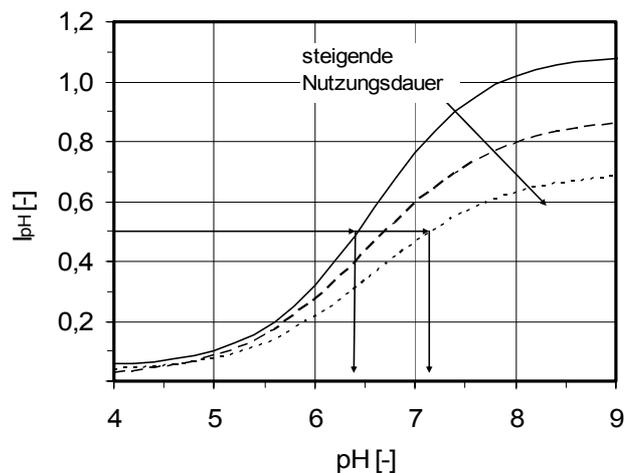


Abbildung 52: Kalibrierfunktion der *Hydroplate HP96T* als Funktion der Nutzungsdauer. Zwischen je zwei aufeinander folgenden Kalibrierungen wurde die *Hydroplate* in einer Fermentation über 20 h eingesetzt.

Laut Herstellerangaben beeinflusst die Ionenstärke im Bereich 0 - 100 mM die *pH*-Messung mit dem in der *Hydroplate HP96T* verwendeten Sensor. Da Kultivierungsmedien in der Regel höhere Ionenstärken aufweisen, wurden die Kalibrierfunktionen für Standardlösungen mit Ionenstärken von 150, 200, 323 und 581 mM verglichen (Abbildung 53).

Im Bereich $pH = 6 - 8$ liegt der Mittelwert der relativen Standardabweichung bei 3,8 %. Das Maximum der relativen Standardabweichung liegt bei 7,1 %. Um Messfehler zu minimieren sollte die Kalibrierung folglich bei der Ionenstärke des jeweiligen Mediums erfolgen.

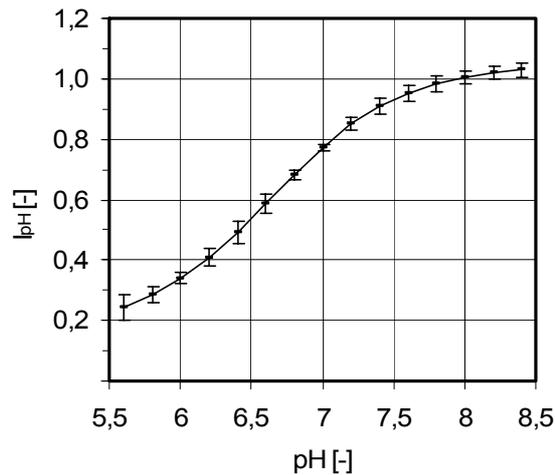


Abbildung 53: Einfluss der Ionenstärke der eingesetzten Standardlösungen auf die Kalibrierfunktion der *Hydroplate HP96T*. Die referenzierten Fluoreszenzintensitäten I_{pH} sind Mittelwerte aus Kalibrierungen mit Standardlösungen der Ionenstärken 150, 200, 323 und 581 mM ($n_i = 4$).

Aufgrund des starken Einflusses des Ausbleichens der *Hydroplate HP96T* wurde die *Hydroplate HP96L* getestet. Die Sensoren dieser Hydroplate enthalten zusätzlich zum Indikator- und Referenzfluorophor eine optische Isolierschicht, welche eine Interferenz zwischen Lichtemission der Probe in der Kavität und dem Sensor verhindert. Die *Hydroplate HP96L* zeigte im Rahmen der Messgenauigkeit keine Drift über der Lebensdauer. Der Sensor ist folglich durch die optische Isolierung vor dem Ausbleichen geschützt. Die optische Isolierung verhindert jedoch die transmissive Messung der Absorption in denselben Kavitäten, welche zur pH -Messung verwendet werden. Für Mehrfachbestimmungen ist somit ein größeres Probenvolumen notwendig. In Kultivierungen wird folglich eine Probe in eine Reihe mit Sensoren abgegeben. Daraus wird ein definiertes Volumen entnommen und in Kavitäten der Proben-Mikrotiterplatte ohne Sensoren zur Absorptionsmessung pipettiert.

4.7.2. Optische Dichte

Die Etablierung einer automatisierten Abschätzung der Biotrockenmasse während den Kultivierungen im mL-Maßstab wird durch eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte in der Proben-Mikrotiterplatte realisiert. Der Zusammenhang zwischen OD_{650} im Mikrotiterplatten-Photometer und der Biotrockenmasse kann, wie im Einstrahlphotometer üblich, mit linearer Regression genähert werden (Abbildung 54). Man erhält einen maximalen Messbereich von $0,07 - 0,61 \text{ g L}^{-1}$ ($0,08 - 0,72 \text{ OD-Einheiten}$) bei einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,987$. Die nach der

Biotrockenmasse aufgelöste Korrelationsgleichung lautet bei einem Messvolumen von 200 μL :

$$BTM = 0,84 \cdot OD \quad (45)$$

Die Ausbildung des konkaven Meniskus führt zu einer geringeren Lichtdurchgangsstrecke bei gegebenem Gesamtvolumen der Messung. Eine Steigerung des Gesamtvolumens bei gleichem Probevolumen führt deshalb zu einer geringfügigen Erhöhung der Steigung der linearen Regressionsgeraden, da die Verkleinerung der Lichtdurchgangsstrecke aufgrund der Meniskusbildung relativ zur Gesamtlichtdurchgangsstrecke abnimmt.

Eine hohe Steigung der Regressionsgeraden ist vorteilhaft, da die Fehler auf die Abschätzung der Biotrockenmasse durch Messungenauigkeiten der optischen Dichte minimiert werden. Des Weiteren führt eine Maximierung der Gesamtlichtdurchgangsstrecke zu geringeren Standardabweichungen der OD-Bestimmung. Folglich ist die Messung in hohem Gesamtvolumen vorteilhaft.

Durch Näherung der Korrelation zwischen OD_{650} im Mikrotiterplatten-Photometer und der Biotrockenmasse mit einem Polynom zweiten Grades kann der Messbereich auf $0,07 - 2,4 \text{ g L}^{-1}$ ($0,08 - 1,74$ OD-Einheiten) bei einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,995$ erhöht werden. Die nach der Biotrockenmasse aufgelöste Korrelationsgleichung lautet:

$$BTM = 3,02 - \sqrt{9,13 - \frac{OD}{0,20}} \quad (46)$$

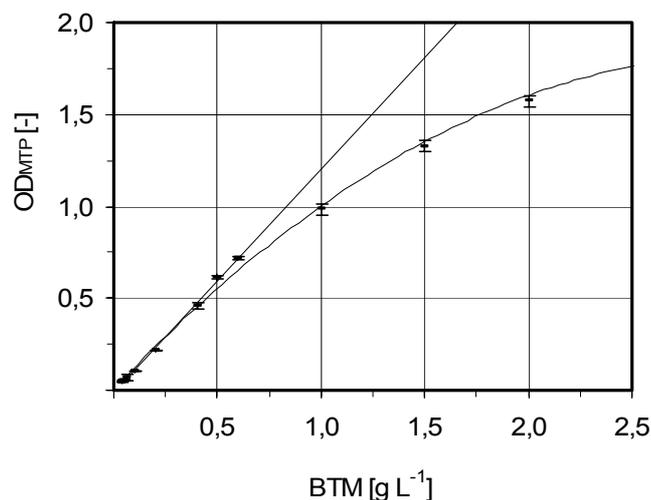


Abbildung 54: Zusammenhang zwischen OD_{650} gemessen im Mikrotiterplatten-Photometer und der Biotrockenmassekonzentration (BTM). Näherung mit linearer Regression und einem Polynom zweiten Grades.

4.7.3. Diskussion

Der vom Hersteller genannte Einfluss der Ionenstärke des Mediums auf den Sensor wirkt sich im Bereich der Ionenstärken typischer Kultivierungsmedien nicht wesentlich auf die *pH*-Messungen aus. Aufgrund der sehr geringen erzielten Standardabweichungen von Mehrfachbestimmungen von unter 1 % einer unbenutzten Mikrotiterplatte bis zu 4 % einer Mikrotiterplatte, welche in einem Prozess evaluiert wurde, kann auf Mehrfachbestimmungen verzichtet werden, um Probenvolumen einzusparen.

Die Bestimmung der optischen Dichte im Mikrotiterplatten-Photometer einer verdünnten Probe und die Korrelation zur Biotrockenmasse über ein Polynom zweiten Grades ermöglichen einen weitaus größeren Messbereich als eine lineare Korrelation. Lineare Korrelationen werden lediglich bei manueller Messung im Labor bevorzugt, da eine weitere Verdünnung für eine Messung im Einstrahlphotometer in der Regel schneller hergestellt werden kann, als eine komplizierte Berechnung der Biotrockenmasse mit Polynomfunktionen. Da weder die lineare noch die Korrelationen mit einem Polynom zweiten Grades dem realen Zusammenhang entsprechen und zudem das Prozesskontrollsystem die Umrechnung von optischer Dichte zu Biotrockenmasse durchführt, spielt die Komplexität der Korrelation nur eine untergeordnete Rolle. Eine Evaluierung der Güte der Umrechnung anhand des Bestimmtheitsmaßes bestätigt, dass die Polynomfunktion zweiten Grades durchaus eingesetzt werden kann.

4.8. Referenzkultivierungen

4.8.1. Satzkultivierung in der gerührten Blasensäule

Zur Bestimmung der Wachstumseigenschaften wurde *E. coli* in einer Blasensäule mit integriertem Rührorgan und Strömungsbrechern bei 37 °C, 500 min⁻¹ Rührerdrehzahl und einer Belüftungsrate von 0,5 min⁻¹ kultiviert (Abbildung 55). Die Kultivierung fand im Mineralmedium mit einer Ausgangsglukosekonzentration von 12 g L⁻¹ statt. Der Umrechnungskoeffizient zwischen der im Einstrahlphotometer gemessenen optischen Dichte und der Biotrockenmasse wurde zu 0,58 g OD⁻¹ bestimmt. Aus der logarithmischen Auftragung der Biotrockenmasse über die Zeit wurde eine maximale Wachstumsrate von $\mu = 0,54 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$) für das exponentielle Wachstum bestimmt, welches nach einer lag-Phase von etwa 1 h einsetzte. Der vollständige Verbrauch der Glukose im Reaktor wird durch einen abrupten *pO*₂-Anstieg angezeigt. Der danach auftretende geringe *pO*₂-Abfall bei *t*_P = 5,4 h deutet auf die Verstoffwechslung der gebildeten Nebenprodukte hin. Nach 5,5 h steigt der *pO*₂ nochmals an. Aufgrund des relativ hohen *pO*₂ ist dieser Anstieg, welcher abermals eine reduzierte Sauerstoffaufnahme und damit den

Verbrauch der Nebenprodukte anzeigt, kaum erkennbar. Der integrale Biomasseertragskoeffizient Y_{XS} ergibt sich zu $0,53 \text{ g g}^{-1}$. Während der Prozesszeit 0,9 - 1,9 h wurde eine k_La -Bestimmung durchgeführt. Die erhaltenen Daten sind nicht dargestellt.

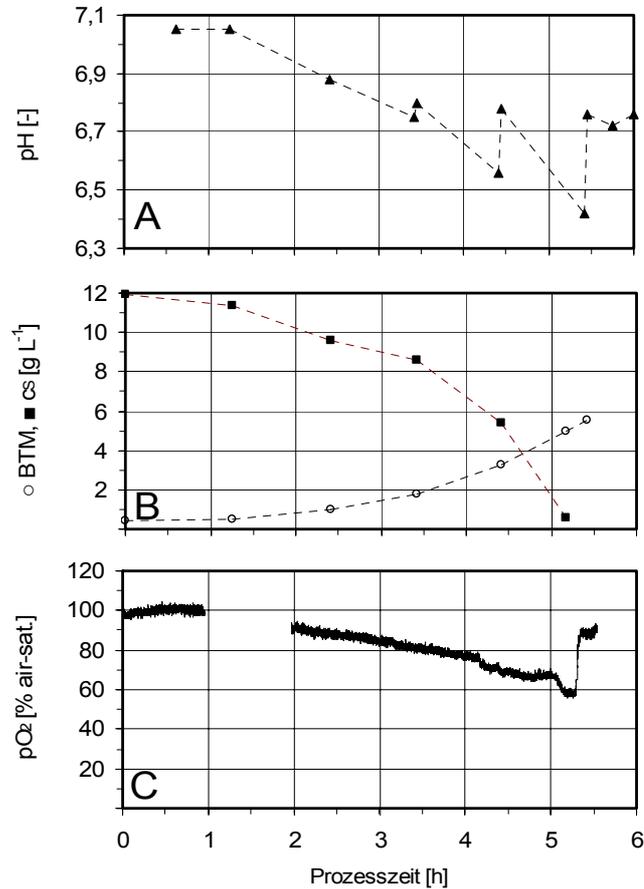


Abbildung 55: Satzkultivierung von *E. coli* in der gerührten Blasensäule in definiertem Mineralmedium. (A) Verlauf des pH bei manueller, intermittierender Regelung auf $pH = 6,8$. (B) Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (BTM) und der Glukosekonzentration c_s . (C) Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 .

4.8.2. Zulaufkultivierung im Laborrührkesselreaktor

Zur Bestimmung der Wachstumseigenschaften von *E. coli* im Laborrührkesselreaktor wurde eine Referenzkultivierung im 3 L-Maßstab durchgeführt (Abbildung 56).

Die Wachstumsrate während der exponentiellen Wachstumsphase betrug $0,57 \text{ h}^{-1}$. Der integrale Biomasseertragskoeffizient Y_{XS} lag bei $0,49 \text{ g g}^{-1}$. Der Verbrauch der Ausgangsglukosekonzentration bei einer Prozesszeit von 7,2 h wird durch einen abrupten Anstieg des pO_2 angezeigt. Danach folgt eine kurze Phase der Verstoff-

wechselung der im Satzbetrieb produzierten Stoffwechselnebenprodukte. Während dieser Phase steigt der pH leicht an, da die Regelung nur einseitig erfolgt. Nach der Verstoffwechslung der Nebenprodukte, welche durch den zweiten pO_2 -Anstieg angezeigt wird, wurde die intermittierende Zudosierung bei

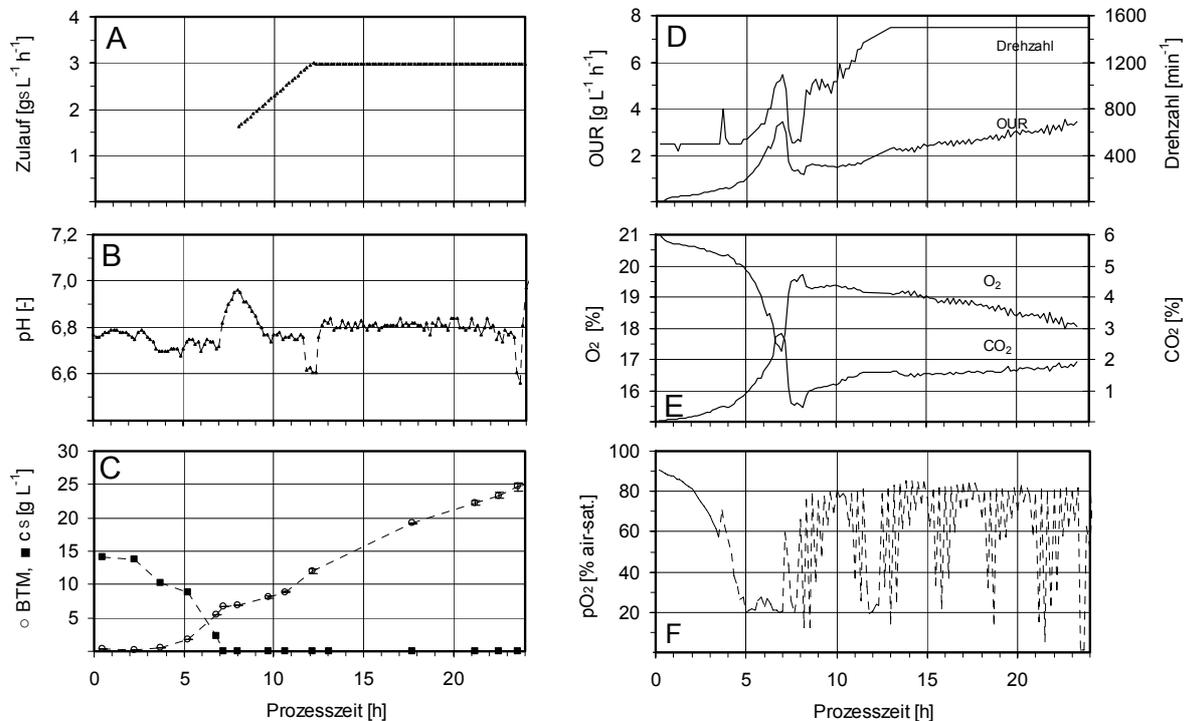


Abbildung 56: Zulaufkultivierung mit *E. coli* im 3 L-Maßstab im Mineralmedium. (A) Nach Verbrauch der Ausgangsmenge Glukose und den gebildeten Stoffwechselnebenprodukten wurde ein linear ansteigendes Dosierprofil gestartet. Nach Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl des Reaktors wurde die Dosierrate konstant gehalten. (B) Verlauf des pH durch kontinuierliche Regelung auf 6,8 mit 25 % NH_4OH . (C) Verlauf der Glukosekonzentration c_s und Biotrockenmassekonzentration (BTM). (D) Verlauf der Rührerdrehzahl und der Sauerstoffaufnahme OUR . (E) Verlauf der O_2 und CO_2 -Konzentration im Abgas. (F) Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 . Die Linie ist gestrichelt, da die Daten mit einem Zeitintervall von 10 Minuten gemittelt werden und somit die Schwankung im Dosierintervall von 4 Minuten nicht erkennbar ist.

einer Prozesszeit von 8 h gestartet. Nach Zudosierung von Zudosierlösung fällt der pO_2 aufgrund der erhöhten Sauerstoffaufnahme der Zellsuspension stark ab. Nach Verbrauch der in der Zudosierlösung enthaltenen Kohlenstoffquelle steigt der pO_2 wieder an. Aufgrund der Mittelung der Daten mit einem Zeitintervall von 10 min sind die einzelnen Zudosierintervalle in Abbildung 56F nicht zu erkennen. Nach Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl von 1500 min^{-1} wurde die Dosierrate ab einer Prozesszeit von 12 h konstant gehalten. Während des Zulaufverfahrens fiel der Biomasseertragskoeffizient Y_{XS} von $0,49$ auf $0,33 \text{ g g}^{-1}$. Dies zeigt den wachsenden Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels bei fallender Wachstumsrate von $0,14$ auf $0,04 \text{ h}^{-1}$.

Die maximale Sauerstoffaufnahme OUR von $3,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ am Ende des Satzbetriebs konnte vom Bioreaktor mit einer Belüftungsrate von 1 min^{-1} und einer Rührerdrehzahl von 1080 min^{-1} gedeckt werden. Die maximale Sauerstofflöslichkeit des Mineralmediums bei 37 °C wurde zu $6,13 \text{ mg L}^{-1}$ berechnet (Schumpe, 1993). Unter der Annahme eines konstanten pO_2 im Medium kann damit der $k_L a$ für die Rührerdrehzahl 1080 min^{-1} zu $0,25 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt werden. Am Ende des intermittierenden, linear ansteigenden Dosierprofils wurde bereits für eine Sauerstoffaufnahme von $1,9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ die maximale Rührerdrehzahl von 1500 min^{-1} notwendig.

4.8.3. Diskussion

Die durchgeführten Satzkultivierungen mit *E. coli* in der gerührten Blasensäule mit 200 mL Reaktionsvolumen und im Laborrührkesselreaktor mit 3 L Reaktionsvolumen ergaben ähnliche maximale Wachstumsraten von $0,56 \text{ h}^{-1} \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$. In den pH -geregeltten Ansätzen in der gerührten Blasensäule und im Laborrührkesselreaktor wird ein mittlerer Biomasseertragskoeffizient Y_{XS} von $0,51 \pm 0,02 \text{ g g}^{-1}$ erzielt (Tabelle 6). Für *E. coli* wurden in kontinuierlichem Betrieb Biomasseertragskoeffizienten von $0,45 - 0,53 \text{ g g}^{-1}$ ermittelt (Kayser, 1999). Die intermittierende pH -Regelung mit einer Frequenz von 1 h^{-1} scheint bei der vorliegenden Wachstumsrate keinen negativen Einfluss auf den Biomasseertrag zu haben.

Tabelle 6: Vergleich der Wachstumsrate μ und des Biomasseertrags Y_{XS} für Satz- und Zulaufbetrieb der Referenzkultivierungen in der gerührten Blasensäule und dem Laborrührkesselreaktor.

Reaktionssystem	Satzbetrieb		Zulaufbetrieb
	$\mu, [\text{h}^{-1}]$	$Y_{XS}, [\text{g g}^{-1}]$	$Y_{XS}, [\text{g g}^{-1}]$
Gerührte Blasensäule	0,54	0,53	
Laborrührkesselreaktor	0,57	0,49	0,33
MW	$0,56 \pm 0,02 (3,8 \%)$	$0,51 \pm 0,02 (5,5 \%)$	

Während der intermittierenden Zulaufkultivierung im Laborrührkessel sinkt der Biomasseertragskoeffizient von $0,49$ auf $0,36 \text{ g g}^{-1}$ ab. Dies ist einerseits darin begründet, dass aufgrund der linear steigenden und anschließend konstanten Zudosierung die Wachstumsrate im Prozessverlauf von $0,14$ auf $0,04 \text{ h}^{-1}$ sinkt. Bei niedrigerer Wachstumsrate steigt der Kohlenstoffanteil, der für den Erhaltungsstoffwechsel benötigt wird. Ergebnisse aus Kultivierungen von *E. coli* TG1 in kontinuierlichem Betrieb bestätigen, dass der Anteil des Kohlenstoffbedarfs des Erhaltungsstoffwechsels am Gesamtkohlenstoffbedarf bei Verringerung der Durchflussrate von $0,14$ auf $0,05 \text{ h}^{-1}$ von 10% auf über 35% steigt (Kayser, 1999). Folglich steht im Prozessverlauf weniger Kohlenstoff zum Biomasseaufbau zur Verfügung. Der Biomasseertragskoeffizient sinkt. Dieser Effekt tritt auch bei

Zulaufverfahren mit kontinuierlicher Zudosierung auf. Während einer Hochzell-dichte-Kultivierung von *E. coli* TG1 lag der Biomasseertragskoeffizient im Satzbetrieb bei einer exponentiellen Wachstumsrate von $0,45 \text{ h}^{-1}$ bei $0,52 \text{ g g}^{-1}$. Im Zulaufbetrieb wurde durch exponentielles Zufüttern die Wachstumsrate auf $0,11 \text{ h}^{-1}$ eingestellt und nur ein deutlich niedrigerer Y_{XS} von $0,42 \text{ g g}^{-1}$ festgestellt (Riesenberg *et al.*, 1991b). Der steigende Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels bei sinkender Wachstumsrate ist ebenfalls für andere Mikroorganismen wie beispielsweise *Zymomonas mobilis* bekannt (Oliviera *et al.*, 1992).

Im Gegensatz zur Kohlenstofflimitierten kontinuierlichen Zudosierung führt das intermittierende Zufüttern zu transient erhöhten Glukosekonzentrationen, so dass der transient aktive Nebenproduktstoffwechsel den Biomasseertragskoeffizient stärker erniedrigt als bei Kultivierungen mit kontinuierlichem Zudosieren. Im hier vorliegenden Prozess beispielsweise wird durch das intermittierende Zudosieren mit einer Frequenz von 15 h^{-1} bei der höchsten Zudosierate von $3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine Glukosespitzenkonzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Dieser Wert liegt über der kritischen Konzentration von $0,03 \text{ g L}^{-1}$ ab der in *E. coli* Nebenproduktbildung einsetzt (Vrabel *et al.*, 2001). Aufgrund der integral sehr niedrigen Wachstumsrate sind die Mikroorganismen in der Lage diese Nebenprodukte wieder zu verstoffwechseln. Für *E. coli* ATCC 8739 wird beispielsweise die kritische Wachstumsrate, bis zu der Acetataufnahme stattfindet mit $0,63 \text{ h}^{-1}$ angegeben (Guardia und Calvo, 2001).

Die spezifische Sauerstoffaufnahme q_O des exponentiellen Wachstums wurde anhand der Sauerstoffkonzentration im Abgas zu $0,5 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ abgeschätzt. Nimmt man einen Sauerstoffverbrauch von $0,1 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für den Erhaltungsstoffwechsel an (Calhoun *et al.*, 1993), ergibt sich ein Ausbeutekoeffizient Biomasse pro Sauerstoff Y_{XO} von $1,41 \text{ g g}^{-1}$. Dies entspricht Literaturdaten (Calhoun *et al.*, 1993; Paalme *et al.*, 1997).

Die transient erhöhte Glukosekonzentration als Folge des intermittierenden Zudosierens erfordert gleichzeitig eine erhöhte Sauerstoffaufnahme der Biomasse nach jedem Dosierschritt. Soll im Prozessverlauf ein minimaler pO_2 nicht unterschritten werden, führt die intermittierende Fahrweise dazu, dass bei gleicher maximaler Sauerstoffeintragsrate nur ein geringerer Sauerstoffbedarf der Biomasse befriedigt werden kann als im Satzbetrieb. Die intermittierende Zudosierung erfordert folglich eine höhere maximale Sauerstoffeintragsrate bei gleicher integraler Zudosierate.

4.9. Kultivierungen im mL-Bioreaktor

4.9.1. Rührerprototypenserie ‚A‘

Parallel zur Optimierung der Sauerstoffeintragsleistung der Rührerprototypen der Serie ‚A‘ wurden die Rührsysteme im Hinblick auf ihre Einsetzbarkeit in Kultivierungen in mL-Reaktoren mit 15,5 mm Innendurchmesser getestet. Während Kultivierungen in Medien mit komplexen Bestandteilen (Hefeextrakt, Pepton) ohne Antischaummittelzugabe wurde Schaumbildung beobachtet. Der sich bildende Schaum akkumuliert grundsätzlich im Zentrum der Trombe (Abbildung 57A). Da unabhängig vom maximalen k_La des jeweils eingesetzten Rührsystems die maximale Biotrockenmasse in intermittierend pH -geregelten Satzkultivierungen bei ungefähr 3 g L^{-1} limitiert war, wurde vermutet, dass die Schaumschicht Blaseneintrag und Sauerstoffübergang behindert und damit als zusätzliche Stofftransportbarriere fungiert. Während einer Kultivierung mit pO_2 -Messung wurde nach Wechsel von Sauerstoff- auf Luftbegasung der in Abbildung 58 dargestellte pO_2 -Verlauf gemessen. Nach Zugabe von Antischaummittel wurde der Stoffaustausch wesentlich beschleunigt. Eine Auswertung des k_La für die Kurventeile vor und nach Antischaumzugabe ergab eine Beschleunigung des Stoffübergangs von mehr als den Faktor 20. Die Schaumschicht war folglich für den reduzierten Stofftransport verantwortlich. In automatisiert betriebenen Zulaufkultivierungen im Mineralmedium mit Antischaummittel wurden bis zu 10 g L^{-1} Biotrockenmasse erzielt.

