

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

**Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch
veränderlicher Mikroorganismen**

Ralf Hortsch

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. Andreas Kremling
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Bley,
Technische Universität Dresden

Die Dissertation wurde am 17.01.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Maschinenwesen am 28.03.2011 angenommen.

Der Mensch hat dreierlei Wege, klug zu handeln; erstens durch Nachdenken, das ist das Edelste, zweitens durch Nachahmen, das ist das Leichteste, und drittens durch Erfahrung, das ist das Bitterste.

- Konfuzius -

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München.

Zu dieser Dissertation haben mehrere Personen auf unterschiedliche Weise beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte:

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr.-Ing. Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung, Unterstützung und vor alle Dingen die Freiräume die er mir bei der Bearbeitung des Projektes eingeräumt hat.

Weiterhin danke ich meinem Coreferenten Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Bley für die Übernahme der Aufgabe, sowie die während des Studiums bei ihm erworbenen Kenntnisse, die Grundlage für eine erfolgreiche wissenschaftliche Arbeit waren. Herrn Prof. Dr.-Ing. Kremling danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein wichtiger Dank gebührt Herrn Dr. rer. nat. Stratmann, der mir sehr bei der Einarbeitung mit den Streptomycceten geholfen hat und mir während der Projektlaufzeit jederzeit für Rückfragen zur Verfügung gestanden hat.

Herrn Dr.-Ing. Klaus Kaufmann und Michael Fischer von der 2mag AG danke ich für die Unterstützung bei der Fertigung der Rührorgane und Reaktoren.

Bei Christoph Bendig, Danielle Dennewald und Peter Riedlberger möchte ich mich für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation bedanken.

Meinen ehemaligen Studenten Anastassja Akal, Sven Bresch, Claudia Gollwitzer, Benjamin Huber, Markus Jeschek, Christine Kastner, Harald Krispin, Karsten Müller, Andrea Okroy und Stefan Reinlein danke ich für die fleißige Mitarbeit.

Ein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bioverfahrenstechnik für das sehr gute Arbeitsklima, das wesentlich zu einer motivierenden Arbeitsweise beigetragen hat.

Abschließend danke ich meiner gesamten Familie, sowie meiner Freundin Katrin für die private Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit.

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Problemstellung und Zielsetzung	2
3	Theoretische Grundlagen	4
3.1	Verfahrenstechnische Charakterisierung von Rührreaktoren	4
3.1.1	Hydrodynamik.....	4
3.1.2	Leistungseintrag	6
3.1.3	Sauerstoffeintrag	8
3.1.4	Maximale lokale Energiedissipation	13
3.1.5	Verhalten bei viskosen Fluiden	17
3.1.6	Effektive Schergeschwindigkeit.....	22
3.2	Parallele Bioreaktorsysteme	24
3.2.1	Geschüttelte Systeme	24
3.2.2	Blasensäulen.....	25
3.2.3	Gerührte Systeme	26
3.2.4	Verfahrenstechnische Betrachtung.....	31
3.3	<i>Streptomyces tendae</i>	34
3.3.1	Morphologie und Wachstum.....	34
3.3.2	Nikkomycin Z	35
3.3.3	Kultivierung in Bioreaktoren	37
3.3.4	Rheologisches Verhalten.....	39
4	Material und Methoden	41
4.1	Verwendete Bioreaktorsysteme.....	41
4.1.1	Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan	41
4.1.2	Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan	42
4.1.3	Laborrührreaktor	42
4.2	Verfahrenstechnische Charakterisierung des Paddelrührorgans im Milliliter-Bioreaktor.....	43
4.2.1	Verwendete Modellfluide und Bestimmung der Rheologie.....	43
4.2.2	Bestimmung des Leistungseintrags.....	44

4.2.3	Bestimmung des k_{La}	45
4.2.4	Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation	46
4.2.5	Bestimmung der effektiven Schergeschwindigkeit	48
4.3	Verfahrenstechnische Charakterisierung des Gas-induzierenden Rührorgans im Milliliter-Bioreaktor	50
4.3.1	Bestimmung des Leistungseintrags	50
4.3.2	Bestimmung des k_{La}	50
4.3.3	Bestimmung der kritischen Rührerdrehzahl für Gasinduktion.....	51
4.3.4	Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation	51
4.4	Verfahrenstechnische Charakterisierungen des Laborrührreaktors	52
4.4.1	Bestimmung des Leistungseintrags	52
4.4.2	Bestimmung des k_{La}	52
4.5	Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i>	53
4.5.1	Mikroorganismus und Stammhaltung	53
4.5.2	Nährmedien	53
4.5.3	Vorkulturherstellung	55
4.5.4	Kultivierung im Laborrührreaktor im Satzverfahren	55
4.5.5	Kultivierung im Laborrührreaktor im Zulaufverfahren.....	56
4.5.6	Kultivierung im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan	57
4.5.7	Kultivierung im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan.....	58
4.6	Analytik bei der Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i>	58
4.6.1	Bestimmung der Biotrockenmasse	58
4.6.2	HPLC-Bestimmung der Nikkomycin Z-Konzentration	59
4.6.3	HPLC-Bestimmung der Mannitkonzentration	60
4.6.4	Bestimmung der Rheologie	60
4.6.5	Bestimmung der Oberflächenspannung	60
5	Ergebnisse und Diskussion	62
5.1.	Referenzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> im Laborrührreaktor	62
5.1.1	Kultivierung und Morphologie.....	62
5.1.2	Charakterisierung des rheologischen Verhaltens	65
5.1.3	Identifikation geeigneter Modellfluide.....	68

5.2. Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan	71
5.2.1 Parallele Kultivierung	71
5.2.2 Sauerstoffübergang bei viskosen Fluiden	74
5.3. Entwicklung eines neuartigen Paddelrührorgans für Milliliter-Bioreaktoren.....	78
5.3.1 Rührerkonzept	78
5.3.2 Optimierung der Rührergeometrie	81
5.3.3 Einbindung des Rührorgans in den Bioreaktorblock	86
5.4. Verfahrenstechnische Charakterisierung des Paddelrührorgans	89
5.4.1 Leistungseintrag	89
5.4.2 Sauerstoffeintrag	92
5.4.3 Maximale lokale Energiedissipation	95
5.4.4 Effektive Schergeschwindigkeit.....	100
5.5. Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan	102
5.5.1 Parallele Kultivierung	102
5.5.2 Ermittlung der repräsentativen Viskosität.....	106
5.6. Reaktionstechnische Untersuchung der Nikkomycin Z-Bildung durch <i>Streptomyces tendae</i>	109
5.6.1 Untersuchung von Nährmedienzusätzen im Milliliter-Bioreaktor.....	109
5.6.2 Zulaufkultivierung im Laborrührreaktor	111
6 Zusammenfassung und Ausblick	114
7 Literatur	119
Abkürzungen und Formelzeichen	131
Tabellenverzeichnis	135
Abbildungsverzeichnis	136
Anhang	

1 Einleitung

Die Anzahl wirtschaftlich interessanter biotechnologischer Reaktionen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Dies ist besonders auf die großen Fortschritte im Bereich der Genetik, wie der Erschließung des Genoms von immer mehr Mikroorganismen und der zielgerichteten Modifikation von Proteinen zurückzuführen.

Die Selektion aussichtsreicher Biokatalysatoren benötigt eine enorme Anzahl an Parallelversuchen, die unter kontrollierten technischen Bedingungen stattfinden sollten. Weiterhin erfordert die Optimierung der biotechnologischen Prozesse, sowie deren Übertragung in den Pilot- und Produktionsmaßstab, zusätzliche Versuchsreihen, die zeitlich, apparativ und personell sehr aufwendig sind und damit die Entwicklung des gesamten Produktionsprozesses verlangsamen. Geeignete miniaturisierte Parallelreaktoren können die Entwicklungszeiten erheblich verkürzen und ermöglichen eine „Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung“ (Weuster-Botz 2005, Micheletti und Lye 2006).

Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren verschiedene Bioreaktoren im Milliliter- und Mikroliter-Maßstab entwickelt (unter anderem Szita *et al.* 2005, Harms *et al.* 2006, Lee *et al.* 2006, Tang *et al.* 2006), deren Nutzbarkeit und Limitationen bisher vor allem für die Kultivierung von Bakterien wie *Escherichia coli* oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt wurden.

In zahlreichen industriell relevanten biotechnologischen Prozessen finden jedoch morphologisch veränderliche Mikroorganismen, die sowohl in Mycel- als auch in Pelletform wachsen können, Anwendung. Diese Mikroorganismen produzieren die Mehrheit der verfügbaren Antibiotika (Watve *et al.* 2001), können zahlreiche Biotransformationen durchführen (Ishige *et al.* 2005, Goldberg *et al.* 2007) und werden zunehmend zur Expression homologer und heterologer Proteine eingesetzt (Ishige *et al.* 2005, Nevalainen *et al.* 2005). Wichtige Vertreter sind beispielsweise *Aspergillus spp.*, *Streptomyces spp.* oder *Trichoderma spp.*

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die effektive Gewinnung von Prozessinformationen stellt in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung und -optimierung einen wesentlichen Engpass dar. Ein Ansatz zur Überwindung dieser Problematik ist die Miniaturisierung und Parallelisierung von Bioreaktoren (Weuster-Botz 2005, Bareither und Pollard 2011). Da der Standardlaborrührreaktor immer noch der am häufigsten verwendete Reaktortyp in der biotechnologischen Industrie ist, sollten bei Bioreaktoren im kleinen Maßstab ähnliche physikalische Bedingungen wie in Reaktoren des Labor- und Pilotmaßstabes vorliegen, um die Skalierbarkeit der Prozesse sicherzustellen (Weuster-Botz *et al.* 2007). Dies kann durch die Entwicklung miniaturisierter Rührreaktoren erreicht werden.

Das von Puskeiler *et al.* (2005a) an der TU München entwickelte gerührte Parallelbioreaktorsystem ermöglicht im Milliliter-Maßstab gleichzeitig 48 Kultivierungen zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung. Das System nutzt dabei magnetisch angetriebene Gas-induzierende Rührorgane und erreicht sehr hohe Sauerstoffübergangskoeffizienten von $k_{La} > 0,4 \text{ s}^{-1}$. Neben der Möglichkeit einer kontrollierten Prozessführung ist vor allem die Ähnlichkeit der gerührten Milliliter-Bioreaktoren zu gerührten Standardbioreaktoren ein entscheidender Vorteil. Die Nutzbarkeit des Minibioreaktorsystems zur skalierbaren Bioprozessentwicklung wurde dabei bisher für einzellige Mikroorganismen wie zum Beispiel *Escherichia coli* (Puskeiler *et al.* 2005b, Kusterer *et al.* 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Kusterer *et al.* 2008), *Cupriavidus necator* (Höfel *et al.* 2010) und *Bacillus subtilis* (Knorr *et al.* 2007, Vester *et al.* 2009) gezeigt.

Die Eignung des Milliliter-Bioreaktors mit Gas-induzierendem Rührorgan zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen war bisher jedoch unklar, da sich durch deren komplexe Morphologie neue Anforderungen an die Mikro-Bioverfahrenstechnik ergeben. Zum einen ist die Morphologie der Mikroorganismen, die wiederum einen starken Einfluss auf die Produktivität der Zellen haben kann, von den im Bioreaktor auftretenden Kräften abhängig (Smith *et al.* 1990, Jüsten *et al.* 1996, Cui *et al.* 1997). Zum anderen ändert das Kulturmedium, vor allem bei Mycelwuchsform, seine Eigenschaften von einem niedrigviskosen Newton'schen Verhalten hin zu stark strukturviskosem nicht-Newton'schen Fließverhalten (Riley *et al.* 2000, Pollard *et al.* 2002). Dies führt zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Viskosität innerhalb des Bioreaktors und kann zu Problemen bezüglich der

Homogenisierung und des Massentransports führen. Weiterhin neigen filamentöse Mikroorganismen stark zum Bewachsen der Reaktorwände, was eine kontrollierte Prozessführung erschwert (Larsen *et al.* 2004) und besonders im Milliliter-Maßstab problematisch ist.

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war daher zunächst die Eignung des Gas-induzierenden Rührorgans zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen zu evaluieren. Falls die Kultivierung in diesen Milliliter-Bioreaktoren nicht erfolgreich verläuft, sollte die Entwicklung und verfahrenstechnische Charakterisierung neuer Rührsysteme im Milliliter-Maßstab durchgeführt werden. Die neu entwickelten Rührorgane sollten dabei die hauptsächlich während der Kultivierung auftretenden Probleme wie beispielsweise Wandwachstum und hohe Viskosität des Kulturmediums lösen können.

Zur Charakterisierung der Skalierbarkeit mikrobieller Reaktionen in dem neu gestalteten Reaktorsystem wurde *Streptomyces tendae* (*S. tendae*) als Modellmikroorganismus gewählt. Der Actinomycet *S. tendae* zeigt das typische Verhalten morphologisch veränderlicher Mikroorganismen (variable Morphologie, strukturviskoses Kulturmedium und Neigung zum Wandwachstum) und produziert außerdem das pharmazeutisch interessante Fungizid Nikkomycin Z (Nix *et al.* 2009).

Zum Erreichen der Ziele wurden folgende Arbeitsschritte geplant:

- Etablierung und Charakterisierung eines Referenzprozesses zur Kultivierung von *S. tendae* W42-0 im Satzverfahren im Laborrührreaktor
- Evaluierung der Funktionsfähigkeit des Milliliter-Bioreaktors mit Gas-induzierendem Rührorgan zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen
- Modifikation/Neukonstruktion des Rührorgans und Milliliter-Bioreaktors
- Verfahrenstechnische Charakterisierung des neuen Milliliter-Bioreaktors und Vergleich mit einem Standardlaborrührreaktor
- Einsatz der neu entwickelten Milliliter-Bioreaktoren zur parallelen Kultivierung von *S. tendae* W42-0 und Vergleich der Ergebnisse mit dem Referenzprozess
- Reaktionstechnische Charakterisierung der Nikkomycin Z-Bildung unter Anwendung der neuen Milliliter-Bioreaktoren

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Verfahrenstechnische Charakterisierung von Rührreaktoren

3.1.1 Hydrodynamik

In der Biotechnologie stellt der Rührreaktor den im Pilot- und Produktionsmaßstab am häufigsten verwendeten Reaktortyp dar. Die Homogenisierung des Mediums erfolgt dabei über die Drehbewegung eines auf einer Achse angebrachten Rührorgans.

Der Betriebspunkt der Reaktoren wird meist so gewählt, dass turbulente Strömung im gesamten Reaktorinhalt vorliegt. Darunter versteht man örtlich instationäre, dreidimensionale Wirbelströmungen (Kraume 2003). Die Turbulenzbewegung kann nach Kolmogorov (1958) als eine Überlagerung von Turbulenzwirbeln verschiedener Größenordnung aufgefasst werden, die ihre kinetische Energie kaskadenartig an jeweils immer kleinere Wirbel abgeben (Abb. 3.1).

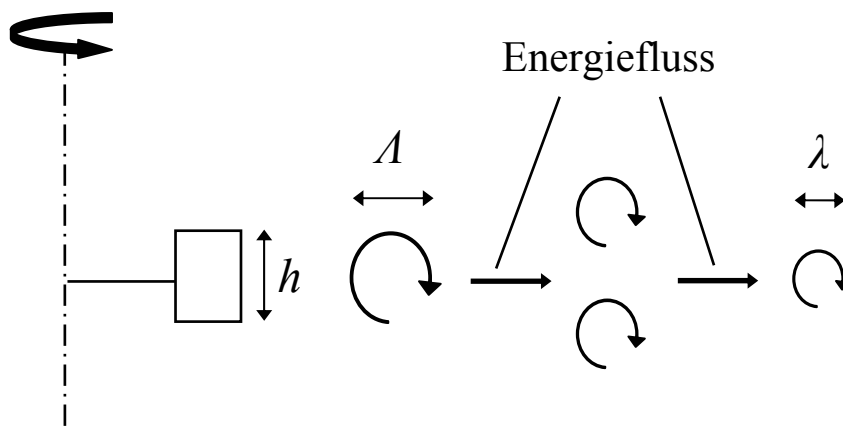


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Wirbelgrößen und des Energietransports bei Turbulenzbewegungen im Rührreaktor (modifiziert nach Kraume (2003)).