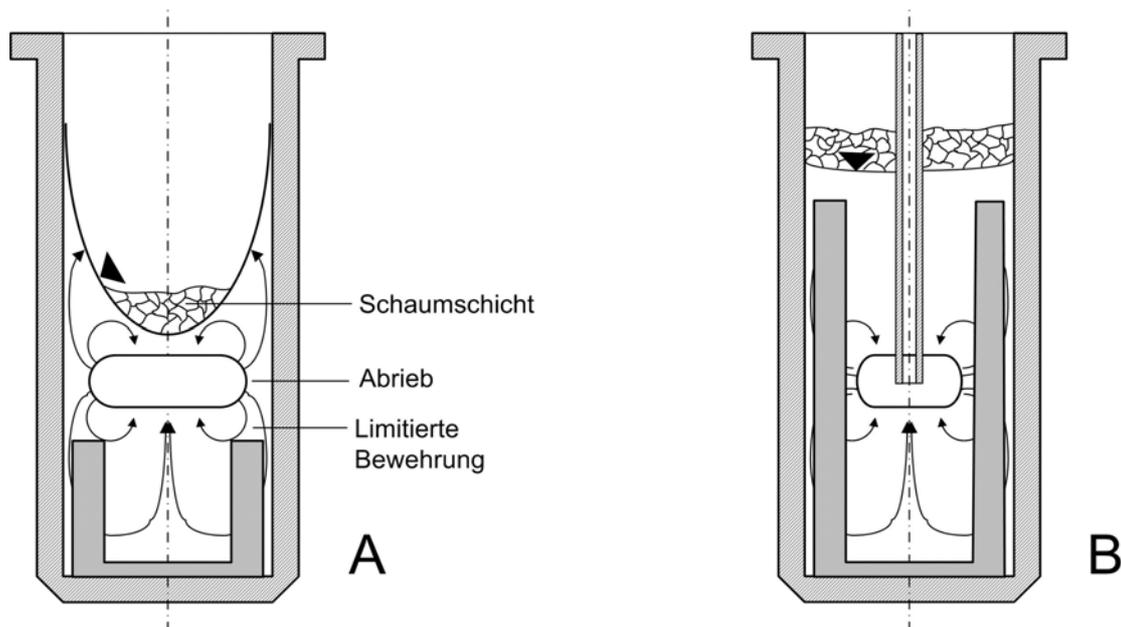


Abbildung 57: (A) Identifizierte Nachteile der Rührerprototypenserie ‚A‘. (B) Entwickelte Lösung

Der frei schwebende Betrieb sämtlicher Rührsysteme der Prototypenserie ‚A‘ führte zu Materialabrieb am Rührorgan und an der Innenwand des Gefäßes. Ein

weiterer identifizierter Nachteil der Rührsysteme der Prototypenserie ‚A‘ bestand in der nicht ausreichenden Bewehrung der mL-Bioreaktoren. Der maximal erreichbare Bewehrungsgrad der verwendeten Reaktionsgefäße durch optimales Ausnutzen des Freiraums unterhalb der Rotationsebene der Rührorgane lag bei 0,14. Im Vergleich dazu liegt der Bewehrungsgrad eines genormten Rührbehälters mit vier Strömungsbrechern mit einer Breite von einem Zehntel des Reaktordurchmessers bei mindestens 0,4.

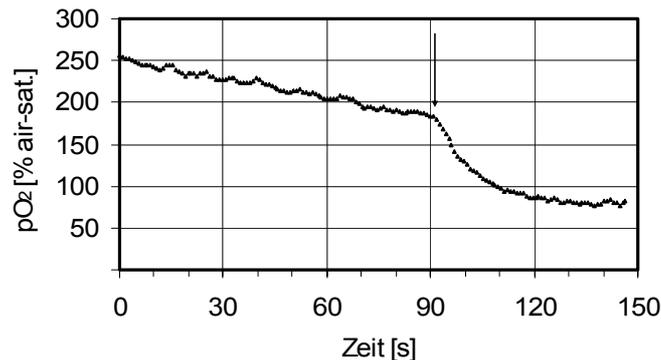


Abbildung 58: Gemessener pO_2 -Verlauf während einer Kultivierung nach Wechsel von Sauerstoff- auf Luftbegasung. Bei $t = 90$ s wurde Antischaummittel zugegeben.

Der entwickelte Lösungsansatz (Abbildung 57B) basiert auf dem gelagerten Betrieb der Rührorgane auf einer Achse, welche an der Sterilgasabdeckung des Reaktionsblocks befestigt wird. Die Reduzierung des Rührerdurchmessers bzw. Vergrößerung des Gefäßdurchmessers ermöglicht die Einbringung von Strömungsbrechern, welche nach oben über die Rotationsebene des Rührorgans hinaus ausgeführt sind. Dadurch kann eine Bewehrung wie im genormten Rührkesselreaktor erzielt werden. Die Ausführung der Achse als Hohlrohr ermöglicht wiederum die räumliche Nähe zwischen Umgebungsgasphase und Rührorgan, da aufgrund der Rotation des Rührorgans die Flüssigphase im Zentrum des Rührorgans radial nach außen gepumpt wird. Dadurch können erneut die Voraussetzungen für effektiven Blaseneintrag geschaffen werden. Das Ansaugen der umgebenden Gasphase durch die Hohlachse umgeht gleichzeitig den limitierenden Effekt einer möglichen Schaumschicht an der Flüssigkeitsoberfläche, wenn die Ansaugöffnung oberhalb der Schaumschicht zu liegen kommt. Auf Basis dieses Lösungsansatzes wurde die Rührerprototypenserie ‚B‘ für Reaktionsgefäße mit 20,0 mm Innendurchmesser entwickelt.

4.9.2. Rührerprototypenserie ‚B‘

Parallele Vergleichbarkeit

Die Vergleichbarkeit von parallelen Kultivierungen wurde in einem Parallelansatz mit acht mL-Bioreaktoren mit 20,0 mm Innendurchmesser evaluiert. Die mL-Bioreaktoren wurden von Rührorganen des Rührerprototypen B3 mit Achslagerung durchmischt. Mit dem Reaktionsmedium aus einem Bioreaktor wurde am Ende der Kultivierung eine Biotrockenmasse-Bestimmung durchgeführt. Die Korrelation zwischen optischer Dichte im Einstrahlphotometer und Biotrockenmasse betrug $0,58 \text{ g OD}^{-1}$. Der Zusammenhang zwischen der optischen Dichte im Mikrotiterplatten-Photometer und der Biotrockenmasse BTM wurde durch das Polynom zweiten Grades $\text{OD} = -0,128 (\text{BTM})^2 + 0,878 \text{ BTM}$ genähert. Die gleiche Korrelation wurde mit aufkonzentrierten Zellen der Vorkultur im Schüttelkolben ermittelt. Die Polynomfunktion lautet in diesem Fall $\text{OD} = -0,118 (\text{BTM})^2 + 0,858 \text{ BTM}$. In beiden Fällen wurde ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,99$ ermittelt. Die Zellen nach der Kultivierung im mL-Bioreaktor weisen dementsprechend eine ähnliche Zellgröße und Zellgrößenverteilung auf wie die Zellen der Schüttelkolbenkultur.

Abbildung 59 zeigt die Verläufe der Biotrockenmasse und des pH in fünf der sieben inokulierten Reaktoren (R1 bis R5) und dem nicht inokulierten Kontrollreaktor (C). Die Kultivierung wurde nach 10,5 Stunden aufgrund technischer Probleme abgebrochen. Einer der beiden nicht gezeigten Reaktoren war durch eine im Mittel 15 % höhere Biotrockenmasse charakterisiert, was möglicherweise auf einen Fehler bei der Pipettierung der Medienkomponenten zurück zu führen ist. Im zweiten nicht gezeigten Reaktor konnte der stabile Betrieb des Rührsystems nicht aufrechterhalten werden. Durch den daraus resultierenden Sauerstoffmangel war nach der Inokulierung kein weiteres Zellwachstum möglich. Während des Satzbetriebs wurde durch schrittweise Erhöhung der Drehzahl der pO_2 manuell auf 20 % gesteuert. Die maximale Drehzahl am Ende des Satzbetriebs betrug 2240 min^{-1} .

In den Reaktoren R1 – R5 findet während der Satzphase bis zu einer Prozesszeit von $t_P = 4,2 \text{ h}$ exponentielles Wachstum mit einer mittleren Wachstumsrate von $0,46 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$) statt. Dabei werden $6,2 \text{ g L}^{-1}$ Biotrockenmasse mit einer relativen Standardabweichung von 2,9 % gebildet. Der mittlere Biomasseertragskoeffizient berechnet sich zu $0,46 \text{ g g}^{-1}$.

Nach Ende der linear steigenden Zudosierung bei einer Prozesszeit von $t_P = 8,2 \text{ h}$ wird eine mittlere Biotrockenmasse von $9,46 \text{ g L}^{-1} \pm 0,50 \text{ g L}^{-1}$ erzielt, was einer relativen Standardabweichung von 5,3 % entspricht (Abbildung 60). Die Wachstumsrate während der linearen Zudosierung beträgt $0,09 \text{ h}^{-1}$. Der mittlere Biomasseertragskoeffizient Y_{XS} betrug $0,34 \text{ g g}^{-1}$. Die Wachstumsparameter sind nochmals in Tabelle 7 zusammengefasst. Über die gesamte Prozesszeit liegt die relative Standardabweichung der Biotrockenmasse in den fünf Reaktionsansätzen unter 14,5 %.

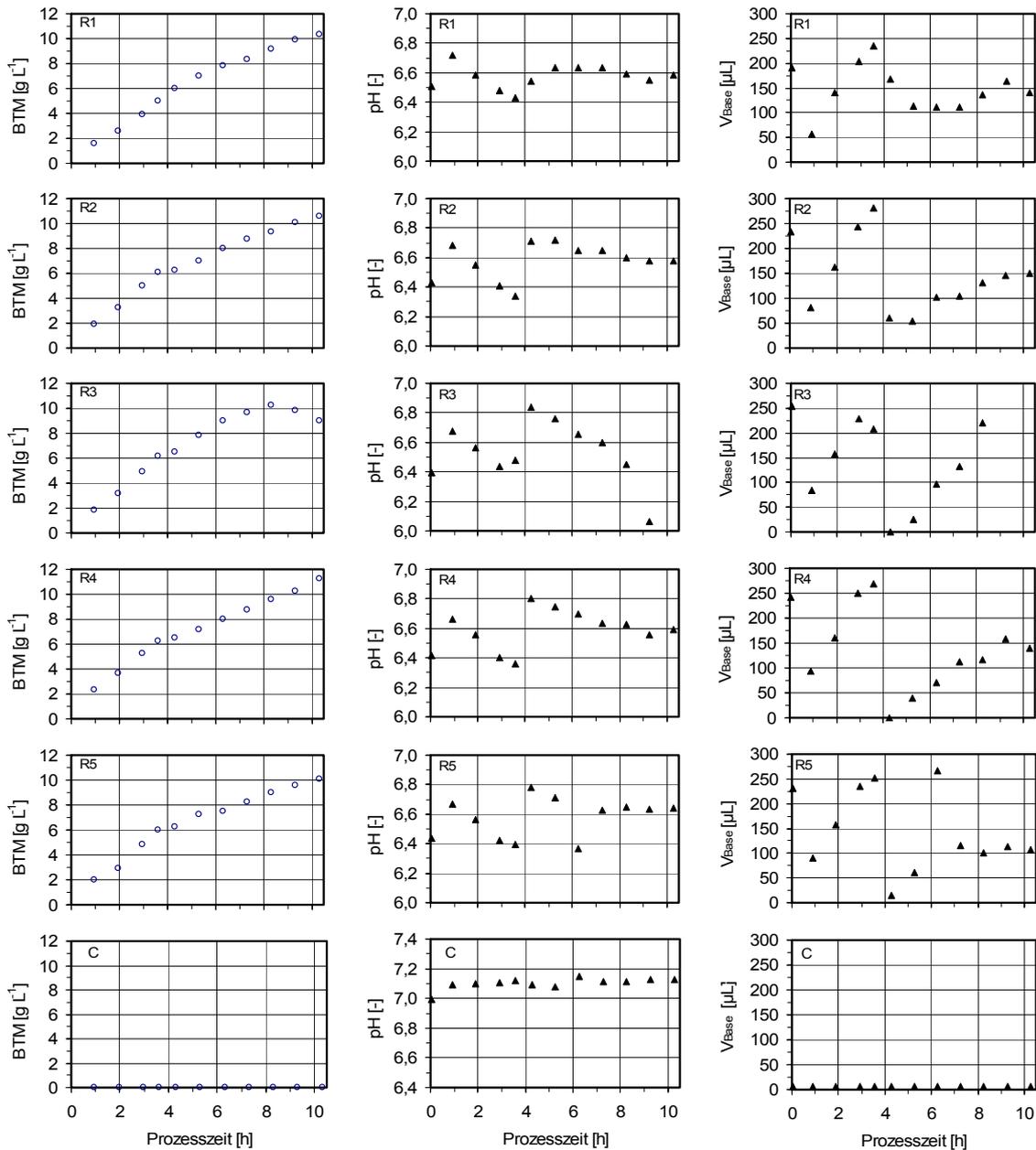


Abbildung 59: Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (BTM), des pH und dem intermittierend zudosierten Titrationsvolumen während einer Parallelkultivierung von *E. coli* in mL-Bioreaktoren R1 bis R5 sowie dem nicht inokulierten und nicht pH -kontrollierten Kontrollreaktor C.

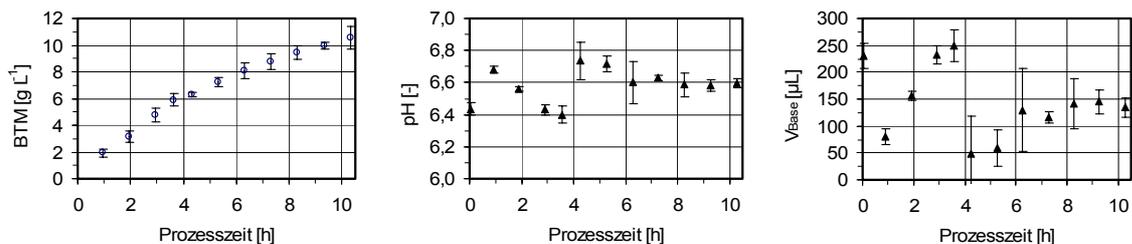


Abbildung 60: Mittelwerte des Verlaufs der Biotrockenmassekonzentration (BTM), des pH und dem intermittierend zudosierten Titrationsvolumen einer parallelen Zulaufkultivierung in mL-Bioreaktoren ($n_i = 5$).

Die *pH*-Verläufe der fünf parallelen Kultivierungen sind annähernd identisch. Der zu Beginn in den Reaktionsansätzen vorliegende *pH* von ungefähr 6,5 wird zunächst durch Zugabe eines Titrationsvolumens von über 200 µL auf 6,8 angehoben. Im Verlauf der Satzphase fällt der nach je einer Stunde ohne Titration

Tabelle 7: Mittelwerte der maximal erreichten Biotrockenmassekonzentration (BTM_{max}), der Wachstumsrate μ und des Biomasseertrags Y_{XS} von fünf parallelen Zulaufkultivierungen im mL-Bioreaktor nach Ende des Satzbetriebs und nach 4 Stunden Zulaufbetrieb mit linear steigendem Dosierprofil.

Parameter		Satzbetrieb	Zulaufbetrieb (Linear steigend)
BTM_{max}	[g L ⁻¹]	6,20 +/- 0,18 (2,9 %)	9,46 +/- 0,50 (5,3 %)
μ	[h ⁻¹]	0,46	0,09
Y_{XS}	[g g ⁻¹]	0,46	0,34

gemessene *pH* ab. Dies ist eine Folge der stetig steigenden Nebenproduktbildung der Biomasse. Daraus resultiert das während der Satzphase stetig steigende, notwendige Volumen an Titrationsmittel. Nach Verbrauch der gebildeten Nebenprodukte am Ende des Satzbetriebs und Start des linear ansteigenden Zudosierprofils ist die *pH*-Abweichung vom Sollwert 6,8 zu Beginn gering und steigt wieder mit ansteigendem Zulaufvolumen an. Dies schlägt sich wiederum im ansteigenden Titrationsmittelvolumen nieder. Die Nebenproduktbildungsrate der Zellen ist folglich an die Glukoseaufnahme gekoppelt. Bei Übergang zur konstanten Zudosierung scheint auch der pro Stunde auftretende *pH*-Abfall annähernd konstant. Die konstante Nebenproduktbildung führt ebenfalls zu einem konstanten notwendigen Volumen an Titrationsmittel. Insgesamt wurde im Prozessverlauf pro Reaktionsansatz etwa 1,5 mL Titrationsmittel zudosiert.

Der nicht inokulierte Kontrollreaktor zeigt kein Zellwachstum über der Prozesszeit. Die Sterilgasüberlagerung garantierte somit sterile Bedingungen in diesem Reaktor. Der im Kontrollreaktor gemessene *pH* spiegelt folglich die Stabilität der *pH*-Messung mit der Hydroplate über der Prozesszeit wieder. Der mittlere gemessene *pH* beträgt 7,10 +/- 0,04. Die relative Standardabweichung über die gesamte Prozesszeit von 10,5 h beträgt 0,5 %.

Evaluierung der nicht-invasiven, faseroptischen pH und pO₂ Messtechnik

Zur Evaluierung der nicht-invasiven *online pH* und *pO₂* Messung wurde eine Satz Kultivierung im mL-Bioreaktor mit 20,0 mm Innendurchmesser durchgeführt, welcher vom Rührerprototypen B2 mit Achslagerung durchmischt wurde (Abbildung 61). Der Umrechnungskoeffizient zwischen der optischen Dichte im Einstrahlphotometer und der Biotrockenmasse betrug 0,58 g OD⁻¹. Die Wachstumsrate lag bei 0,52 h⁻¹ (R² = 0,996) bis zum stöchiometrischen Verbrauch der

Glukose. Zwei aufeinander folgende pO_2 -Maxima bei einer Prozesszeit $t_P = 5,6$ und $5,9$ h zeigen den Verbrauch der Glukose und der Stoffwechselnebenprodukte an. Während des Verbrauchs der Stoffwechselnebenprodukte ab $t_P = 5,6$ h steigt der pH an. Der pO_2 -Anstieg bei $t_P = 5$ h findet direkt im Anschluss an die Zudosierung von Titrationsmittel statt und ist somit eine Folge der metabolischen Reaktion der Zellen auf die pH -Titration. Der mittlere Biomasseertragskoeffizient Y_{XS} betrug $0,47 \text{ g g}^{-1}$.

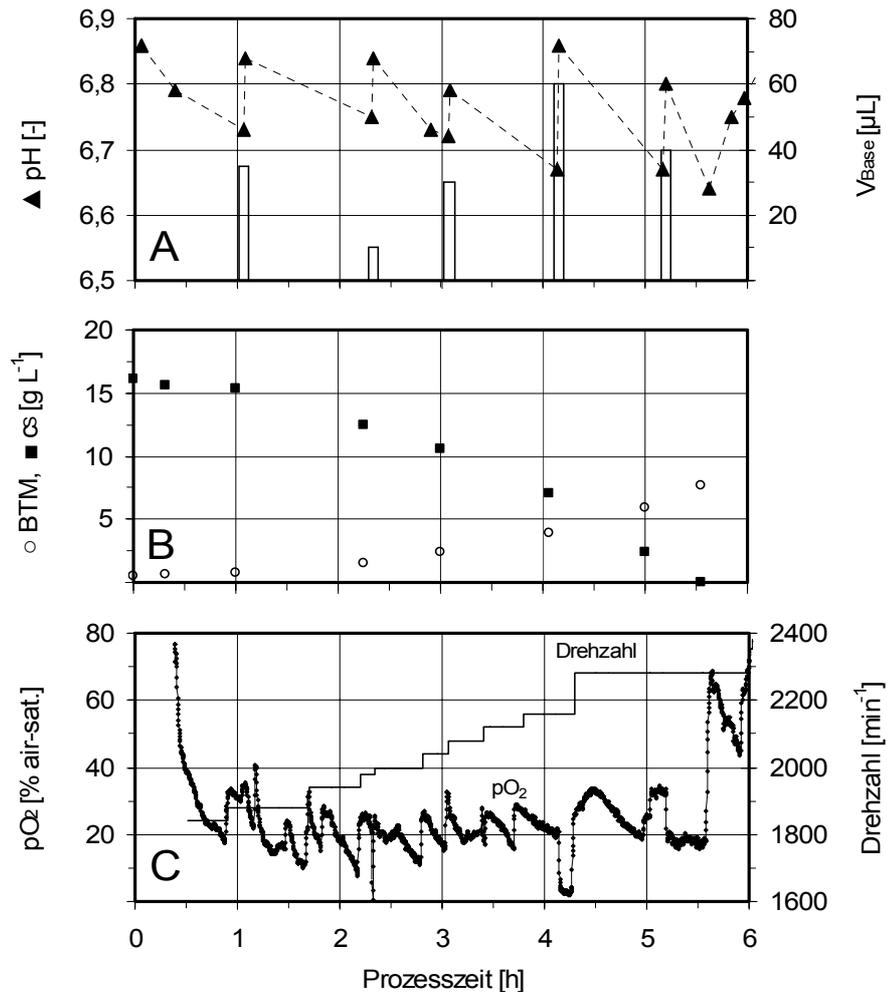


Abbildung 61: Satzkultivierung von *E. coli* im mL-Bioreaktor. (A) Verlauf des pH durch manuelle Regelung auf 6,8 mit 7,5 % NH_4OH -Lösung. (B) Verlauf der Glukosekonzentration c_S und Biotrockenmassekonzentration (BTM). (C) Verlauf der Rührerdrehzahl und der gelösten Sauerstoffkonzentration pO_2 .

Der Vergleich der Messwerte der invasiven (*MicroxTX*) mit der nicht-invasiven (*Fibox3*) pO_2 -Messtechnik ist in Abbildung 62 dargestellt. Beide Messtechniken stellen den pO_2 -Verlauf nahezu identisch dar. Die Abweichungen der beiden Signale liegen im Mittel bei unter 2 % Luftsättigung.

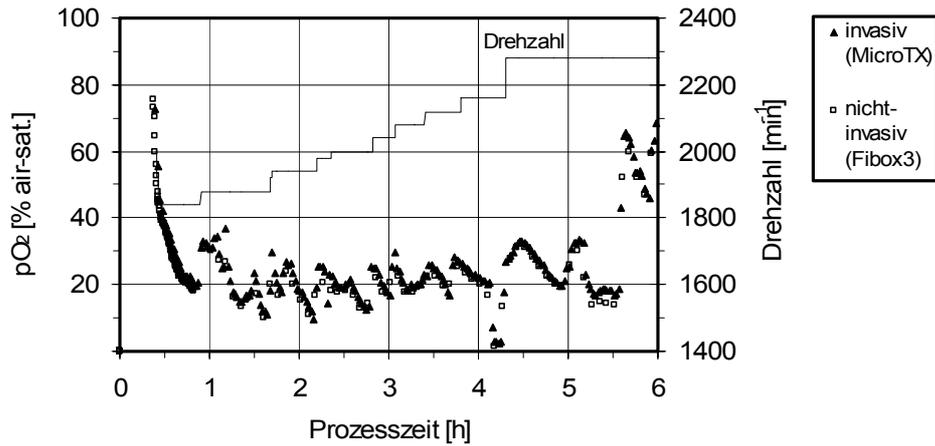


Abbildung 62: Vergleich der *online* Daten der pO_2 Analytik mit den fluorometrischen Messtechniken *MicroTX* (invasiv) und *Fibox3* (nicht-invasiv) während einer Satzkultivierung im mL-Bioreaktor.

Abbildung 63 zeigt den Vergleich der *online* Messtechnik *PDD* mit den jeweils vor und nach der Basenzugabe per Miniatur-*pH*-Elektrode ermittelten *pH*-Werten. Die Abweichung liegt über das gesamte Satzverfahren unter 0,1 *pH* Einheiten. Die aus der Zugabe von Titrationsmittel resultierenden *pH*-Sprünge werden von beiden Messtechniken abgebildet.

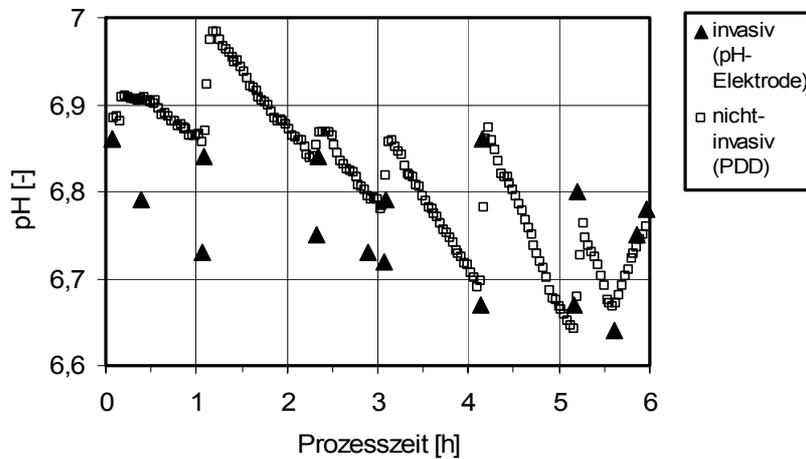


Abbildung 63: Vergleich der *online* Daten der *pH* Analytik mit der *PDD* Messtechnik (nicht-invasiv) und den diskontinuierlich gemessenen Werten mit der Miniatur-*pH*-Elektrode (invasiv) während einer Satzkultivierung im mL-Bioreaktor.

Mit Hilfe der während der Referenzkultivierung im Litermaßstab ermittelten spezifischen Sauerstoffaufnahme $q_O = 0,5 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ kann mit Gleichung 22 für die jeweiligen Probenahmezeitpunkte für bekannte Drehzahl, Biotrockenmasse und pO_2 ein $k_L a$ abgeschätzt werden. Da bei dieser Abschätzung die Sauerstoffab-

reicherung des Prozessgases vernachlässigt wird, handelt es sich um einen minimal vorliegenden k_La für die verschiedenen Drehzahlen (Abbildung 64). Für die maximale Drehzahl wurde der Probenahmezeitpunkt $t_p = 5$ h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt noch genügend Glukose vorhanden war, um die Annahme der konstanten Sauerstoffaufnahme q_O aufgrund immer noch maximaler Wachstumsrate μ aufrechterhalten zu können.

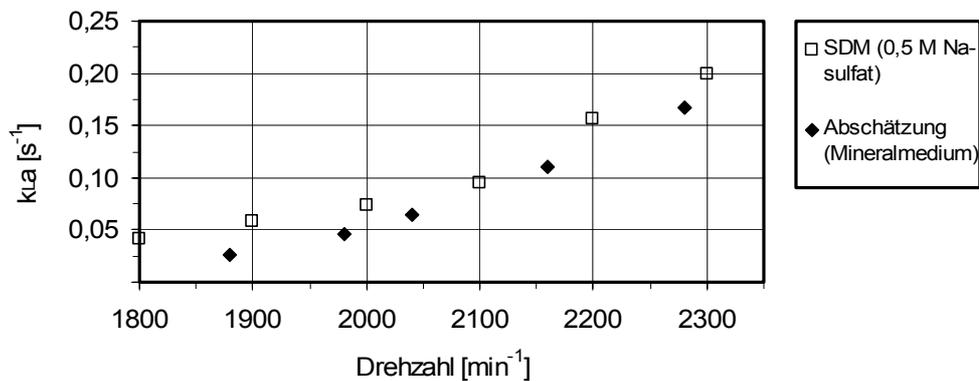


Abbildung 64: Vergleich des k_La der Stickstoffdesorptionsmethode (SDM) mit k_La -Abschätzung mit Hilfe von q_O aus Abgasanalytikdaten des 3 L-Maßstabs und der Biotrockenmassekonzentration (BTM) während einer *E. coli* Kultivierung im Mineralmedium im mL-Bioreaktor.

Im Verlauf der Kultivierung wird der k_La von $0,03 \text{ s}^{-1}$ bei 1880 min^{-1} bis auf $0,17 \text{ s}^{-1}$ bei 2280 min^{-1} gesteigert. Ab einer Drehzahl von ca. 2140 min^{-1} liegt ein k_La von über $0,1 \text{ s}^{-1}$ vor. Der Unterschied zwischen den mit den beiden Methoden ermittelten k_La -Verläufen wäre unter Berücksichtigung der Sauerstoffanreicherung des Prozessgases noch geringer.

Evaluierung des Rührerprototypen B4 in einer Zulaufkultivierung

Der Rührerprototyp B4 zeichnet sich im Vergleich zu den Prototypen B2 und B3 durch das Erreichen einer maximalen Drehzahl von 3400 min^{-1} aus. In der automatisiert durchgeführten Kultivierung wurde der Rührerprototyp B4 im Zweifachansatz mit dem Rührerprototyp B3 verglichen.

In allen drei Reaktoren sind annähernd identische pH und Biotrockenmasse-Verläufe bis zu einer Prozesszeit von $t_p = 14 \text{ h}$ zu erkennen (Abbildung 65). Die relative Standardabweichung der pH -Messungen der einzelnen Reaktoren liegt unter $1,3 \%$. Die relative Standardabweichung des Verlaufs der Biotrockenmasse liegt unter $7,9 \%$. Der Vergleich der beiden Rührsysteme B4 ist durch relative Standardabweichungen im pH -Verlauf von unter $0,4 \%$, im Biotrockenmasseverlauf von unter $4,8 \%$ charakterisiert. Aus dem Biotrockenmasse-Verlauf wurde eine mittlere maximale Wachstumsrate von $0,46 \text{ h}^{-1}$ im Satzbetrieb ermittelt.

Das nicht-invasive faseroptische Messsystem *Fibox3* bildet *online* den erwarteten Verlauf des pO_2 ab. Dieser fällt zu Beginn der Satzphase bis er nach Erreichen von 20 % Luftsättigung durch manuelle Steigerung der Drehzahl bei 20 % Luftsättigung annähernd konstant gehalten wird. Nähert sich die Glukosekonzentration

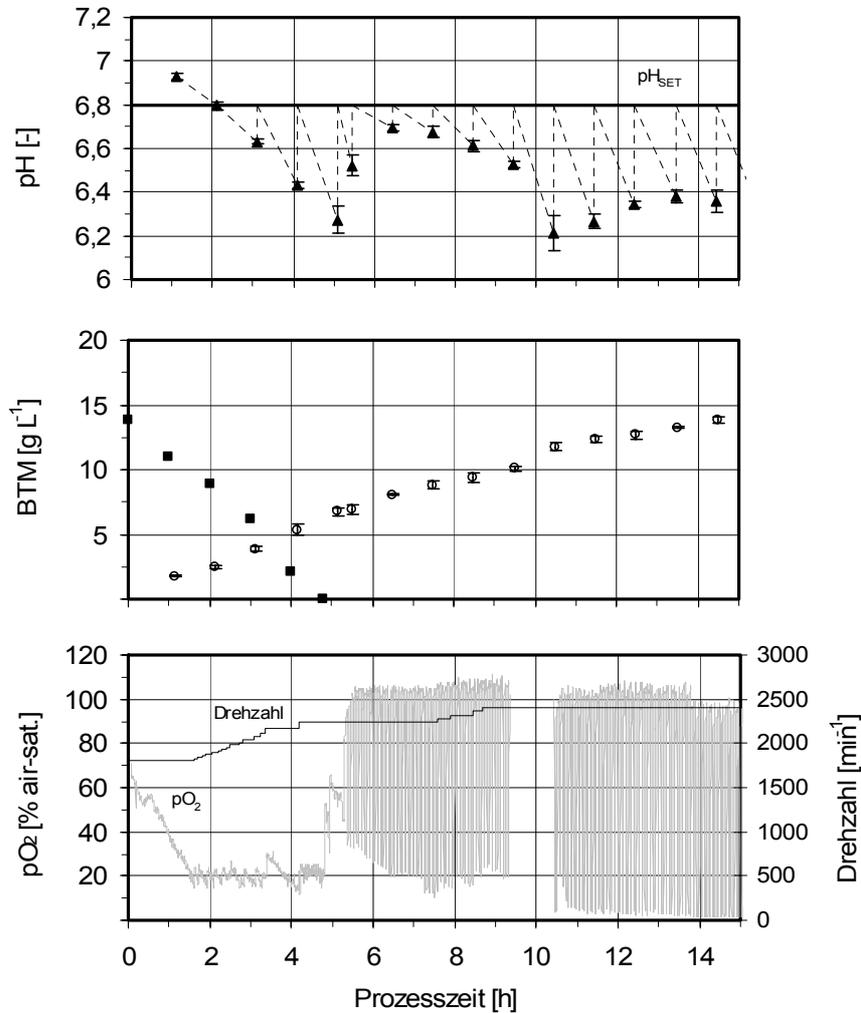


Abbildung 65: Prozessparameter einer automatisiert durchgeführten Kultivierung im mL-Maßstab als Funktion der Zeit. Angegebene Werte des pH und der Biotrockenmassekonzentration (BTM) sind Mittelwerte aus den beiden Reaktoren mit dem Rührsystem B4 und dem mL-Bioreaktor mit dem Rührsystem B3. Die Werte der Glukosekonzentration c_S und des pO_2 wurden im mL-Bioreaktor mit dem Rührsystem B3 ermittelt. Die Rührerdrehzahl war in allen drei mL-Bioreaktoren gleich. (A) pH als Funktion der Prozesszeit. Zur Verdeutlichung der Auswirkungen der intermittierenden Titration ist eine gestrichelte Linie hinzugefügt. (B) Biotrockenmassekonzentration (BTM) und Glukosekonzentration c_S als Funktion der Zeit. (C) Gelöstsauerstoffkonzentration pO_2 und Rührerdrehzahl als Funktion der Zeit.

Null ist über eine längere Zeit keine weitere Erhöhung der Rührerdrehzahl notwendig. Die sinkende Glukosekonzentration nahe Null führt zu einer geringeren

Wachstumsrate und damit spezifischen Sauerstoffaufnahme der Zellen. Der Verbrauch der Ausgangskonzentration Glukose und der Nebenprodukte wird wiederum durch zwei pO_2 -Spitzen bei $t_P = 4,7$ und $5,3$ h angezeigt. Die Dauer der Verstoffwechslung der Nebenprodukte liegt wie bei den vorherigen Ansätzen im Bereich von 30 min. Nach Beginn der intermittierenden Zudosierung zeigt das Sauerstoffsignal das typisch transiente Verhalten. Nach Zugabe von Glukose sinkt der pO_2 auf ein Minimum. Nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle erreicht der pO_2 wieder seinen Ausgangswert. Dieses Verhalten ist in (Abbildung 66) verdeutlicht.

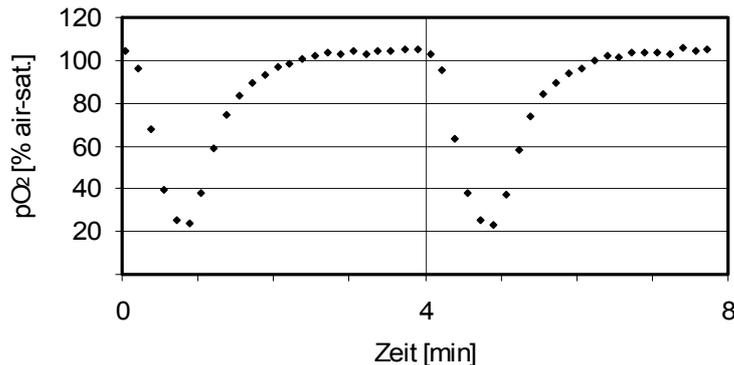


Abbildung 66: Oszillieren des pO_2 bei intermittierender Zudosierung mit einer Frequenz von 15 h^{-1} .

Das Rührsystem B3 fiel bei einer Prozesszeit von $14,5$ h bei einer Biotrockenmasse von 14 g L^{-1} aus. Dies ist eine Folge des Betriebes bei der Maximaldrehzahl von 2400 min^{-1} welche in wässriger Lösung ermittelt wurde. Die erhöhte Zelldichte führt zu einem Anstieg der Viskosität und reduziert damit die maximale Drehzahl. Die beiden Rührsysteme B4 liefen stabil bis zum Abbruch der Kultivierung bei einer Prozesszeit von 21 h. Die beiden Ansätze erzielten eine maximale Biotrockenmasse von $19,3 \text{ g L}^{-1} \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$.

Maßstabsvergleich

Der Vergleich des Verlaufs der Biotrockenmasse des zweifach Ansatzes mit dem Rührsystem B4 und der Referenzkultivierung im Laborrührkessel ist in Abbildung 67A dargestellt. Die Prozesszeit der Kultivierung im Laborrührkesselreaktor wurde so angepasst, dass der Start des Zulaufverfahrens zur gleichen Zeit $t_P = 5,5$ h aufgetragen ist. Die gemessene Biotrockenmasse im mL-Reaktor bleibt hinter dem im Laborrührkesselreaktor zurück. Dies ist jedoch durch den unterschiedlichen Volumenverlauf der Kultivierungen in den beiden Maßstäben begründet (Abbildung 67B). Der Reaktionsvolumenverlauf im mL-Bioreaktor wurde aus Zudosierung von Titrationmittel, Zudosierlösung und destilliertem Wasser zum Verdunstungsausgleich und dem Volumenverlust durch Probenahme und Verdunstung so abgeschätzt, dass das experimentell ermittelte Endvolumen von

12,8 mL zur Prozesszeit $t_p = 20,9$ h erzielt wurde. Dabei wurde ein Verdunstungsvolumenstrom von $85 \mu\text{L h}^{-1}$ erhalten, welches dem experimentell ermittelten von $87 \pm 8 \mu\text{L}$ beinahe entspricht. Das Reaktionsvolumen im Laborrührkesselreaktor

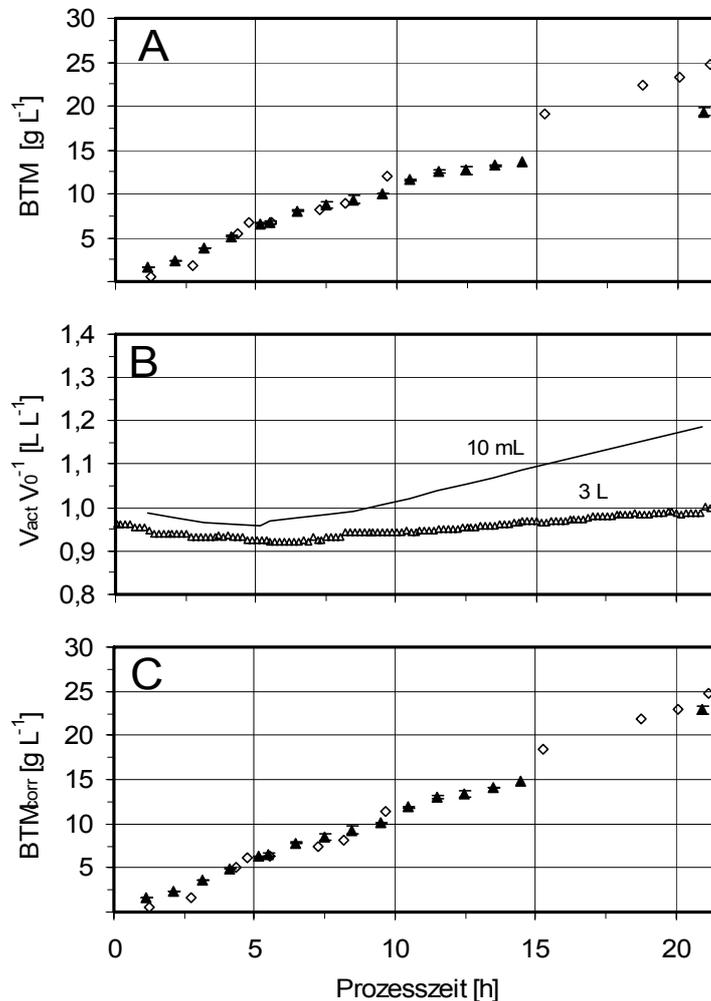


Abbildung 67: (A) Gemessene Biotrockenmassekonzentration (BTM) über der Prozesszeit der Zulaufkultivierung im mL-Bioreaktor ($V_{R,init} = 10,8$ mL) und im Laborrührkesselreaktor ($V_{R,init} = 3000$ mL). (B) Schätzung des relativen Reaktionsvolumens im mL-Bioreaktor (durchgezogene Linie) und gemessener Verlauf des Reaktionsvolumens im Laborrührkesselreaktor (Δ). (C) Vergleich der korrigierten Biotrockenmasse-Verläufe im mL-Bioreaktor (\blacktriangle) und im Laborrührkesselreaktor (\blacklozenge). Werte der korrigierten Biotrockenmassekonzentration (BTM_{corr}) sind aufgrund unterschiedlicher Verdünnungen korrigiert.

wurde *online* gravimetrisch ermittelt. Während das Reaktionsvolumen V_{act} der Kultivierung im Labormaßstab im Verlauf des Satzverfahrens bis auf 92 % des Ausgangsvolumen V_0 sinkt, bleibt das Reaktionsvolumen im mL-Bioreaktor über 96 % des Ausgangsvolumens. Von Beginn des Zulaufverfahrens steigen beide relative Reaktionsvolumina an. Das Reaktionsvolumen im mL-Bioreaktor steigt ab

einer Prozesszeit von 10 h mit $1,56 \% \text{ h}^{-1}$ ($156 \mu\text{L h}^{-1}$) mehr als drei Mal so schnell wie das Reaktionsvolumen im Laborrührkesselreaktor mit $0,49 \% \text{ h}^{-1}$ ($14,6 \text{ mL h}^{-1}$). Bei Abbruch des Prozesses im mL-Bioreaktor wurde ein Endvolumen von 12,8 mL oder 119 % des Ausgangsvolumens ermittelt. Zum gleichen Zeitpunkt im Verlauf der Kultivierung im Laborrührkesselreaktor beträgt das Reaktionsvolumen 99 % des Ausgangsvolumens. Der höhere Anstieg des Reaktionsvolumens im mL-Maßstab ist die Folge der geringeren Glukosekonzentration im Zulauf von 250 g L^{-1} und der geringeren Konzentration des Titrationsmittels von 7,5 % NH_4OH . Das stärker angewachsene Reaktionsvolumen im mL-Bioreaktor führt zu einer Verdünnung der jeweils gemessenen Biotrockenmassekonzentration. Nach Korrektur dieser Verdünnung durch Multiplizieren der Biotrockenmassekonzentration mit dem relativen Reaktionsvolumen $V_{\text{act}} \times V_0^{-1}$ erhält man die korrigierte Biotrockenmassekonzentration BTM_{corr} (Abbildung 67C). Die beiden Biotrockenmasse-Verläufe zeigen annähernd identischen Verlauf. Bei Prozessende lag in den mL-Bioreaktoren im Mittel eine korrigierte Biotrockenmasse von $22,9 \text{ g L}^{-1}$ vor.

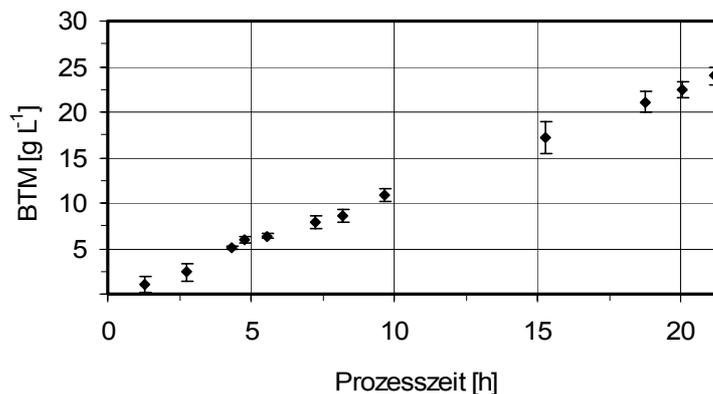


Abbildung 68: Vergleich der Biotrockenmassekonzentration (BTM) über der Prozesszeit der Zulaufkultivierungen im mL-Bioreaktor und Laborrührkesselreaktor.

Abbildung 68 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der korrigierten Biotrockenmassekonzentration BTM_{corr} der Kultivierungen im Zweifachansatz mit dem Rührsystem B4 im mL-Bioreaktor und der Referenzkultivierung im Laborrührkesselreaktor. Um die Biotrockenmasse der Kultivierung im mL-Maßstab für die Probenahmezeitpunkte der Kultivierung im Labormaßstab zu erhalten, wurde zwischen den Messwerten linear extrapoliert. Unter Ausgrenzung der hohen relativen Standardabweichungen der beiden Messungen zu Beginn der Satzphase liegen die relativen Standardabweichungen ab einer Prozesszeit von 3 h bei unter 10,6 %. Die mittlere Biotrockenmassekonzentration der Kultivierungen in den beiden Maßstäben bei der Prozesszeit $t_p = 20,9 \text{ h}$ betrug $24,0 \text{ g L}^{-1} \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$.

4.9.3. Diskussion

Obwohl durch den schwebenden Magnetantrieb ungelagerte Rührorgane bis zu Drehzahlen von 2600 min^{-1} stabil in Rotation versetzt werden konnten, wurde eine Abnutzung des Rührorgans und der Gefäßwand festgestellt. Die fehlende Lagerung auf einer Achse führte folglich dazu, dass die Gefäßwand zur Stabilisierung der Drehbewegung des Rührorgans notwendig war. Der selbst zentrierende Betrieb ohne Abrieb konnte nicht realisiert werden. Die Lagerung der Rührorgane auf einer Achse wurde somit als neue Randbedingung in die weitere Entwicklungsarbeit aufgenommen. Die Achslagerung verhindert den Abrieb des Rührorgans und des Gefäßes, ermöglicht die Integration längerer Strömungsbrecher in den mL-Bioreaktor zur Steigerung der Bewehrung, ermöglicht von Schaumbildung unabhängigen Sauerstoffeintrag und erleichtert außerdem die Handhabbarkeit von vielen parallelen Reaktionsgefäßen, da die Rührorgane fest mit der Sterilgasabdeckung verbunden werden können.

Die in der parallelen Zulaufkultivierung mit dem Rührerprototypen B3 verwendeten Rührorgane wurden anhand eines Labormusters zur Evaluierung der Sauerstoffeintragsleistung manuell in einer Kleinserie von 10 Stück hergestellt. Von diesen 10 Rührorganen wurden 8 mit den nach visueller Begutachtung identifizierten geringsten Abweichungen vom Labormuster ausgewählt. Der Ausfall eines Rührorgans zu Beginn der Kultivierung ist eine Folge der durch die manuelle Fertigung bedingten hohen Toleranzen. Da die Serienfertigung des Rührorgans in Zukunft mit einer 5-Achsen Dreh- / Fräsmaschine erfolgt, sollten geringere Toleranzen erzielt werden können als bei manueller Einzelfertigung.

Während des Satzbetriebs der Kultivierung zur parallelen Vergleichbarkeit erreichen die Wachstumsrate bzw. der Biomasseertrag jeweils 81 bzw. 94 % der Referenzkultivierung im Litermaßstab. Während des Zulaufbetriebs mit linear steigendem Zudosierprofil erreicht der Biomasseertrag der mL-Kultivierungen 103 % des Wertes der Referenzkultivierung im Litermaßstab. Während der Satzkultivierung zur Evaluierung der nicht-invasiven *online* Messtechniken erreichte die Wachstumsrate im mL-Bioreaktor 91 % des Wertes der Referenzkultivierung im Litermaßstab. Der Biomasseertrag lag bei 96 % des Wertes der Referenzkultivierung im Litermaßstab.

Das nicht-invasive pO_2 -Messsystem (*Fibox3*) liefert ein dem invasiven Messsystem (*MicroxTX*) im Rahmen der Messgenauigkeit identisches Signal. Die marginalen Abweichungen liegen durchaus im Rahmen von Abweichungen wie sie auch durch unterschiedliche Kalibrierungen ein und desselben Messsystems erzielt werden. Der Verlauf des Messsignals des nicht-invasiven *pH*-Messsystems (*PDD*) entspricht ebenfalls dem des Messsignals, welches mit der Miniatur-*pH*-Elektrode erhalten wurde. Die im Verlauf der Prozesszeit von 6 h erkennbare Annäherung der beiden Messsignale ist möglicherweise in einer leicht erhöhten Drift des einen Messsystems gegenüber dem anderen begründet.

Die Abschätzung des k_La aus dem pO_2 -Verlauf führt zu einem minimalen k_La , da die Sauerstoffanreicherung des Prozessgases messtechnisch im mL-Maßstab nicht zugänglich ist und deshalb vernachlässigt werden muss. Trotzdem wurde ein k_La von bis zu $0,17 \text{ s}^{-1}$ bei einer maximal vorliegenden Drehzahl von 2280 min^{-1} mit dem Rührerprototypen B2 ermittelt. Dadurch ist das Erreichen eines k_La wie im Laborrührkessel nicht nur durch k_La -Bestimmungen mit Messmethoden in Modellmedien, sondern auch während einer Kultivierung in einem typischen Mineralmedium gezeigt worden. Der abgeschätzte k_La während der Kultivierung im Mineralmedium liegen in derselben Größenordnung, bleiben jedoch unter dem k_La , welcher mit Messmethoden im voll-koaleszenten Modellmedium $0,5 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$ erzielt wurde. Ursache hierfür ist einerseits die geringere Ionenstärke des Mineralmediums, welche nicht zu vollständiger Koaleszenzhemmung führt. Des Weiteren wird unter Vernachlässigung der Sauerstoffanreicherung des Prozessgases ein zu niedriger k_La abgeschätzt. Eine weitere, nicht vorhersagbare Rolle kann der Einfluss der Biomasse auf die Koaleszenzeigenschaften bzw. die Blaseneintrageigenschaften des Rührorgans spielen.

Die relativen Standardabweichungen zwischen Biotrockenmasse-Verläufen eines Zweifachansatzes mit dem Rührsystem B4 liegen unter $4,8 \%$. Die Standardabweichungen des *offline* intermittierend gemessenen pH liegen unter $0,4 \%$ und sind somit nicht signifikant.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Volumenverläufe in den beiden Maßstäben erreichen die Wachstumsrate bzw. der Biomasseertrag während des Satzbetriebs jeweils 81% bzw. 88% der Referenzkultivierung im Litermaßstab. Während des Zulaufbetriebs mit linear steigendem Zudosierprofil erreicht der Biomasseertrag der mL-Kultivierungen 106% des Wertes der Referenzkultivierung.

Ein Vergleich aller gezeigten Kultivierungen im mL-Maßstab mit den Kultivierungen der etablierten Reaktionssysteme gerührte Blasensäule und Laborrührkesselreaktor ist in Tabelle 8 abgebildet. Die Wachstumsrate bzw. der Biomasseertrag in den mL-Kultivierungen erreicht 87% bzw. 90% der Referenzkultivierungen der etablierten Reaktionsgefäße. Der integrale Biomasseertrag während der Zulaufverfahren erreicht im mL-Maßstab 105% des Wertes der Referenzkultivierungen.

Die bestimmten Abweichungen liegen in einer Größenordnung, wie sie auch bei Mehrfachkultivierungen in etablierten Reaktionsgefäßen auftreten. Die Unterschiede in der maximal erreichten Wachstumsrate im Satzbetrieb können durchaus aus den unterschiedlichen Animpfdichten resultieren. Ebenfalls wäre ein Einfluss des Leistungseintrags möglich, falls das Rührsystem im mL-Maßstab bei äquivalentem k_La mehr Leistung einträgt als die drei Rushton-Turbinen im Laborrührkesselreaktor. Weitere Vergleichskultivierungen in den unterschiedlichen Reaktionsgefäßen mit ein und derselben Vorkultur in Medien desselben Ansatzes

könnten eventuell Aufschluss darüber geben, ob der Unterschied in der Wachstumsrate signifikant ist.

Tabelle 8: Vergleich der Wachstumsparameter von *E. coli* in den etablierten Reaktionssystemen (gerührte Blasensäule und Laborrührkesselreaktor) mit den Ergebnissen der Kultivierungen im mL-Bioreaktor.

Reaktionssystem	Satzbetrieb		Zulaufbetrieb
	μ , [h ⁻¹]	Y_{XS} , [g g ⁻¹]	Y_{XS} , [g g ⁻¹]
Etablierte Systeme	0,56 +/- 0,02	0,50 +/- 0,02	0,33
Kultivierungen im mL-Bioreaktor	0,48 +/- 0,03	0,45 +/- 0,02	0,35 +/- 0,01
mL-Maßstab / Etablierte Systeme	87 %	90 %	105 %

Bisher in der Literatur veröffentlichte maximale Zelldichten in Parallelreaktionssystemen für mikrobielle Anwendungen belaufen sich auf 5,1 g L⁻¹ *E. coli* in einem pH-geregelten, intermittierenden Zulaufverfahren im Schüttelkolben (Weuster-Botz *et al.*, 2001a), 12,5 g L⁻¹ *S. carnosus* in einem pH-geregelten Satzverfahren in einer Blasensäule (Dilsen *et al.*, 2001), 9,5 g L⁻¹ *S. lividans* in einem pH-ungeregelten Satzverfahren in einer *Deepwell*-Mikrotiterplatte (Minas *et al.*, 2000) und 1,6 g L⁻¹ *E. coli* in einem ebenfalls pH-ungeregelten Satzverfahren in einem Miniatur-Rührkesselreaktor (Lamping *et al.*, 2003). Ein Maßstabsvergleich mit Kultivierungen im Bioreaktor des Labormaßstabs und Zelldichten von über 10 g L⁻¹ wurde in diesen Reaktionssystemen bisher nicht durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Die Bioprozessentwicklung beginnt mit der Suche, Charakterisierung und Optimierung einer biologischen Aktivität mit industrieller Relevanz (*primary screening*, Primärauswahl). Hierbei kann durch moderne gentechnische Methoden eine riesige Menge an potentiell optimierten Biokatalysatoren generiert werden. Die Aufnahme einer möglichst großen Zahl dieser Kandidaten in die weitergehende Prozessentwicklung (*secondary screening*, Sekundärauswahl) sowie eine möglichst frühzeitige, parallel zur Primärauswahl ablaufende Prozessentwicklung im Labormaßstab verkürzen die Entwicklungszeit eines ökonomischen Bioprozesses.

Aufgrund unzureichender Paralleltechniken liegt der Geschwindigkeitslimitierende Schritt der Bioprozessentwicklung in der Prozessentwicklung im Labormaßstab. Mit momentan verfügbaren Reaktionsgefäßen können entweder eine hohe Zahl von unkontrollierten Parallelreaktionen im Satzverfahren oder eine relativ geringe Anzahl von 4 bis 16 Reaktionen mit hohem apparativen Aufwand unter technischen Bedingungen durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein neuartiges Konzept für ein Parallelreaktorsystem mit hoher Parallelität, hohem Automatisierungsgrad und dem Labormaßstab ebenbürtigen bioverfahrenstechnischen Parametern entwickelt werden, um den Personal- und Kosteneinsatz pro Versuch zu reduzieren und somit Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung ermöglichen zu können.

Eine Parameterstudie, welche übliche Kultivierungszeiten, den Wärmeübergang, und die Verdunstung umfasste, führte zur Auswahl eines Ausgangsvolumens für den mL-Bioreaktor von mindestens 5 mL. Als aussichtsreichste Begasungsstrategie für den mL-Bioreaktor wurde aufgrund des großen Oberfläche / Volumenverhältnis in diesem Maßstab die Begasung per Gas-Induktion durch ein selbst ansaugendes Rührsystem bewertet. Die Dimensionen des Rührsystems und mL-Bioreaktors wurden auf der Basis einer weiteren Parameterstudie unter Berücksichtigung der notwendigen Rührerumfangsgeschwindigkeit zur Gas-Induktion, der angestrebten Re -Zahl und des Leistungseintrags definiert.

Die Entwicklung eines Rührsystems zur Gas-Induktion im mL-Maßstab erfolgte in zwei Phasen. Rührerprototypen einer ersten Serie ‚A‘, welche in Rotation aufgrund einer internen Kanalstruktur Strömungen induzieren, erzielten im mL-Bioreaktor mit Strömungsbrechern einen maximalen Sauerstoffübergangskoeffizienten $k_L a$ von $0,24 \text{ s}^{-1}$. Dieser hohe $k_L a$ kann allerdings nur in einem relativ geringen Volu-

menbereich aufrechterhalten werden. Ein Überschreiten eines kritischen Grenzvolumens führte durchwegs zu einer Limitierung des Gasaustauschs zwischen dispergierter Gasphase und Umgebungsluft. Eine zweite Rührerprototypenserie ‚B‘ wurde dahingehend optimiert, diese Limitierung durch Bereitstellung von Prozessgas im Zentrum des Rührorgans und Verkleinerung des Verhältnisses aus Durchmesser des Rührorgans zu Durchmesser des mL-Bioreaktors zu überwinden. Die Lagerung der Rührorgane auf einer Hohlachse ermöglichte zudem die Erhöhung der Bewehrung des mL-Bioreaktors durch Strömungsbrecher, welche über die gesamte Höhe des mL-Bioreaktors ausgeführt werden konnten. Rührsysteme der Serie ‚B‘ erzielten einen maximalen k_La von über $0,4 \text{ s}^{-1}$. Eine Volumenzunahme von 50 % des Ausgangsvolumens reduzierte den vorliegenden k_La um 20 %, so dass das Rührsystem für Zulaufverfahren geeignet ist. Die manuelle Fertigung der Rührorgane resultierte in Toleranzen, welche eine Streuung der Sauerstoffsorptionsleistung verschiedener Rührorgane gleichen Typs bei gleichen Bedingungen von weniger als 7 % zur Folge hatten. Diese Differenzen sollten durch automatisierte Serienfertigung weiter minimiert werden können.

Zur Erleichterung der Handhabbarkeit der parallelen mL-Bioreaktoren wurde auf der Basis eines kommerziellen Reaktionsblocks für chemische Synthesen ein Bioreaktionsblock für 48 mL-Bioreaktoren entwickelt, welcher eine magnetisch induktive Antriebseinheit und Wärmetauscher zur Temperierung der Reaktionsmedien sowie zur Kühlung des Kopfgasraumes der Reaktoren zur Reduzierung der Verdunstung zur Verfügung stellt.

Zur Aufrechterhaltung monoseptischer Bedingungen in den mL-Bioreaktoren wurde eine Sterilgasabdeckung entwickelt, welche die zentrale Einspeisung von sterilem Prozessgas ermöglicht.

Durch die Integration des Reaktionsblocks in einen Pipettierroboter wurde die Automatisierung der Probenahme sowie eine Zudosierung von Titrationsmitteln zur pH -Kontrolle und zur Durchführung von Zulaufverfahren ermöglicht. Die Pipettiergenauigkeit des Pipettierroboters wurde für relevante Lösungen optimiert. Die Abweichung der Pipettiergenauigkeit konnte durch Anpassung der Pipettierparameter des Pipettierroboters auf unter 5 % reduziert werden.