Für die größten Wirbel wird dabei der Makromaßstab der Turbulenz Λ eingeführt, der in etwa der Rührerhöhe h entspricht:

$$\Lambda \approx h \quad (1)$$

Der hohe Energiegehalt der großen Wirbel wird auf die Turbulenzelemente nächst kleinerer Ordnung übertragen, wobei Viskositätskräfte zunächst keine Rolle spielen. Diese dominieren erst bei hinreichend kleinen Wirbeln, so dass die Energie vollständig in Wärme dissipiert

(Kraume 2003). Diese Dissipationswirbel lassen sich mit dem Mikromaßstab der Turbulenz λ (auch Kolmogorov-Länge) beschreiben:

$$\lambda = \sqrt[4]{\frac{\nu^3}{\varepsilon_\emptyset}} \quad (2)$$

ε_\emptyset ... mittlere Energiedissipation [W kg^{-1}]

ν ... kinematische Viskosität [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]

wobei sich die mittlere Energiedissipation ε_\emptyset wie folgt berechnet:

$$\varepsilon_\emptyset = \frac{P}{V \cdot \rho} \quad (3)$$

P ... eingetragene mechanische Leistung [W]

V ... Flüssigkeitsvolumen [L]

ρ ... Dichte [kg m^{-3}]

Der Turbulenzgrad der Strömung lässt sich dimensionslos mittels der Reynoldszahl (Re) kennzeichnen, wobei in Standardrührreaktoren mit Strömungsbrechern bei $Re > 10^4$ vollständig turbulente Strömung vorliegt (siehe auch Kapitel 3.1.2):

$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta} \quad (4)$$

d ... Rührerdurchmesser [m]

n ... Rührerdrehzahl [min^{-1}]

η ... dynamische Viskosität [Pa s]

ρ ... Dichte [kg m^{-3}]

Abbildung 3.2 zeigt qualitativ das Förderverhalten eines Scheibenblattrührers im Vergleich zu einem Propellerrührer im bewehrten Reaktor. Es ist zu erkennen, dass der Scheibenblattrührer eine vorwiegend radiale Strömung erzeugt, wohingegen beim Propellerrührer die axiale Komponente deutlich stärker ausgeprägt ist. Der Einsatz von Strömungsbrechern wirkt dabei der kreisenden Flüssigkeit im zylindrischen Behälter entgegen und verbessert somit die Durchmischung. In einem Rührreaktor ohne Einbauten kommt es zur Ausbildung einer Flüssigkeitstrombe, die bei hohen Rührerdrehzahlen das Rührorgan erreichen kann. Dieser hydrodynamische Zustand ist meist unerwünscht, da es zu

einer außerordentlich starken Beanspruchung der Rührerwelle, ihrer Lagerung und Abdichtung kommen kann.

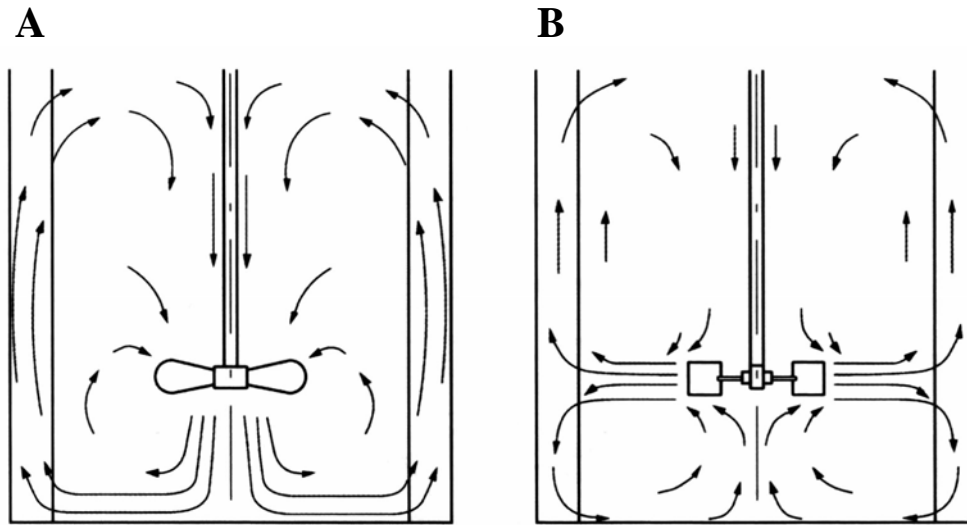


Abb. 3.2: Strömungsbahnen im bewehrten Rührkesselreaktor mit Propellerrührer (A) und Scheibenblattrührer (B) (Zlokarnik 2005).

3.1.2 Leistungseintrag

Die durch das Rührorgan in einen Rührreaktor eingebrachte Leistung, kann mit Hilfe der Newton-Zahl (Ne) dimensionslos beschrieben werden:

$$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d^5} \quad (5)$$

d ... Rührerdurchmesser [m]

n ... Rührerdrehzahl [min^{-1}]

P ... eingetragene mechanische Leistung [W]

ρ ... Dichte [kg m^{-3}]

Im unbegasteten Reaktor ist die Ne -Zahl nur von der Re -Zahl abhängig und es lässt sich die so genannte Leistungscharakteristik f mit $Ne = f(Re)$ bilden. Dieser Zusammenhang ist für jeden Rührertyp und die entsprechende Einbaugeometrie spezifisch und muss experimentell oder durch numerische Methoden bestimmt werden (Kraume 2003).

Abbildung 3.3 zeigt beispielhaft die Leistungscharakteristik verschiedener Rührorgane im bewehrten Reaktor. Es lassen sich 3 Strömungsbereiche erkennen (Zlokarnik 2005):

- 1) im *laminaren Strömungsbereich* ist der Einfluss der Trägheitskräfte (Dichte) durch die Zähigkeitskräfte (Viskosität) unterbunden und es gilt:

$$Ne \cdot Re = const. \quad (6)$$

- 2) im *turbulenten Strömungsbereich* ist kein Einfluss der Viskosität mehr vorhanden und es gilt:

$$Ne = const. \quad (7)$$

- 3) in unbewehrten Behältern gibt es einen *Übergangsbereich*, in dem sowohl der Einfluss der Dichte als auch der Viskosität vorhanden ist. Ein einfacher Zusammenhang lässt sich für diesen Fall nicht bilden, es gilt jedoch annähernd:

$$Ne \cdot Re^{1/3} = const. \quad (8)$$

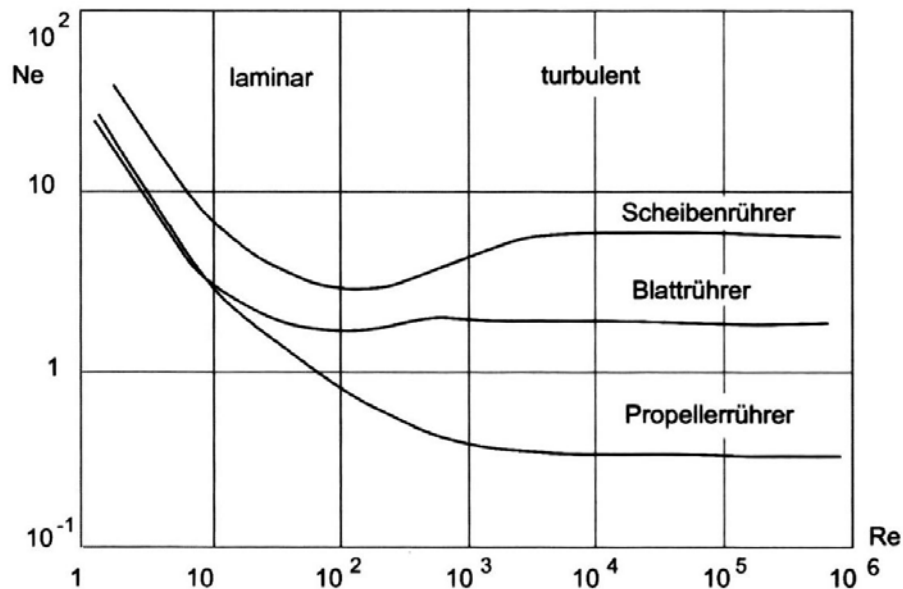


Abb. 3.3: Leistungscharakteristik für verschiedene Rührorgane im bewehrten Rührreaktor (Chmiel 2006).

In begasten Rührreaktoren sinkt der Leistungseintrag mit steigendem Gasgehalt in der Flüssigphase ab und die *Ne*-Zahl ist neben der *Re*-Zahl auch noch von der Gasdurchsatzkennzahl (*Q*) und der Froude-Zahl (*Fr*) abhängig (Zlokarnik 1973, Henzler 1982).

3.1.3 Sauerstoffeintrag

Eine der wichtigsten Kenngrößen für Bioreaktoren ist der gas/flüssig-Stofftransport, da vor allen Dingen bei aeroben Prozessen Sauerstoff meist das limitierende Substrat für das Wachstum der Mikroorganismen ist. In der Literatur finden sich drei wesentliche Modelle zur Beschreibung des gas/flüssig-Stofftransports: das Penetrationsmodell, die Theorie der Oberflächenerneuerung, sowie das Zweifilmmodell (Chmiel 2006). Letzteres wird in der Praxis am häufigsten verwendet und soll deswegen nachfolgend beschrieben werden.

Das Zweifilmmodell geht davon aus, dass sich an der Phasengrenzfläche zwischen Gas und Flüssigkeit sofort das thermodynamische Gleichgewicht einstellt und auf beiden Seiten der Phasengrenze ein Bereich laminarer Strömung vorliegt, während im Kern beider Phasen (*bulk*) turbulente Strömung vorherrscht (Abb. 3.4). In der laminaren Grenzschicht erfolgt der Stofftransport rein diffusiv, während im turbulenten Bereich konvektiver Stofftransport mit vernachlässigbaren Konzentrationsgradienten stattfindet.

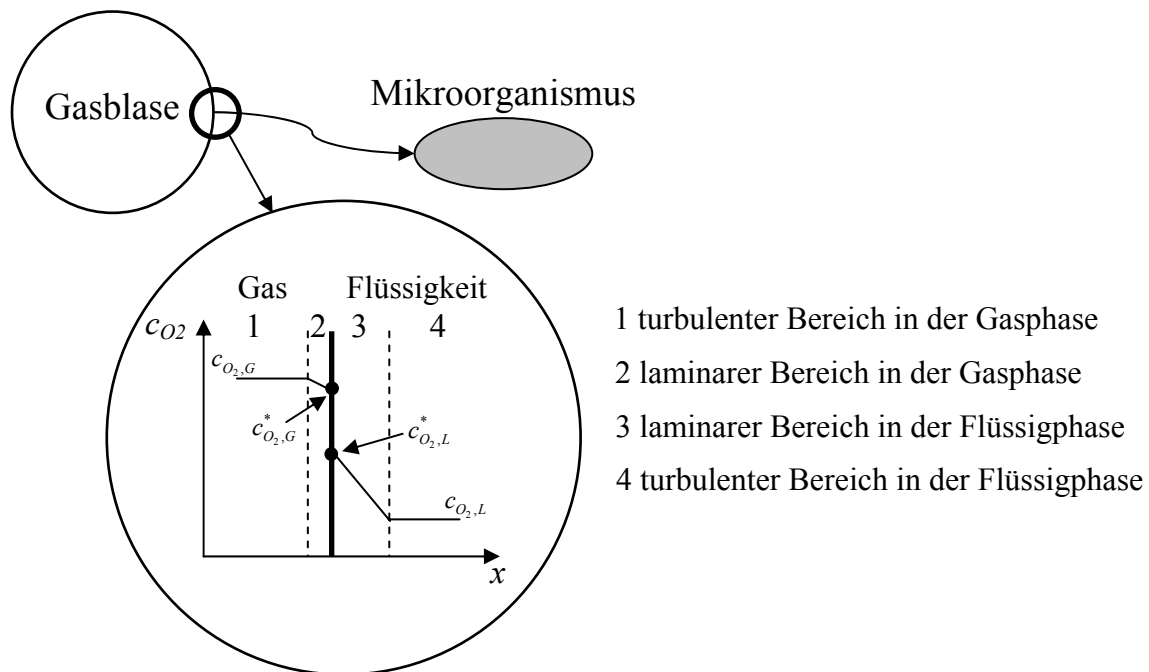


Abb. 3.4: Sauerstoffkonzentration in der Gas- und Flüssigphase in der Umgebung der Phasengrenze nach dem Zweifilmmodell (modifiziert nach Chmiel 2006).

Der Diffusionsprozess in den laminaren Grenzschichten ist maßgeblich für den Stofftransport über die Phasengrenze hinweg. Da die Grenzschicht im Gas viel dünner als die Grenzschicht in der Flüssigphase ist ($\Delta x_G \ll \Delta x_L$) und der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Luft viel größer ist als in wässriger Lösung ($D_{O_2,G} \gg D_{O_2,L}$), kann der

gasseitige Stofftransportwiderstand vernachlässigt werden. Der Massestrom des Sauerstoffs durch die laminare Flüssigkeitsschicht ist mit dem 1. Fick'schen Gesetz beschreibbar:

$$m_{O_2,G/L} = -D_{O_2,L} \cdot A_{L/G} \cdot \frac{dc_{O_2,L}}{dx_L} \quad (9)$$

$A_{L/G}$... Phasengrenzfläche [m²]

$c_{O_2,L}$... Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase [g L⁻¹]

$D_{O_2,L}$... Sauerstoff Diffusionskoeffizient [m² s⁻¹]

$m_{O_2,G/L}$... Sauerstoffmassestrom über die Grenzfläche [g h⁻¹]

x_L ... Dicke der laminaren Grenzschicht der Flüssigphase [m]

Unter der Voraussetzung eines über die gesamte laminare Flüssigphase konstanten Gradienten und unter Einbeziehung des Flüssigkeitsvolumens V_L ergibt sich:

$$\frac{m_{O_2,G/L}}{V_L} = \frac{D_{O_2,L}}{\Delta x_L} \cdot \frac{A_{L/G}}{V_L} \cdot (c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}) \quad (10)$$

$c_{O_2,L}^*$... Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase an der Phasengrenze [g L⁻¹]

Das Verhältnis $D_{O_2,L}/\Delta x_L$ entspricht dem Stoffübergangskoeffizienten k_L und das $A_{L/G}/V_L$ -Verhältnis der spezifischen Phasengrenzfläche a . Deren Produkt $k_L a$ kann experimentell bestimmt werden. Die *Oxygen Transfer Rate* (OTR) ergibt sich zu:

$$OTR = \frac{m_{O_2,G/L}}{V_L} = k_L a \cdot (c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}) \quad (11)$$

Bei Rührreaktoren mit 6-Blatt-Scheibenrührern treten unter Standardbedingungen meist $k_L a$ zwischen 0,05 s⁻¹ und 0,3 s⁻¹ auf (Van't Riet 1979, Middleton 1985). Für niedrigviskose Medien fanden Cooper *et al.* (1944) eine Korrelation für den $k_L a$ mit dem volumenspezifischen Leistungseintrag P/V und der Gasleerrohrgeschwindigkeit u_G , die häufig für Maßstabsübertragungen herangezogen wird:

$$k_L a = C_1 \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{\alpha_1} \cdot u_G^{\beta_1} \quad (12)$$

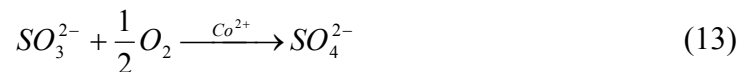
Die Parameter C_1 , α_1 und β_1 wurden von Van't Riet (1979) bei der Auswertung zahlreicher Arbeiten für nicht-koaleszierende Medien zu $C_1 = 2,6 \cdot 10^{-2} \text{ W}^{-\alpha_1} \text{ L}^{\alpha_1} \text{ m}^{-\beta_1} \text{ s}^{\beta_1-1}$, $\alpha_1 = 0,4$ und $\beta_1 = 0,5$ bestimmt, wobei ein relativer Fehler von $\pm 20 - 40 \%$ vorliegt.

Messmethoden

Zur Bestimmung des k_{La} gibt es eine Reihe von chemischen und physikalischen Messmethoden, die grundsätzlich in stationäre und dynamische Methoden unterteilt werden. Die wichtigsten Methoden werden im Folgenden kurz erläutert:

Klassische Sulfitoxydationsmethode

Die klassische Sulfitoxydationsmethode ist eine stationäre Methode und wurde erstmal von Cooper *et al.* (1944) beschrieben. Dabei wird ein Fließgleichgewicht der Oxidation von Sulfit zu Sulfat mit Hilfe eines Katalysators (meist Co^{2+}) in der Versuchsflüssigkeit erzielt. Aus der verbrauchten Sulfitmenge und der Reaktionszeit kann unter Berücksichtigung der Stöchiometrie der nachfolgenden Reaktionsgleichung der k_{La} berechnet werden.



Nachteil der Methode ist, dass zum einen die Reaktion schnell genug ablaufen muss, so dass die Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase nahe Null ist, zum anderen aber gewährleistet sein muss, dass die Reaktion nur im Kern der Flüssigphase und nicht in der laminaren Grenzschicht abläuft.

Dynamische Stickstoffdesorptionsmethode

Bei der dynamischen Stickstoffdesorptionsmethode wird der Sauerstoff in der Flüssigphase zunächst durch eine Begasung mit reinem Stickstoff desorbiert. Nach vollständiger Desorption findet eine sofortige Umstellung auf Luft- oder Sauerstoffbegasung statt und die Aufsättigungskinetik wird ermittelt. Unter der Annahme der idealen Rückvermischung der Gas- und Flüssigphase kann aus den Messdaten unter Anpassung folgender Gleichung der k_{La} bestimmt werden:

$$\frac{c_{O_2}^* - c_{O_2}(t)}{c_{O_2}^* - c_{O_2}(0)} = e^{-t \cdot k_{La}} \quad (14)$$

c_{O_2} ... Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase [g L^{-1}]

$c_{O_2}^*$... Sauerstoffkonzentration an der Phasengrenze [g L^{-1}]

Gleichung 14 gilt allerdings nur, wenn die Ansprechzeit t_E des Messsystems viel kleiner als der Reziprokwert des größten zu messenden $k_L a$ ist, da dieser sonst unterschätzt wird (Gaddis 1999). Im Realfall wird das Zeitverhalten des Messsystems meist als PT_1 -Glied mit Totzeit Δt approximiert (Fuchs und Ryu 1971). Demnach ergibt sich nach Linek *et al.* (1987) folgende Gleichung zur Bestimmung des $k_L a$:

$$\frac{c_{O_2}^* - c_{O_2}(t)}{c_{O_2}^* - c_{O_2}(0)} = \left(\frac{1}{1 - t_E \cdot k_L a} \right) \cdot \left(e^{-(t-\Delta t)k_L a} - t_E \cdot k_L a \cdot e^{\frac{t-\Delta t}{t_E}} \right) \quad (15)$$

Der Nachteil dieser dynamischen Methode ist, dass sich die Gasphase im realen System nicht sprunghaft austauschen lässt und damit die Messung verfälscht wird.