Die Automatisierung der *atline* Prozesskontrolle zur Messung des pH und der optischen Dichte erfolgte mittels eines Mikrotiterplatten-Photometers, eines in den Pipettierroboter integrierten Greifarms und eines Mikrotiterplatten-Waschgeräts.

Zur Etablierung einer parallelen pH -Messung wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde mit Hilfe von in Mikrotiterplatten immobilisierten, fluorometrischen pH -Sensoren der pH *atline* in einem integrierten Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Zur pH -Kontrolle wurde ein Proportionalregler eingesetzt.

Die zweite verfolgte Strategie zur parallelen pH -Messung umfasst die nicht-invasive Messung mit Hilfe von in den mL-Bioreaktoren integrierten fluorometrischen Sensoren. Diese werden von einer optischen Ausleseinheit durch die

Gefäßwand hindurch ausgelesen. Erste Messungen mit Prototypen der Sensoreinheiten während einer *pH*-geregelten Satzkultivierung von *E. coli* ergaben sehr gute Übereinstimmungen der Messsignale für *pH* und pO_2 im Vergleich zu Referenzmessungen.

Die *atline* Abschätzung der Biotrockenmassekonzentration wurde durch Messung der optischen Dichte der Reaktorproben im Mikrotiterplatten-Photometer durchgeführt. Durch Verwendung eines Polynoms zweiten Grades zur Korrelation der optischen Dichte mit der Biotrockenmassekonzentration konnte ohne weitere Verdünnungen ein Messbereich von 0,7 - 24 g L⁻¹ für *E. coli* erzielt werden.

Die Prozesskontrolle wurde mit der Gerätesoftware des Pipettierroboters realisiert. Diese Software ist lediglich zur Steuerung von Arbeitsabläufen ausgelegt und erlaubt deshalb a priori keine Etablierung einer *pH*-Regelung. Diese Funktion wurde mit Hilfe der graphischen Programmieroberfläche *LabView* erstellt, indem das Auslesen des im Mikrotiterplatten-Photometer gemessenen *pH* und das Erstellen einer Arbeitsanweisung für den Pipettierroboter ermöglicht wird.

In einer Parallelkultivierung von *E. coli* im Zulaufverfahren in fünf mL-Bioreaktoren wurde die am Ende der Satz- bzw. Zulaufphase erzielte Biotrockenmassekonzentration durch eine Abweichung von weniger als 5,3 % vom Mittelwert charakterisiert. Die relative Standardabweichung der in Mikrotiterplatten durchgeführten *atline pH*-Messungen lag während des gesamten Prozesses unter 2,0 %.

Kultivierungen von *E. coli* im mL-Bioreaktor erzielten im Satzbetrieb eine Wachstumsrate μ von 0,48 h⁻¹ oder 87 % des Werts der etablierten Referenzsysteme Laborrührkesselreaktor (3 L) und gerührte Blasensäule (200 mL). Der Biomassertrag im Satzbetrieb lag bei 0,45 g g⁻¹ oder 90 % des Wertes der Referenzsysteme. Im Zulaufbetrieb wurde im mL-Bioreaktor ein Biomassertrag von 0,35 g g⁻¹ oder 105 % des Wertes im Laborbioreaktor erzielt.

Der Vergleich des Zulaufverfahrens mit intermittierendem Dosierprofil im 3 L-Maßstab und im mL-Bioreaktor zeigt unterschiedlichen Volumenverlauf aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen der eingesetzten Titrationsmittel und Zudosierlösungen. Unter Berücksichtigung dieses unterschiedlichen Volumenverlaufs wurde eine Abweichung zwischen den Biotrockenmasse-Verläufen im 3 L-Maßstab und im mL-Maßstab von unter 10,5 % ermittelt. Somit wurde eine erfolgreiche Maßstabsverkleinerung eines *pH*-geregelten Zulaufverfahrens vom Maßstab 3 L in den Maßstab 10 mL durchgeführt. In beiden Maßstäben wurde nach einer Prozesszeit von 20,9 h im Mittel eine Biotrockenmassekonzentration von 24,0 +/- 1,0 g L⁻¹ erzielt (Abbildung 69).

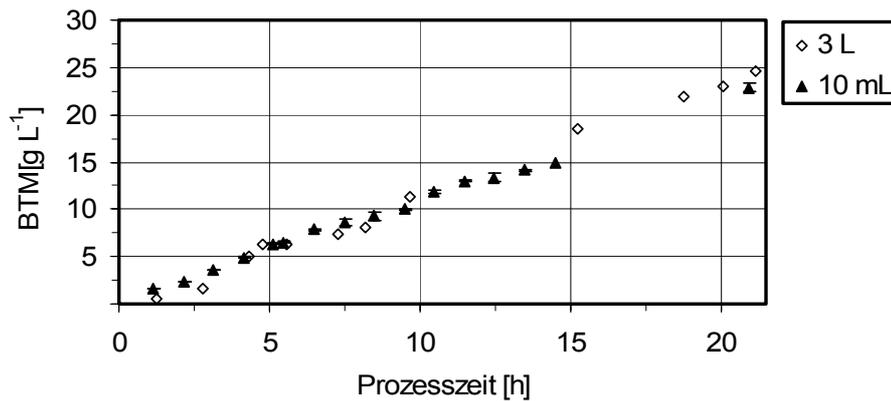


Abbildung 69: Maßstabsverkleinerung eines Zulaufverfahrens mit *E. coli* vom Labormaßstab (3 L) in den Maßstab der entwickelten mL-Bioreaktoren (10 mL).

Das entwickelte Reaktionssystem im mL-Maßstab stellt Rahmenbedingungen zur Verfügung, um Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklungen durchführen zu können. Die Sauerstoffsorptionsleistung, Parallelität sowie der Automatisierungsgrad übertreffen bisher verfügbare parallele Reaktionssysteme. Das entwickelte System erlaubt die automatisierte Durchführung von *pH*-geregelten Zulaufverfahren mit hoher Datendichte bei geringem Reaktionsvolumen. Die daraus resultierende Einsparung an Material, Personal und Zeitbedarf kann zur effizienteren Bioprozessentwicklung beitragen.

6. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die wissenschaftlich-technischen Grundlagen erarbeitet, um automatisiert in bis zu 48 parallelen Versuchsansätzen *pH*-geregelter Zulaufverfahren im mL-Maßstab durchführen zu können. Dazu wurde ein mL-Bioreaktor mit einem Gas-induzierenden Rührsystem bis zur Serienreife entwickelt. Die Fertigung des Rührorgans wird in Zukunft automatisiert mit Hilfe von CNC-Dreh-/Fräsmaschinen erfolgen. Der mL-Bioreaktor wird aus Polystyrol im Spritzgussverfahren gefertigt werden. In folgenden Arbeiten müssen die Sauerstoffsorptionsleistung, die Wärmeübergangseigenschaften und die Sterilbedingungen des mL-Bioreaktors der Serienproduktion überprüft und nochmals die parallele Vergleichbarkeit verifiziert werden. Diese sollte bei automatisiert hergestellten Teilen aufgrund der höheren erzielbaren Fertigungspräzision noch niedriger liegen als bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, manuell gefertigten Prototypen.

Die in Zusammenarbeit mit einem industriellen Kooperationspartner entwickelte, nicht-invasive fluorometrische Messtechnik für *pH* und *pO₂* lag bislang nur als 1-Kanal-Messgerät vor. Sobald diese Messtechnik als paralleles System verfügbar ist, kann durch höhere Datendichte im Bereich von 30 Messwerten für *pH* und *pO₂* pro mL-Bioreaktor und Stunde eine verbesserte Regelung dieser beiden Parameter erzielt werden. Darüber hinaus kann das bisher zur *atline pH*-Messung notwendige Probenvolumen eingespart werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Prozesskontrollsoftware (*Gemini*, *LabView*) ermöglicht bislang keine variable Zeittaktung von Zudosier- und Probenahmeschritten, sondern folgt starr den programmierten Zeitintervallen. Die zusammen mit einem weiteren industriellen Partner in Entwicklung befindliche *Scheduling*-Software wird diese Einschränkung überwinden und somit ein Prozesssensitives Takten der Arbeitsabläufe ermöglichen.

Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen mit *E. coli* erlaubten die Produktion von 24 g L⁻¹ Biotrockenmasse in *pH*-geregelter Zulaufverfahren. Mit *Saccharomyces cerevisiae* wurden im *pH*-geregelter Zulaufverfahren ebenfalls 30 g L⁻¹ Biotrockenmasse erzielt (Kusterer, 2003). Um die Einsetzbarkeit des Systems auszuweiten, sollten noch weitere, industriell interessante Organismen wie beispielsweise *P. pastoris* auf ihre Wachstumseigenschaften untersucht werden. Um den maximalen Leistungseintrag des Systems in Kultivierungen zu

testen, könnten filamentöse Bakterien und Pilze wie beispielsweise *Streptomyces sp.* oder *Aspergillus sp.* kultiviert werden.

Der Leistungseintrag des Gas-induzierenden Rührsystems ist bisher messtechnisch nicht zugänglich. In folgenden Arbeiten könnte eine Modellierung per CFD einen Anhaltspunkt über die Größenordnung des Leistungseintrags ergeben.

Die per Pipettierroboter etablierte intermittierende Zudosierung zu den mL-Bioreaktoren führt zu oszillierender Substratkonzentration, Sauerstoffaufnahme und pO_2 . Der Einfluss dieser im Vergleich zur kontinuierlichen Zudosierung abweichenden Bedingungen auf das Wachstum und die Produktivität eines gegebenen Prozesses muss jeweils überprüft werden. Da sowohl positiver (Weuster-Botz *et al.*, 2001a) als auch negativer Einfluss (Lin und Neubauer, 2000) beobachtet wurde, ist die intermittierende Dosierung möglicherweise nicht für alle Prozesse anwendbar.

Auch in Bioreaktoren des Produktionsmaßstabs finden Zellen allerdings oszillierende Bedingungen auf ihrem Weg durch den Bioreaktor vor. Die intermittierende Betriebsweise mit variablen Zeitintervallen in Bioreaktoren kleinen Maßstabs kann möglicherweise Aufschluss über die Auswirkungen der oszillierenden Bedingungen im Produktionsreaktor geben (Lin und Neubauer, 2000). Die entwickelten mL-Bioreaktoren könnten möglicherweise als optimales Werkzeug zur Bearbeitung dieser Fragestellung eingesetzt werden.

Das Potential der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten parallelen mL-Bioreaktoren und der Automatisierungstechnik übertrifft das Potential von bislang verfügbaren parallelen Reaktionssystemen. Durch im Verlauf der Prozessentwicklung frühzeitige Evaluierung der Wachstumseigenschaften (Sekundärauswahl) eines Biokatalysators können daraus resultierende prozesstechnische Einschränkungen in der laufenden Entwicklung (Primärauswahl) berücksichtigt werden, so dass für einen gegebenen Biokatalysator mit größerer Wahrscheinlichkeit ein ökonomischer Prozess entwickelt werden kann. Die automatisierte Durchführung von 48 pH -geregelten Kultivierungen im Zulaufverfahren bei Sauerstoffsorptionsleistungen wie im Laborrührkessel sollte den Personal- und Kosteneinsatz pro Versuch erheblich reduzieren, Prozessentwicklungszeiten verkürzen und somit Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung ermöglichen.

7. Literaturverzeichnis

Akesson M, Karlsson EN, Hagander P, Axelsson JP, Tocaj A. 1999. *On-line* detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients. *Biotechnol Bioeng* 64(5):590-8.

Akesson M, Hagander P, Axelsson JP. 2000. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnol Bioeng* 73(3):223-230.

Altenbach-Rehm J, Weuster-Botz D. 1995. Vorrichtung zur Serienkultivierung von Mikroorganismen bzw. Zellen in begasten Flüssigkeitssäulen. Patent DE 19529099.

Altenbach-Rehm J, Drescher T, Weuster-Botz D. 1997. Verfahren und Vorrichtung zur Serienkultivierung von Organismen. Patent DE 19709603.

Altenbach-Rehm J, Nell C, Arnold M, Weuster-Botz D. 1999. Parallel bubble columns with fed-batch technique for microbial process development on a small scale. *Chem Eng Technol* 22(12):1051-1058.

Anderlei T, Büchs J. 2001. Device for *online* measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochem Eng J* 7:157-162.

Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. 2004. *Online* respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem Eng J* 17:187-194.

Arber W, Kuhnlein U. 1967. Mutational loss of the B-specific restriction in bacteriophage fd. *Pathol Microbiol* 30:946-952.

Arber W. 1974. DNA modification and restriction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 14(0):1-37.

Arnold FH, Moore JC. 1997. Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 58:1-14.

Arjunwadkar SJ, Saravanan K, Pandit AB, Kulkarni PR. 1998. Gas liquid mass transfer in dual impeller bioreactor. *Biochem Eng J* 1:99-106.

Bermejo LL, Welker NE, Papoutsakis ET. 1998. Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 genes in *Escherichia coli* for acetone production and acetate detoxification. *Appl Environ Microb* 64(3):1079-1085.

Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF and others. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331):1453-74.

Bouaifi M, Hebrard G, Bastoul D, Roustan M. 2001. A comparative study of gas hold-up, bubble size, interfacial area and mass transfer coefficients in stirred gas-liquid reactors and bubble columns. *Chem Eng Process* 40(2):97-111.

Boettner M, Prinz B, Holz C, Stahl U, Lang C. 2002. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 99(1):51-62.

Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng* 68(6):589-593.

Büchs J. 2001a. Introduction to advances and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J* 7(2):91-98.

Büchs J, Lotter S, Milbradt C. 2001b. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 7(2):135-141.

Calhoun MW, Oden KL, Gennis RB, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM. 1993. Energetic efficiency of *Escherichia coli*: Effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J Bacteriol* 175:3020-3025.

Chen JH, Hsu YC, Chen YF, Lin CC. 2003. Application of gas-inducing reactor to obtain high oxygen dissolution in aeration process. *Water Research* 37:2919-2928.

Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 70(11):3240-3244.

Cooper CM, Fernstrom GA, Miller SA. 1944. Performance of agitated gas-liquid contactors. *Ind Eng Chem* 36:504-509.

- Crick FH, Watson JD. 1956. Structure of small viruses. *Nature* 177:473-475.
- Crueger W, Crueger A. 1989. *Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. München, Oldenburg Verlag.
- Dang NDP, Karrer DA, Dunn IJ. 1977. Oxygen transfer coefficients by dynamic model moment analysis. *Biotechnol Bioeng* 19:853-865.
- Dilsen S, Paul W, Herforth D, Sandgathe A, Altenbach-Rehm J, Freudl R, Wandrey C, Weuster-Botz D. 2001. Evaluation of parallel operated small-scale bubble columns for microbial process development using *Staphylococcus carnosus*. *J Biotechnol* 88(1):77-84.
- DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 22(2):151-85.
- Doig SD, Pickering SC, Lye GJ, Woodley JM. 2002. The use of microscale processing technologies for quantification of biocatalytic Baeyer-Villiger oxidation kinetics. *Biotechnol Bioeng* 80(1):42-9.
- Ducommun P, Ruffieux PA, Furter MP, Marison I, von Stockar U. 2000. A new method for *on-line* measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures. *J Biotechnol* 78(2):139-147.
- Duetz WA, Ruedi L, Hermann R, O'Connor K, Buchs J, Witholt B. 2000. Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl Environ Microbiol* 66(6):2641-6.
- Duetz WA, Witholt B. 2001. Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. *Biochem Eng J* 7:113-115.
- Elmahdi I, Baganz F, Dixon K, Harrop T, Sugden D, Lye GJ. 2003. pH control in microwell fermentations of *S. erythraea* CA340: influence on biomass growth kinetics and erythromycin biosynthesis. *Biochem Eng J* 16:299-310.
- Ernst & Young. 2003. *Zeit der Bewährung*. Deutsche Biotechnologie Report 2003. <http://www.ey.com>, Mannheim, Ernst & Young.
- Fischer E, Zamboni N, Sauer U. 2004. High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography-mass spectrometry derived ^{13}C constraints. *Anal Biochem* 325:308-316.

Fuchs R, Ryu DDY. 1971 Effect of surface aeration on scale-up procedures for fermentation processes. *Ind Eng Chem Process Des Develop* 10(2):190-196.

Gaddis ES. 1999. Mass transfer in gas-liquid contactors. *Chem Eng Process* 38(4-6):503-510.

Gagnon H, Lounès M, Thibault J. 1998. Power consumption and mass transfer in agitated gas-liquid columns: A comparative study. *Can J Chem Eng* 76:379-389.

Genbank. 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/Complete.html>

Gogate PR, Pandit AB. 1999. Survey of measurement techniques for gas-liquid mass transfer coefficient in bioreactors. *Biochem Eng J* 4:7-15.

Guardia MJ, Calvo EG. 2001. Modeling of *Escherichia coli* growth and acetate formation under different operational conditions. *Enz Microb Technol* 29:449-455.

Gupta A, Rao G. 2003. A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. *Biotechnol Bioeng* 84(3):351-358.

Havelka P, Moucha T, Sinkule J, Linek V. 1998. Chemical dynamic method for measuring k_La in gas-liquid dispersions. *Chem Eng Commun* 168:97-110.

Hermann R, Walther N, Maier U, Büchs J. 2001. Optical method for the determination of the oxygen transfer capacity of small bioreactors based on sulfite oxidation. *Biotechnol Bioeng* 74(5):355-363.

Hermann R, Lehmann M, Buchs J. 2003. Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *Biotechnol Bioeng* 81(2):178-186.

Holms H. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* 19:85-116.

Huisman GW, Gray D. 2002. Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. *Curr Opin Biotech* 13:352-358.

Imai Y, Takei H, Matsumura M. 1987. A simple Na_2SO_3 feeding method for k_La measurement in large-scale fermentors. *Biotechnol Bioeng* 29:982-993.

Jensen EB, Carlsen S. 1990. Production of recombinant human growth-hormone in *Escherichia-coli* - Expression of different precursors and physiological-effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol Bioeng* 36(1):1-11.

John GT. 2001. Mikrotiterplatten mit integrierter *pH*- und Sauerstoffsensorik: Charakterisierung und biotechnologische Anwendungen. Dissertation, Universität des Saarlandes.

John GT, Klimant I, Wittmann C, Heinzle E. 2003. Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation. *Biotechnol Bioeng* 81(7):829-36.

Kawase Y, Moo-Young M. 1990. Mathematical models for design of bioreactors: Application of Kolmogorov theory of isotropic turbulence. *Chem Eng J* 43:19-41.

Kayser AN. 1999. Stoffflüsse in *Escherichia coli* TG1 unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen. Dissertation, TU Braunschweig.

Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD. 1995. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 39:59-65.

Kostov Y, Harms P, Randers-Eichhorn L, Rao G. 2001. Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnol Bioeng* 72(3):346-52.

Kusterer A. 2003. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* im Liter- und mL-Maßstab. Diplomarbeit, TU München.

Lamping SR, Zhang H, Allen B, Shamlou PA. 2003. Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing. *Chem Eng Sci* 58(3-6):747-758.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W and others. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921.

Lara-Márquez A, Wild G, Midoux N. 1994. A review of recent chemical techniques for the determination of the volumetric mass transfer coefficient k_La in gas-liquid reactors. *Chem Eng Proc* 33:247-260.

Lee SY. 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *TIBTECH* 14(3):98-105.

Liepe F. 1994a. Kap. 6 Begasen. In: Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden Teil 4. Weinheim, VCH-Verlagsgesellschaft, 158-167.

Liepe F. 1994b. Kap. 2 Rühr-ausrüstungen. In: Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden Teil 4. Weinheim, VCH-Verlagsgesellschaft, 37-80.

Liese A, Seelbach K, Wandrey C. 2000. Industrial biotransformations, Weinheim, Wiley VCH Verlag GmbH.

Lin HY, Neubauer P. 2000. Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant *Escherichia coli*. J Biotech 79:27-37.

Linek V, Vacek V. 1981. Chemical engineering use of catalyzed sulfite oxidation kinetics for the determination of mass transfer characteristics of gas-liquid contactors. Chem Eng Sci 36(11):1747-1768.

Linek V, Vacek V, Benes P. 1987. A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen-transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte-solutions and viscous liquids. Chem Eng J Biotech Eng 34(1):11-34.

Linek V, Benes P, Vacek V. 1989. Dynamic pressure method for k_La measurement in large-scale bioreactors. Biotechnol Bioeng 33(11):1406-1412.

Linek V, Benes P, Sinkule J. 1990. Critical assessment of the steady-state Na_2SO_3 feeding method for k_La measurement in fermentors. Biotechnol Bioeng 35(8):766-770.

Linek V, Sinkule J, Benes P. 1991. Critical assessment of gassing-in methods for measuring k_La in fermentors. Biotechnol Bioeng 38(4):323-330.

Linek V, Benes P, Sinkule J, Moucha T. 1993. Nonideal pressure step method for k_La measurement. Chem Eng Sci 48(9):1593-1599.

Linek V, Moucha T, Dousova M, Sinkule J. 1994. Measurement of k_La by dynamic pressure method in pilot-plant fermentor. Biotechnol Bioeng 43(6):477-482.

Linek V, Moucha T, Sinkule J. 1996. Gas-liquid mass transfer in vessels stirred with multiple impellers. 2. Modelling of gas-liquid mass transfer. Chem Eng Sci 51(15):3875-3879.

Lye GJ, Ayazi-Shamlou P, Baganz F, Dalby PA, Woodley JM. 2003. Accelerated design of bioconversion processes using automated microscale processing techniques. TIBTECH 21(1):29-37.

Maharbiz MM, Holtz WJ, Howe RT, Keasling, JD. 2004. Microbioreactor arrays with parametric control for high-throughput experimentation. *Biotechnol Bioeng* 85(4):376-381.

Maier B, Dietrich C, Büchs J. 2001a. Correct application of the sulfite oxidation methodology of measuring the volumetric mass transfer coefficient k_La under non pressurized and pressurized conditions. *Trans IChem E* 79:107-112.

Maier U, Büchs J. 2001b. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 7(2):99-106.

Maier U. 2002. Gas/Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben, Dissertation, Universität Aachen und Shaker Verlag, Aachen.

Maier U, Losen M, Büchs J. 2004. Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biochem Eng J* 17:155-167.

Matsumura M, Sakuma H, Yamagata T, Kobayashi J. 1982. Performance of oxygen transfer in a new gas entraining fermentor. *J Ferment Technol* 60(6):551-563.

Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:560-564.

Merchuk JC, Yona S, Siegel MH, Benzvi A. 1990. On the 1st-order approximation to the response of dissolved-oxygen electrodes for dynamic k_La estimation. *Biotechnol Bioeng* 35(11):1161-1163.

Meusel W. 1988. Kap. 6.2. Auswahl von Ausrüstungen. In: *Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden Teil 4*. Weinheim, VCH-Verlagsgesellschaft, 167-172.

Middleton JC. 1985. Gas-liquid dispersion and mixing. In: Harnby N, Edwards MF, Nienow AW, *Mixing in the process industries*. Butterworth & Co, 322-355.

Minas W, Bailey JE, Duetz W. 2000. *Streptomyces* in micro-cultures: growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format. *Ant van Leeuwenhoek* 78(3-4):297-305.

Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Ann Rev Microbiol* 3:371-378.

Moresi M, Patete M. 1988. Prediction of k_La in conventional stirred fermentors. *J Chem Eng Biotechnol* 197-209.

Moucha T, Linek V, Sinkule J. 1995. Measurement of k_La in multiple-impeller vessels with significant axial dispersion in both phases. *Trans IChem E* 73:286-290.

Müller C. 2002. The evolution of the biotechnology industry in Germany. *TIBTECH* 20(7):287-290.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(1):263-273.

Nielsen J. 2001. Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:263-283.

Nirenberg M. 2004. Historical review: Deciphering the genetic code – a personal account. *Trends Biochem Sci* 29(1):46-54.

Nocentini M. 1990. Mass transfer in gas-liquid, multiple-impeller stirred vessels: A discussion about experimental techniques for k_La measurement and models comparison. *Trans IChem E* 68:287-294.

Nocentini M, Fajner D, Pasquali G, Magelli F. 1993. Gas-liquid mass transfer and holdup in vessels stirred with multiple Rushton turbines: Water and water-glycerol solutions. *Ind Eng Chem Res* 32:19-26.

OECD Organisation for economic cooperation and development. 2001. *The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability*. Paris, OECD Publications.

Oh G, Moo-Young M, Chisti Y. 1998. Automated fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* based on *on-line* monitored maximum substrate uptake rate. *Biochem Eng J* 1:211-217.

Oliviera EG, Morais JO, Pereira N. 1992. Determination of the energy maintenance coefficient of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett* 14(11):1081-1084.

Paalme T, Elken R, Kahru A, Vanatalu K, Vilu R. 1997. The growth rate control in *Escherichia coli* at near to maximum growth rates: the A-stat approach. *Ant van Leeuwenhoek* 71:217-230.

Patwardhan AW, Joshi JB. 1998. Design of stirred vessels with gas entrainment from free liquid surface. *Can J Chem Eng* 76:339-364.

Patwardhan AW, Joshi JB. 1999. Design of gas-inducing reactors. *Ind Eng Chem Res* 38(1):49-80.

Poncin S, Nguyen C, Midoux N, Breyse J. 2002. Hydrodynamics and volumetric gas-liquid mass transfer coefficients of a stirred vessel equipped with a gas-inducing impeller. *Chem Eng Sci* 57:3299-3306.

Riesenberg D. 1991a. High-Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotech* 2(3):380-384.

Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz D, Sanders EA, Roß A, Deckwer WD. 1991b. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J Biotechnol* 20:17-28.

Riesenberg D, Guthke R. 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biot* 51(4):422-430.

Rondon MR, Goodman RM, Handelsman J. 1999. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol* 17(10):403-9.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732):1350-1354.

Sanger F, Micklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing and chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.

Saravanan K, Joshi JB. 1995. Gas-inducing-type mechanically agitated contactors - Hydrodynamic characteristics of multiple impellers. *Ind Eng Chem Res* 34(7):2499-2514.

Sawant SB, Joshi JB. 1979. Critical impeller speed for onset of gas inducing in gas inducing types of agitated contactors. *Chem Eng J* 18:87-91.

Schumpe A, Quicker G, Deckwer WD. 1982. Gas solubilities in microbial culture media. *Adv Biochem Eng* 24:1-38.

Schumpe A. 1993. The estimation of gas solubilities in salt solutions. *Chem Eng Sci* 48:153-158.

Shamlou PA. 2003. Scaleable processes for the manufacture of therapeutic quantities of plasmid DANN. *Biotechnol Appl Biochem* 37:207-218.

Simonnet A. 2003. Charakterisierung von blasenbegasteten Fermentern hinsichtlich des Sauerstoffeintrags. Diplomarbeit, TU München.

Stemmer WP. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(22):10747-10751.

van de Walle M, Shiloach J. 1998. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. *Biotechnol Bioeng* 57(1):71-78.

van't Riet K. 1979. Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind Eng Chem Process Des Dev* 18(3):357-364.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA and others. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-51.

Vrabel P, van der Lans RGJM, van der Schot FN, Luyben KCAM, Xu B, Enfors SO. 2001. CMA: integration of fluid dynamics and microbial kinetics in modelling of large-scale fermentations. *Chem Eng J* 84(3):463-474.

Walsh G. 2003. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *Europ J Pharm Biopharm* 55:3-10.

Walther I, van der Schoot BH, Jeanneret S, Arquint P, de Rooij NF, Gass V, Bechler B, Lorenzi G, Cogoli A. 1994. Development of a miniature bioreactor for continuous culture in a space laboratory. *J Biotechnol* 38:21-32.

Weng Z, de Lisi C. 2002. Protein therapeutics: promises and challenges for the 21st century. *TIBTECH* 20(1):29-35.

Weuster-Botz D. 1999. Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung. Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich

Weuster-Botz D. 2000. Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search? *J Biosci Bioeng* 90(5):473-483.

Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Arnold M. 2001a. Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochem Eng J* 7(2):163-170.

Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Hawrylenko A. 2001b. Process-engineering characterization of small-scale bubble columns for microbial process development. *Bioproc Biosys Eng* 24:3-11.

Weuster-Botz D, Stevens S, Hawrylenko A. 2002. Parallel-operated stirred-columns for microbial process development. *Biochem Eng J* 11:69-72.

Wilhelm E, Battino R, Wilcock RJ. 1977. Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem Rev* 77:219-262.

Wodick R. 1972. Compensation of measuring errors produced by finite response time in polarographic measurements with electrodes sensitive to oxygen and hydrogen. *Pflug Arch Eur J Phy* 336(4):327-344.

Wolfram E, Arnold M, Franz A, Weuster-Botz D, Wandrey C. 2000a. Verfahren für die Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentration in einem Medium. Patent DE10024969.

Wolfram E, Arnold M, Franz A, Weuster-Botz D, Wandrey C. 2000b. Verfahren und Vorrichtung für die Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentration in einem Medium. Patent DE 10024992.

Wolfram E. 2002. Parallele Substratkontrolle in Bioreaktoren mit geringem Volumen. Dissertation, TU München.

Wu H. 1995. An issue on applications of disk turbine for gas-liquid mass transfer, *Chem Eng Sci* 50(17):2801-2811.

Wu H, Arcella V, Malavasi M. 1998. A study of gas-liquid mass transfer in reactors with two disk turbines. *Chem Eng Sci* 53(5):1089-1095.

Zlokarnik M. 1999. *Rührtechnik*. Berlin, Heidelberg. Springer Verlag.

A. Material und Methoden

A.1. Material

A.1.1. Allgemeines

Folgende Geräte (Tabelle 9), Labormaterialien (Tabelle 10) und Software (Tabelle 11) wurden im Verlauf der Arbeiten verwendet.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Laborgeräte mit Herstellerangabe

Gerät	Name	Hersteller
A/D-Wandlerkarte	<i>PCI-6024E</i>	<i>National Instruments, München</i>
Abgasanalytik	<i>Easyline</i>	<i>ABB, Frankfurt</i>
Analytikwaage	<i>AG 285</i>	<i>Mettler Toledo, Giessen</i>
Bioreaktor	<i>Labfors</i>	<i>Infors, Bottmingen, Schweiz</i>
Inkubationsschüttler	<i>Multitron</i>	<i>Infors, Bottmingen, Schweiz</i>
Küvettenphotometer	<i>Genesys20</i>	<i>Thermo Electron, Dreieich</i>
Laborroboter	<i>Genesis RSP 150</i>	<i>Tecan, Crailsheim</i>
Mikrotiterplatten- Photometer	<i>Fluostar Galaxy</i>	<i>BMG Labtech, Offenburg</i>
Mikrotiterplatten- Waschgerät	<i>Columbus</i>	<i>Tecan, Crailsheim</i>
Massendurchflussmesser	<i>5850E</i>	<i>Brooks Instrument, Baar, Schweiz</i>
pH Elektrode	<i>105-DPAS-SC-K85/325</i>	<i>Mettler-Toledo, Giessen</i>
pH Elektrode, miniatur	<i>28 510 51 51</i>	<i>Schott, Mainz</i>
pH Messgerät	<i>PDD</i>	<i>Presens, Regensburg</i>
pO ₂ Elektrode	<i>InPro6000 420 S/P</i>	<i>Mettler-Toledo, Giessen</i>
pO ₂ Elektrode	<i>CellOx 325</i>	<i>WTW, Weilheim</i>
pO ₂ Messgerät	<i>Fibox3</i>	<i>Presens, Regensburg</i>
pO ₂ Messgerät	<i>MicroTX</i>	<i>Presens, Regensburg</i>
Schlauchpumpe	<i>BVP Easyload</i>	<i>Ismatec, Giattbrugg, Schweiz</i>
Schwebekörperdurchfluss- messer	<i>V100</i>	<i>Vögtlin, Lörrach</i>
Tischzentrifuge	<i>Mikro 20</i>	<i>Hettich, Tuttlingen</i>
Waage	<i>Explorer</i>	<i>Ohaus, Giessen</i>
Zentrifuge	<i>Rotixa 50RS</i>	<i>Hettich, Tuttlingen</i>

Tabelle 10: Auflistung sonstiger Materialien und Geräte

Material	Beschreibung	Hersteller
Enzymkits	Acetat, Glukose	<i>R-Biopharm</i> , Darmstadt
Glukosemessgerät	<i>AccuCheck</i>	<i>Roche</i> , Basel, Schweiz
Hydroplates	HP96L, HP96T	<i>Presens</i> , Regensburg
Kunststoff Rohmaterial	PTFE, PEEK, PMMA	<i>Sahlberg</i> , München
Magnete	SmCo, NdFeB	<i>Fehrenkemper Magnetsysteme</i> , Messenkamp
Prototypen Reaktionsblöcke	40 Kavitäten	<i>H+P Labortechnik</i> , Oberschleissheim
Spritzenkörper	<i>Inject</i> , 10 und 20 mL	<i>B. Braun Petzold</i> , Melsungen
Spritzenkörper	20 mL	<i>Terumo</i> , Somerset, NJ, USA
Sterilfilter	<i>Midisart 2000</i>	<i>Sartorius</i> , Göttingen
Steuergerät Reaktionsblockprototyp	<i>Thermomodul 40ST</i>	<i>H+P Labortechnik</i> , Oberschleissheim
Steuergerät Reaktionsblockprototyp	<i>Variomag Shakemodul</i>	<i>H+P Labortechnik</i> , Oberschleissheim

Tabelle 11: Software

Software	Beschreibung	Hersteller
<i>CATIA V5 R12</i>	CAD Software	<i>Dassault Systèmes</i> , Suresnes, Frankreich
<i>Fluostar Software 4.31</i>	Steuersoftware des Mikrotiterplatten- Photometers	<i>BMG Labtech</i> , Offenburg
<i>Gemini 3.4 SP2</i>	Steuersoftware des Laborroboters	<i>Tecan</i> , Crailsheim
<i>Iris 1.0</i>	Steuersoftware Bioreaktor Labormaßstab	<i>Infors</i> , Bottmingen, Schweiz
<i>LabView 6.1</i>	Graphische Programmier- oberfläche zur Gerätesteuerung und Auswertung des $k_L a$	<i>National Instruments</i> , München
<i>Microx TX</i>	Auslesesoftware	<i>Presens</i> , Regensburg
<i>PDD, Fibox3</i>	Auslesesoftware	<i>Presens</i> , Regensburg
<i>tscmdl.exe</i>	Kommandozeilenapplika- tion für den Reaktionsblock	<i>Albrecht Elektronik</i> , München
<i>WinWash 1.3</i>	Programmiersoftware des Mikrotiterplatten- Waschgeräts	<i>Tecan</i> , Crailsheim

A.1.2. Laborrührkesselreaktor

Für Referenzexperimente wurde ein Laborrührkesselreaktor mit einem Nominalvolumen von 7,5 L eingesetzt (*Labfors, Infors*). Der Reaktor ist mit drei Strömungsbrechern ausgestattet und wird von drei 6-Blatt Scheibenrührer durchmischst (Abbildung 70). Die Kontrolleinheit ist mit der Software *Iris (Infors)* ausgestattet. Die Temperatur wird durch eine Temperatursonde gemessen und einen Thermostat geregelt. Zur Temperierung des Bioreaktors wird das Heizmedium durch den Glasdoppelmantel gepumpt. Eine *pH*-Einstabmesskette (*Mettler-Toledo*) sowie *pO₂*-Sonde (*Mettler-Toledo*) ermöglichen die Regelung dieser beiden Parameter. Die Belüftungsrate wird über einen Massendurchflussmesser (*Westphal*) geregelt. Die Primärdispersierung des Gases erfolgt über eine Gasdusche mit 11 Öffnungen mit je 1 mm Durchmesser.

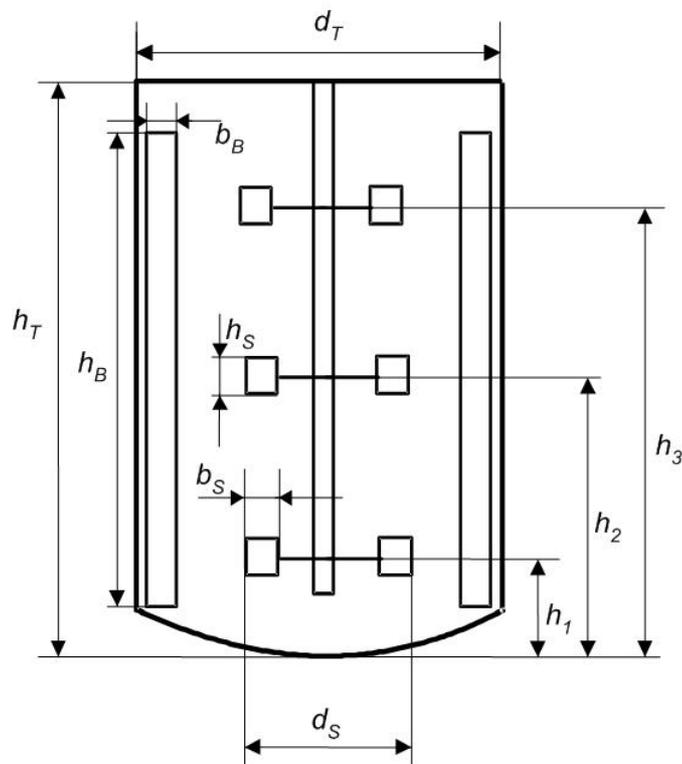


Abbildung 70: Geometrie des Laborrührkesselreaktors. $d_T = 150$ mm, $h_T = 450$ mm, $b_B = 15$ mm, $h_B = 350$ mm, $d_S = 55$ mm, $h_S = 11$ mm, $b_S = 11$ mm, $h_1 = 25$ mm, $h_2 = 85$ mm, $h_3 = 144$ mm.

A.1.3. Blasensäule

Die Blasensäule (*Profors, Infors, Bottmingen, Schweiz*) besitzt ein Nominalvolumen von 300 mL und ist zusätzlich mit drei Strömungsbrechern ausgestattet (Abbildung 71). Die Durchmischung erfolgt mit einem 6-Blatt Scheibenrührer, welcher von einem in der nicht abgebildeten Bodenplatte rotierenden Permanentmagneten angetrieben wird. Analog zur Bemaßung in Abbildung 70 besitzt der

Reaktor folgende Geometrie: $d_T = 60$ mm, $h_T = 140$ mm, $b_B = 15$ mm, $h_B = 109$ mm, $d_S = 28$ mm, $h_S = 8$ mm, $b_S = 8$, $h_1 = 40$ mm. Zur Temperierung wird die Blasen säule in einem Inkubator betrieben. Die Begasung erfolgt über eine Sinterplatte am Boden des Reaktors. Der Volumenstrom des Prozessgases wird über einen Schwebekörperdurchflussmesser (V100, Vögtlin) eingestellt.

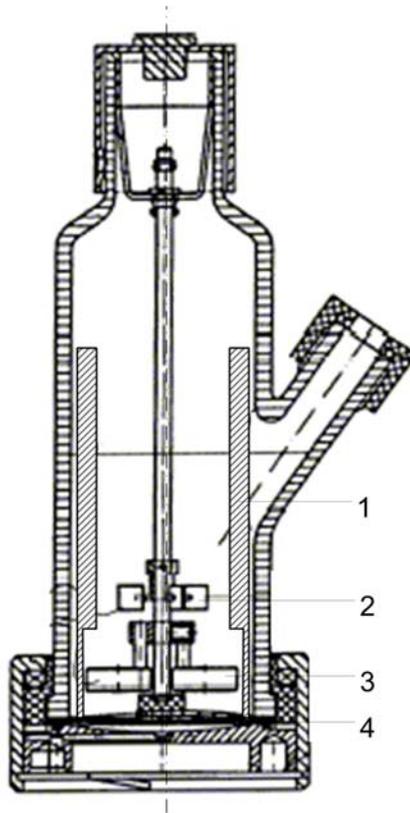


Abbildung 71: Prinzipskizze der Blasen säule. 1: Strömungsbrecher. 2: Rushton-Turbine. 3: Magnete. 4: Sinterplatte.

Die Sinterplatte wird vor Benutzung für 48 h in 96 % (m/v) H_2SO_4 und 1 h in alkalischer Reinigungslösung im Ultraschallbad gereinigt. Zur Entfernung der Rückstände des Reinigungsmittels wird die Sinterglasplatte mehrfach mit destilliertem Wasser gespült. Nach Einbau wurde unter Begasung nochmals mehrfach mit destilliertem Wasser gespült bis keine Schaumbildung mehr auftrat.

A.1.4. Rührsystem und mL-Bioreaktoren

Prototypenserie ,A'

Die Prototypen wurden in mL-Reaktionsgefäßen mit 15,5 mm Innendurchmesser hinsichtlich ihrer Laufeigenschaften, ihre Blaseneintragsverhaltens und Sauerstoffübergangskoeffizienten charakterisiert (Abbildung 72). Strömungsbrecher

wurden aus der Frontpartie eines Spritzenstempels gefertigt, indem der Stempel auf eine Länge von 14 mm abgestochen und danach durch eine zentrische Bohrung mit einem Durchmesser von 10 und einer Tiefe von 4 mm versehen wurde. Der Spritzenauslass wurde über der Bunsenbrennerflamme erwärmt und auf einer Metallplatte flachgedrückt. Dabei wurde die Öffnung dicht verschmolzen.

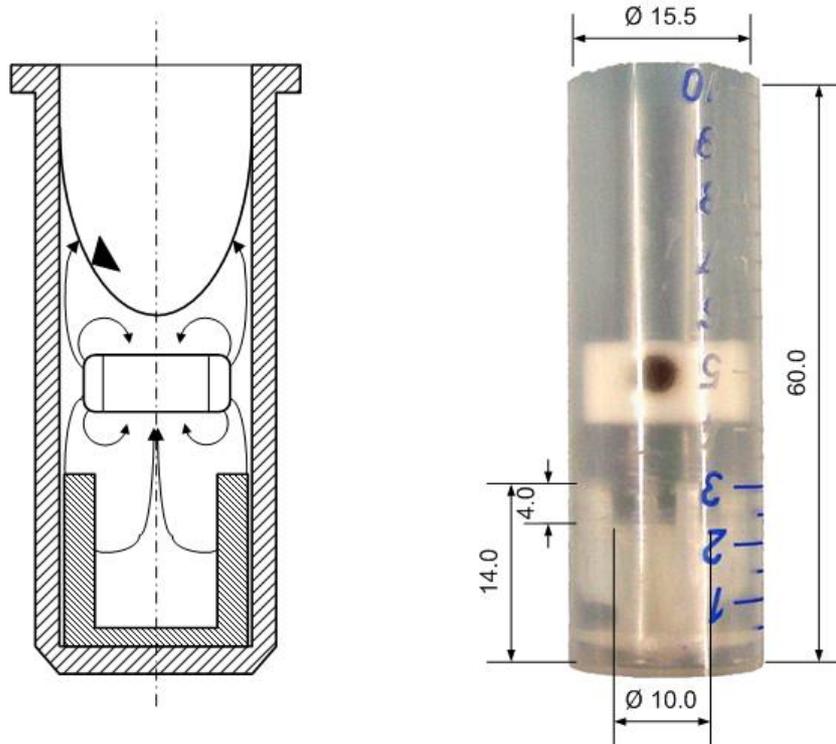


Abbildung 72: Prinzipskizze und Photo eines mit Rührorgan bestückten mL-Bioreaktors mit 15,5 mm Innendurchmesser. Alle Maße in mm.

Die Prototypen A1 - A10 (Tabelle 12) wurden aus PTFE Rohmaterial (*Sahlberg*) gefertigt und mit NdFeB-Magneten bestückt (*Fehrenkemper Magnetsysteme*). Der Antrieb erfolgte durch ein schwebendes Magnetfeld, welches 40-fach parallel in einem Aluminiumblock mit integrierter Temperierung (*H+P Labortechnik*) erzeugt wurde.

Um den gelagerten Betrieb der Rührorgane zu ermöglichen, wurden diese mit einer Zentrumsbohrung versehen. Mit Hilfe einer in diese Zentrumsbohrung eingepressten Welle konnten die Rührorgane ebenfalls mechanisch mit einem Elektromotor angetrieben und optisch hinsichtlich der induzierten Strömung evaluiert werden. Durch Einbau einer Achse in die Reaktionsgefäße konnten die Rührorgane außerdem durch das Magnetfeld des Reaktionsblocks angetrieben werden.

Tabelle 12: Prototypenserie ‚A‘: Geometrie und Magnetbestückung

Nummer	d, [mm]	h, [mm]	n_{Magnete}	Länge, [mm]	d, [mm]
A1	9	15,4	2	4	3
A2	5,25	14,5	1	10	4
A3	12,5	8,1	2	4	2,5
A4	14,5	10	2	4	2,5
A5	14,5	8,7	2	4	2,5
A6	15,2	6,2	2	4	3
A7	13,3	20	4	4	2,5
A8	14,5	9	2	4	2,5
A9	14,5	10	2	4	3
A10	14,5	7,3	2	2	5

Prototypenserie ‚B‘

Die Rührerprototypen der Serie ‚B‘ wurden aus PTFE, PEEK und PMMA Rohmaterial (*Sahlberg*) gefertigt und mit NdFeB-Magneten (*Fehrenkemper Magnetsysteme*) bestückt (Tabelle 13). Sie wurden in mL-Bioreaktoren mit 20,0 mm Innendurchmesser und vier eingepressten Strömungsbrechern betrieben (Abbildung 73). Diese mL-Bioreaktoren wurden aus Standard-Spritzenkörpern mit

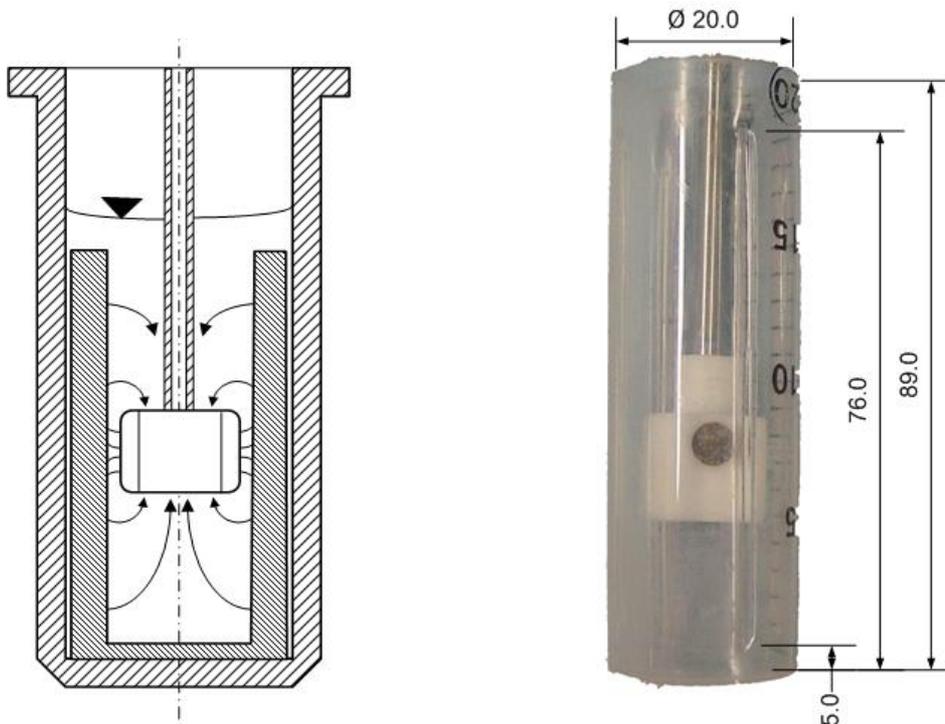


Abbildung 73: Prinzipskizze und Photo eines mit Rührorgan bestückten mL-Bioreaktors mit 20,0 mm Innendurchmesser. Alle Maße in mm.

20 mL Nominalvolumen gefertigt. Die Strömungsbrecher wurden durch ein speziell gefertigtes Presswerkzeug in die Hülle der Spritzenkörper eingepresst. Dazu

wurde der Spritzenkörper auf das Presswerkzeug aufgeschoben, das Werkzeug mit den Pressblechen zusammengesetzt und in kochendem Wasser für 3 Minuten erhitzt. Durch Aufschieben eines Metallrings durch einen Hebelmechanismus am Presswerkzeug wurden die Pressbleche in die Hülle des Spritzenkörpers gedrückt.

Tabelle 13: Prototypenserie ‚B‘. Geometrie und Magnetbestückung.

Nummer	d, [mm]	h, [mm]	n_{Magnet}	Länge, [mm]	d, [mm]
B1	14,5	19,6	4	4	2,5
B2	14,5	12	2	2	5
B3	14,5	12	2	2	5
B4	14,5	12	2	3	6

Nach Abkühlen des gesamten Werkzeugs in kaltem Wasser, wurde der Spritzenkörper aus dem Presswerkzeug entfernt. Die dabei entstehenden Strömungsbrecher haben eine radiale Breite von 2 mm und eine Länge von 71 mm. Sie beginnen in einer Höhe von 5 mm über dem Reaktorboden. Auf Basis dieses mL-Bioreaktors wurde die Serienfertigung per Spritzgussverfahren geplant. Die technische Zeichnung des Rührorgans B4 ist in Anhang B abgebildet.

A.1.5. Reaktionsblöcke

Die Charakterisierung der Rührerprototypen der Serie ‚A‘ erfolgte in einem Reaktionsblock-Prototypen (Länge/Breite/Höhe: 26/17,5/5 cm) mit 40 Kavitäten mit einem Durchmesser von 18,0 mm (*H+P Labortechnik*). Der Prototyp ist aus Aluminium gefertigt und mit einem Wärmetauscher aus Kupfer ausgestattet. Das Steuergerät des Prototyps (*Thermomodul 40ST, H+P Labortechnik*) erlaubte maximale Drehzahlen von 3000 min^{-1} sowie eine Temperaturregelung über eine elektrische Heizung im Block und ein externes Thermometer.

Für mL-Bioreaktoren mit 20,0 mm Außendurchmesser der Prototypenserie ‚B‘ wurde eine Einfachrührstelle verwendet. Die Steuerung erfolgt über ein Steuergerät (*Shakemodul, H+P Labortechnik*), welches per serieller Schnittstelle ansteuerbar ist. Die Steuersoftware *tscmdl.exe (Albrecht Elektronik)* wurde in *LabView* implementiert. Die maximale Drehzahl beträgt 4000 min^{-1} .

A.1.6. Pipettiersystem

Folgende Kriterien wurden zur Auswahl eines geeigneten Pipettiersystems berücksichtigt: Dosiertechnik (individuelle bzw. integrale Spritzenpumpen), Spreizbarkeit der Dosierstrecken, Minimales Pipettiervolumen, Pipettiergenauigkeit, Pipettiergeschwindigkeit, Integration eines Greifarms, Größe des Arbeitstisches, Marktpräsenz der verschiedenen Anbieter, vorausgehende

Integration spezieller Applikationen, verfügbare Software, Schnittstellengestaltung der Software und Anschaffungspreis.

Für den angestrebten Verwendungszweck wurde der *Genesis RSP 150 (Tecan)* mit der Software *Gemini 3.40 SP2* beschafft. Dieser Laborroboter ist mit acht unabhängigen Dosierstrecken ausgerüstet, welche bis zu einer Distanz von 40 mm voneinander gespreizt werden können. Spezielle Pipettieradeln und Spritzenpumpen mit 500 μL Volumen erschließen theoretisch einen Volumenbereich von 0,5 – 500 μL (*low volume Option*). Das Gerät ist mit einem integrierten robotischen Mikrotiterplatten-Greifarm ausgestattet. Die Fläche des Arbeitstisches, welche mit den Pipettieradeln erreicht werden kann, misst 30 x 112,5 cm (Tiefe/Breite).

A.1.7. Mikrotiterplatten-Waschgerät

Das Mikrotiterplatten-Waschgerät *Columbus (Tecan)* verfügt über 16 Kanäle, so dass je zwei Reihen einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten gleichzeitig gesäubert werden können. Mit der Software *WinWash V1.30* wurde ein Waschprogramm erstellt um die Hydroplates nach jedem Messzyklus zu reinigen (Tabelle 14). Die zusätzlichen Programmparameter sowie die Rahmenbedingungen zur Behandlung der Hydroplate HP96L wurden definiert (Tabelle 15 und Tabelle 16).

Tabelle 14: Waschprogramm zur Reinigung der Proben-Mikrotiterplatten im Mikrotiterplatten-Waschgerät *Columbus*

1: Cycle Begin: 1
2: ASP 4sec 10mm s ⁻¹
3: Cycle Repeat: 1
4: Cycle Begin: 2
5: WASH Ov/ASP CH:1 300 μL 10mm s ⁻¹
6: Cycle Repeat: 2
7: Cycle Begin: 3
8: WASH Bot/ASP CH:1 300 μL 10mm s ⁻¹
9: Cycle Repeat: 2
10: END

Tabelle 15: Definition der geometrischen Parameter der Proben-Mikrotiterplatte (*Hydroplate HP96L*).

Name	HP96L
Dispensing Position	22
Absaugposition 1	-30
Absaugposition 2	8
Bodenposition	110
Bodenwaschposition	99
Overflowposition	2

Tabelle 16: Waschparameter zur Reinigung der Proben-Mikrotiterplatte.

Dispensing-Rate	4
Absaugrate	2
2. Absaugposition	Ja
Wähle Reihen	Nein
Modus	Streifen
Endabsaugen	Ja
Zeit	3 s
Geschwindigkeit	10 mm s ⁻¹
2. Absaugen	Ja
Zeit	4 s
Geschwindigkeit	10 mm s ⁻¹

A.1.8. Mikrotiterplatten-Photometer

Zur Realisierung der Anforderungen an die *atline* Analytik sowie zu ihrer möglichst flexiblen Weiterentwicklung wurde das Mikrotiterplatten-Photometer *Fluostar Galaxy* (*BMG Labtech*) eingesetzt. Das Gerät ermöglicht Messungen in den beiden Messmodi Absorption und Fluoreszenz und besitzt zwei interne Dosierpumpen mit deren Hilfe Vorlageflüssigkeiten individuell in die einzelnen Kavitäten einer im Messschacht befindlichen Mikrotiterplatte dosiert werden können. Diese Funktion entlastet den Laborroboter, da das Verdünnungsmittel direkt im Photometer zu den Reaktorproben gegeben werden kann.

Die Automatisierung der *atline* Analytik macht das Umschalten zwischen Absorption- und Fluoreszenzmodus notwendig. Da das Mikrotiterplatten-Photometer für die beiden Messmodi je einen speziellen Anregungslichtleiter verwendet, wurde ein Schrittmotor in das Gerät integriert, der das Lichtleiterrad auf der Seite des Anregungslichts dreht.

A.1.9. Hydroplates

Die *Hydroplates (Presens)* enthalten am Boden der Kavitäten einen Sensorspot, welcher in einer organischen Matrix zwei immobilisierte Fluoreszenzfarbstoffe enthält. Das Auslesen der Fluorophore erfolgt im Mikrotiterplatten-Photometer. Der transparente Sensorspot der *HP96T* ermöglicht das transmissive Auslesen dieses Plattentyps. Der Sensorspot der *HP96L* enthält eine optische Isolierung zur Vermeidung von Streulichteinflüssen aus der Probe in der Kavität der Hydroplate. Transmissive Messungen sind dadurch nicht möglich. Tabelle 17 fasst die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Referenz- und Indikatorfluorophore der beiden Plattentypen zusammen.

Der Quotient $I_{pH} = I_I / I_R$ kann zum pH über eine Sigmoidfunktion korreliert werden. Die Verwendung eines Referenzfarbstoffs erhöht die Messgenauigkeit über der Lebensdauer der Sensoren, da eine Abnahme der Signalintensität durch „Ausbluten“ des Sensors einen geringeren Einfluss auf das Messsignal zur Folge hat.