Dynamische Sulfitmethode

Bei der dynamischen Sulfitmethode wird der in der Flüssigphase enthaltene gelöste Sauerstoff durch Sulfitoxidation entfernt (Havelka *et al.* 1998). Zu Beginn der Aufsättigungsphase muss die zugegebene Menge Sulfit vollständig verbraucht sein, um eine Verfälschung der Messwerte durch parallel weiterlaufende Sulfitoxidation zu vermeiden. Dies kann durch den Einsatz ausreichender Mengen an Katalysator (meist Co^{2+}), oder auch durch photometrische Messung des Restsulfitgehaltes im Medium verhindert werden. Die Aufsättigungskinetik kann mit Gleichung 15 beschrieben und der $k_L a$ bestimmt werden. Die dynamische Sulfitmethode liefert für einen breiten Betriebsbereich als korrekt geltende $k_L a$ und hat lediglich den Nachteil, dass die Messung nur in einem Modellfluid und nicht während eines realen Prozesses durchgeführt werden kann.

Dynamische Druckmethode

Die dynamische Druckmethode bestimmt den $k_L a$ aus dem Verlauf des Gelöstsauerstoffsignals nach Aufprägung einer Druckerhöhung (Linek *et al.* 1989). Die Methode gilt als eine der genauesten zur Bestimmung des $k_L a$, da in allen Gasblasen des Systems unabhängig von der Durchmischung ein Drucksprung erfolgt. Als nachteilig ist der erhöhte apparative Aufwand anzusehen, da vor allem in kleineren Bioreaktoren standardmäßig keine Manometer oder druckunempfindlichen Messsensoren vorhanden sind.

Statische Methode im realen Prozess

Der $k_L a$ während einer Kultivierung mit Mikroorganismen lässt sich mit der statischen Methode bestimmen. Bei nicht-limitierten aeroben Prozessen ist die OTR gleich der *Oxygen Uptake Rate* (OUR) der Mikroorganismen:

$$OTR = OUR \quad (16)$$

Die OUR kann durch eine Massenbilanz des Sauerstoffs in Zu- und Abluft (z.B über eine Abgasanalytik) wie folgt bestimmt werden:

$$OUR = \frac{(y_{O_2,In} - y_{O_2,Out}) \cdot F_G}{V_M} \cdot \frac{M_{O_2}}{V_L} \quad (17)$$

$y_{O_2,In}$... Molanteil des Sauerstoffs in der Zuluft [-]

$y_{O_2,Out}$... Molanteil des Sauerstoffs in der Abluft [-]

F_G ... Gasvolumenstrom [L h⁻¹]

V_M ... Molvolumen des idealen Gases [mol L⁻¹]

M_{O_2} ... Molmasse von Sauerstoff [g mol⁻¹]

V_L ... Flüssigkeitsvolumen [L]

Aus Gleichung 16 ergibt sich mit Gleichung 17 und Gleichung 11 folgende Beziehung zur Bestimmung des $k_L a$:

$$k_L a = \frac{OUR}{c_{O_2,L}^* - c_{O_2,L}} \quad (18)$$

Die Gelöstsauerstoffkonzentration an der Phasengrenze kann mit dem Henry-Gesetz berechnet werden:

$$c_{O_2,L}^* = k_H \cdot p_{O_2} \quad (19)$$

$c_{O_2,L}^*$... Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase an der Phasengrenze [g L⁻¹]

k_H ... Henry-Konstante [mol m⁻³ bar⁻¹]

p_{O_2} ... Sauerstoffpartialdruck [bar]

Generell können sich die Messergebnisse der einzelnen Methoden zur $k_L a$ -Bestimmung je nach Betriebspunkt des Rührreaktors stark unterscheiden, so dass eine sorgfältige Evaluation der erhaltenen Messergebnisse vorgenommen werden muss (Linek *et al.* 1987). So kann es bei Begasung mit Luft bei hohen Leistungseinträgen zu einer vielfachen Unterschätzung des

$k_L a$ durch den sogenannten *small bubble* Effekt kommen (Linek *et al.* 1991). Bei hohen maximalen lokalen Energiedissipationen (siehe auch Kapitel 3.1.4) entstehen sehr kleine Blasen, die eine hohe Verweilzeit im Reaktor haben und durch ihr großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis schnell das Diffusionsgleichgewicht erreichen. Damit tragen diese Gasblasen nicht mehr zur Aufsättigung des Mediums mit Sauerstoff bei, sondern fungieren als Sauerstoffsinken. Dieses Verhalten muss bei der Auswertung der Messdaten berücksichtigt werden.

3.1.4 Maximale lokale Energiedissipation

Die durch das Rührorgan in das Reaktorvolumen eingetragene Leistung ist nicht homogen über den Reaktorquerschnitt verteilt, sondern unterliegt starken lokalen Schwankungen. Dies führt zu unterschiedlichen lokalen Kräften. Die Kenntnis dieser Kräfte ist vor allem für Dispergiervorgänge, bei denen große lokale Kräfte erwünscht sind und für Partikelzerstörungsprozesse, die vor allem in der Biotechnologie unerwünscht sind, von großer Bedeutung (Henzler 2000). Weiterhin können lokale Kräfte bei der Kultivierung von morphologisch veränderlichen Mikroorganismen einen Einfluss auf die Wachstumsmorphologie und folglich auch auf die Produktivität haben (Smith *et al.* 1990, Jüsten *et al.* 1996, Cui *et al.* 1997).

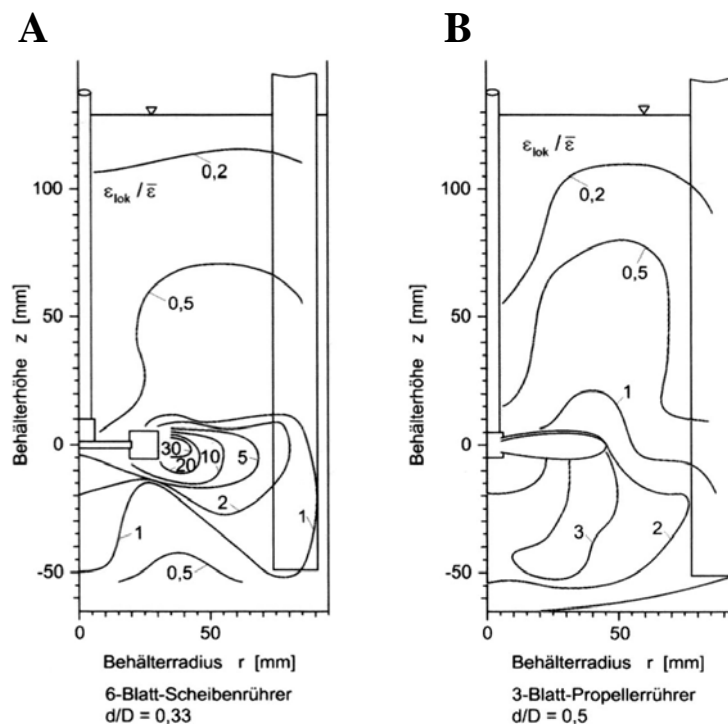


Abb. 3.5: Isoenergetische Linien eines 6-Blatt-Scheibenrührers (A) und eines 3-Blatt-Propellerrührers (B) im turbulenten Bereich (Kraume 2003).

Der entscheidende verfahrenstechnische Parameter zur Beschreibung hydrodynamischer Beanspruchung in Rührreaktoren ist nach Hinze (1955), sowie Zhou und Kresta (1996) die maximale lokale Energiedissipation ε_{max} . In Rührreaktoren lässt sich ε_{max} nach Liepe *et al.* (1988) wie folgt berechnen:

$$\varepsilon_{max} = \frac{c_D \cdot u_{tip}^3}{h} \quad (20)$$

c_D ... Dissipationsbeiwert = 0,1 [-]

h ... Länge des Turbulenzerzeugers senkrecht zur Hauptströmungsrichtung (für 6-Blatt-Scheibenrührer: Höhe des Rührerblatts) [m]

wobei sich die Rührerumfangsgeschwindigkeit u_{tip} wie folgt ergibt:

$$u_{tip} = d \cdot \pi \cdot n \quad (21)$$

d ... Rührerdurchmesser [m]

n ... Rührerdrehzahl [min^{-1}]

Abbildung 3.5 zeigt die Verteilung der lokalen Energiedissipation, in dimensionsloser Form auf ε_{\emptyset} (Gleichung 3) normiert, beispielhaft für einen 6-Blatt-Scheibenrührer und einen 3-Blatt-Propellerrührer. Es ist zu erkennen, dass die Bereiche mit höchster lokaler Energiedissipation in Rührernähe liegen, während in rührerfernen Gebieten deutlich geringere Energiedissipationen vorliegen. Weiterhin zeigt die Abbildung, dass je nach Rührertyp starke Unterschiede bezüglich der Energiedissipationen auftreten. Für Rührreaktoren mit 6-Blatt-Scheibenrührern liegt das Verhältnis $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\emptyset}$ zwischen 10 und 30 (Liepe *et al.* 1988, Kresta 1998, Kraume 2003).

Das Verhältnis $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\emptyset}$ ist dabei sowohl von der Rührergeometrie, als auch von der Einbaugeometrie abhängig. Generell tragen großflächige Rührer die Leistung gleichmäßiger in das Reaktionsmedium ein. Weiterhin ist bei Rührorganen, die ein großes Verhältnis von Rührerdurchmesser zu Reaktordurchmesser (d/D) haben, das Verhältnis $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\emptyset}$ kleiner (Henzler 2000).

Messmethoden

Die direkte Messung der maximalen lokalen Energiedissipation ist sehr schwierig und technisch aufwendig. Nur wenige Arbeiten über direkte Strömungsmessungen mit photographischen Techniken (Cutter 1966), Laser-Doppler-Anemometrie (LDA; Wu und Patterson, Zhou und Kresta 1998) oder *Particle Image Velocimetry* (PIV; Sheng *et al.* 2000) sind bisher aus der Literatur bekannt. Häufig werden deshalb Modellsysteme eingesetzt, von denen die wichtigsten nachfolgend kurz erläutert werden:

Flüssig/flüssig Dispersionsysteme

Bei diesem Modellsystem werden zwei nicht miteinander mischbare Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Wasser/Öl-Systeme oder Wasser/Lösungsmittel-Systeme, eingesetzt. Je nach Größe der im Reaktorsystem auftretenden Kräfte stellt sich nach einer bestimmten Zeit ein charakteristischer maximaler Tropfendurchmesser ein, der beispielsweise durch laseroptische Verfahren gemessen werden kann. Die bei unterschiedlichen Betriebsbedingungen gemessenen maximalen Tropfendurchmesser erlauben demzufolge einen Rückschluss auf die auftretenden maximalen lokalen Energiedissipationen. Eine wichtige Voraussetzung der flüssig/flüssig Messsysteme ist, dass deren Koaleszenz möglichst effektiv verhindert wird (zum Beispiel durch Zugabe eines Emulgators), um Messfehler zu vermeiden.

Ton/Polymer-Flockensystem

Das erstmals von Hoffmann *et al.* (1992) publizierte Ton/Polymer-Flockensystem besteht aus einer Suspension des Tonminerals Blauton, das mittels eines kationischen Polymers zur Flockenbildung gebracht wird. Die gebildeten Blautonflocken werden durch die im Reaktorsystem auftretenden Kräfte zerkleinert, bis sich ein charakteristischer Enddurchmesser einstellt. Der jeweilige Enddurchmesser kann zum Beispiel durch laseroptische Verfahren bestimmt werden. Ein wesentlicher Vorteil des beschriebenen Blautonflockensystems ist dabei, dass es im Gegensatz zu anderen Stoffsystemen nur zu einer vernachlässigbar geringen Reagglomeration der Flocken kommt (Biedermann und Henzler 1994). Weiterhin haben sowohl der pH, die Temperatur sowie die Ionenstärke des Mediums kaum Einfluss auf das System und ermöglichen somit eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen (Hoffmann *et al.* 1995). Da es sich bei der

Blautonflockensuspension um kein monodisperses System handelt, ergibt jede Messung eine Partikelgrößenverteilung. Als charakteristischer Partikeldurchmesser des Zerkleinerungsprozesses wird deshalb der Medianwert der Volumensummenverteilung ($d_{50,3}$) herangezogen.

Henzler und Biedermann (1996) untersuchten zahlreiche Rührorgane, Einbaugeometrien und verschiedene Reaktoren mithilfe des Blautonflockensystems und zeigten dessen Nutzbarkeit zur Charakterisierung von Rührreaktoren.

Immobilisierte Enzyme

Durch Aktivitätsmessung von auf einer Matrix immobilisierten Enzymen kann ebenfalls auf die maximale lokale Energiedissipation geschlossen werden (Henzler and Biedermann 1996). Die immobilisierten Enzyme (zum Beispiel Acylase auf Ionentauscherharz) werden in den zu untersuchenden Reaktor eingebracht. Je nach Betriebsbedingung lösen sich unterschiedlich viele Bruchstücke aus der immobilisierenden Substanz, die dann keine Aktivität besitzen. Die gemessene Restaktivität der Enzyme ermöglicht folglich Rückschlüsse auf die im Reaktorsystem auftretenden Kräfte. Nachteilig bei dieser Methode ist, dass die Enzymaktivität neben der hydrodynamischen Beanspruchung von einer Vielzahl weiterer Parameter wie beispielsweise pH oder Temperatur abhängig ist, die während des Versuches reproduzierbar eingestellt und kontrolliert werden müssen.

3.1.5 Verhalten bei viskosen Fluiden

Bei der Kultivierung einiger Mikroorganismen kommt es zu einer starken Erhöhung der Viskosität des Kulturmediums. Grund dafür sind entweder entstehende Stoffwechselprodukte (zum Beispiel Pullulan, Xanthan), oder die Mikroorganismen selbst (zum Beispiel Actinomyceten und Pilze; siehe auch Kapitel 3.3.4). Dadurch kommt es insbesondere zu Veränderungen der Hydrodynamik, des gas/flüssig-Stofftransports und des Leistungseintrags, die im Folgenden betrachtet werden sollen.

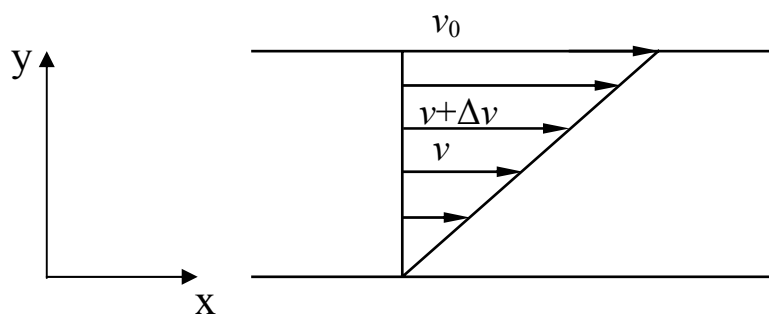


Abb. 3.6: Scherbeanspruchung einer Flüssigkeit zwischen zwei planparallelen sich gegeneinander bewegendem Platten.

Rheologie von Flüssigkeiten

Werden zwei planparallele Platten, zwischen denen sich eine Flüssigkeit befindet, mit der konstanten Geschwindigkeit v_0 gegeneinander bewegt, stellt sich im stationären Zustand aufgrund der inneren Kräfte in der Flüssigkeit ein lineares Geschwindigkeitsprofil ein (Abb. 3.6). Laut dem Newton'schen Reibungsgesetz (1723) ist die zur Bewegung der Platten notwendige Kraft pro Flächeneinheit τ (Schubspannung) proportional zu der Geschwindigkeitsänderung senkrecht zur Verschiebungsrichtung und es folgt:

$$\tau = \eta \cdot \frac{dv}{dy} \quad (22)$$

Der in Gleichung 22 angegebene Proportionalitätsfaktor η wird auch dynamische Viskosität genannt. Der Geschwindigkeitsgradient dv/dy wird als Schergeschwindigkeit γ bezeichnet. Gilt die Beziehung:

$$\tau = \eta \cdot \gamma = \text{const.} \quad (23)$$

dann liegt ein sogenanntes Newton'sches Fluid vor, bei dem die Viskosität eine Stoffkonstante ist, die im Wesentlichen nur von der Temperatur abhängt.

Flüssigkeiten bei denen die Viskosität von der Schergeschwindigkeit abhängt bezeichnet man demnach als nicht-Newton'sche Fluide (Abb. 3.7). Dieses Verhalten tritt beispielsweise bei Polymerlösungen, Suspensionen elastischer Partikel und bei vielen Biosuspensionen auf. Es werden drei Stoffklassen unterschieden:

- 1) *Bingham'sche Fluide*, die eine Fließgrenze τ_0 aufweisen ab, der das Fluid zu fließen beginnt (zum Beispiel Pasten)
- 2) *dilatante Fluide*, bei denen die Viskosität mit zunehmender Schergeschwindigkeit steigt (zum Beispiel Treibsand, Stärkelösungen)
- 3) *strukturviskose Fluide*, deren Viskosität mit zunehmender Schergeschwindigkeit sinkt (zum Beispiel Polymerlösungen)

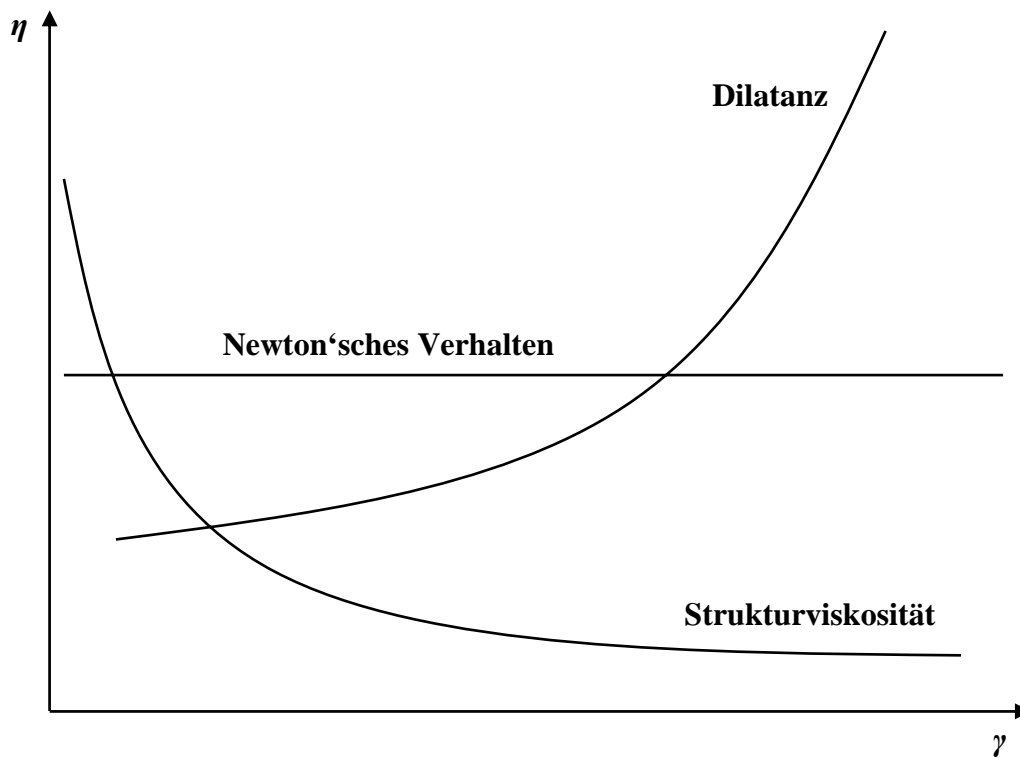


Abb. 3.7: Prinzipielles rheologisches Verhalten verschiedener Fluide.

Biosuspensionen sind in der Regel strukturviskose Fluide. Deren rheologische Verhalten lässt sich mathematisch nach Henzler (2007) am besten mit einem modifizierten Carreau-Ansatz beschreiben:

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{\sqrt{1 + \left[\frac{\gamma^{1/(1-m)}}{K/\eta_0} \right]^2}} + \eta_\infty \quad (24)$$

- K ... Konsistenzindex [mPa s^m]
 m ... Fließindex [-]
 γ ... Schergeschwindigkeit [s⁻¹]
 η_0 ... Viskosität bei $\gamma \rightarrow 0$ [mPa s]
 η_∞ ... Viskosität bei $\gamma \rightarrow \infty$ [mPa s]

Da in der Praxis die Bereiche für $\gamma \rightarrow 0$ und $\gamma \rightarrow \infty$ nicht relevant und messtechnisch schwer erfassbar sind, lassen sich für die meisten Prozesse strukturviskose Fluide gut mit dem Ostwald-de-Waele Gesetz beschreiben:

$$\eta = K \cdot \gamma^{m-1} \quad (25)$$

Des Weiteren gibt es Flüssigkeiten, bei denen die Viskosität zusätzlich noch ein zeitliches und elastisches Verhalten aufweist, die hier jedoch nicht weiter betrachtet werden.

Leistungseintrag und Hydrodynamik viskoser Fluide

Je höher die Viskosität der zu rührenden Flüssigkeit ist, desto mehr Leistung muss eingetragen werden, um die Rührerdrehzahl konstant zu halten (Abb. 3.8). Beim Rühren Newton'scher Flüssigkeiten bleibt die in Kapitel 3.1.2 beschriebene Leistungscharakteristik erhalten und der Einfluss der Viskosität äußert sich durch eine deutliche Abnahme der *Re*-Zahl (Gleichung 4). Dadurch muss bei höher viskosen Fluiden eine entsprechend hohe Rührerdrehzahl vorliegen, um Prozesse weiterhin im turbulenten Bereich zu betreiben.

Bei nicht-Newton'schen strukturviskosen Fluiden ist der in Abbildung 3.8 schematisch aufgezeigte Verlauf des Leistungseintrags über die Rührerdrehzahl zu beobachten. Bei niedrigen Rührerdrehzahlen und folglich niedrigen Schergeschwindigkeiten, liegt eine vergleichsweise hohe Viskosität der Flüssigkeit vor und mehr Leistung muss eingetragen werden. Mit der Erhöhung der Rührerdrehzahl sinkt die Viskosität immer stärker, weswegen ein geringerer Leistungseintrag zum Rühren erforderlich ist. Die dimensionslose Leistungscharakteristik strukturviskoser Fluide wird meist mit Hilfe einer effektiven Reynolds-Zahl (Re_{eff}) gebildet, die sich wie folgt berechnet:

$$Re_{eff} = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta_{eff}} \quad (26)$$

- d ... Rührerdurchmesser [m]
 n ... Rührerdrehzahl [min⁻¹]

η_{eff} ... effektive Viskosität [Pa s]

ρ ... Dichte [kg m^{-3}]

Die zur Berechnung notwendige effektive Viskosität η_{eff} wird dabei mittels einer für die jeweiligen Betriebsbedingungen spezifischen effektiven Schergeschwindigkeit gebildet, auf deren Bestimmung in Kapitel 3.1.6 näher eingegangen wird. Allgemein wurden bei experimentell ermittelten Leistungscharakteristiken strukturviskoser Fluide Abweichungen vom Newton'schen Kennlinienverlauf beobachtet. Jedoch variieren die Aussagen je nach Literaturquelle, so dass derzeit keine allgemeingültigen Gesetze verfügbar sind (Kraume 2003). Mathematische Ansätze zur Berechnung des Leistungseintrags in nicht-Newton'sche Fluide existieren nur rein empirisch und mit meist engen Gültigkeitsbereichen, so dass diese nicht universell zur Auslegung verwendbar sind.

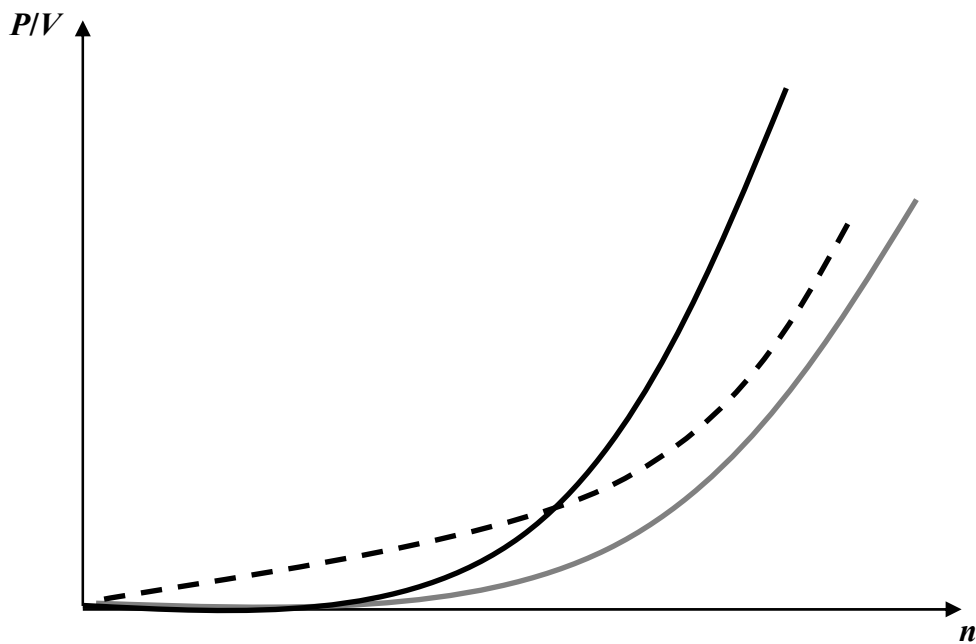


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des volumenspezifischen Leistungseintrags beim Rühren Newton'scher Fluide mit niedriger (graue Linie) und erhöhter Viskosität (schwarze Linie) im Vergleich zu einem nicht-Newton'schen strukturviskosen Fluid (schwarze gestrichelte Linie).

Sauerstoffeintrag in viskose Fluide

Mit zunehmender Viskosität der Flüssigkeit verringert sich der gas/flüssig-Stofftransport, da sich sowohl der Stoffübergangskoeffizient k_L , als auch die spezifische Phasengrenzfläche a verkleinern. Die Verringerung von k_L folgt dabei hauptsächlich aus einer starken Abnahme des Diffusionskoeffizienten D bei viskosen Fluiden (Henzler 1980). Die spezifische Phasengrenzfläche a nimmt vor allen Dingen durch die verschlechterten

Dispergiereigenschaften der Rührorgane bei viskosen Medien ab, so dass mehr Gasblasen mit großem Durchmesser vorliegen.

Bei nicht-Newton'schen strukturviskosen Fluiden kommt es zu einer ungleichen Verteilung der Viskosität über den Reaktorquerschnitt. In Zonen mit erhöhter Schergeschwindigkeit, meist in Rührernähe, liegt eine niedrigere Viskosität als in rührerfernen Zonen vor. Dadurch entstehen innerhalb des Reaktors Gebiete mit stark unterschiedlichen Sauerstoffeinträgen. Eine genaue Betrachtung der räumlichen Unterschiede ist experimentell kaum möglich, so dass eine globale Beschreibung des Sauerstoffübergangs über das gesamte Reaktorvolumen erfolgt.

Zur einfachen mathematischen Beschreibung des $k_L a$ in viskosen Fluiden ermittelten Ryu und Humphrey (1972) eine Erweiterung von Gleichung 12 unter zusätzlicher Einbeziehung der Viskosität η :

$$k_L a = C_2 \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{\alpha_2} \cdot u_G^{\beta_2} \cdot \eta^{\gamma_2} \quad (27)$$

P/V	... volumenspezifischer Leistungseintrag [W L^{-1}]
u_G	... Gasleerrohrgeschwindigkeit [m s^{-1}]
η	... dynamische Viskosität [mPa s]
C_2	... empirische Konstante [$\text{W}^{-\alpha_2} \text{L}^{\alpha_2} \text{m}^{-\beta_2} \text{s}^{\beta_2 - \gamma_2 - 1} \text{Pa}^{-\gamma_2}$]
$\alpha_2, \beta_2, \gamma_2$... empirische Konstanten [-]

Garcia-Ochoa und Gomez (1998) zeigten, dass Gleichung 27 zur Beschreibung zahlreicher Newton'scher und nicht-Newton'scher Fluide verwendet werden kann, wobei bei nicht-Newtonschen Fluiden wiederum die effektive Viskosität η_{eff} zur Auslegung genutzt wird (siehe auch Kapitel 3.1.6).

3.1.6 Effektive Schergeschwindigkeit

Bei Prozessen, in denen die Reaktionsflüssigkeit ein nicht-Newton'sches strukturviskoses Verhalten aufweist, wird zur Auslegung der Reaktoren und für Maßstabsübertragungen jeder Rührerdrehzahl im Reaktor eine effektive Schergeschwindigkeit γ_{eff} zugeordnet. Bei bekanntem rheologischen Verhalten der Flüssigkeit kann dann über Gleichung 25 die effektive Viskosität η_{eff} für jeden Betriebspunkt ermittelt werden.

Für die Berechnung der effektiven Schergeschwindigkeit sind in der Literatur zahlreiche, meist empirische Korrelationen zu finden, die sich teilweise stark voneinander unterscheiden. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Konzepte.

Tab. 3.1: Übersicht über die wichtigsten Konzepte zur Berechnung der effektiven Schergeschwindigkeit γ_{eff} in Rührreaktoren.

Literaturquelle	Berechnungsformel
Bowen (1986)	$\gamma_{eff} = 4,2 \cdot n \cdot \left(\frac{d}{D}\right)^{0,3} \cdot \frac{d}{h} \quad (28)$
Calderbank und Moo-Young (1959)	$\gamma_{eff} = k \cdot \left(\frac{4 \cdot m}{3 \cdot m + 1}\right)^{m/(m-1)} \cdot n \quad (29)$
Henzler und Kauling (1985)	$\gamma_{eff} = L^{2/(1+m)} \cdot \left[\frac{P/V}{K}\right]^{1/(1+m)} \quad (30)$
Kelly und Gigas (2003)	$\gamma_{eff} = 33,3 \cdot n \quad (31)$
Metzner und Otto (1957)	$\gamma_{eff} = k \cdot n \quad (32)$
Perez <i>et al.</i> (2006)	$\gamma_{eff} = 33,1 \cdot n^{1,4} \quad (33)$

D ... Reaktordurchmesser [m]

d ... Rührerdurchmesser [m]

h ... Höhe des Rührerblatts [m]

k ... empirische Konstante [-]

K ... Konsistenzindex [mPa s^m]

L ... Anpassungsparameter [-]

m ... Fließindex [-]

n ... Rührerdrehzahl [min⁻¹]

P/V ... volumenspezifischer Leistungseintrag [W L⁻¹]

Die Konzepte von Metzner und Otto (1957, Gleichung 32), sowie Calderbank und Moo-Young (1959, Gleichung 29) wurden ursprünglich nur für den laminaren Strömungsbereich ermittelt. Trotzdem wird in vielen Arbeiten weiterhin vor allem das Konzept nach Metzner und Otto (1957) verwendet, wobei nach Ducla *et al.* (1983) $k = 11,5$ für Scheibenrührer ist. Mehrere Autoren konnten jedoch zeigen, dass unter Anwendung dieses Konzepts die effektive Schergeschwindigkeit im turbulenten Strömungsbereich stark unterschätzt wird (Kelly und Gigas 2003, Perez *et al.* 2006, Henzler 2007, Campesi *et al.* 2009).

Die Konzepte nach Kelly und Gigas (2003, Gleichung 31) und Perez *et al.* (2006, Gleichung 33) liefern demnach realistischere Schergeschwindigkeiten, da in den Arbeiten auch der turbulente Strömungsbereich mittels *Computational Fluid Dynamics* (CFD) beziehungsweise theoretischer Herleitungen betrachtet wurde. Henzler und Kauling (1985) leiteten durch Dimensionsanalyse Gleichung 30 für die effektive Schergeschwindigkeit ab, die den Leistungseintrag anstatt der Rührerdrehzahl beinhaltet und deswegen auch als „Leistungskonzept“ bezeichnet wird. Für das Konzept nach Bowen (1986, Gleichung 28) liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor.

Alternativ zu den in Tabelle 3.1 angegebenen Konzepten wurde von Cerri *et al.* (2008), Campesi *et al.* (2009) und Thomasi *et al.* (2010) eine neue Methode zur experimentellen Bestimmung der effektiven Schergeschwindigkeiten anhand von k_{La} -Messungen in unterschiedlich viskosen Fluiden gezeigt. Die Methode geht davon aus, dass bei höheren k_{La} eine größere gas/flüssig-Phasengrenzfläche durch kleinere Gasblasen vorliegt, aus der folglich auf die Schergeschwindigkeit geschlossen werden kann.

3.2 Parallele Bioreaktorsysteme

Die Miniaturisierung und Parallelisierung von Bioreaktoren zur Bioprozessentwicklung ist von großem Interesse, da die Anzahl biotechnologischer Reaktionen stark angestiegen ist. Neben der Möglichkeit, eine möglichst hohe Anzahl paralleler Versuche durchführen zu können, ist die Skalierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse in Reaktoren des Pilot- und Produktionsmaßstabs dabei ein wesentliches Kriterium. Die drei wichtigsten Gruppen an verfügbaren Parallelsystemen lassen sich in geschüttelte Systeme, Blasensäulen und gerührte Systeme unterscheiden, deren wichtigste Entwicklungen, sowie Vor- und Nachteile nachfolgend erläutert werden sollen.

3.2.1 Geschüttelte Systeme

Geschüttelte Systeme, wie Schüttelkolben und Mikrotiterplatten (MTPs), sind immer noch die am häufigsten verwendeten Reaktoren, wenn es um die Untersuchung einer Vielzahl verschiedener Stämme oder Versuchsbedingungen geht (Büchs 2001). Dabei wird die Flüssigkeit durch Rotation des Reaktionsgefäßes ebenfalls in eine Rotationsbewegung gezwungen, wodurch eine Durchmischung des Reaktionsmediums erreicht wird. Der Sauerstoffeintrag in geschüttelten Systemen erfolgt über reine Oberflächenbegasung. Ein Vorteil ist die einfache Handhabung und vor allem bei MTPs, der hohe Parallelisierungsgrad der Experimente.