Tabelle 17: Anregungs- und Emissionswellenlängen der *Hydroplates*

<i>Hydroplate</i>	Referenz R Excitation/Emission	Indikator I Excitation/Emission
<i>HP96T</i>	540/590 nm	485/540 nm
<i>HP96L</i>	485/620 nm	485/540 nm

A.2. Auslegung des mL-Bioreaktors

A.2.1. Reaktionsvolumen

Die Erstabschätzung eines sinnvollen Volumens des mL-Bioreaktors erfolgte unter Berücksichtigung des Volumenverlusts durch Verdunstung und Probenahme. Die Verdunstung wurde für verschiedene Volumina zwischen 1 und 10 mL abgeschätzt (Gleichung 47). Dabei wurde die vollständige Aufsättigung von trockenem Prozessgas angenommen.

$$\dot{M}_V = \dot{V}_G \cdot \rho_G \cdot \Delta Y \quad (47)$$

Die Sättigungsbeladung Y_S von Luft bei 37 °C und 1 bar beträgt 41,1 g kg⁻¹ (Gleichung 48).

$$Y_S = \frac{M_{H_2O}}{M_{Air}} \cdot \frac{1}{\left(\frac{p_G}{p_S} - 1\right)} \quad (48)$$

Tabelle 18: Parameter zur Berechnung des Verdunstungsvolumenstroms

	Wasser	Luft
Dichte	$\rho_{37^\circ\text{C}} = 0,993 \text{ kg m}^{-3}$	$\rho_{37^\circ\text{C}} = 1,142 \text{ kg m}^{-3}$
Sättigungsdampfdruck	$p_s(37^\circ\text{C}, 1\text{bar}) = 6,28 \cdot 10^3 \text{ Pa}$	

A.2.2. Wärmeübergang

Die Wärmebilanz um einen isolierten mL-Bioreaktor umfasst die eingetragene Rührleistung, die Wärmeproduktion der Mikroorganismen, die Verdunstungswärme und den Wärmeübergang an den Wärmetauscher. Zur Abschätzung eines Maximalwertes der Wärmeabgabe wurde die Verdunstungswärme vernachlässigt. Die maximale Rührleistung wurde zu 10 W L^{-1} angenommen. Die Wärmeproduktion einer Kultivierung mit einem Sauerstoffeintragsrate von $3,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde mit Gleichung 49 zu $12,8 \text{ W L}^{-1}$ abgeschätzt, so dass eine Gesamtwärme von $22,8 \text{ W L}^{-1}$ oder 114 mW pro 5 mL abgeführt werden muss.

$$\dot{Q}_{MO} = OUR \cdot 14,4 \text{ kJ g}^{-1} \quad (49)$$

In einem mL-Bioreaktor aus Glas mit einer Wandstärke von 1 mm welcher ohne Luftspalt eine Kontaktfläche von 10 cm^2 zu einem Wärmetauscher aus Metall mit 1 mm Wandstärke besitzt, kann mit Gleichung 50 ein Wärmedurchgangskoeffizient k_Q von $35,6 \text{ mW cm}^{-2} \text{ K}^{-1}$ berechnet werden.

$$k_Q = \frac{1}{R_{Ges}} = \frac{1}{\sum R_i} = \frac{1}{\sum \frac{1}{\alpha_i} + \sum \frac{s_i}{\lambda_i}} \quad (50)$$

Dabei wurde mit einer Strömungsgeschwindigkeit v des Mediums und des Wärmetauscherfluids an der jeweiligen Behälterwand von $0,1 \text{ m s}^{-1}$ gerechnet. Um unter diesen Bedingungen die abgeschätzte Wärme von 114 mW pro 5 mL Reaktionsvolumen abführen zu können, reicht eine Temperaturdifferenz von $0,33 \text{ }^\circ\text{C}$ aus (Gleichung 51).

$$\Delta T = \frac{\dot{Q}}{k_Q \cdot A} \quad (51)$$

Um diese Temperaturdifferenz unter $1 \text{ }^\circ\text{C}$ zu halten, kann ein Luftspalt von bis zu $0,15 \text{ mm}$ in Kauf genommen werden.

Tabelle 19: Parameter zur Berechnung des Wärmeübergangs

Wärmeübergangskoeffizient α	$\alpha = 350 + 2100 \cdot \sqrt{v}$
Wärmeleitfähigkeiten λ	$\lambda_{Glas} = 1,36$
	$\lambda_{Luft} = 0,026$
	$\lambda_{Stahl} = 15$

A.2.3. Begasungsart

Diffusion

Der Sauerstofftransport per Diffusion \dot{J}_O über eine Begasungsmembran berechnet sich unter Annahme eines konstanten Diffusionskoeffizienten D_O , stationärer Diffusion über eine Grenzschicht der Dicke δ und einem linearen Konzentrationsgradienten Δc nach den Fick'schen Gesetzen zu.

$$\dot{J}_O = \frac{\dot{M}_O}{A} = \frac{D_O}{\delta} \cdot \Delta c \quad (52)$$

Unter den genannten Bedingungen lässt sich ein Stoffübergangskoeffizient k_G einführen.

$$k_G = \frac{D_O}{\delta} \quad (53)$$

Der Gesamtstoffübergangskoeffizient k_G setzt sich aus den Einzelwiderständen auf der Gasseite k_G , der Membran k_M und der Flüssigseite k_L zusammen. Der Widerstand auf der Gasseite kann aufgrund der um den Faktor 1000 höheren Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs in der Gasphase vernachlässigt werden. Es gilt:

$$\frac{1}{k_G} = \frac{1}{k_M} + \frac{1}{k_L} \quad (54)$$

Der Stofftransportwiderstand der Membran k_M lässt sich unter Berücksichtigung der Definition der Permeabilität Pe schreiben als:

$$k_M = \frac{D_O}{\delta} = \frac{Pe \cdot K_H}{\delta} \quad (55)$$

Um eine Aussage über den maximalen Gesamtstoffübergang über eine typische Silikonmembran mit einem mittleren Diffusionsweg von 0,1 mm machen zu können wurden Werte für k_G und k_M benötigt. Aus der Literatur (Walther *et al.*, 1994) wurde unter der Annahme, dass die Stoffwerte der verwendeten Membran denen von Silikon ähnlich sind, ein Gesamtstoffübergangskoeffizient $k_G = 3,95 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ entnommen. Der Stoffübergangskoeffizient einer Silikonmembran mit einem mittleren Diffusionsweg von 0,1 mm wurde zu $1,1 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$ bestimmt. Somit ergibt sich ein flüssigseitiger Stoffübergangskoeffizient $k_L = 6,15 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$. Der Gesamtstoffübergang repräsentiert folglich nur 35,9 % des maximal über die Membran möglichen Stoffübergangs.

Um in einem Flüssigvolumen von 5 mL einen $k_L a$ Wert von über $0,1 \text{ s}^{-1}$ zu erzielen müsste eine Membranoberfläche A_M von $126,6 \text{ cm}^2$ zur Verfügung gestellt werden (Gleichung 56).

$$A_M > \frac{k_L a \cdot V}{k_L} \quad (56)$$

Für einen Silikonschlauch mit einem Außendurchmesser von 2 mm würde daraus eine Mindestlänge von 2 m resultieren.

Blasensäule

Der Leistungseintrag in eine Blasensäule setzt sich aus der notwendigen Energie zur Blasenbildung am Begasungsorgan (Gleichung 57) und der Expansionsarbeit beim Aufsteigen der Blasen in der Flüssigkeit (Gleichung 58) zusammen.

$$\left(\frac{P}{V}\right)_0 = \frac{6 \cdot u \cdot \sigma}{H \cdot d_b} \quad (57)$$

$$\left(\frac{P}{V}\right)_E = \frac{u \cdot R \cdot T}{V_M \cdot H} \cdot \ln \frac{p_0 + \rho_L \cdot g \cdot H}{p_0} \quad (58)$$

Der Primärgasblasendurchmesser kann durch ein Kräftegleichgewicht an einer sich bildenden Gasblase bestimmt werden. Sobald die Auftriebskraft F_A (Gleichung 59) während der Blasenbildung größer wird als die Summe der Oberflächenkraft am Porenrand F_σ (Gleichung 60), der Trägheitskraft der zu verdrängenden Flüssigkeit F_T (Gleichung 61) und der Reibungskraft in der verdrängten Flüssigkeit F_η (Gleichung 62), löst sich die Blase vom Begasungsorgan ab.

$$F_A = \frac{\pi}{6} \cdot \Delta\rho \cdot g \cdot d_b^3 \quad (59)$$

$$F_\sigma = d_p \cdot \sigma_L \quad (60)$$

$$F_T = 1,3 \cdot \rho_L \cdot \left(\frac{\dot{V}_{G,P}}{d_b}\right)^2 \quad (61)$$

$$F_\eta = 15 \cdot \eta \cdot \left(\frac{\dot{V}_{G,P}}{d_b}\right) \quad (62)$$

Der Gasvolumenstrom durch die Poren des Begasungsorgans kann mit Hilfe einer Massenbilanz aus dem Gasvolumenstrom \dot{V}_G , dem Porendurchmesser d_p , der Fläche A und der Porosität ε_p der Begasungsmembran ermittelt werden (Gleichung 63).

$$\dot{V}_{G,P} = \frac{\dot{V}_G \cdot \frac{\pi}{4} \cdot d_p^2}{A \cdot \varepsilon_p} \quad (63)$$

A.3. Software zur Prozesskontrolle

Die Steuerung des Gesamtablaufs einer Kultivierung für bis zu acht Parallelreaktoren erfolgt durch ein *Gemini*-Skript (Anhang C). Der Aufbau des *Gemini*-Skripts ist in Abbildung 74 schematisch dargestellt.

Zu Beginn werden die später zur *pH* Kontrolle sowie zur Umrechnung der optischen Dichte im Mikrotiterplatten-Photometer zur Biotrockenmasse benötigten Parameter in einer globalen Variable gespeichert. Die Initialisierung des Photometers beinhaltet gleichzeitig die Inbetriebnahme und das Spülen der im Photometer integrierten Spritzenpumpe. Nach Anlegen der Datenfiles werden im *Gemini*-Skript interne Parameter wie beispielsweise Anzahl der Durchläufe im Satz- bzw. Zulaufbetrieb und Volumenströme für Verdunstungsausgleich und Zufütterung abgefragt. Danach beginnt das eigentliche Prozesskontrollprogramm, welches in Satzbetrieb und Zulaufbetrieb mit jeweils linearem oder konstantem Zudosierprofil unterteilt ist (Abbildung 74A). Ein Probenahmezyklus startet mit der Sterilisierung

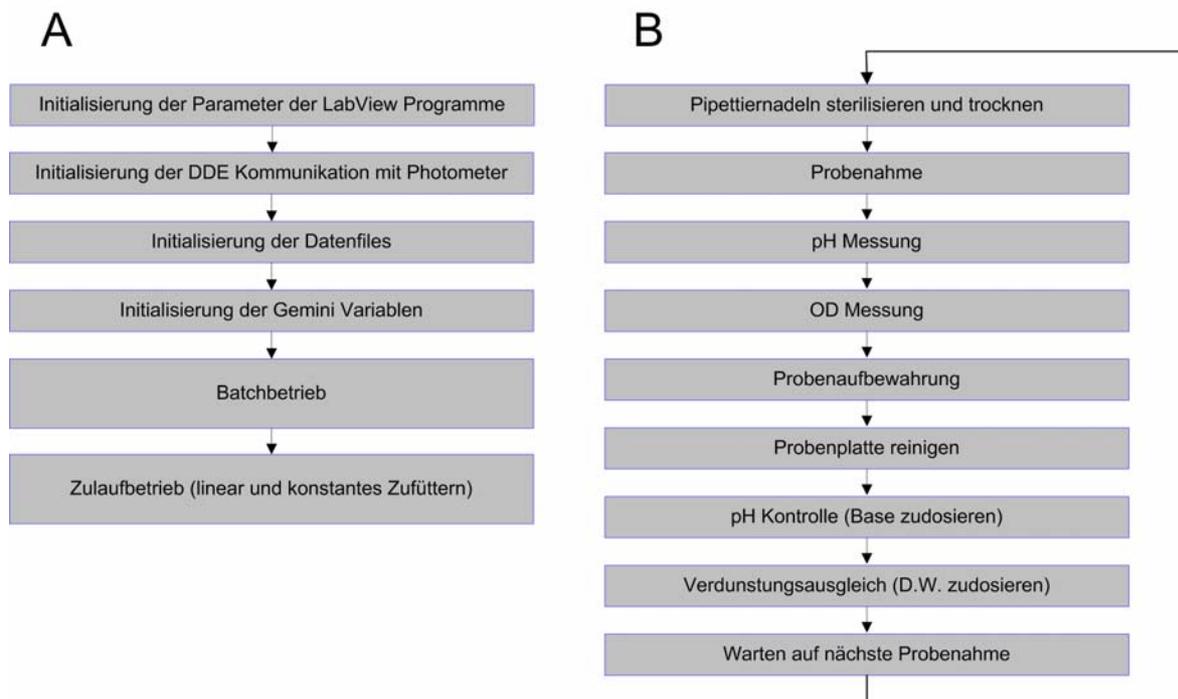


Abbildung 74: Schematischer Aufbau des *Gemini*-Skripts zur Kontrolle einer Parallelkultivierung für acht mL-Bioreaktoren. (A) Gesamtablauf. (B) Ablauf eines Probenahmezyklus im Satzbetrieb. Im Zulaufbetrieb wird parallel zu den angegebenen Arbeitsschritten im vorgegebenen Zeittakt von 4 Minuten zudosiert.

der Pipettieradeln und der Probenahme aus den mL-Bioreaktoren in eine Probenahme-Mikrotiterplatte auf der Kühlstation. Dabei werden zunächst 50 μL Probe in Reihe A der Probenahme-Mikrotiterplatte abgegeben und von dort erneut 20 μL aufgenommen und in Reihe B abgegeben. Die Probenahme-Mikrotiterplatte

wird zum Photometer transportiert, wo zunächst im Fluoreszenzmodus der pH in Reihe A gemessen wird. Dazu wird der in das Mikrotiterplatten-Photometer integrierte Elektromotor zum automatisierten Umschalten zwischen Absorptions- und Fluoreszenzmodus durch ein *LabView* Programm über serielle Schnittstelle gesteuert. Der in der Photometer Software vorab definierte Test zur pH -Messung wird vom *LabView* Programm *pH_read&control_GV* durch Übermittlung des DDE-Schnittstellenbefehls gestartet. Nach Abschluss der Messung werden die Daten aus dem zuletzt geschriebenen Datenfile extrahiert. Danach wird vom *LabView* Programm *Start_cx_viab_GV* die Messung der optischen Dichte gestartet. Dieses Messprogramm verdünnt zunächst die Proben in Reihe B mit 180 μL PBS (8 g L^{-1} NaCl, 1,44 g L^{-1} K_2HPO_4 , 0,24 g L^{-1} KH_2PO_4 , 0,2 g L^{-1} KCl, pH 7,4) bevor im Absorptionsmodus die OD_{650} gemessen wird. Nach Transport zum Mikrotiterplatten-Waschgerät wird die Probenahmeplatte gereinigt. Dazu wird ein vorab mit Hilfe der Software WinWash V1.30 (*Tecan*) definiertes Waschprogramm über serielle Kommunikation gestartet. Das in *LabView* erstellte Steuerprogramm *mpw_start.vi* greift auf Befehle des Kommunikationsprotokolls zurück und wird aus dem *Gemini*-Skript über die Kommandozeile gestartet. Nach Beendigung des Waschvorgangs wird die Probenahme-Mikrotiterplatte wieder auf die Kühlstation transportiert. Danach wird die pH -Titration durch Aufrufen einer Arbeitsliste durchgeführt, welche nach der pH -Messung vom *LabView* Programm *pH_read&control_GV* generiert wurde. Die pH -Regelung wird mit einem einfachen Proportionalregler durchgeführt. Zur Bestimmung des notwendigen Dosiervolumens zur pH -Kontrolle wurde das Mineralmedium mit dem eingesetzten Titrationsmittel titriert. Der Zusammenhang zwischen pH -Änderung und Titrationsvolumen wurde mit einer Polynomfunktion dritten Grades genähert. Deren Koeffizienten wurden zur Berechnung des notwendigen Titrationsvolumens für eine gegebene pH -Abweichung eingesetzt. Des Weiteren wird destilliertes Wasser zum Verdunstungsausgleich in die mL-Bioreaktoren pipettiert. Während des Zulaufbetriebs wird während allen Arbeitsschritten Zudosierlösung mit einer Frequenz von 15 h^{-1} zugegeben. Tabelle 20 fasst die *LabView* Programme und ihre Funktion zusammen.

Tabelle 20: Übersicht über die zur Prozesskontrolle entwickelten *LabView* Programme und ihrer Funktion.

<i>LabView</i> Programm	Funktion
<i>Init_global_variable_HCDC</i>	Abfrage notwendiger Parameter für alle <i>LabView</i> Programme, welche im späteren Prozessverlauf aufgerufen werden. Zwischenspeicherung in einer globalen Variable.
<i>Prep_data_files2_GV</i>	Anlegen der Datendateien.
<i>InitDDEComm</i>	Initialisieren der Kommunikation mit dem Photometer per DDE Schnittstelle. Durchführung der Initialisierung der Dosierpumpe des Photometers.
<i>Save_system_time_GV</i>	Speicherung der aktuellen Systemzeit und Uhrzeit. Ermöglicht die spätere Umrechnung der Probenahmezeitpunkte in die aktuelle Uhrzeit bzw. Prozesszeit.

<i>PlateOut</i>	Öffnen des Messschachts des Photometers.
<i>Plateln</i>	Schließen des Messschachts des Photometers.
<i>pH_read&control_GV</i>	Umstellen der Lichtleiterposition auf Fluoreszenzmodus. Starten des Messprogramms der Photometer Software zur <i>pH</i> Messung. Abwarten der Verfügbarkeit der Daten. Auslesen der Fluoreszenzintensitäten und Berechnung der relativen Intensität IR. Umrechnung in den aktuellen <i>pH</i> . Berechnung des notwendigen Titrationsvolumens. Datenspeicherung. Rückstellung der Lichtleiterposition auf Absorptionsmodus.
<i>Start_cx_viab_GV</i>	Starten des Messprogramms der Photometer Software zur Messung der optischen Dichte. Abwarten der Verfügbarkeit der Daten. Auslesen der Daten und Umrechnung in Biotrockenmasse. Datenspeicherung.
<i>mpw_start</i>	Starten eines vordefinierten Waschprogramms des Mikrotiterplatten-Waschgeräts.

A.4. Messmethoden zur k_La -Bestimmung

Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde mit einer faseroptischen Sauerstoffoptode (*MicroxTX*, *Presens*) gemessen. Für alle verwendeten Optoden wurde in Vorversuchen die Ansprechzeit bestimmt. Dazu wurde die Optode in eine per Stickstoffdesorption entgaste 0,5 M Na_2SO_4 Lösung getaucht. Die Ansprechzeit t_{90} ist die Zeit, die die Optode benötigt um 90 % des Sprungs der Gelöstsauerstoffkonzentration aufzuzeichnen. Die Ansprechzeit wurde durch lineare Regression aus dem aufgezeichneten $p\text{O}_2$ -Abfall bestimmt.

In den Reaktionssystemen Rührkesselreaktor und gerührte Blasensäule wurden die Gasvolumenströme per Massendurchflussmesser (*Westphal*) geregelt. Die Gasvolumenströme im Reaktionssystem mL-Bioreaktor wurden über Schwebekörperdurchflussmesser eingestellt. Die korrekte Einstellung und Aufrechterhaltung des Eichvordrucks der Schwebekörperdurchflussmesser wurde durch ein Barometer überprüft.

A.4.1. Dynamische Sulfitmethode

Nach Einstellung der Reaktionsbedingungen (Drehzahl und Temperatur) wurde die gewünschte Katalysatorkonzentration eingestellt. Soweit nicht anders angegeben wurde der k_La bei einer CoSO_4 -Konzentration von 1 mM bestimmt. Dazu wurde das entsprechende Volumen einer 500 mM Stammlösung zugegeben. Sulfitlösung wurde als 0,5 M Stammlösung mit per Stickstoffdesorption desorbierten destilliertem Wasser angesetzt und in 1,5 mL Teilproben bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, um die gleich bleibende Qualität dieser Lösung zu garantieren. Die Auszehrung des Gelöstsauerstoffs erfolgt bei Luftbegasung durch Zugabe von 0,1 - 2 mM Na_2SO_3 . Bei Sauerstoffbegasung wurde bis zu 10 mM Na_2SO_3 zugegeben. Die Menge Sulfit wurde so gewählt, dass 0 % Sauerstoffsättigung erreicht und mit der Sauerstoffoptode (*MicroxTX*, *Presens*) gemessen werden konnte. Die nach

stöchiometrischem Verbrauch des Sulfits eintretende Aufsättigung wurde aufgezeichnet und ausgewertet.

A.4.2. Stickstoffdesorptionsmethode

Bei den gewünschten Reaktionsbedingungen wird die Flüssigphase durch Begasung mit Stickstoff desorbiert. Nach erneutem Umstellen auf Luftbegasung zeichnet sich eine Aufsättigungskurve ab, welche aufgezeichnet und ausgewertet wird. In den Reaktionssystemen gerührte Blasensäule und Laborrührkesselreaktor wurden beide Prozessgase über einen 3/2-Wegehahn verbunden um ein promptes Umstellen von Stickstoff auf Luft zu ermöglichen. In den mL-Bioreaktoren des Prototyps ‚A‘ wurde die Begasung mit Stickstoff durch Einleiten des Gasstromes in den Kopfgasraum erzielt. Umstellen auf Luftbegasung erfolgte mittels 3/2-Wegehahn. Die Prototypen der Serie ‚B‘ wurden mit Stickstoff über die Hohlachse begast. Umstellung auf Luftbegasung erfolgte durch Entfernen des Stickstoffschlauchs von der Hohlachse, so dass Umgebungsluft eingesaugt werden konnte.

A.4.3. Auswertung des $k_L a$

Die Auswertung der Aufsättigungskurven erfolgte unter Annahme einer ideal durchmischten Gas- und Flüssigphase im Bioreaktor mit Hilfe von Gleichung 19. Damit wird die Ansprechzeit t_E der Optode berücksichtigt und die Zeit t als Fließvariable behandelt um die zeitliche Verzögerung zwischen Stickstoff und Luft- bzw. Sauerstoffbegasung in der Flüssigphase nach Wechsel des Prozessgases zu berücksichtigen (Linek *et al.*, 1987).

Die nicht-lineare Regression wurde mit einem linearen Newton Algorithmus (*Solver, Microsoft Excel*) oder des Levenberg-Marquardt Algorithmus (*LabView, National Instruments*) durchgeführt. Die Auswertung per *Excel* beansprucht viel Zeit zur Extraktion der Rohdaten, Näherung und Darstellung der Ergebnisse. Im Hinblick auf die große Zahl von Messkurven welche bis zur Fertigstellung eines neuen Rührsystems im mL-Maßstab anfallen, wurde mit der Software *LabView* ein Programm entwickelt, welches eine automatische Extraktion und Näherung des $k_L a$ aus Datenfiles ermöglicht, welche von der Messsoftware erzeugt werden. Eine Datenvisualisierung ermöglicht dem Benutzer innerhalb kürzester Zeit den $k_L a$ im Hochdurchsatz zu evaluieren.

A.5. Atline Analytik (Kultivierung)

A.5.1. Optische Dichte im Einstrahlphotometer

Die optische Dichte OD_{650nm} von zellhaltigen Proben wurde als Maß für die Biomassekonzentration verwendet. Notwendige Vorverdünnungen um einen Endwert von 0,05 - 0,4 OD-Einheiten zu erreichen wurden mit PBS hergestellt. Die OD-Messungen erfolgten in einem Einstrahlphotometer (*Genesys20, Thermo Electron*).

A.5.2. Optische Dichte im Mikrotiterplatten-Photometer

Zur Abschätzung der Biotrockenmasse aus Absorptionsmessungen im Mikrotiterplatten-Photometer wurde eine Umrechnungskurve ermittelt. Dazu wurde von Zellsuspensionen bekannter Biotrockenmasse im Dreifachansatz die OD_{650nm} bestimmt. Der Zusammenhang zwischen OD_{650nm} und Biotrockenmasse wurde mit Polynomfunktionen ersten und zweiten Grades genähert (*Microsoft Excel*).

A.5.3. Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden die Zellen aus 1 mL Teilproben in abgewogenen Eppendorfgefäßen in der Tischzentrifuge (*Mikro 20, Hettich*) pelletiert (13000 g, 5 min). Die Zellpellets wurden einmal mit PBS gewaschen und bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus der Massendifferenz des Eppendorfgefäßes mit und ohne Probe wurde die Biotrockenmasse berechnet.

A.5.4. pH-Messungen mit Hydroplates im Mikrotiterplatten-Photometer

Zur automatisierten *atline* pH-Messung wurden die Hydroplates HP96T und HP96L (*Presens, Regensburg*) eingesetzt. Zur Kalibrierung der Hydroplates wurde Mineralmedium mit 5 verschiedenen pH-Werten zwischen 5,0 und 9,0 im mindestens Dreifachansatz mit Fluoreszenzlichtleitern per Reflexionsmessung vermessen. Die Bestimmung der Koeffizienten der Sigmoidfunktion erfolgte per nicht-linearer Regression (*Solver, Microsoft Excel*). Um in den *Hydroplates HP96L* transmissiv Absorptionsmessungen durchführen zu können, wurde eine Reihe Sensorspots durch mehrfaches Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol entfernt.

A.5.5. Faseroptische pH-Messung

Das Fluoreszenzmessgerät *PDD* (*Presens, Regensburg*) misst die referenzierte Fluoreszenzlebensdauer eines Indikatorfluorophors, welcher in einer organischen Matrix immobilisiert ist. Der Fluorophor wird im Reaktionsgefäß platziert. Das

Lichtsignal wird nicht-invasiv, durch die Wand des Reaktionsgefäßes ausgelesen und von einer optischen Faser vom Fluorophor zum Messgerät transportiert. Die Kalibrierung erfolgte mit 5 Phosphatpufferlösungen mit einer Konzentration von 150 mM mit einem *pH* zwischen 5,0 und 9,0.

A.5.6. Faseroptische pO_2 -Messung

Mit dem Messgerät *Fibox3* (*Presens*, Regensburg) wird die referenzierte Fluoreszenzlebensdauer eines Indikatorfluorophors gemessen. Das Lichtsignal wird vom Fluorophor in der organischen Matrix ebenfalls nicht-invasiv über eine optische Faser zum Messgerät transportiert. Die Kalibrierung auf 100 % Luftsättigung erfolgt im mL-Bioreaktor in Kultivierungsmedium nach Luftbegasung über mindestens drei Minuten. Die Kalibrierlösung für 0 % Luftsättigung wird durch Zugabe von 10^{-3} M $CoSO_4$ und 10 mM Na_2SO_3 unter Rühren ohne Blasenbildung hergestellt.

A.5.7. Enzymatische Metabolitbestimmung

Zur Bestimmung der Glukose- und Acetatkonzentration wurden enzymatische Testkits verwendet (*R-Biopharm*), welche auf den Mikrotiterplatten-Maßstab übertragen wurden. Dabei wurden die in Tabelle 21 angegebenen Volumina der einzelnen Lösungen verwendet.

Tabelle 21: Volumina der Testkomponenten des Acetat- und Glukosekits von *R-Biopharm* zur Messung im Mikrotiterplatten-Maßstab. Die Enzymlösungen wurden entsprechend den Angaben vorverdünnt.

	Acetat		Glukose	
	Verdünnung	V, [μ L]	Verdünnung	V, [μ L]
(1) Puffer		66,6		80
(2) Cofaktoren		13,3		-
(3) Probe		10		8
(4) D.W.		103,3		152
(5) Enzym 1	(1:15)	10	(1:7,5)	10
(6) Enzym 2	(1:7,5)	10		-
V_{Ges}		213,3		250

Zur Bestimmung der Konzentrationen wurden die Gleichungen in den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokollen verwendet. Der maximale Messbereich, welcher durch einen linearen Zusammenhang zwischen Absorption und Analytkonzentration charakterisiert ist, wurde jeweils in Vorversuchen mit Standardlösungen bestimmt.

A.5.8. Glukosebestimmung

Die Messung der Glukosekonzentration während der Kultivierungen erfolgte mit dem Blutzuckermessgerät *AccuCheck (Roche)*. Proben wurden 3 min in der Tischzentrifuge bei 13000 min^{-1} abzentrifugiert. Die Glukosebestimmung erfolgte mit $5 \mu\text{L}$ bei Raumtemperatur. Notwendige Vorverdünnungen wurden mit PBS (pH 7,4) durchgeführt.

A.5.9. Pipettiergenauigkeit des Laborroboters

Die Pipettiergenauigkeit des Laborroboters wurde gravimetrisch bestimmt. Je Pipettierstrecke wurden 15 Pipettierschritte ausgeführt. Nach Abgabe der Flüssigkeit über einer Präzisionswaage (*AG285, Mettler Toledo*) wurde automatisiert das aktuelle Gewicht über die serielle Schnittstelle mit einem entwickelten *LabView* Programm ausgelesen. Die Differenz aus Gewicht vor und nach dem Pipettieren wurde mit Hilfe der Dichte der Flüssigkeit zu dem jeweilig pipettierten Volumen umgerechnet. Die Dichte der Pipettierlösungen wurde in Messkolben mit 10 mL Volumen bei Raumtemperatur dreifach bestimmt.

Zur Pipettierung der einzelnen Lösungen wurden neue Flüssigkeitsklassen auf Basis der Standard Flüssigkeitsklasse für wässrige Medien „Wasser“ definiert (Anhang D). Die vorgenommenen Änderungen der Pipettierparameter abgesehen von den Kalibrierfaktoren in den definierten Flüssigkeitsklassen sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Änderungen in den definierten Flüssigkeitsklassen im Vergleich zur Standard Flüssigkeitsklasse „Wasser“.