Ein wesentlicher Nachteil der geschüttelten Systeme ist dabei, dass sie sich verfahrenstechnisch von Rührreaktoren unterscheiden und damit die erhaltenen Ergebnisse nur eingeschränkt skalierbar sind. Weiterhin können standardmäßig in geschüttelten Systemen wichtige Parameter wie der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und der pH nicht *online* erfasst werden. Das Fehlen der Möglichkeit, automatisch Zudosierungen zu realisieren, limitiert die durchführbaren Experimente auf einfache, unkontrollierte Satzverfahren.

Um diese reaktionstechnischen Limitationen zu umgehen, wurden verschiedene Lösungen zur *online* Erfassung sowohl des pO_2 und pH mit Hilfe optischer Sensoren (Wittmann *et al.* 2003, Schneider *et al.* 2009), als auch der OTR und der *Carbon Transfer Rate* (CTR) mittels spezieller Messapparaturen (Anderlei *et al.* 2004, Brethauer *et al.* 2007, Guez *et al.* 2008) für Schüttelkolben publiziert. Optische Sensoren für pO_2 und pH (John *et al.* 2003, Kensy *et al.* 2005), sowie zur Messung der optischen Dichte (OD) (Samorski *et al.* 2005) sind ebenfalls für MTPs verfügbar.

Eine vollkommen neue Geometrie der Kavitäten in MTPs wurde von Funke *et al.* (2009) vorgestellt. Die sogenannte „*Flower Plate*“ hat dabei am Rand der Kavitäten Strömungsbrechern ähnliche Einkerbungen, die den gas/flüssig Stoffaustausch stark erhöhen. Ein erstes Gerät zum Betrieb von MTPs mit der Möglichkeit zur Erfassung von pO_2 , pH und OD wurde von Kensy *et al.* (2009) vorgestellt. Die Kombination mit einem Pipettierroboter ermöglicht dabei zusätzlich automatisierte Zugaben von zum Beispiel Induktionsmittel (Huber *et al.* 2009).

Lösungen zur fehlenden Zudosierungen von Substraten beziehungsweise zur Kontrolle des pH wurden von Weuster-Botz *et al.* (2001a) durch ein Pumpen-/Ventilsystem für Schüttelkolben und von Buchenauer *et al.* (2009) und Funke *et al.* (2010a,b), durch die Entwicklung einer Mikrodosiertechnik für MTPs, vorgestellt. Alternativ dazu wurden sowohl auf Diffusion aus einem Polymer (Jeude *et al.* 2006), als auch enzymatischer Stoffwandlung (Panula-Perälä *et al.* 2008) basierende Freisetzungssysteme entwickelt.

3.2.2 Blasensäulen

Bei Blasensäulen erfolgt der Leistungseintrag allein durch einen am Boden des Reaktors eingebrachten Gasvolumenstrom. Zur Verteilung und Zerkleinerung der Gasblasen geschieht dies meist über eine Sinterglasfritte oder eine perforierte Platte. Dadurch sind ohne großen apparativen Aufwand vergleichsweise hohe k_La erreichbar (Weuster-Botz 2005).

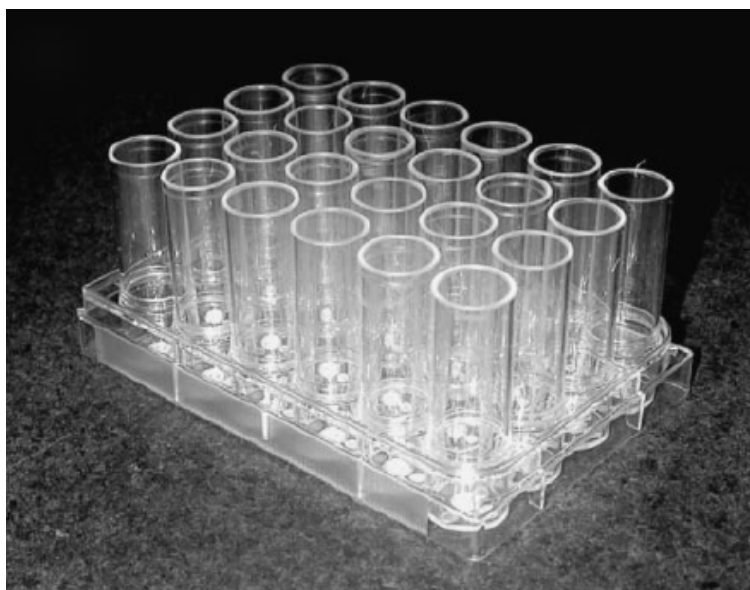


Abb. 3.9: Photo der parallelen Blasensäulen nach Tang *et al.* (2006).

Ein paralleles Blasensäulensystem aus 24 Milliliter-Reaktoren (mit jeweils 10 mL Füllvolumen) mit der *online* Messung von pO₂ und pH über optische Sensoren, sowie der Möglichkeit, über Ammoniak oder CO₂ den pH zu regeln, wurde von Tang *et al.* (2006) und Isett *et al.* (2007) vorgestellt (siehe Abb. 3.9). Zur besseren Durchmischung kann das System zusätzlich noch mit bis zu 500 min⁻¹ geschüttelt werden.

Andere Arbeitsgruppen entwickelten Blasensäulen mit 8 (Frachon *et al.* 2006), 12 (Doig *et al.* 2005) beziehungsweise 16 parallelen Reaktoren (Altenbach-Rehm *et al.* 1999, Weuster-Botz *et al.* 2001b, Havel *et al.* 2008). Eine Besonderheit stellt die gerührte Blasensäule von Weuster-Botz *et al.* (2002) dar, die durch ein zusätzlich eingebautes Rührorgan eine Steigerung des k_La auf $> 0,3 \text{ s}^{-1}$ erreicht.

Ein Nachteil an Blasensäulen ist, dass sie sich verfahrenstechnisch von Rührreaktoren vor allem bezüglich des Leistungseintrags und der Energiedissipation unterscheiden und die erhaltenen Ergebnisse somit nur eingeschränkt skalierbar sind (siehe auch Kapitel 3.2.4).

3.2.3 Gerührte Systeme

Parallele Rührreaktoren im Milliliter-Maßstab sind ein effizientes Mittel zur „Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung“, da sie verfahrenstechnisch vergleichbare Eigenschaften wie Rührreaktoren im Labor- und Pilotmaßstab haben (Hortsch und Weuster-Botz 2010b, Marques *et al.* 2010). Aus diesem Grund ist meist eine bessere Skalierbarkeit von Ergebnissen aus dem Milliliter-Maßstab in den Liter-Maßstab gegeben. Eine Übersicht über die wichtigsten parallelen Rührreaktoren und deren Eigenschaften ist in Tabelle 3.2 angegeben. Es ist zu erkennen, dass sich die einzelnen Reaktorkonzepte bezüglich Arbeitsvolumen, Parallelisierungsgrad und vor allem bezüglich des erreichbaren Sauerstoffeintrags unterscheiden.

Die bisher publizierten parallelen Milliliter-Rührreaktorsysteme lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen:

- 1) miniaturisierte Rührreaktoren, die geometrisch ähnlich zu Rührreaktoren des Labor- und Produktionsmaßstabs sind
- 2) neue Reaktorkonzepte, die speziell für den Milliliter-Maßstab entwickelt wurden.

Tab. 3.2: Übersicht über die wichtigsten parallelen Milliliter-Rührreaktoren und deren Eigenschaften.

Reaktor	Literatur- quelle	Arbeits- volumen [mL]	Rührertyp	$k_L a_{max}$ [s ⁻¹]	Anzahl paralleler Reaktoren	BTM _{max} [g L ⁻¹]	publizierte Anwendungen
Bioreaktorblock	Puskeiler <i>et al.</i> 2005a, Weuster-Botz <i>et al.</i> 2005	8-14	magnetisch angetriebenes Gas- induzierendes Rührorgan	> 0,4	48	36,9 ^a	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. necator</i>
Cellstation	Kostov <i>et al.</i> 2001, Harms <i>et al.</i> 2006	35	Rührer mit Motorantrieb	0,1	12-24	~ 3	<i>E. coli</i>
Mikro-Bioreaktor	van Leeuwen <i>et al.</i> 2010	0,1	magnetisch angetriebener Rührfisch	N/A	2	~ 6	<i>C. utilis</i>
Miniaturisierter Rührreaktor	Lamping <i>et al.</i> 2003, Betts <i>et al.</i> 2006	7	drei 6-Blatt- Scheibenrührer mit Motorantrieb	0,13	1	4	<i>E. coli</i>
Miniatur- bioreaktorsystem	Gill <i>et al.</i> 2008a	100	magnetisch angetriebener 6-Blatt- Scheibenrührer	0,11	16	9 ^b	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
Mikroliter- Bioreaktor	Szita <i>et al.</i> 2005, Zhang <i>et al.</i> 2006	0,15	Magnetrührer	0,02	8	~ 3 ^a	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>

^a Daten auf *E. coli* bezogen^b Daten auf *B. subtilis* bezogen

Zur ersten Gruppe gehören im Wesentlichen die Arbeiten von Lamping *et al.* (2003), Betts *et al.* (2006) und Gill *et al.* (2008a). Diese Reaktoren sind, analog zu Reaktoren im Liter-Maßstab, meist mit entsprechend miniaturisierten Begasungseinrichtungen und Rührorganen ausgestattet.

Die *online* Erfassung von pO₂, pH und teilweise auch OD erfolgt meist über in den Reaktordeckel oder –boden eingebaute miniaturisierte optische Sonden. Ein Vorteil dieser Reaktoren ist, dass für die Skalierung von Prozessen bekannte geometrische Parameter (zum Beispiel *H/D*- oder *d/D*-Verhältnis) oder Prozesskenngrößen (zum Beispiel Begasungsrate) konstant gehalten werden können. Weiterhin liegen ähnliche hydrodynamische Verhältnisse wie im Liter-Maßstab in den Reaktoren vor.

Ein wesentlicher Nachteil der beschriebenen Reaktoren ist die Schwierigkeit, diese hochgradig zu parallelisieren. Der Grund dafür ist, dass bisher keine einfache technische Lösung gefunden wurde, Gasvolumenströme im mL min⁻¹ Bereich zu dosieren, oder auch Zugaben von Substrat und Titrationsmitteln ohne erheblichen apparativen Aufwand zu realisieren. Weiterhin ist sowohl die Verbindung der notwendigen Kabel und Schläuche, als auch die nachfolgende Reinigung ab einem höheren Parallelisierungsgrad nur noch schwer durchführbar.

Um die erwähnten Probleme vor allem bezüglich des apparativen Aufwands und des Parallelisierungsgrades zu beheben, wurden neue Reaktorkonzepte für den Milliliter-Maßstab entwickelt. Harms *et al.* (2006) publizierten ein System, bei dem 12 bis 24 Reaktoren kreisförmig angeordnet sind und mit dem sequenziell automatisierte Probenahmen durchführbar sind. Optische Sensoren am Boden der Reaktoren ermöglichen es *online* pO₂, pH und Fluoreszenz zu erfassen (Kostov *et al.* 2001). Der Sauerstoffeintrag des Systems erfolgt durch Oberflächenbegasung. Die Möglichkeit automatisierte Zulaufprozesse und Zugaben von pH-Titrationsmittel zu realisieren, ist bisher für dieses System nicht bekannt.

Eine weitere Miniaturisierung von Rührreaktoren auf nur 0,15 mL Arbeitsvolumen wurde von Szita *et al.* (2005) und Zhang *et al.* (2006) vorgenommen. Das System nutzt einen Magnetrührer, der zur Homogenisierung des Mediums eingesetzt wird. Sauerstoff wird dabei durch Oberflächenbegasung über eine gaspermeable Membran eingetragen (Zanzotto *et al.* 2004) und pO₂, pH und OD können durch optische Sensoren erfasst werden (Zanzotto *et al.* 2006).

Einen auf der Kavität einer MTP beruhenden Bioreaktor mit 0,1 mL Arbeitsvolumen und einem magnetischen Rührer zur Homogenisierung, wurde von van Leeuwen *et al.* (2009) entwickelt. Durch elektrochemischer Sensoren können pO_2 , pH und Biomasse *online* erfasst werden (van Leeuwen *et al.* 2010).

Die beiden letztgenannten Reaktorsysteme ermöglichen zwar durch ihre kleine Abmessung eine gute Parallelisierung, jedoch ist durch das geringe Arbeitsvolumen die zusätzliche Probennahme für beispielsweise HPLC-Analysen stark eingeschränkt. Weiterhin scheint eine automatische Zudosierung von Substraten oder Titrationsmitteln sehr schwierig, da deren Volumina im Nanoliter-Bereich liegen würden.

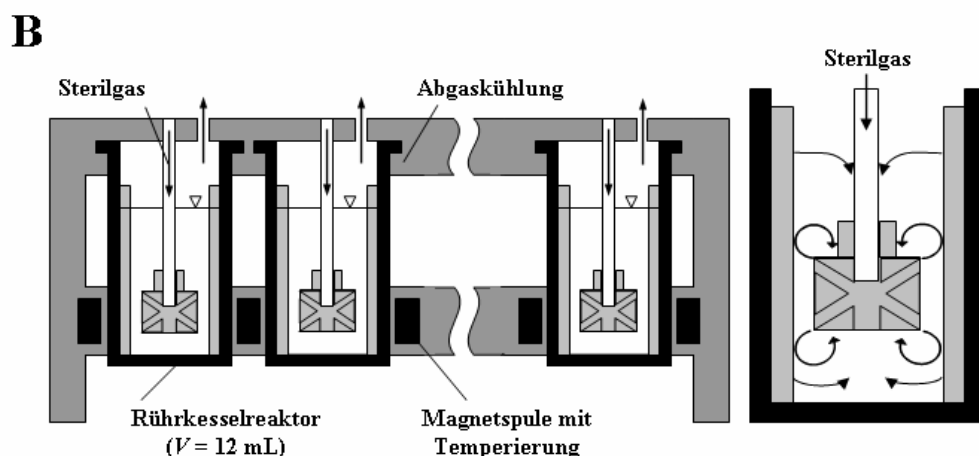
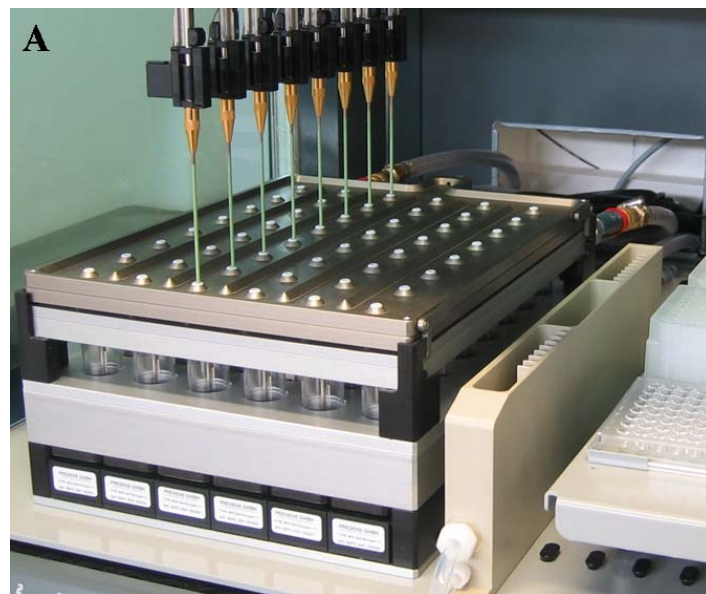


Abb. 3.10: Gerührtes Parallelreaktorsystem im Milliliter-Maßstab nach Puskeiler *et al.* (2005a): Photo des Parallelreaktorsystems mit 48 Rührkesselreaktoren (A) und schematischer Aufbau der Milliliter-Reaktoren (B).

Bioreaktorblock

Ein vollkommen neuer Ansatz war die Entwicklung eines „Bioreaktorblocks“ (siehe Abb. 3.10) zum parallelen Betrieb von 48 Rührreaktoren unter kontrollierten Bedingungen (Puskeiler *et al.* 2005a, Weuster-Botz *et al.* 2005). Die Einwegreaktoren aus Polystyrol haben ein Arbeitsvolumen von 8 bis 14 mL und enthalten vier Strömungsbrecher zur Unterstützung der vollständigen Durchmischung. Jeder Reaktor besitzt einen eigenen Rührer, der von einem magnetisch-induktiven Antriebssystem in Rotation versetzt und über einen Wärmetauscher temperiert wird (siehe Abb. 3.10B). Die sterile Sauerstoffversorgung erfolgt durch Gas-induzierenden Rührorgane, die über Hohlachsen Gas aus dem Kopfraum jedes Reaktors ansaugen und durch Querbohrungen ins Medium dispergieren (siehe Abbildung 3.10B).

Durch die vorliegende zweigeteilte Ringströmung wird eine gleichmäßige Verteilung der angesaugten Gasphase im Reaktionsmedium ermöglicht. Der Sauerstoffeintrag steigt mit der Drehzahl und erreicht im Drehzahlbereich zwischen 2000 und 2800 min^{-1} einen k_{La} von 0,1 bis 0,4 s^{-1} (Puskeiler *et al.* 2005a).

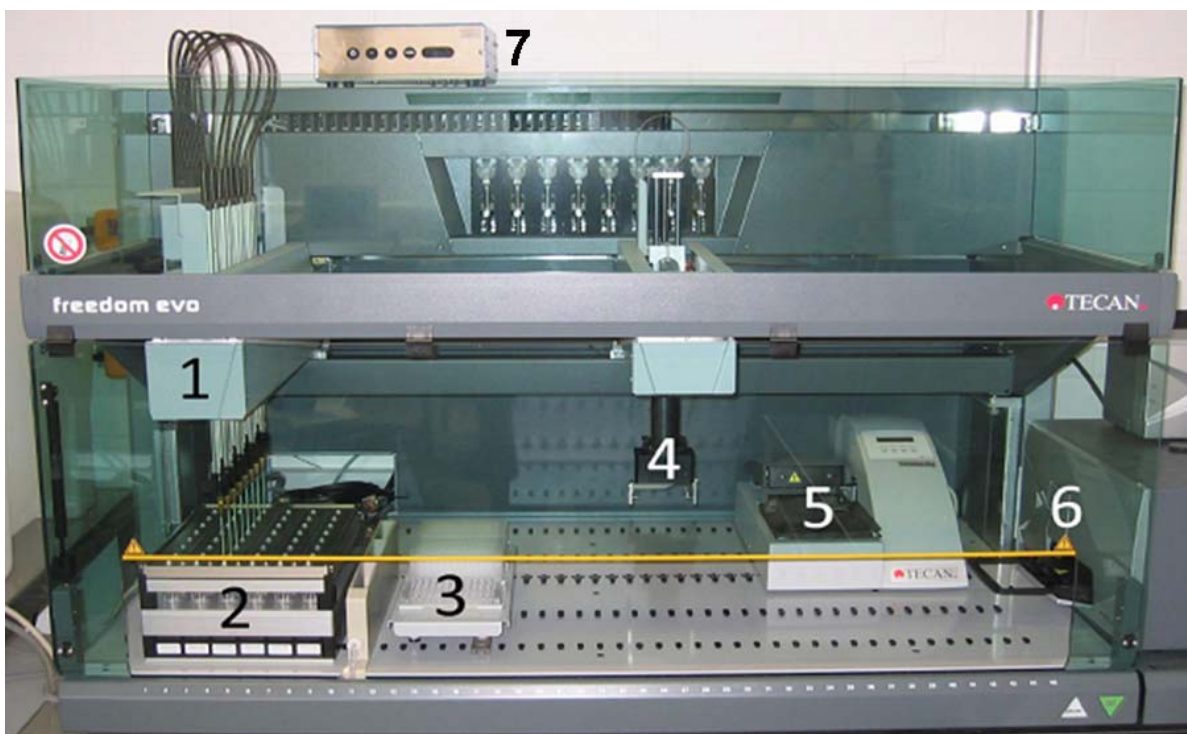


Abb. 3.11: Bioreaktorblock integriert in einen Laborroboter. 1: Pipettierarm, 2: Bioreaktorblock, 3: Vorlagengefäße für Flüssigkeiten, 4: MTP-Greifer, 5: MTP-Washstation, 6: MTP-Lesegerät, 7: Rührersteuerung (modifiziert nach Kusterer 2007).

Zur Prozessüberwachung und -kontrolle ist jeder Reaktor mit zwei immobilisierten chemischen Sensoren für pH und pO_2 am Reaktorboden ausgerüstet, die berührungslos *online* von unter den Reaktoren platzierten optischen Ausleseeinheiten erfasst werden (Kusterer *et al.* 2008). Abbildung 3.11 zeigt die Kombination des Bioreaktorblocks mit einem Laborroboter. Dadurch können automatisierte Zulaufverfahren, sowie die Titration von Base oder Säure zur pH-Regelung für jeden Reaktor individuell realisiert werden. Weiterhin können Probenahmen, sowie eine *at-line* Analyse der Proben auf beispielsweise Biomassekonzentration, fluoreszierende Produkte oder Enzymaktivität automatisiert erfolgen (Knorr *et al.* 2007, Vester *et al.* 2009).

Die Nutzbarkeit des Milliliter-Parallelbioreaktorsystems für die Durchführung von 48 parallelen Reaktionen wurde bisher für die Kultivierung von *Escherichia coli* (Puskeiler *et al.* 2005b, Kusterer *et al.* 2008, Hortsch und Weuster-Botz 2011), *Saccharomyces cerevisiae* (Kusterer *et al.* 2008), *Bacillus subtilis* (Knorr *et al.* 2007, Vester *et al.* 2009) und *Cupriavidus necator* (Höfel *et al.* 2010) nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine hohe parallele Reproduzierbarkeit der Prozessdaten.

3.2.4 Verfahrenstechnische Betrachtung

Für die zuverlässige Skalierung von Prozessen aus parallelisierten Milliliter-Reaktoren in Reaktoren des Labor- und Pilotmaßstabs ist es wichtig, die verfahrenstechnischen Charakteristiken des jeweiligen Systems zu kennen. Im Folgenden wird deshalb eine verfahrenstechnische Betrachtung der in den Kapiteln 3.2.1 bis 3.2.3 beschriebenen Parallelsysteme vorgenommen.

Leistungseintrag

In Rührreaktoren des Labor- und Produktionsmaßstabs mit Scheibenblattrührern werden, je nach Rührerdrehzahl und Reaktorgröße, meist Leistungseinträge von 5 bis 15 W L^{-1} gemessen. Der Leistungseintrag in geschüttelten Systemen ist für die meisten Betriebspunkte geringer als in Rührreaktoren. Für Schüttelkolben ermittelten Büchs *et al.* (2000a) Leistungseinträge bis 4 W L^{-1} für sehr hohe Schüttelfrequenzen von $> 300 \text{ min}^{-1}$. Die Leistungscharakteristik für Schüttelkolben ergibt dabei selbst für hohe *Re*-Zahlen keine konstante *Ne*-Zahl und damit eine andere Hydrodynamik als diese für Rührreaktoren bekannt ist (Büchs *et al.* 2000b, siehe zum Vergleich auch Abb. 3.3).

Für MTPs wurden bisher keine Messdaten zum Leistungseintrag publiziert. Zhang *et al.* (2008), sowie Barrett *et al.* (2010) schätzten aus CFD-Simulationen den Leistungseintrag für MTPs mit 96-Kavitäten und 24-Kavitäten zu maximal $0,1 \text{ W L}^{-1}$ beziehungsweise 1 W L^{-1} ab.

Der Leistungseintrag in miniaturisierten Blasensäulen erfolgt lediglich durch den eingebrachten Gasvolumenstrom und ist damit wesentlich geringer als der in Rührreaktoren oder Schüttelkolben. Messungen von Weuster-Botz *et al.* (2001b) ergaben Werte unter $0,2 \text{ W L}^{-1}$. Durch Einsatz von zusätzlichen Rührorganen in Blasensäulen kann der Leistungseintrag auf mehr als 1 W L^{-1} gesteigert werden (Weuster-Botz *et al.* 2002).

Für gerührte Milliliterreaktoren liegen bisher nur wenige Messwerte für den Leistungseintrag vor. Gill *et al.* (2008b) nutzten einen Drehmomentsensor zur Erfassung des Leistungseintrags. Die erstellte Leistungscharakteristik zeigte den Beginn des turbulenten Bereichs für $Re > 8000$ mit einer Ne -Zahl von 3,5. Dieser Wert liegt in einem zu Standardrührreaktoren vergleichbaren Bereich, der für 6-Blatt-Scheibenrührer bei $Ne = 4 - 5$ liegt (Zlokarnik 2005). Weitere Abschätzungen des Leistungseintrags in gerührten Milliliter-Reaktoren wurden unter Verwendung von CFD von Lamping *et al.* (2003) und Puskeiler *et al.* (2005b) vorgenommen und ergaben vergleichbare Größenordnungen wie in Reaktoren des Labor- und Pilotmaßstabs.

Sauerstoffeintrag

Der maximale Sauerstoffeintrag der verschiedenen Parallelsysteme unterscheidet sich teilweise stark. So sind in MTPs und Schüttelkolben meist $k_{La} < 0,1 \text{ s}^{-1}$ messbar (Marques *et al.* 2010). Neuere Entwicklungen einer MTP mit veränderten Kavitäten erreichen laut Funke *et al.* (2009) k_{La} von ca. $0,16 \text{ s}^{-1}$. Diese Werte liegen dennoch deutlich unter den bei Standardbedingungen in Rührreaktoren erreichten Werten von ca. $0,3 \text{ s}^{-1}$ (Van't Riet 1979, Middleton 1985, siehe auch Kapitel 3.1.3).

Miniaturisierte Blasensäulen erreichen k_{La} von bis zu $0,2 \text{ s}^{-1}$ und tragen damit wesentlich mehr Sauerstoff in das Medium ein als geschüttelte Systeme (Weuster-Botz 2005). Im Falle der gerührten Blasensäule von Weuster-Botz *et al.* (2002) werden sogar $k_{La} > 0,3 \text{ s}^{-1}$ erreicht.

Die Sauerstoffübergangskoeffizienten der verschiedenen Milliliter-Rührreaktoren weichen stark voneinander ab (Tab. 3.2). Die erreichbaren maximalen k_{La} reichen von sehr niedrigen

Werten ($0,02 \text{ s}^{-1}$, Szita *et al.* 2005) bis zu Werten, die höher als in Standardrührreaktoren sind ($> 0,4 \text{ s}^{-1}$, Puskeiler *et al.* 2005a).

Maximale lokale Energiedissipation

Nur wenige Arbeiten zur Messung der maximalen lokalen Energiedissipation in miniaturisierten Systemen sind bisher publiziert. Für MTPs und Blasensäulen sind keine Messwerte verfügbar. Aus den geringen erreichbaren Leistungseinträgen kann jedoch geschlussfolgert werden, dass das Verhältnis $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\emptyset}$ wesentlich geringer als in Rührreaktoren ist (Weuster-Botz 2005).

Für Schüttelkolben bestimmten Peter *et al.* (2006) die maximale lokale Energiedissipation mittels eines flüssig/flüssig Dispersionssystems (siehe auch Kapitel 3.1.4). Das Verhältnis $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\emptyset}$ liegt demnach im Schüttelkolben zwischen 3 und 6 und ist damit deutlich geringer als in Standardrührreaktoren ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\emptyset} = 10 - 30$).

Für Milliliter-Rührreaktoren liegen bisher für keines der Systeme aus Tabelle 3.2 Daten zur maximalen lokalen Energiedissipation vor. Aufgrund der relativ hohen erreichbaren Leistungseinträge und einer vergleichbaren Hydrodynamik kann jedoch von einem ähnlichen Verhalten wie in Standardrührreaktoren ausgegangen werden.

3.3 *Streptomyces tendae*

3.3.1 Morphologie und Wachstum

Die Gattung der Streptomyceten gehört zur Ordnung der Actinomyceten und damit zu den gram-positiven Bakterien. Aufgrund ihres ausgeprägten Sekundärmetabolismus zählen die Streptomyceten zu den größten Produzenten medizinisch relevanter Antibiotika und Antimykotika (Watve *et al.* 2001). Wichtige Beispiele sind Amphotericin B, Nystatin, Streptomycin und Tetracyclin. Neben diesen niedermolekularen Bausteinen werden auch Proteine wie Streptavidin, Migrastatin und mehrere Restriktionsenzyme gebildet. Außerdem werden Streptomyceten vermehrt zur Expression heterologer Proteine eingesetzt (Binnie *et al.* 1997).

Die Spezies *Streptomyces tendae* wurde erstmals 1970 aus Bodenproben der Region Nikko in Japan isoliert (Dähn *et al.* 1976). Wie die meisten Actinomyceten gehört *S. tendae* zu den Sporenbildnern, wobei die Sporen an den Lufthyphen gebildet werden (Schlegel 1992). *S. tendae* kann sowohl als fadenförmiges Mycel, als auch als Pellet wachsen (Abb. 3.12). Die Morphologie ist dabei von zahlreichen Faktoren wie Nährmedienzusammensetzung, Kultivierungsparametern (zum Beispiel Temperatur, pH, Animpfmenge) und im Reaktionssystem auftretenden mechanischen Kräften abhängig (Metz und Kossen 1977, Papagianni 2004). Für Actinomyceten wurden bisher nur wenige Untersuchungen zur genauen Ursache der Bildung von Pellets durchgeführt. Laut Vecht-Lifshitz *et al.* (1990) kommt bei *S. tendae* die Pelletbildung durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Zellwänden zustande.

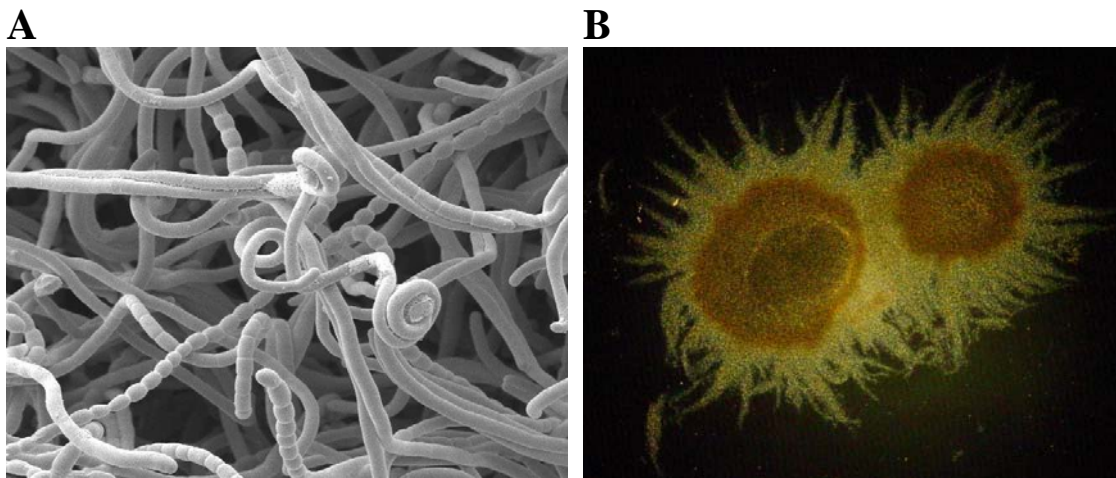


Abb. 3.12: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Mycels (A; Quelle: University of Strathclyde, Glasgow, Schottland) und lichtmikroskopische Aufnahme der Pellets (B) von *Streptomyces spp.*

Je nach Stamm und Stoffwechselprodukt kann die Wachstumsmorphologie einen starken Einfluss auf die Produktbildung haben (Braun und Vecht-Lifshitz 1991). Die Mycelform hat den Vorteil, dass schnelleres Wachstum möglich ist, da es nicht zu intrazellulären Transportlimitationen kommen kann. Weiterhin ist bei Prozessen, deren Produktbildung unabhängig von der Morphologie ist, häufig die Raum-Zeit-Ausbeute besser (Wucherpfennig *et al.* 2010). Nachteilig kann sich die bei Mycelwachstum meist stark erhöhte Viskosität des Kulturmediums auswirken, die verfahrenstechnische Herausforderungen an den Betrieb der Bioreaktoren stellt (siehe Kapitel 3.3.4).

Das Wachstum als Pellet ist immer dann von Vorteil, wenn die Produktbildung bei dieser Morphologie wesentlich gesteigert ist. Weiterhin ergeben sich durch das meist niedrigviskose Verhalten des Kulturmediums prozesstechnische Vorteile bei der Kultivierung und Aufarbeitung (Wucherpfennig *et al.* 2010). Ein wesentlicher Nachteil von Pellets ist, dass die inneren Zonen durch Transportlimitationen wenig oder gar nicht mit Nährstoffen und vor allen Dingen Sauerstoff versorgt werden (Hille *et al.* 2009). Dieser Effekt ist umso ausgeprägter, je größer der Gesamtdurchmesser der Pellets ist, so dass es im Inneren zu einer Verringerung oder sogar zum Absterben der Biomasse kommt (Hille *et al.* 2005).

Morphologische Untersuchungen mit den Mycel- und Pelletgeometrien wurden von Reichl *et al.* (1992a) und Treskatis *et al.* (1997) durchgeführt.

3.3.2 Nikkomycin Z

Nikkomycine gehören zur Gruppe der Peptid-Nukleosid Antibiotika und werden u.a. von *S. tendae* gebildet. Diese Gruppe von Antibiotika kann in den Aufbau der Zellwand bei Hefen, Pilzen und Insekten eingreifen (Hector 1993). Es wurden bisher ca. 30 verschiedene Nikkomycine beschrieben, wobei im Wildtyp die Nikkomycine X (ca. 60 %) und Z (ca. 30 %) die biologisch aktiven Hauptkomponenten darstellen und Nikkomycin Z die pharmakologisch interessante Verbindung ist (Hector *et al.* 1990).

Eine Identifikation der unterschiedlichen Nikkomycine ist über die jeweiligen UV-Absorptionsmaxima möglich (Fiedler 1984). Das Maximum bei Nikkomycinen mit Pyrimidinring (Nikkomycin Z) liegt bei 260 nm, während der Imidazolring (Nikkomycin X) bei 290 nm maximal absorbiert.