Pipettergut	Änderung	Kommentar
Destilliertes Wasser	Flüssigkeitsdetektion ausgeschaltet	Destilliertes Wasser lässt sich kapazitiv nicht detektieren
	Volumenbereich bis $500 \mu\text{L}$	Ausschöpfung des maximalen Volumenbereichs der Spritzenpumpen
Zellhaltiges Medium	Aufnahmegeschwindigkeit auf $15 \mu\text{L s}^{-1}$ reduziert	Geringere Standardabweichungen
Glukoselösung	Flüssigkeitsdetektion simultan mit allen Pipettiernadeln, schlechte Leitfähigkeit und 20 mm s^{-1} Detektionsgeschwindigkeit	Verbesserung der Detektion von wässriger Glukoselösung
Glycerinlösung	Erhöhung der Abgabegeschwindigkeit	Verbesserung des Tropfenabrisses

Zur Anpassung der Kalibriergeraden in den Flüssigkeitsklassen der Steuersoftware *Gemini* wurden für mindestens drei Pipettierolumina die Abweichungen des Ist-Volumens vom Soll-Volumen bestimmt. In der Auftragsung Istwert über Sollwert

kann durch die Messpunkte eine lineare Trendlinie gelegt werden. Der Reziprokwert der Steigung und der negative Y-Achsenabschnitt wird der Software *Gemini* in Form einer Kalibriergeraden zur Verfügung gestellt. Dadurch wird die auftretende Differenz korrigiert und höhere Pipettiergenauigkeit erzielt.

A.6. Kultivierungen mit *Escherichia coli*

A.6.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren mindestens analytischen Grades.

A.6.2. Medien

Definiertes Mineralmedium

Vorkulturen und Bioreaktorkultivierungen wurden in einem definierten Mineralmedium folgender Zusammensetzung kultiviert (nach Riesenberg *et al.*, 1991b): Glukosex1H₂O (16,5 g L⁻¹), KH₂PO₄ (13,3 g L⁻¹), (NH₄)₂HPO₄ (4,0 g L⁻¹), Zitronensäure-Monohydrat (1,86 g L⁻¹), MgSO₄x7H₂O (1,2 g L⁻¹), EDTA (8,4 mg L⁻¹), CoCl₂x6H₂O (2,5 mg L⁻¹), MnCl₂x4H₂O (15 mg L⁻¹), CuCl₂x2H₂O (1,5 mg L⁻¹), H₃BO₃ (3,0 mg L⁻¹), Na₂MoO₄x2H₂O (2,5 mg L⁻¹), Zn(CH₃COO)₂x2H₂O (13 mg L⁻¹), Fe(III)-zitrat (12,5 mg L⁻¹), Thiamin-HCl (4,5 mg L⁻¹), Antischaummittel CLEROL 265 (0,1 mL L⁻¹).

Dazu wurden folgende Stammlösungen angesetzt: (1) Glukosex1H₂O (550 g L⁻¹), (2) KH₂PO₄ (26,6 g L⁻¹), (NH₄)₂HPO₄ (8,0 g L⁻¹), Zitronensäure-Monohydrat (3,72 g L⁻¹), (3) MgSO₄x7H₂O (500 g L⁻¹), (4) EDTA (8,4 g L⁻¹), (5) Spurenelemente: CoCl₂x6H₂O (2,5 g L⁻¹), MnCl₂x4H₂O (15 g L⁻¹), CuCl₂x2H₂O (1,5 g L⁻¹), H₃BO₃ (3,0 g L⁻¹), Na₂MoO₄x2H₂O (2,5 g L⁻¹), Zn(CH₃COO)₂x2H₂O (13 g L⁻¹), (6) Fe(III)-zitrat (12,5 g L⁻¹), (7) Thiamin HCl (5 g L⁻¹). Die Stammlösungen (1), (2), (3) und (4) und eine unverdünnte Antischaummittellösung wurden bei 121 °C für 20 min dampf-sterilisiert. Die Stammlösungen (5), (6) und (7) wurden mit einem Sterilfilter mit 0,22 µm Porenweite steril filtriert (Sartorius, Göttingen). Stammlösung (7) wurde jeweils frisch angesetzt.

Das Medium der Vorkultur wurde aus folgenden Volumina (pro Liter) der Stammlösungen angesetzt: (1) 50 mL, (2) 500 mL, (3) 2,4 mL, (4) 1 mL, (5) 1 mL, (6) 8 mL, (7) 0,9 mL. Auf einen Liter wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Der pH wird durch Zugabe von 4 M NaOH auf 6,8 eingestellt.

Das Zufütterungsmedium besteht aus Glukose (variable Konzentration), MgSO₄x7H₂O (20 g L⁻¹), EDTA (13,0 mg L⁻¹), CoCl₂x6H₂O (4,15 mg L⁻¹), MnCl₂x4H₂O (24,9 mg L⁻¹), CuCl₂x2H₂O (2,5 mg L⁻¹), H₃BO₃ (5,0 mg L⁻¹),

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,15 mg L⁻¹), $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (21,7 mg L⁻¹), Fe(III)-zitat (47,6 mg L⁻¹).

Das Zufütterungsmedium wurde aus folgenden Volumina (pro Liter) der Stammlösungen angesetzt: (1) variables Volumen (3) 40 mL, (4) 1,55 mL, (5) 1,66 mL, (6) 3,81 mL. Auf einen Liter wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Luria Broth (LB)

LB-Medium enthält 10 g L⁻¹ Hefeextrakt, 5 g L⁻¹ NaCl und 5 g L⁻¹ Pepton. Nach Einstellen des *pH* auf *pH* 7,2 mit 4 M NaOH wird die Lösung dampf-sterilisiert.

A.6.3. Stammhaltung

Der verwendete *E. coli* Stamm K12 (DSM 498) wurde bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (DSMZ) beschafft. Ein 500 mL Schüttelkoben ohne Schikanen mit 50 mL Mineralmedium wurde mit 500 µL einer bestehenden Glycerinkonserve oder der in PBS aufgenommenen Zellen der Stammsammlung angeimpft. Nach Inkubation bei 37 °C bei 200 min⁻¹ bis zu einer $\text{OD}_{650\text{nm}} = 0,6 - 0,8$ wurde der Schüttelkolben in Eiswasser abgekühlt und mit sterilem Glycerin versetzt, so dass eine Glycerinkonzentration von 30 % erreicht wurde. 1 mL Teilproben wurden in Eppendorfgefäßen bei -80 °C gelagert.

A.6.4. Vorkultur

Die Vorkulturen für die Kultivierung in den mL-Bioreaktoren, dem Schüttelkolben und der gerührten Blasensäule wurden in einem 500 mL Schüttelkolben ohne Strömungsbrecher mit 50 mL definiertem Mineralmedium angesetzt. Die Vorkulturen wurden jeweils mit 0,06 – 0,3 % (v/v) der *E. coli* Glycerinkonserven inokkuliert und für 14 - 16 h bei 200 min⁻¹ und 37 °C bis zu einer $\text{OD}_{650\text{nm}} = 1 - 5,4$ inkubiert. Die Menge Glycerinkonserve und die Inkubationszeit waren so eingestellt, dass die Zellen sich am Ende der Inkubation noch im exponentiellen Wachstum befanden.

Die Vorkultur für die Kultivierung im Laborrührkesselreaktor wurde in vier 1000 mL Schüttelkolben ohne Schikanen mit 250 mL Medium angesetzt. Die Schüttelkolben wurden mit 0,0625 % (v/v) der *E. coli* Glycerinkonserven inokkuliert und für 17 h bei 200 min⁻¹ und 37 °C inkubiert.

A.6.5. Satzkultivierung in der gerührten Blasensäule

Die 50 mL Vorkultur wurde bei 4500 min⁻¹ (4777 g) und 4 °C 10 min in zwei 50 mL Falcon-Gefäßen abzentrifugiert (*Rotixa RS, Hettich*) und jeweils in 1 mL PBS (*pH*

7,4) aufgenommen. Die gerührte Blasensäule wurde mit der gesamten Zellmasse in 200 mL Mineralmedium mit 12 g L^{-1} Glukoseausgangskonzentration angeimpft. Die Kultivierung wurde zur Temperierung auf 37 °C in einem Inkubator bei einer Belüftungsrate von $0,1 \text{ L min}^{-1}$ und einer Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} durchgeführt. Die *pH*-Kontrolle auf 6,8 erfolgte manuell mit einer Frequenz von 1 h^{-1} mit 7,5 % NH_4OH . Die *pH*-Messung erfolgte mit einer Miniatur-*pH*-Elektrode (*Schott*). Der Sauerstoffpartialdruck wurde mit einer Optode (*MicroxTX, Presens*) bestimmt.

A.6.6. Zulaufkultivierung im Laborrührkesselreaktor

Der Bioreaktor wurde mit 33,3 % (v/v) Vorkultur in 2 L Mineralmedium angeimpft. Die Kultivierung wurde bei 37 °C mit einer Belüftungsrate von 3 L min^{-1} und einer Rührerdrehzahl von 500 min^{-1} gestartet. Der *pH* wurde kontinuierlich mit einer *pH*-Sonde (*105-DPAS-SC-K85/325, Mettler-Toledo*) gemessen und durch Zugabe von 25 % NH_4OH auf 6,8 geregelt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium wurde mit einer *pO₂*-Sonde (*InPro6000 420 S/P, Mettler-Toledo*) gemessen und durch Erhöhung der Rührerdrehzahl auf 20 % Luftsättigung geregelt.

Der Verbrauch der Ausgangsmenge Glukose und der im Satzbetrieb gebildeten Stoffwechselnebenprodukte wurde durch zwei aufeinander folgende *pO₂*-Spitzen angezeigt. Daraufhin wurde das Zulaufverfahren mit einem linear steigenden Fütterungsprofil mit $\dot{m}_s = 1,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1} + t \times 0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-2}$ gestartet welches einem Volumenstrom $\dot{V} = 10,53 \text{ mL h}^{-1} + t \times 2,11 \text{ mL h}^{-2}$ entspricht. Die Glukosekonzentration im Zulauf betrug 455 g L^{-1} . Die Zufütterung erfolgte intermittierend durch eine Schlauchpumpe (*Ismatec*) mit einer Frequenz von 15 h^{-1} . Die Zufütterung pro Dosierintervall von 4 min erfolgte innerhalb von 10 Sekunden. Bei Erreichen der Höchstdrehzahl des Rührers von 1500 min^{-1} wurde auf ein konstantes Fütterungsprofil mit dem aktuellen Wert von $2,98 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($19,65 \text{ mL h}^{-1}$) umgestellt und die Belüftungsrate auf 4 L min^{-1} erhöht.

A.6.7. Zulaufkultivierung im mL-Bioreaktor Serie ‚B‘

Die acht parallel betriebenen mL-Bioreaktoren wurden vom Rührerprototypen B3 mit Achslagerung durchmischt. Zwei Vorkulturen mit je 50 mL Reaktionsvolumen wurden gemischt und in PBS aufkonzentriert. Die Reaktoren wurden mit 10 % (v/v) der aufkonzentrierten Zellsuspension angeimpft. Die OD_{650} zu Beginn der Kultivierung lag bei 1,94. Die Rührerausgangsdrehzahl betrug 1800 min^{-1} . Der mit einer Optode (*MicroxTX, Presens*) in einem Reaktor gemessene *pO₂* wurde durch Erhöhung der Drehzahl auf 20 % geregelt. Der *pH* sowie die optische Dichte wurden intermittierend mit einer Frequenz von 1 h^{-1} automatisiert im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Kalibrierung der zur *pH*-Messung eingesetzten Hydroplate bei den *Gain*-Werten 26 (Indikator) und 62 (Referenzfluorophor) ergab die Koeffizienten der Sigmoidfunktion $a = 0,004$, $b = 0,999$, $c = 6,696$ und $d = 0,917$. Die relative Standardabweichung der Fünffachbestimmung lag unter 2,3 %.

Der pH wurde automatisiert mit einer Frequenz von 15 h^{-1} durch Zudosierung von 2,5 % NH_4OH auf 6,8 geregelt. Am Ende der Satzphase wurde die Prozesssteuerung neu gestartet, so dass sich hier ein kürzeres Messintervall ergibt. Der pH wurde in unregelmäßigen Abständen in einigen Reaktoren durch Messungen mit einer Miniatur- pH -Elektrode überprüft.

Nach Ende der Satzphase wurde das Zulaufverfahren mit einem linear steigenden Fütterungsprofil mit $\dot{m}_s = 1,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1} + t \times 0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-2}$ gestartet. Bei Verwendung einer Zudosierlösung mit 250 g L^{-1} Glukose-Monohydratlösung entspricht dies einem Volumenstrom $\dot{V} = 72,9 \text{ } \mu\text{L h}^{-1} + t \times 14,6 \text{ } \mu\text{L h}^{-2}$. Die Zudosierung erfolgte automatisiert durch den Laborroboter mit einer Frequenz von 15 h^{-1} . Nach vier Stunden wurde auf ein konstantes Fütterungsprofil mit $\dot{m}_s = 3,0 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ umgestellt.

A.6.8. Evaluierung der *online pH* und pO_2 Messung

Der mL-Bioreaktor mit 20,0 mm Innendurchmesser wurde von dem Rührerprototypen B2 mit Achslagerung durchmischt. Der Reaktor wurde mit 25 % (v/v) der Vorkultur in 7,5 mL Mineralmedium bei pH 6,8 inokkuliert. Die Ausgangsrührerdrehzahl betrug 1800 min^{-1} . Der pH wurde kontinuierlich, nicht-invasiv (*PDD, Presens*) und diskontinuierlich, invasiv mit einer Miniatur- pH -Elektrode (*Schott*) bestimmt. Der pH wurde manuell mit 7,5 % NH_4OH mit einer Frequenz von 1 h^{-1} auf 6,8 geregelt. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde kontinuierlich, nicht-invasiv mit einem immobilisierten Sensor (*Fibox3, Presens*) und kontinuierlich, invasiv mit einer Optode (*MicroTX, Presens*) gemessen. Der pO_2 wurde manuell durch Erhöhen der Rührerdrehzahl auf 20 % geregelt.

A.6.9. Evaluierung des Rührerprototypen B4 in einer Zulaufkultivierung

Drei mL-Bioreaktoren mit 20,0 mm Innendurchmesser wurden automatisiert parallel betrieben. Zwei wurden vom Rührerprototypen B4, der dritte vom Rührerprototypen B2 durchmischt. Je 10 mL Mineralmedium wurden mit 800 μL einer aufkonzentrierten Vorkultur inokkuliert. Die optische Dichte zu Beginn des Prozesses betrug 2. Der pO_2 wurde *online* mit dem Messsystem *Fibox3* gemessen und durch manuelle Erhöhung der Rührerdrehzahl auf 20 % geregelt. Die Kalibrierung des Messsystems *Fibox3* auf 0 % Luftsättigung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und ergab einen Phasenwinkel von $24,60^\circ$. Der Wert für 100 % Luftsättigung wurde zu Beginn der Kultivierung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ zu $57,85^\circ$ bestimmt. Der pH sowie die optische Dichte wurden intermittierend mit einer Frequenz von 1 h^{-1} automatisiert im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Die Kalibrierung der eingesetzten Hydroplate lieferte bei den *Gain*-Werten 25 (Indikator) und 60 (Referenz) die Koeffizienten der Sigmoidfunktion $a = 0,118$, $b = 1,000$, $c = 6,798$ und $d = 0,712$. Der Umrechnungsfaktor zwischen der optischen Dichte im Einstrahlphotometer und der Biotrockenmasse wurde zu $0,58 \text{ g L}^{-1}$ bestimmt. Die

Korrelation zwischen optischer Dichte im Mikrotiterplatten-Photometer und Biotrockenmasse ergab die Polynomfunktion $OD = -0,34 (BTM)^2 + 0,79 BTM$. Durch automatisierte Zudosierung von 7,5 % NH_4OH wurde der pH intermittierend mit einer Frequenz von $1 h^{-1}$ auf 6,8 geregelt. Das kürzere Messintervall am Ende der Satzphase resultiert aus dem Neustart der Prozesssteuerung nach Verstoffwechslung der Ausgangskonzentration Glukose und der Stoffwechselnebenprodukte. Das Zufütterungsverfahren wurde analog zu A.6.7 durchgeführt. Die Glukosekonzentration im Zulauf betrug $250 g L^{-1}$.

B. Konstruktionszeichnungen

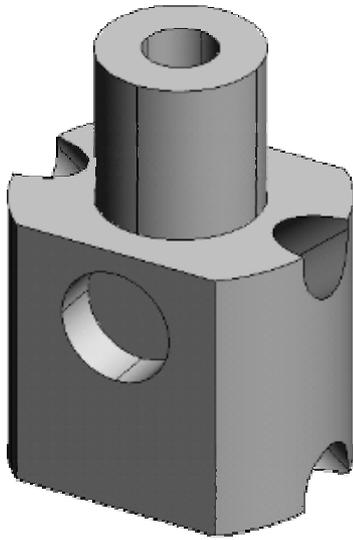


Abbildung 75: 3D-Ansicht des Rührsystems B3.

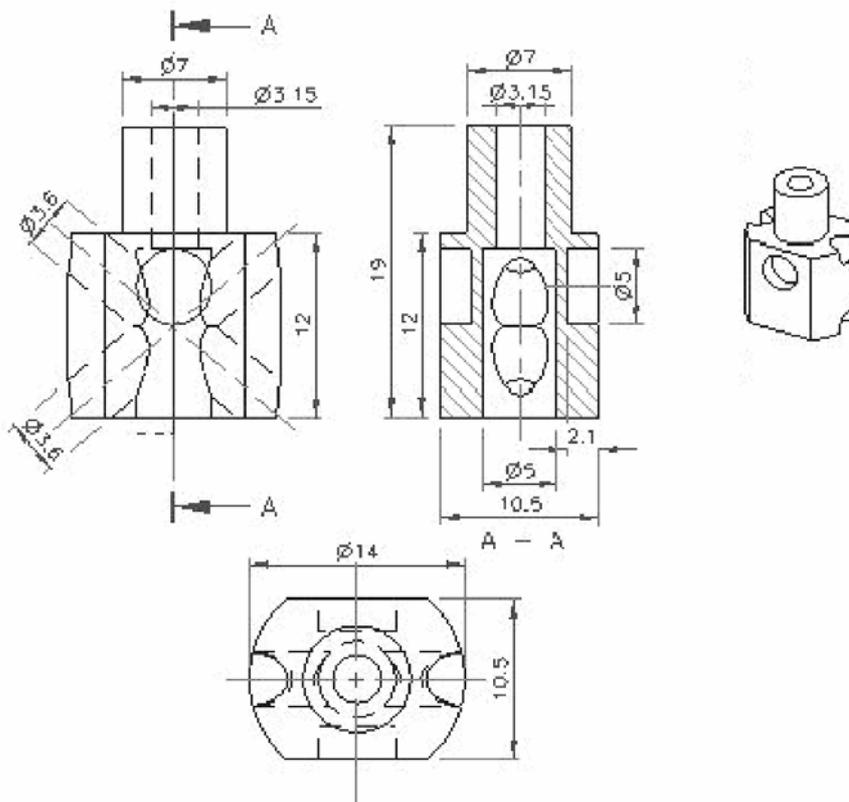


Abbildung 76: Technische Zeichnung des Rührorgans B3.

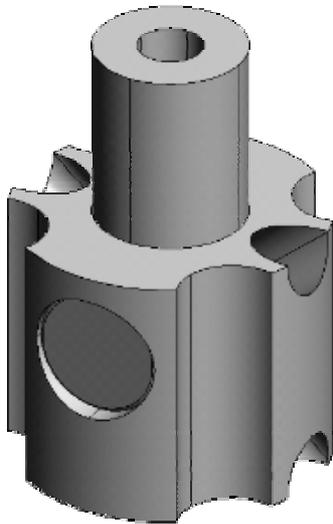


Abbildung 77: 3D-Ansicht des Rührsystems B4.

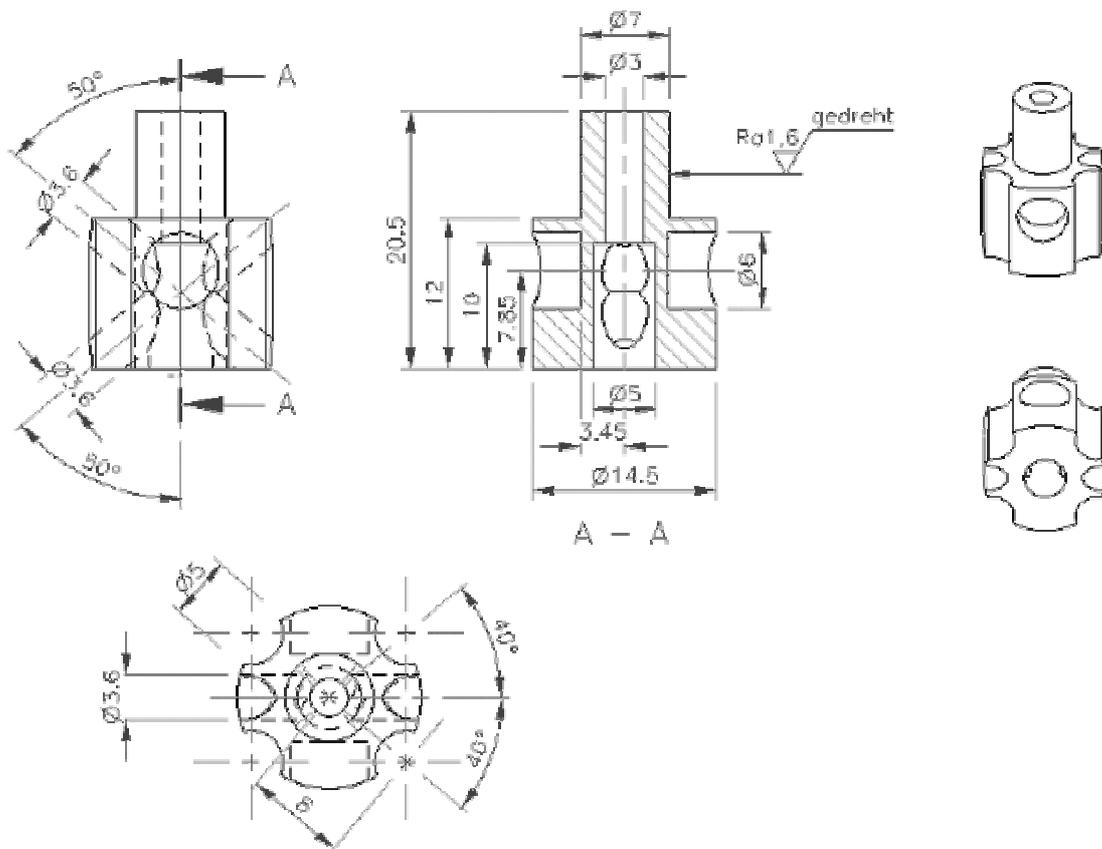


Abbildung 78: Technische Zeichnung des Rührorgans B4.

C. Gemini-Skript zur Prozesskontrolle

	Ausführen	"\LabVIEW.exe \Init_global_variable_HCDC.vi"
	Abfrage	"Continue?" Klang : kein
	Ausführen	"\LabVIEW.exe \Prep_data_files2_GV.vi"
	Ausführen	"\LabVIEW.exe \InitDDEComm.vi"
	Ausführen	"\LabVIEW.exe \Save_system_time_GV.vi"
	Variable setzen	sample_vol "Sample volume?", 25 - 100
	Variable setzen	evap_vol "Evaporation volume (per hour)?", 5 - 300
	Variable setzen	dec_evap_vol "Decrease of evaporation volume (per hour)?", 0 - 30
	Variable setzen	feed_vol "Feeding volume (per hour)?", 0 - 300
	Variable setzen	inc_feed_vol "Increase of feeding volume (per hour)?", 0 - 100
	Variable setzen	feed_vol_const "Constant feeding volume (per hour)?", 0 - 300
	Variable setzen	sample_time "Sample time (seconds)?", 900 - 7200
	Variable setzen	loop_no "Number of loops during batch?", 1 - 20
	Variable setzen	loop_no_lin "Number of loops during linear feeding?", 1 - 20
	Variable setzen	loop_no_const "Number of loops during constant feeding?", 1 - 20
	Abfrage	"Continue?" Klang : kein
	Schleifen-Beginn	loop_no mal "Batch"
	Timer starten	1
	Kommentar	Tip Wash
	Aufnehmen	  100 µl Tip Wash "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
	Abgeben	  100 µl Tip Wash "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
	Kommentar	Tip drying in sterile gas flow

23	 LIHA Bewegung	  Anfahren mit globalem Z-Bewegen "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
24	 Timer starten	2
25	 Auf Timer warten	Timer 2 : 5 sec
26	 LIHA Bewegung	  Z-Bewegung "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
27	 Kommentar	Sampling
28	 Aufnehmen	  sample_vol µl RP_cell_susp "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
29	 Abgeben	  sample_vol µl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
30	 Kommentar	Wait for gas hold-up reduction
31	 Timer starten	2
32	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
33	 Auf Timer warten	Timer 2 : 10 sec
34	 Aufnehmen	  20 µl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
35	 Abgeben	  20 µl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 2, Zeilen 1-8)
36	 Kommentar	Open MTP slot of photometer
37	 Ausführen	"\LabVIEW.exe \Plateout.vi"
38	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
39	 Kommentar	Move Sample-MTP to Photometer
40	 ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
41	 ROMA Vektor	Vektor "BMG Reader", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
42	 Kommentar	Start pH measurement
43	 Ausführen	"\LabVIEW.exe \pH_read&control_GV.vi"
44	 Kommentar	Wait until pH measurement finished

45		Timer starten	2
46		Auf Timer warten	Timer 2 : 50 sec
47		Kommentar	Start cx measurement
48		Ausführen	"LabVIEW.exe \Start_cx_viab_GV.vi"
49		Kommentar	Wait until cx measurement finished
50		Timer starten	2
51		Auf Timer warten	Timer 2 : 145 sec
52		Kommentar	Open MTP slot of photometer
53		Ausführen	"LabVIEW.exe \Plateout.vi"
54		Kommentar	Wait until slot open
55		Auf Timer warten	Timer 2 : 155 sec
56		Kommentar	Move Sample-MTP to Cooled Carrier
57		ROMA Vektor	Vektor "BMG Reader", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
58		Kommentar	Close MTP slot of photometer
59		Ausführen	"LabVIEW.exe \PlateIn.vi"
60		ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
61		Kommentar	Gather samples in MTP on MTP site 2
62		Aufnehmen	 180 µl RP_cell_susp_2 "Hydroplate" (Spalte 2, Zeilen 1-8)
63		Abgeben	 180 µl RP_cell_susp_2 "Viability" (Spalte 1, Zeilen 1-8) , 1 Option
64		Spitzen waschen	 3 + 3 ml
65		Kommentar	Move MTP to MTP Washer
66		ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position

67		ROMA Vektor	Vektor "Columbus", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
68		Kommentar	Start wash
69		Ausführen	"\LabVIEW.exe \mpw_start.vi"
70		Kommentar	Wait until wash finished
71		Timer starten	2
72		Auf Timer warten	Timer 2 : 60 sec
73		Kommentar	Move MTP back to Cooled carrier
74		ROMA Vektor	Vektor "Columbus", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
75		ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
76		Kommentar	pH control
77		Arbeitsliste	 Arbeitsliste einlesen "C:\WINNT\Profiles\Administrator\DESKTOP\Worklist.gwl" pH_base
78		Arbeitsliste	Gelesene Arbeitslisten ausführen
79		Kommentar	Evaporation compensation
80		Aufnehmen	  evap_vol µl Water_custom "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
81		Abgeben	  evap_vol µl Water_custom "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
82		Spitzen waschen	 3 + 3 ml
83		Auf Timer warten	Timer 1 : sample_time sec
84		Variable setzen	evap_vol = evap_vol-dec_evap_vol
85		Schleifen-Ende	"Batch"
86		Kommentar	Linearly increasing feeding
87		Schleifen-Beginn	loop_no_lin mal "linear feed"
88		Timer starten	1

$\times=2 \times 2$	Variable setzen		$feed_vol = feed_vol + inc_feed_vol / 15$
89			
	Aufnehmen	 	$feed_vol / 15 \mu l$ RP_Gluc_250_2 "DeepWellPlate" (Spalte 9, Zeilen 1-7)
90			
	Abgeben	 	$feed_vol / 15 \mu l$ RP_Gluc_250_2 "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-7)
91			
	Spitzen waschen		3 + 3 ml
92			
	Kommentar		Tip Wash
93			
	Aufnehmen	 	100 μl Tip Wash "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
94			
	Abgeben	 	100 μl Tip Wash "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
95			
	Kommentar		Tip drying in sterile gas flow
96			
	LIHA Bewegung	 	Anfahren mit globalem Z-Bewegen "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
97			
	Timer starten		2
98			
	Auf Timer warten		Timer 2 : 5 sec
99			
	LIHA Bewegung	 	Z-Bewegung "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
100			
	Kommentar		Sampling
101			
	Aufnehmen	 	sample_vol μl RP_cell_susp "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
102			
	Abgeben	 	sample_vol μl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
103			
	Kommentar		Wait for gas hold-up reduction
104			
	Timer starten		2
105			
	Spitzen waschen		3 + 3 ml
106			
	Auf Timer warten		Timer 2 : 10 sec
107			
	Aufnehmen	 	20 μl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
108			
	Abgeben	 	20 μl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 2, Zeilen 1-8)
109			
	Kommentar		Open MTP slot of photometer
110			