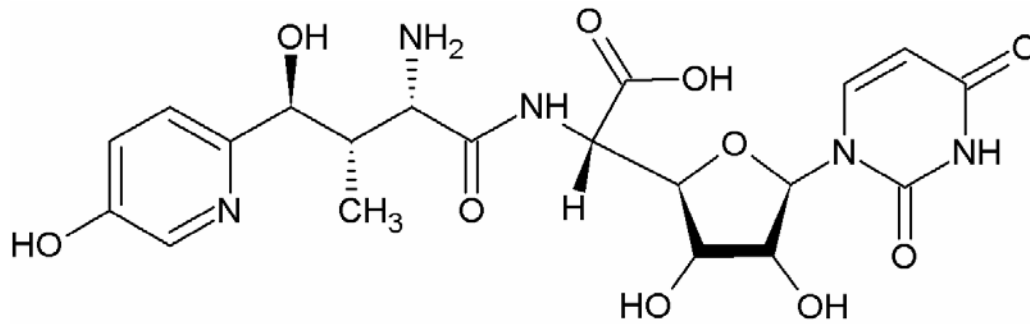


Abb. 3.13: Strukturformel von Nikkomycin Z.

Aufgrund des in der Struktur vorhandenen Pyrimidinrests (Abb. 3.13) besitzt Nikkomycin Z Ähnlichkeit mit UDP-N-Acetylglucosamin und wirkt als natürlicher Hemmer von Chitinsynthasen (Goldberg *et al.* 2000, Graybill *et al.* 2007). Die pharmazeutische Wirksamkeit wurde bereits in präklinischen Phasen und klinischen Studien der Phase I (orale Verabreichung) nachgewiesen. Dabei konnte eine sehr gute Verträglichkeit von Nikkomycin Z bis zu 2,5 g pro Patient und Tag verzeichnet werden (Nix *et al.* 2009). Derzeit finden weitere Studien an der University of Arizona zur Behandlung der Coccidioidomykosen (*Valley Fever*) statt (Galgiani 2007).

Einige Veröffentlichungen befassen sich mit der Biosynthese und genetischen Organisation des Nikkomycin-Biosyntheseclusters (Bruntner *et al.* 1999, Lauer *et al.* 2001). Dabei konnte das vollständige Gencluster (ca. 22 Gene) identifiziert werden (Bormann 2002). Der Biosyntheseweg von Nikkomycin Z wurde näher von Bruntner *et al.* (1999) untersucht. Die Verknüpfung der Nikkomycinsynthese zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel wird dabei über das Nukleosid Uridin und über die Aminosäure L-Lysin hergestellt. Im Syntheseweg wurden weiterhin zwei P450 Monooxygenasen identifiziert, die zur Sauerstoffabhängigkeit der Nikkomycinbildung beitragen könnten. Lohr *et al.* (1989) fanden in ihren Untersuchungen, dass Nikkomycin Z sowohl beim Vorliegen von Mycel-, als auch Pelletwachstum gebildet wird.

Crüger *et al.* (1985) führten Stabilitätsuntersuchungen mit Nikkomycin Z durch und stellten einen deutlichen Zerfall bei pH > 6 fest.

3.3.3 Kultivierung in Bioreaktoren

Allgemein lässt sich das Wachstum von Mikroorganismen in Satzkultivierungen in sechs Wachstumsphasen unterteilen (Abb. 3.14):

- I Adaptionsphase
- II Übergangsphase I
- III exponentielle Wachstumsphase
- IV Übergangsphase II
- V stationäre Phase
- VI Absterbephase

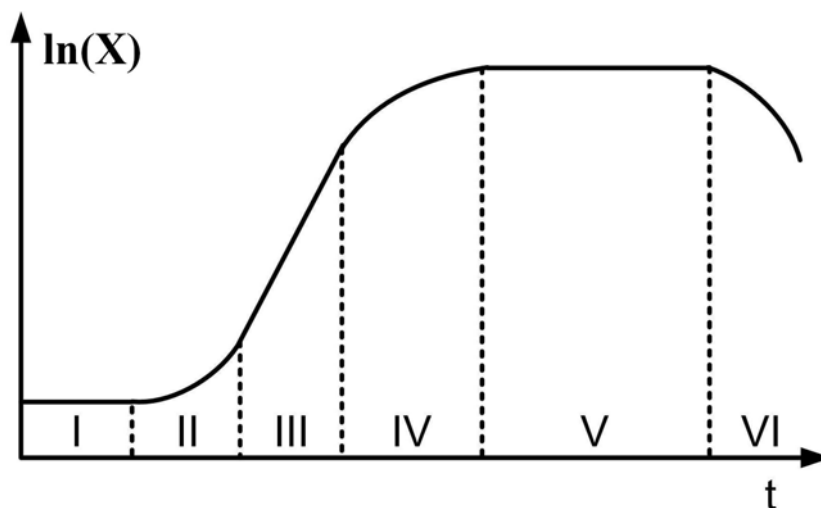


Abb. 3.14: Idealisierte Wachstumskurve einer Mikroorganismenkultur im Satzverfahren.

Bei Mycel und Pellet bildenden Mikroorganismen liegt im Gegensatz zu den meisten Bakterien und Hefen eine stark ausgeprägte stationäre Phase vor, in der meist die Produktbildung erfolgt (Papagianni 2004). Dadurch beträgt die gesamte Kultivierungsdauer, auch in einfachen Satzkultivierungen, häufig mehr als 100 h.

Die spezifische Wachstumsrate μ lässt sich aus dem Anstieg der Biomasse über die Zeit berechnen (Gleichung 34), wobei die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} während der exponentiellen Wachstumsphase vorliegt.

$$\mu = \frac{1}{c_X} \cdot \frac{dc_X}{dt} \quad (34)$$

c_X ... Biotrockenmassekonzentration [g L^{-1}]

t ... Zeit [h]

μ ... spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]

Bisher sind nur relativ wenige Arbeiten zur definierten Kultivierung von *S. tendae* und der Nikkomycin Z-Produktion in Bioreaktoren des Labormaßstabes bekannt. Crüger *et al.* (1985) entwickelten ein feststoffhaltiges optimiertes Produktionsmedium mit den Hauptbestandteilen Sojamehl (Stickstoffquelle), sowie einer Kombination der Kohlenstoffquellen Stärke und Mannit. Für Wachstum und Produktion wurde experimentell ein optimaler pH von 5,5 bestimmt. Weiterhin zeigte sich in Temperaturversuchen, dass bei 24 °C eine optimale Nikkomycin Z-Bildung stattfindet, wobei das Wachstum bei dieser niedrigen Temperatur verringert ist. Das Temperaturoptimum für das Wachstum liegt laut Reichl *et al.* (1992b) bei 35 °C bis 37 °C.

Mit einem auf Crüger *et al.* (1985) aufbauenden optimierten Produktionsmedium und der Produktionsmutante *S. tendae* Tü 901/S 2466 konnten Schüz *et al.* (1993) im Zulaufverfahren bei 27 °C nach 328 h ca. 6 g L⁻¹ Nikkomycin Z produzieren. Nachteilig, sowohl für einen definierten Prozessverlauf, als auch für die nachfolgenden Aufarbeitungsschritte sind dabei jedoch die im Medium enthaltenen Feststoffe.

Aus diesem Grund wurde von Schüz *et al.* (1993) ein vollständig lösliches Komplexmedium entwickelt, bei dem das feststoffhaltige Sojamehl im Wesentlichen durch Pepton und Hefeextrakt ersetzt wurde. Das Medium konnte erfolgreich für kontinuierliche Kultivierungen eingesetzt werden, wobei im stationären Zustand eine Biotrockenmassekonzentration (BTM) von 20 g L⁻¹ und eine Nikkomycinbildungsrate von 36 mg L⁻¹ h⁻¹ erreicht wurde. Die maximale Wachstumsrate während der Satzkultivierung am Anfang des Prozesses lag bei $\mu_{max} \approx 0,2 \text{ h}^{-1}$ (Schüz 1990).

Alternativ wurden von Lohr *et al.* (1989) und Hege-Treskatis *et al.* (1992) Kultivierungen in definiertem Mineralmedium durchgeführt. Wachstum und Nikkomycinbildung waren dabei jedoch wesentlich geringer als in komplexen Mineralmedien. Maximal konnten in optimierten Zulaufverfahren mit Mineralmedium 1 g L⁻¹ Nikkomycin Z produziert werden (Waldruff *et al.* 1997). Trotzdem ist der Einsatz definierter Medien teilweise vorteilhaft. Zum einen können die einzelnen Effekte von Nährstoffen auf die Produktbiosynthese quantitativ bestimmt werden und zum anderen limitierende Nährstoffe besser identifiziert und reguliert werden (Hege-Treskatis *et al.* 1992). So wurde von Mundry und Kuhn (1991) die Steigerung der Nikkomycinbildung bei niedrigen Phosphatgehalten reaktionstechnisch modelliert und experimentell nachgewiesen. Ein strukturiertes Modell der Nikkomycinproduktion für definierte Mineralmedien wurde von King (1997) publiziert.

Weiterhin erreichten Crüger *et al.* (1985) und Fielder *et al.* (1982) eine Steigerung der Nikkomycinbildung durch Zugabe von Biosyntheseintermediaten oder –vorstufen wie zum Beispiel Uracil oder L-Lysin.

3.3.4 Rheologisches Verhalten

Bei der Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen wie beispielsweise *S. tendae* ändert sich das rheologische Verhalten der Kulturlösung teilweise stark. Beim Wachstum als Pellet erhöht sich die Viskosität des Kulturmediums nur geringfügig und es liegt weiterhin annähernd Newton'sches Verhalten vor (Wucherpfeffig *et al.* 2010). Bei Mycelwachstum hingegen erhöht sich die Viskosität der Kulturlösung und es wird ein nicht-Newton'sches strukturviskoses Verhalten gemessen (Riley *et al.* 2000, siehe auch Kapitel 3.1.5). Der Grund dafür sind die ineinander verzweigten Mycelfäden der Mikroorganismen. Die Strukturviskosität folgt aus der Ausrichtung der Mycelstrukturen entlang der Wirkungsrichtung der auftretenden Kräfte, weshalb sich in Bereichen größerer Scherkräfte die Viskosität reversibel verringert (Nienow 1990). Aus diesem Verhalten resultiert eine ungleichmäßige Verteilung der Viskosität innerhalb des Bioreaktors, die wichtige verfahrenstechnische Größen wie zum Beispiel gas/flüssig-Stofftransport und die Hydrodynamik beeinflusst (siehe auch Kapitel 3.1.5). Dies kann vor allem zu Problemen bezüglich des Sauerstoffeintrags führen. Badino *et al.* (2001) beobachteten einen 20-fache Verringerung des k_{La} während der Kultivierung von Mycel bildenden Mikroorganismen. Weiterhin kann die erhöhte Viskosität zu Problemen bezüglich des Leistungseintrags führen, da vor allem bei der Übertragung von Laborprozessen in Reaktoren des Produktionsmaßstabs die verfügbare Motorleistung häufig ein limitierender Faktor ist (Junker *et al.* 2008).

Das strukturviskose Verhalten stellt daher eine wichtige Prozessgröße bei der Kultivierung Mycel bildender Mikroorganismen dar. Messtechnisch kann das rheologische Verhalten der Kulturlösung in herkömmlichen Rheometern zum Beispiel des Searle-Typs erfasst werden (Oolman *et al.* 1986).

Die erhaltenen Fließkurven lassen sich für den praxisrelevanten Bereich sehr gut mit dem Ostwald-de-Waele Gesetz (Gleichung 25) beschreiben (Henzler und Schäfer 1987), so dass eine Darstellung des Konsistenzindex K und des Fließindex m über die Zeit möglich ist. Warren *et al.* (1995) untersuchten den Verlauf beider Parameter für die Kultivierung von

drei verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen. Bei allen Kultivierungen zeigte sich der gleiche qualitative Verlauf. Der Konsistenzindex K steigt während der exponentiellen Wachstumsphase stark an, während sich in der stationären Phase ein relativ konstanter Wert einstellt. Umgekehrt verhält es sich mit dem Fließindex m , der zu Beginn des Prozesses stark fällt und im weiteren Verlauf nahezu konstant ist. Erst am Ende des Prozesses, wenn die Absterbephase beginnt, sinkt der Konsistenzindex und der Fließindex steigt leicht.

Einige Autoren fanden einen exponentiellen Zusammenhang zwischen Konsistenzindex K und Biotrockenmassekonzentration c_X :

$$K \sim c_X^\delta \quad (35)$$

wobei der Exponent δ zwischen 2 und 4 liegt (Henzler und Schäfer 1987, Allen und Robinson 1990, Olsvik und Kristiansen 1994, Riley *et al.* 2000).

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Bioreaktorsysteme

4.1.1 Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan

Die verschiedenen Prototypen des Paddelrührorgans (technische Zeichnungen siehe Anhang A2) wurden aus Poly-(Ether-Ether-Keton) (PEEK) Rundmaterial (Fa. Sahlberg, Feldkirchen) gefertigt und mit $\text{Sm}_2\text{Co}_{17}$ -Magneten (Fa. IBS Magnet, Berlin) bestückt. Der Antrieb der auf einer Achse befestigten Rührorgane erfolgte magnetisch induktiv entweder im Bioreaktorblock (Weuster-Botz *et al.* 2005; siehe auch Abb. 3.10) oder durch einen Einzelmagneten mit Steuergerät (MIXcontrol 40 speed, 2mag AG, München). Der Betriebsbereich des Paddelrührorgans für Kultivierungen liegt zwischen 600 und 1600 min^{-1} . Um den Verschleiß zu minimieren, wurden Lagerbuchsen aus Zedex-530 (Fa. Fermetronic, München) zwischen Rührorgan und Achse in die Zentrumsbohrung eingepresst. Die Rührorgane wurden in Einwegbioreaktoren ohne Strömungsbrecher (Abb. 4.1; Mini-Bioreaktor HTBD, Fa. 2mag AG, München) bei einem Füllvolumen von 8 bis 12 mL betrieben.

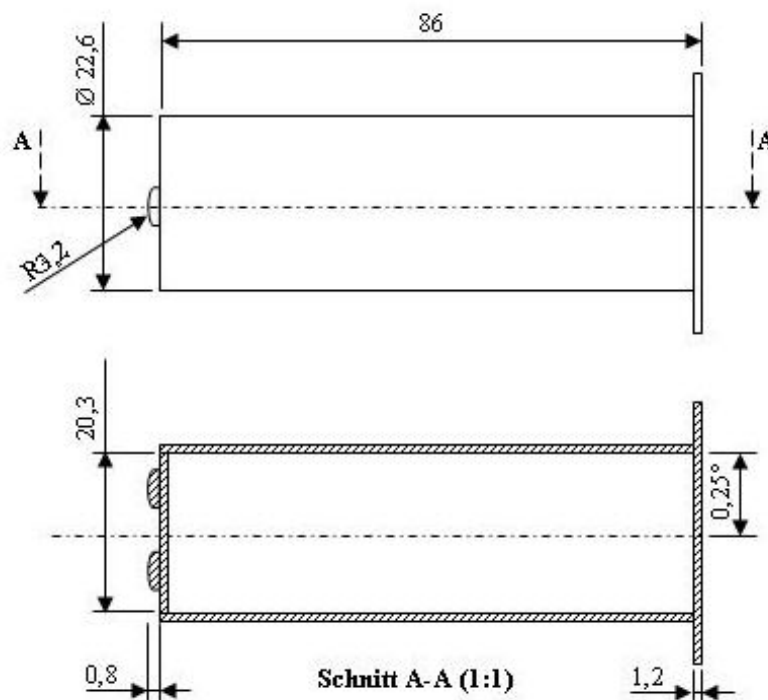


Abb. 4.1: Verwendete Einwegbioreaktoren ohne Strömungsbrecher für den Betrieb des Paddelrührorgans (in Kooperation mit der 2mag AG, München erarbeitet).