111	 Ausführen	"\LabVIEW.exe \Plateout.vi"
112	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
113	 Kommentar	Move Sample-MTP to Photometer
114	 ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
115	 ROMA Vektor	Vektor "BMG Reader", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
116	 Kommentar	Start pH measurement
117	 Ausführen	"\LabVIEW.exe \pH_read&control_GV.vi"
118	 Kommentar	Wait until pH measurement finished
119	 Timer starten	2
120	 Kommentar	Feeding step 1
121	 Auf Timer warten	Timer 1 : 240 sec
122	 Variable setzen	feed_vol = feed_vol+inc_feed_vol/15
123	 Aufnehmen	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "DeepWellPlate" (Spalte 9, Zeilen 1-7)
124	 Abgeben	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-7)
125	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
126	 Kommentar	Open MTP slot of photometer
127	 Ausführen	"\LabVIEW.exe \Plateout.vi"
128	 Kommentar	Wait until slot open
129	 Auf Timer warten	Timer 2 : 155 sec
130	 Kommentar	Move Sample-MTP to Cooled Carrier
131	 ROMA Vektor	Vektor "BMG Reader", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
132	 Kommentar	Close MTP slot of photometer

133	 Ausführen	"LabVIEW.exe \PlateIn.vi"
134	 ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
135	 Kommentar	Gather samples in MTP on MTP site 2
136	 Aufnehmen	  180 µl RP_cell_susp_2 "Hydroplate" (Spalte 2, Zeilen 1-8)
137	 Abgeben	  180 µl RP_cell_susp_2 "Viability" (Spalte 1, Zeilen 1-8) , 1 Option
138	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
139	 Kommentar	Move MTP to MTP Washer
140	 ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
141	 ROMA Vektor	Vektor "Columbus", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
142	 Kommentar	Start wash
143	 Ausführen	"LabVIEW.exe \mpw_start.vi"
144	 Kommentar	Wait until wash finished
145	 Timer starten	2
146	 Kommentar	Feeding step 2
147	 Auf Timer warten	Timer 1 : 480 sec
148	$x=2 \cdot 2$ Variable setzen	feed_vol = feed_vol+inc_feed_vol/15
149	 Aufnehmen	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "DeepWellPlate" (Spalte 9, Zeilen 1-7)
150	 Abgeben	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-7)
151	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
152	 Auf Timer warten	Timer 2 : 60 sec
153	 Kommentar	Move MTP back to Cooled carrier
154	 ROMA Vektor	Vektor "Columbus", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position

155	 ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
156	 Kommentar	pH control
157	 Arbeitsliste	 Arbeitsliste einlesen "C:\WINNT\Profiles\Administrator\DESKTOP\Worklist.gwl" pH_base
158	 Arbeitsliste	Gelesene Arbeitslisten ausführen
159	 Kommentar	Evaporation compensation
160	 Aufnehmen	  evap_vol µl Water_custom "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
161	 Abgeben	  evap_vol µl Water_custom "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
162	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
163	 Variable setzen	A = 0
164	 Schleifen-Beginn	12 mal "FEED2"
165	 Auf Timer warten	Timer 1 : 720+A*240 sec
166	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
167	 Variable setzen	feed_vol = feed_vol+inc_feed_vol/15
168	 Aufnehmen	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "DeepWellPlate" (Spalte 9, Zeilen 1-7)
169	 Abgeben	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-7)
170	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
171	 Variable setzen	A = A+1
172	 Schleifen-Ende	"FEED2"
173	 Auf Timer warten	Timer 1 : sample_time sec
174	 Schleifen-Ende	"linear feed"
175	 Kommentar	const feeding
176	 Variable setzen	feed_vol = feed_vol_const

177	 Schleifen-Beginn	loop_no_const mal "Feeding constant"
178	 Timer starten	1
179	 Variable setzen	feed_vol = feed_vol+inc_feed_vol/15
180	 Aufnehmen	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "DeepWellPlate" (Spalte 9, Zeilen 1-7)
181	 Abgeben	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-7)
182	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
183	 Kommentar	Tip Wash
184	 Aufnehmen	  100 µl Tip Wash "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
185	 Abgeben	  100 µl Tip Wash "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
186	 Kommentar	Tip drying in sterile gas flow
187	 LIHA Bewegung	  Anfahren mit globalem Z-Bewegen "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
188	 Timer starten	2
189	 Auf Timer warten	Timer 2 : 5 sec
190	 LIHA Bewegung	  Z-Bewegung "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
191	 Kommentar	Sampling
192	 Aufnehmen	  sample_vol µl RP_cell_susp "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
193	 Abgeben	  sample_vol µl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
194	 Kommentar	Wait for gas hold-up reduction
195	 Timer starten	2
196	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
197	 Auf Timer warten	Timer 2 : 10 sec
198	 Aufnehmen	  20 µl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)

199	 Abgeben	  20 µl RP_cell_susp "Hydroplate" (Spalte 2, Zeilen 1-8)
200	 Kommentar	Open MTP slot of photometer
201	 Ausführen	"\LabVIEW.exe \Plateout.vi"
202	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
203	 Kommentar	Move Sample-MTP to Photometer
204	 ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
205	 ROMA Vektor	Vektor "BMG Reader", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
206	 Kommentar	Start pH measurement
207	 Ausführen	"\LabVIEW.exe \pH_read&control_GV.vi"
208	 Kommentar	Wait until pH measurement finished
209	 Timer starten	2
210	 Kommentar	Feeding step 1
211	 Auf Timer warten	Timer 1 : 240 sec
212	 Variable setzten	feed_vol = feed_vol+inc_feed_vol/15
213	 Aufnehmen	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "DeepWellPlate" (Spalte 9, Zeilen 1-7)
214	 Abgeben	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-7)
215	 Spitzen waschen	 3 + 3 ml
216	 Kommentar	Open MTP slot of photometer
217	 Ausführen	"\LabVIEW.exe \Plateout.vi"
218	 Kommentar	Wait until slot open
219	 Auf Timer warten	Timer 2 : 155 sec
220	 Kommentar	Move Sample-MTP to Cooled Carrier

221		ROMA Vektor	Vektor "BMG Reader", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
222		Kommentar	Close MTP slot of photometer
223		Ausführen	"\LabVIEW.exe \PlateIn.vi"
224		ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
225		Kommentar	Gather samples in MTP on MTP site 2
226		Aufnehmen	  180 µl RP_cell_susp_2 "Hydroplate" (Spalte 2, Zeilen 1-8)
227		Abgeben	  180 µl RP_cell_susp_2 "Viability" (Spalte 1, Zeilen 1-8) , 1 Option
228		Spitzen waschen	 3 + 3 ml
229		Kommentar	Move MTP to MTP Washer
230		ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
231		ROMA Vektor	Vektor "Columbus", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
232		Kommentar	Start wash
233		Ausführen	"\LabVIEW.exe \mpw_start.vi"
234		Kommentar	Wait until wash finished
235		Timer starten	2
236		Kommentar	Feeding step 2
237		Auf Timer warten	Timer 1 : 480 sec
238		Variable setzen	$feed_vol = feed_vol + inc_feed_vol / 15$
239		Aufnehmen	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "DeepWellPlate" (Spalte 9, Zeilen 1-7)
240		Abgeben	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-7)
241		Spitzen waschen	 3 + 3 ml
242		Auf Timer warten	Timer 2 : 60 sec

 243	Kommentar	Move MTP back to Cooled carrier
 244	ROMA Vektor	Vektor "Columbus", Grid 2, Platz 1 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, greifen , von End- nach Safe-Position
 245	ROMA Vektor	Vektor "Cooled Carrier", Grid 16, Platz 3 (ROMA 1) von Safe- nach End-Position, öffnen, von End- nach Safe-Position
 246	Kommentar	pH control
 247	Arbeitsliste	 Arbeitsliste einlesen "C:\WINNT\Profiles\Administrator\DESKTOP\Worklist.gwl" pH_base
 248	Arbeitsliste	Gelesene Arbeitslisten ausführen
 249	Kommentar	Evaporation compensation
 250	Aufnehmen	  evap_vol µl Water_custom "DeepWellPlate" (Spalte 1, Zeilen 1-8)
 251	Abgeben	  evap_vol µl Water_custom "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-8)
 252	Spitzen waschen	 3 + 3 ml
 253	Variable setzen	A = 0
 254	Schleifen-Beginn	12 mal "FEED3"
 255	Auf Timer warten	Timer 1 : 720+A*240 sec
 256	Spitzen waschen	 3 + 3 ml
 257	Variable setzen	feed_vol = feed_vol+inc_feed_vol/15
 258	Aufnehmen	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "DeepWellPlate" (Spalte 9, Zeilen 1-7)
 259	Abgeben	  feed_vol/15 µl RP_Gluc_250_2 "XBlock" (Spalte 3, Zeilen 1-7)
 260	Spitzen waschen	 3 + 3 ml
 261	Variable setzen	A = A+1
 262	Schleifen-Ende	"FEED3"
 263	Auf Timer warten	Timer 1 : sample_time sec
 264	Schleifen-Ende	"Feeding constant"

D. Flüssigkeitsklassen des Pipettierroboters

Global	Parameter	Water Std. & Low Vol. MULTIPIPETTING			Water Std. & Low Vol. SINGLEPIPETTING		
		Liqu.Detect.	Detect. Mode	detect with odd/even tips twice			detect with odd/even tips twice
	Liqu. Conduct.	good			good		
	Detct. Speed	60 mm/s			60 mm/s		
	Double Dist.	4 mm			4 mm		
Aspirate	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-300 µL	0,5-3 µL	3-15 µL	15-300 µL
	Asp. Speed	10 µl/s	10 µl/s	45 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	45 µl/s
	Delay	200 ms	400 ms	500 ms	200 ms	400 ms	500 ms
	STAG	2 µl	5 µl	7 µl	5 µl	2 µl	10 µl
	LAG	0 µl	0 µl	0 µl	0 µl	7 µl	0 µl
	Speed	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s
	Delay	0 ms	0 ms	0 ms	0 ms	0 ms	0 ms
	TAG	0 µl	0 µl	0 µl	0,25 µl	5 µl	5 µl
	Speed	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s
	Delay	0 ms	0 ms	0 ms	0 ms	0 ms	0 ms
	Excess Volume	12 µl	15 µl	30 µl	0 µl	0 µl	0 µl
	Replace after	2x Discard	2x Discard	2x Discard	1x Discard	1x Discard	1x Discard
	Cond. Volume	0,25 µl	0,25 µl	1 µl	0 µl	0 µl	0 µl
	Use Pinch Valve	yes	yes	yes	no	no	no
	Use Liqu. Detect.	yes	yes	yes	yes	yes	yes
	Asp. Position	liquid level +/-offset with tracking	liquid level +/-offset with tracking	liquid level +/-offset with tracking			
	offset	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
	X:	center	center	center	center	center	center
	Mix before Asp.	no	no	no	no	no	no
	Retract Tips to	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm
	Retract Speed	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s
Dispense	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-300 µL	0,5-3 µL	3-15 µL	15-300 µL
	Dis. Speed	10 µl/s	30 µl/s	110 µl/s	10 µl/s	110 µl/s	110 µl/s
	Breakoff Speed	10 µl/s	30 µl/s	110 µl/s	10 µl/s	110 µl/s	110 µl/s
	Delay	400 ms	400 ms	400 ms	400 ms	0 ms	100 ms
	TAG after each Dis.	no	no	no	no	no	no
	Use Pinch Valve	yes	yes	yes	yes	no	no
	Use Liqu. Detect.	no	no	no	no	no	no
	Dis. Position	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking
	offset	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
	X:	center	center	center	center	center	center
	Tip Touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching
	Mix after Dis.	no	no	no	no	no	no
	Retract Tips to	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm
	Retract Speed	50 mm/s	50 mm/s	50 mm/s	50 mm/s	50 mm/s	50 mm/s
Calibration	Offset	0	0	0	0,15	0,2	0,5
	Factor	1,000	1,000	1,000	1,100	1,045	1,060

Abbildung 79: Pipettierparameter der Standardflüssigkeitsklasse „Wasser“.

Global	Parameter	Water_custom_robert1 Std. & Low Vol. SINGLEPIPETTING		
Liqu. Detect.	Detect. Mode	detect simultaneously with all tips		
	Liqu. Conduct.	bad		
	Detct. Speed	20 mm/s		
	Double Dist.	4 mm		
Aspirate	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL
	Asp. Speed	10 µl/s	10 µl/s	45 µl/s
	Delay	200 ms	400 ms	500 ms
	STAG	5 µl	2 µl	10 µl
	LAG	0 µl	7 µl	0 µl
	Speed	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s
	Delay	0 ms	0 ms	0 ms
	TAG	0,25 µl	5 µl	5 µl
	Speed	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s
	Delay	0 ms	0 ms	0 ms
	Excess Volume	0 µl	0 µl	0 µl
	Replace after	1x Discard	1x Discard	1x Discard
	Cond. Volume	0 µl	0 µl	0 µl
	Use Pinch Valve	no	no	no
	Use Liqu. Detect.	no	no	no
	<u>Asp. Position</u>	z-max, no tracking	z-max, no tracking	z-max, no tracking
	offset	1 mm	1 mm	1 mm
	X:	center	center	center
	Mix before Asp.	no	no	no
	Retract Tips to	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm
Retract Speed	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	
Dispense	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL
	Dis. Speed	10 µl/s	110 µl/s	110 µl/s
	Breakoff Speed	10 µl/s	110 µl/s	110 µl/s
	Delay	400 ms	0 ms	100 ms
	TAG after each Dis.	no	no	no
	Use Pinch Valve	yes	no	no
	Use Liqu. Detect.	no	no	no
	<u>Dis. Position</u>	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking
	offset	0 mm	0 mm	0 mm
	X:	center	center	center
	Tip Touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching
	Mix after Dis.	no	no	no
	Retract Tips to	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm
	Retract Speed	50 mm/s	50 mm/s	50 mm/s
Calibration	Offset	0,15	0,2	0,5
	Factor	1,100	1,045	1,060

Abbildung 80: Pipettierparameter der angepassten Flüssigkeitsklasse zur Pipettierung von wässrigen Medien.

Global	Parameter	cell_susp_1 SINGLEPIPETTING			cell_susp_2 SINGLEPIPETTING		
		0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL
Liqu. Detect.	Detect. Mode	detect with odd/even tips twice			detect with odd/even tips twice		
	Liqu. Conduct.	good			good		
	Detct. Speed	60 mm/s			60 mm/s		
	Double Dist.	4 mm			4 mm		
Aspirate	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL
	Asp. Speed	unver.	unver.	15 µl/s	unver.	unver.	45 µl/s
	Delay			500 ms			500 ms
	STAG			7 µl			7 µl
	LAG			0 µl			0 µl
	Speed			10 µl/s			10 µl/s
	Delay			0 ms			0 ms
	TAG			5 µl			5 µl
	Speed			10 µl/s			10 µl/s
	Delay			0 ms			0 ms
	Excess Volume			0 µl			0 µl
	Replace after			1x Discard			1x Discard
	Cond. Volume			0 µl			0 µl
	Use Pinch Valve			no			no
	Use Liqu. Detect.			yes			yes
	Asp. Position			liquid level +/-offset with tracking			z-max, no tracking
	offset			0 mm			0 mm
	X:			center			center
	Mix before Asp.			no			no
	Retract Tips to			z-dispense -5 mm			z-dispense -5 mm
Retract Speed			20 mm/s			50 mm/s	
Dispense	Volumen			15-500 µL			15-500 µL
	Dis. Speed			110 µl/s			110 µl/s
	Breakoff Speed			110 µl/s			110 µl/s
	Delay			100 ms			100 ms
	TAG after each Dis.			no			no
	Use Pinch Valve			yes			yes
	Use Liqu. Detect.			no			no
	Dis. Position			z-dispense no tracking			z-dispense with tracking
	offset			0 mm			0 mm
	X:			center			center
	Tip Touching			no tip touching			no tip touching
	Mix after Dis.			no			no
	Retract Tips to			z-dispense 0 mm			z-dispense 0 mm
	Retract Speed			50 mm/s			50 mm/s
Calibration	Offset			0			0,5
	Factor			1,093			1,060

Abbildung 81: Pipettierparameter der Flüssigkeitsklassen zum Pipettieren von Zellsuspensionen mit Gasgehalt (cell_susp_1) und ohne Gasgehalt (cell_susp_2).

Global	Parameter	RP Gluc. 250.2 SINGLEPIPETTING			RP Gluc. 475 SINGLEPIPETTING	
		Liqu. Detect.	Detect. Mode	detect simultaneously with all tips		
	Liqu. Conduct.	bad			bad	
	Detet. Speed	20 mm/s			20 mm/s	
	Double Dist.	4 mm			4 mm	
Aspirate	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL	0,5-50 µL	50-300 µL
	Asp. Speed	10 µl/s	10 µl/s	45 µl/s	10 µl/s	unver.
	Delay	200 ms	400 ms	500 ms	400 ms	
	STAG	5 µl	2 µl	10 µl	2 µl	
	LAG	0 µl	7 µl	0 µl	7 µl	
	Speed	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	
	Delay	0 ms	0 ms	0 ms	0 ms	
	TAG	0,25 µl	5 µl	5 µl	5 µl	
	Speed	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	
	Delay	0 ms	0 ms	0 ms	0 ms	
	Excess Volume	0 µl	0 µl	0 µl	0 µl	
	Replace after	1x Discard	1x Discard	1x Discard	1x Discard	
	Cond. Volume	0 µl	0 µl	0 µl	0 µl	
	Use Pinch Valve	no	no	no	no	
	Use Liqu. Detect.	yes	yes	yes	yes	
	Asp. Position	liquid level +/-offset with tracking				
	offset	1 mm	1 mm	1 mm	2 mm	
	X:	center	center	center	center	
	Mix before Asp.	no	no	no	no	
	Retract Tips to	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm	liquid-level -5 mm	
Retract Speed	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s		
Dispense	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL	0,5-3 µL	
	Dis. Speed	10 µl/s	110 µl/s	110 µl/s	110 µl/s	
	Breakoff Speed	10 µl/s	110 µl/s	110 µl/s	110 µl/s	
	Delay	400 ms	0 ms	100 ms	0 ms	
	TAG after each Dis.	no	no	no	no	
	Use Pinch Valve	yes	yes	yes	yes	
	Use Liqu. Detect.	no	no	no	no	
	Dis. Position	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking	z-dispense no tracking	
	offset	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	
	X:	center	center	center	center	
	Tip Touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching	
	Mix after Dis.	no	no	no	no	
	Retract Tips to	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm	z-dispense 0 mm	
	Retract Speed	50 mm/s	50 mm/s	50 mm/s	50 mm/s	
Calibration	Offset	0,34	0,81	0,5	0,608	
	Factor	1,280	0,980	1,060	0,966	

Abbildung 82: Pipettierparameter der Flüssigkeitsklassen zum Pipettieren von Glukoselösungen der Konzentrationen 250 g L⁻¹ und 475 g L⁻¹.

Global	Parameter	Glycerin 400 SINGLEPIPETTING			Glycerin 600 SINGLEPIPETTING		
		0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL	0,5-3 µL	3-9 µL	9-16 µL
Liqu. Detect.	Detect. Mode	detect with odd/even tips twice			detect with odd/even tips twice		
	Liqu. Conduct.	good			good		
	Detect. Speed	60 mm/s			60 mm/s		
	Double Dist.	4 mm			4 mm		
Aspirate	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL	0,5-3 µL	3-9 µL	9-16 µL
	Asp. Speed	10 µl/s	10 µl/s	45 µl/s	10 µl/s	10 µl/s	10 µl/s
	Delay	200 ms	400 ms	500 ms	200 ms	400 ms	400 ms
	STAG	2 µl	5 µl	7 µl	2 µl	5 µl	6 µl
	LAG	0 µl					
	Speed	10 µl/s					
	Delay	0 ms					
	TAG	0 µl					
	Speed	10 µl/s					
	Delay	0 ms					
	Excess Volume	12 µl	15 µl	30 µl	12 µl	15 µl	15 µl
	Replace after	2x Discard	2x Discard	2x Discard	1x Discard	1x Discard	1x Discard
	Cond. Volume	0,25 µl	0,25 µl	1 µl	20 µL	20 µL	15 µL
	Use Pinch Valve	yes	yes	yes	yes	yes	yes
	Use Liqu. Detect.	yes	yes	yes	yes	yes	yes
	Asp. Position	liquid level +/-offset with tracking					
	offset	1 mm					
	X:	center	center	center	center	center	center
	Mix before Asp.	no	no	no	no	no	no
	Retract Tips to	liquid-level -5 mm					
Retract Speed	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	20 mm/s	
Dispense	Volumen	0,5-3 µL	3-15 µL	15-500 µL	0,5-3 µL	3-9 µL	9-16 µL
	Dis. Speed	10 µl/s	30 µl/s	110 µl/s	150 µl/s	110 µl/s	250 µl/s
	Breakoff Speed	10 µl/s	30 µl/s	110 µl/s	225 µl/s	110 µl/s	225 µl/s
	Delay	400 ms	100 ms				
	TAG after each Dis.	no	no	no	no	no	no
	Use Pinch Valve	yes	yes	yes	yes	yes	yes
	Use Liqu. Detect.	no	no	no	no	no	no
	Dis. Position	z-dispense no tracking					
	offset	0 mm					
	X:	center	center	center	center	center	center
	Tip Touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching	no tip touching
	Mix after Dis.	no	no	no	no	no	no
	Retract Tips to	z-dispense 0 mm					
	Retract Speed	50 mm/s					
Calibration	Offset	0	0	0	0	0	0
	Factor	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Abbildung 83: Pipettierparameter der Flüssigkeitsklassen zum Pipettieren von Glycerinlösung der Konzentrationen 400 g L⁻¹ und 600 g L⁻¹.

E. Abkürzungen

Ac	Acetat
Asp	Aspiration
BTM	Biotrockenmasse
C	koaleszente Bedingungen
C.V.	Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)
CFD	computational fluid dynamics
Cond	Conditioning
Conduct	Conductivity
DDE	digital data embedding
Detect	Detection
Dis	Dispensing
DPM	dynamische Druckmethode (<i>dynamic pressure method</i>)
DSM	dynamische Sulfitmethode (<i>dynamic sulfite method</i>)
HPTS	1-hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure tri-Natrium Salz
ISFET	Ionen-selektiver Feldeffekttransistor
LAG	Leading air gap
LB	Luria broth, Komplexmedium
LED	Licht-emittierende Diode
Liqu	Liquid
Mio	Million(en)
NC	nicht-koaleszente Bedingungen
OD _x	optische Dichte, gemessen bei x nm
PBS	Phosphate buffered saline
PEEK	Poly-(Ether-Ether-Keton)
PMMA	Poly-(Methyl-Metacrylat)
P/O	Menge gebildetem ATP pro reduziertem Sauerstoff
PTFE	Poly-(Trifluor-Ethylen)
R ²	Bestimmtheitsmass

O ₂	Sauerstoff
SDM	Stickstoffdesorptionsmethode (<i>standard dynamic method</i>)
SFM	Sulfitzudosiermethode (<i>sulfite feeding method</i>)
STAG	System trailing air gap
TAG	Trailing air gap

Biochemische Formeln und Abkürzungen

ATP	Adenosin-Triphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CAP	Katabolit Aktivator Protein
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

Formelzeichen

a	volumenbezogene Stoffaustauschfläche	[m ⁻¹]
A	Fläche	[m ²]
b	Breite	[m]
c	Konzentration	[g L ⁻¹]*
c_w	Widerstandsbeiwert	[-]
C	Konstante	[-]
d	Durchmesser	[m]
D	Diffusionskoeffizient	[m ² s ⁻¹]
e	Exzentrizität der Schüttelbewegung	[cm]
E_{chem}	chemische Reaktionsbeschleunigung	[-]
F_A	Auftriebskraft	[N]
F_σ	Oberflächenkraft am Porenrand	[N]
F_T	Trägheitskraft	[N]

* Zur besseren Unterscheidung der Ziffer 1 und der Einheit Liter als Kleinbuchstabe hat sich in der Bioverfahrenstechnik die Einheit Liter als Grossbuchstabe durchgesetzt.

F_{η}	Reibungskraft	[N]
h	Höhe	[m]
H	Aussalzparameter	[-]
I	Ionenstärke	[M]
I_{pH}	referenzierte Fluoreszenzintensität	[-]
j	Stromdichte	[g h ⁻¹ m ⁻²]
k	Stoffübergangskoeffizient	[m ² s ⁻¹]
k_{La}	Sauerstoffübergangskoeffizient	[s ⁻¹]
K	Löslichkeitsparameter	[-]
K_H	Henrykonstante	[mol m ⁻³ bar ⁻¹]
$K_{H,0}$	Henrykonstante in reinem Wasser	[mol m ⁻³ bar ⁻¹]
K_S	Sättigungskonzentration (Michaelis-Menten)	[g L ⁻¹]
m	Aufnahmerate des Ertragsstoffwechsels	[g g ⁻¹ h ⁻¹]
M	Molmasse	[g mol ⁻¹]
n	Schüttelfrequenz, Drehzahl	[min ⁻¹], [s ⁻¹]
N	Anzahl	[-]
OTR	Sauerstoffeintragsrate	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
OUR	Sauerstoffaufnahmerate	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
p	Druck	[bar]
pH	<i>pH</i> -Wert	[-]
P	Leistung	[W]
Pe	Permeabilität	[mol s ⁻¹ m ⁻¹ Pa ⁻¹]
q	spezifische Aufnahmerate	[g g ⁻¹ h ⁻¹]
\dot{Q}	Wärmestrom	[W L ⁻¹]
r	Reaktionsgeschwindigkeit	[h ⁻¹]
R	Wärmewiderstand	[W ⁻¹ cm ² K]
t	Zeit	[s], [h]
t_E	Ansprechzeit der Elektrode	[s]
t_P	Prozesszeit	[h]
T	Temperatur	[K], [° C]
u	Gasleerrohrgeschwindigkeit	[cm s ⁻¹]
v	Strömungsgeschwindigkeit	[m s ⁻¹]

v_{Tip}	Rührerumfangsgeschwindigkeit	$[m\ s^{-1}]$
vvm	Belüftungsrate	$[min^{-1}]$
V	Volumen	$[L]$
\dot{V}	Volumenstrom	$[L\ h^{-1}]$
V_M	Molvolumen des idealen Gases (22,4)	$[L\ mol^{-1}]$
y	Molanteil	$[-]$
Y	Ausbeutekoeffizient, (<i>Yield</i>)	$[g\ g^{-1}]$
Y_S	Sättigungsbeladung	$[g\ kg^{-1}]$
z	Ladungszahl	$[-]$

Dimensionslose Kennzahlen

BW	Bewehrungskennzahl
Fr	Froude-Zahl
Ha	Hatta-Zahl
Ne	Newton-Zahl
Q	Gasdurchsatzkennzahl
Re	Reynolds-Zahl

Griechische Symbole

α	Wärmeübergangskoeffizient	$[W\ m^{-2}\ K^{-1}]$
δ	Grenzschichtdicke	$[m]$
Δ	Differenz	$[-]$
η	Viskosität	$[N\ s\ m^{-2}]$
ε	Porösität	$[-]$
ε_G	Gasgehalt	$[-]$
λ	Wärmedurchgangskoeffizient	$[W\ m^{-1}\ K^{-1}]$
μ	Wachstumsrate	$[h^{-1}]$
ν	kinematische Viskosität	$[m^2\ s^{-1}]$
ρ	Dichte	$[g\ cm^3]$
ν	Stöchiometriekoeffizient	$[-]$

Indices

<i>a</i>	begast (<i>aerated</i>)
<i>b</i>	Blase
<i>B</i>	Strömungsbrecher (<i>baffle</i>)
<i>E</i>	Elektrode
<i>F</i>	Zudosierlösung (<i>feed</i>)
<i>G</i>	Gas
<i>i,j</i>	Komponente i bzw. j
<i>I</i>	Rührer (<i>impeller</i>)
<i>L</i>	Flüssigkeit (<i>liquid</i>)
<i>m</i>	Reaktionsordnung
<i>M</i>	Membran
<i>O</i>	Sauerstoff (<i>oxygen</i>)
<i>P</i>	Pore einer Sinterplatte
<i>Q</i>	Wärme
<i>R</i>	Reaktion
<i>S</i>	Substrat
<i>T</i>	Reaktor (<i>tank</i>)
<i>V</i>	Verdunstung
<i>X</i>	Biomasse
<i>0</i>	unbegast, den Ausgangszustand betreffend
*	an der Phasengrenzfläche
<i>act</i>	aktuelle Bedingungen
<i>cat</i>	Katalysator
<i>corr</i>	korrigiert
<i>crit</i>	kritisch
<i>dyn</i>	dynamisch, während Betrieb des Rührers
<i>eq</i>	Gleichgewicht (<i>equilibrium</i>)
<i>flask</i>	Schüttelkolben
<i>Ges</i>	Gesamt
<i>init</i>	initiale Bedingungen
<i>In</i>	Eingang

max maximal

nom nominal

Out Ausgang