4.1.2 Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan

Das Gas-induzierende Rührorgan (Abb. 4.2A; Puskeiler 2004, Kusterer 2007) wurde im Einwegbioreaktor mit Strömungsbrechern (Mini-Bioreaktor HTBD, Fa. 2mag AG, München) mit einem Füllvolumen von 12 mL betrieben. Der Antrieb der auf einer Hohlachse befestigten Rührorgane erfolgte magnetisch induktiv entweder im Bioreaktorblock (Weuster-Botz *et al.* 2005; siehe auch Abb. 3.10) oder durch einen Einzelmagneten mit Steuergerät (MIXcontrol 40 speed, 2mag AG, München). Der Betriebsbereich des Rührorgans für Kultivierungen liegt bei 1800 bis 3000 min^{-1} , um Gasinduktion zu ermöglichen. Die wichtigsten geometrischen Abmessungen sind in Abbildung 4.2B angegeben

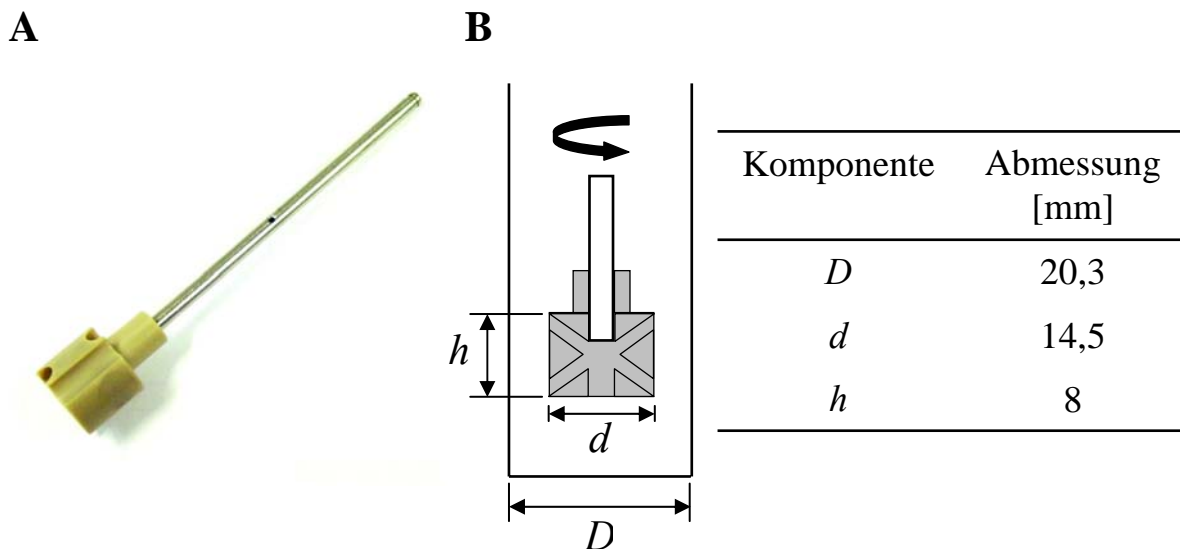


Abb. 4.2: Photo (A) und geometrische Abmessungen (B) des verwendeten Gas-induzierenden Rührorgans.

4.1.3 Laborrührreaktor

Für verfahrenstechnische Referenzmessungen wurde ein Laborrührreaktor (KLF 2000, Fa Bioengineering, Wald, Schweiz) mit Motorantrieb und drei 6-Blatt-Scheibenrührern verwendet. Die geometrischen Abmessungen des Reaktors sind in Abbildung 4.3 angegeben. Der Reaktor wurde mit einem Arbeitsvolumen von 1,7 L und in einem Rührerdrehzahlbereich von 100 bis 1700 min^{-1} betrieben. Die Begasung erfolgte über einen Begasungsring am Reaktorboden, dem ein Massendurchflussmesser vorgeschaltet wurde.

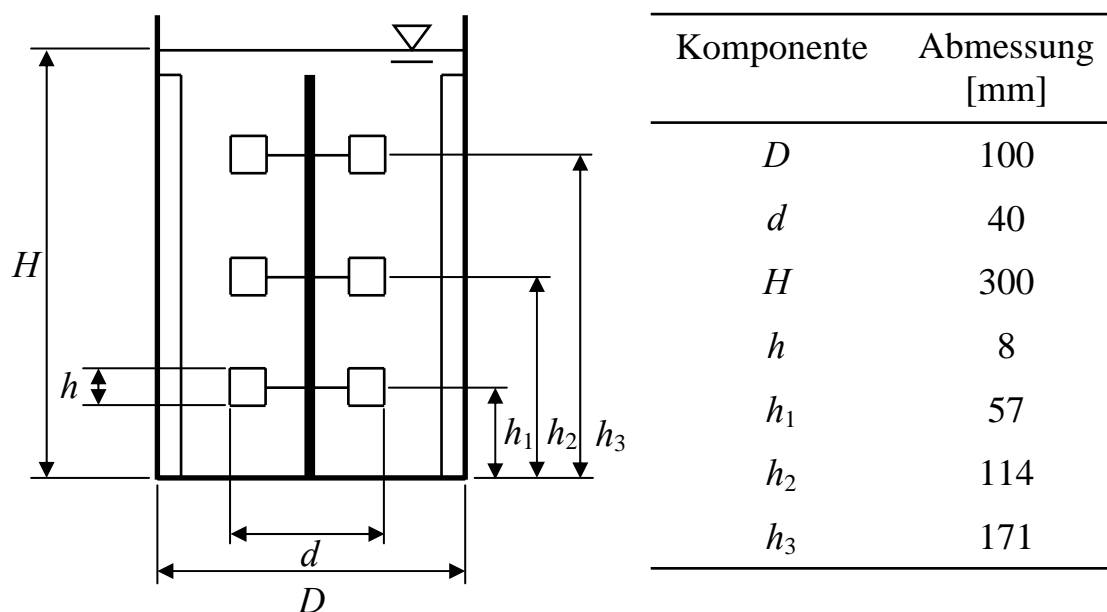


Abb. 4.3: Schematische Abbildung und Geometrie des verwendeten Laborrührreaktors.

4.2 Verfahrenstechnische Charakterisierung des Paddelrührorgans im Milliliter-Bioreaktor

4.2.1 Verwendete Modellfluide und Bestimmung der Rheologie

Zur verfahrenstechnischen Charakterisierung der unterschiedlichen Rührreaktoren kamen verschiedene viskose Modellfluide zum Einsatz, die dem Fließverhalten realer biologischer Systeme ähnlich sind. Es wurden Modellfluide gewählt, die sowohl ein Newton'sches, als auch strukturviskoses Verhalten zeigen. Die Stoffe und deren rheologischen Eigenschaften sind in Tabelle 4.1 angegeben. Die entsprechenden Stoffe wurden alle in 0,5 M Na_2SO_4 -Lösung gelöst, die vorher in VE-Wasser angesetzt wurde.

Tab. 4.1: Verwendete Modellfluide zur Abbildung unterschiedlich viskoser Biosuspensionen.

Modellfluid	Rheologie	Anteil	Hersteller
Na_2SO_4	niedrigviskoses Newton'sches Verhalten	0,5 M	Roth
Glycerin	höher viskoses Newton'sches Verhalten	10 – 90 % (v/v)	Roth
Polyethylenglycol 20000 (PEG)	höher viskoses Newton'sches Verhalten	5 – 20 % (w/v)	VWR
Xanthan (XG)	strukturviskoses Verhalten	0,1 – 0,7 % (w/v)	Roth

Die Bestimmung der Rheologie erfolgte in einem Rheometer mit Doppelspalt-Messsystem (Messsystem 0/115, Rheomat 115, Fa. Contraves, Zürich, Schweiz). Das Rheometer kann die jeweilige Viskosität für Schergeschwindigkeiten im Bereich von $0,226$ bis 3430 s^{-1} in 30 voreingestellten Intervallen messen. Für die Messung wurden 12 mL der zu messenden Flüssigkeit blasenfrei in den Doppelspalt gegeben und bei einer Temperatur von 29 °C vermessen.

4.2.2 Bestimmung des Leistungseintrags

Zur Bestimmung des Leistungseintrags im Milliliter-Reaktor mit Paddelrührorgan wurde das über die Flüssigkeit auf die Reaktorwand übertragene Drehmoment (M) gemessen. Aus diesem lässt sich mit der Winkelgeschwindigkeit (ω) nach folgender Formel der Leistungseintrag berechnen:

$$P = M \cdot \omega = M \cdot 2 \cdot \pi \cdot n \quad (36)$$

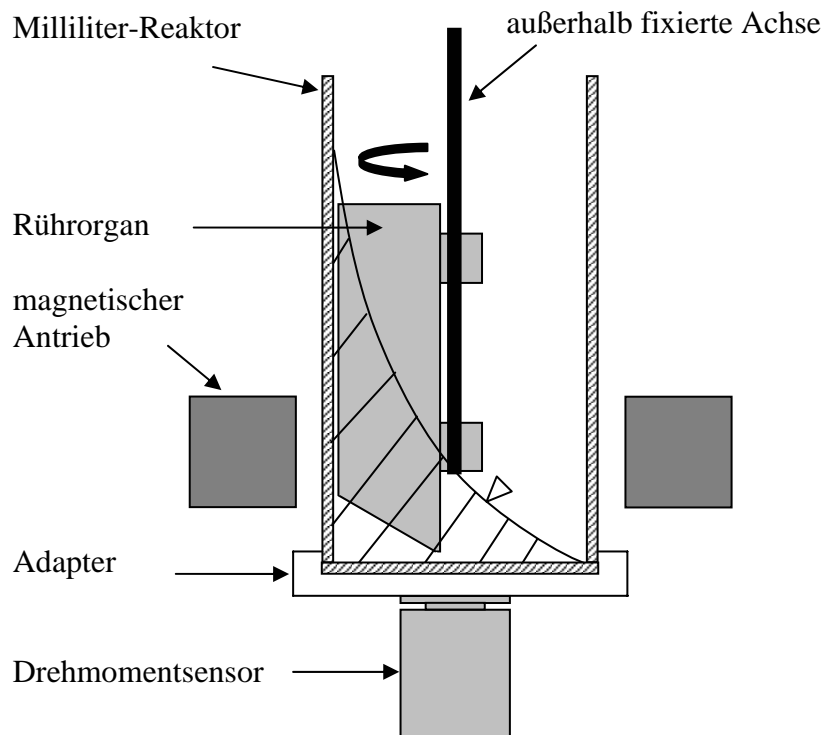


Abb. 4.4: Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des Leistungseintrags im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan.

Da durch das geringe Reaktorvolumen sehr geringe Drehmomente vorliegen, kam ein spezieller Drehmomentsensor (DG1-3, Modia Mess- und Datentechnik GmbH, Neckargmünd) zum Einsatz, der Drehmomente im Bereich von $0,01$ bis 100 mN m messen

kann. Die vom Drehmomentsensor gemessenen digitalen Werte wurden über einen A/D-Wandler (M312.10 Modia Mess- und Datentechnik GmbH, Neckargmünd) in ein analoges Signal umgewandelt und nach Einstellen eines konstanten Wertes direkt am Messgerät abgelesen.

Die Messungen wurden in einem Einzelmessstand mit dem in Abbildung 4.4 gezeigten Versuchsaufbau durchgeführt. Dabei wurde der Milliliter-Reaktor ohne Strömungsbrecher über einen Adapter (technische Zeichnung siehe Anhang A3) auf dem Drehmomentsensor fixiert. Die Achse mit dem Rührorgan wurde separat über eine Klemmvorrichtung so fixiert, dass die Position des Rührorgans im Einzelmessstand exakt der Position im Bioreaktorblock entspricht. Der Antrieb des Rührorgans erfolgte berührungsfrei durch einen Einzelmagneten mit Steuergerät (MIXcontrol 40 speed, 2mag AG, München).

4.2.3 Bestimmung des k_{La}

Die Bestimmung des k_{La} erfolgte mittels der dynamischen Sulfitmethode (siehe auch Kapitel 3.1.3). Aufgrund der kleinen Abmessungen des Milliliter-Bioreaktors wurden die Messungen im Einzelmessstand mit einem optischen Mikro-Sauerstoffsensoren mit geringen Ansprechzeiten zwischen 2 und 3 s (Microx TX, Fa. Presens, Regensburg) durchgeführt, der seitlich im unteren Bereich des Reaktors eingebaut wurde (Abb. 4.5). Vor Beginn der Messung wurde die Ansprechzeit t_E des jeweiligen Sensors bestimmt. Dazu wurde die Optode aus einer mit Sauerstoff gesättigten Atmosphäre in eine Na_2SO_3 -Lösung getaucht. Die Ansprechzeit ist die Zeit, die die Optode benötigt um 90 % der Sprungantwort aufzuzeichnen. Zur Bestimmung wurden jeweils 3 Messungen durchgeführt.

Die Messung erfolgte unter nicht-koaleszierenden Bedingungen bei 25 °C und einer Kopfraumbegasung mit Druckluft von 6 L h^{-1} , in einer 0,5 M Na_2SO_4 -Lösung in der, zur Modellierung viskoser Fluide, gegebenenfalls weitere Stoffe gelöst wurden (siehe auch Tab. 4.1). Der gesamte Rührerdrehzahlbereich von 600 bis 1600 min^{-1} wurde vermessen. Die Auszehrung des gelösten Sauerstoffs im Medium wurde durch Zugabe einer Na_2SO_3 -Lösung (500 mM Stammlösung, Lagerung bei -20 °C) erreicht. Die Menge an Natriumsulfit wurde so gewählt, dass 0 % pO_2 sicher erreicht und von der Optode aufgezeichnet werden konnten. Um eine ausreichend schnelle Reaktion des Natriumsulfits mit dem gelösten Sauerstoff zu ermöglichen, wurde dem Medium 1 mM CoSO_4 als Katalysator (500 mM Stammlösung, Lagerung bei 4 °C) zugegeben.

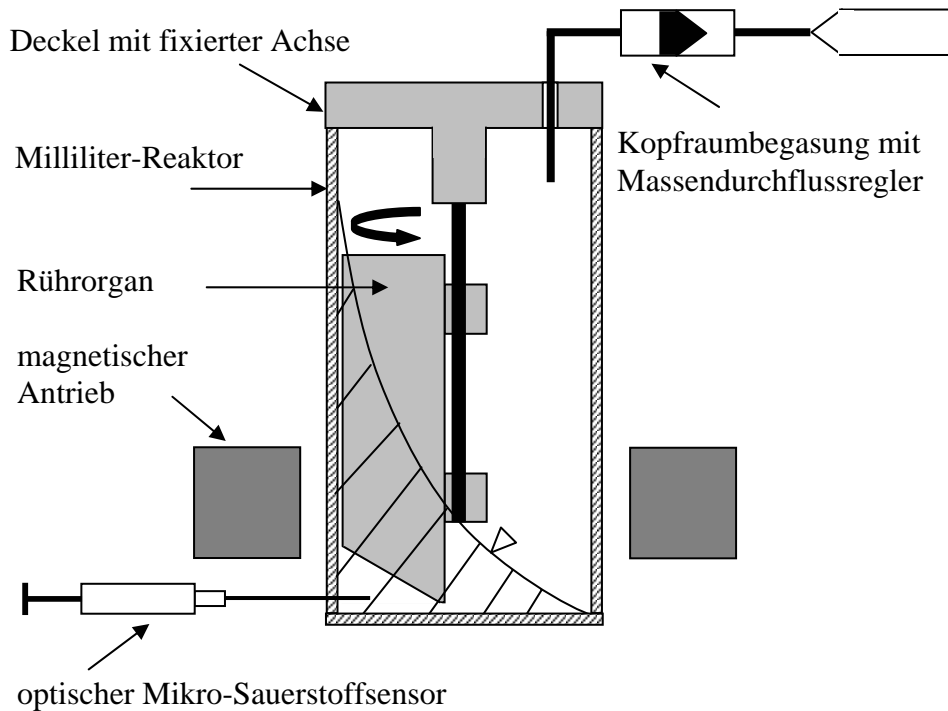


Abb. 4.5: Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des k_La im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan.

Die Kinetik der nach Verbrauch des gelösten Sauerstoffs eintretende Aufsättigung wurde durch die zur Optode gehörige Software (MTX-single ver1.0S, Fa. Presens, Regensburg) aufgezeichnet. Die Bestimmung des k_La aus den Kinetiken erfolgte unter Annahme einer ideal durchmischten Gas- und Flüssigphase mit Gleichung 15, wobei die vorher bestimmte Ansprechzeit berücksichtigt wurde. Die Gleichung wurde mit Hilfe des Levenberg-Marquardt Algorithmus (Labview 7.4, Fa. National Instruments, Austin, USA) den Messdaten angepasst und der k_La ermittelt.

4.2.4 Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation

Die Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation wurde mit dem von Hoffmann *et al.* (1992) beschriebenen Ton/Polymer-Flockensystem durchgeführt (siehe auch Kapitel 3.1.4). Dazu wurden 5 g L^{-1} Blauton (Witterschlicker Blauton HFF, Fa. WBB Fuchs, Ransbach-Baumbach) in VE-Wasser mit 1 g L^{-1} NaCl (zur Unterdrückung von Schwankungen bei der Salzkonzentration) suspendiert. Zur reproduzierbaren Einstellung einer gleichmäßigen Ausgangspartikelgröße, wurde die Suspension vor der eigentlichen Messung für mindestens 1 h im Laborbioreaktor (KLF 2000, Fa. Bioengineering, Wald, Schweiz) bei 1000 min^{-1} gerührt. Anschließend wurden die Milliliter-Reaktoren im Bioreaktorblock mit jeweils 10 mL der Blautonsuspension befüllt und die gewünschte

Rührerdrehzahl eingestellt. Die Flockung erfolgte durch die Zugabe von $0,03 \text{ g L}^{-1}$ eines kationischen Polymers (Praestol 650BC, Fa. Ashland, Krefeld; 5 g L^{-1} Stammlösung). Da im Milliliter-Reaktor aufgrund der kleinen Abmessungen keine *online* Messung der Partikelgrößen möglich ist, wurde die Beanspruchungszeit nach Vorversuchen auf 40 min festgelegt. Die nach der Beanspruchungszeit eingestellte Partikelgrößenverteilung wurde *offline* bestimmt. Dazu wurde der Inhalt von drei Milliliter-Bioreaktoren in einem 50 mL Becherglas vereinigt und mittels eines Magnetrührers (Länge: 24 mm, Durchmesser: 8 mm) auf einer Magnetrührplatte (Variomag Monotherm, Fa. H+P Labortechnik, Oberschleißheim) bei 600 min^{-1} durchmischt, um eine Sedimentation der Flocken zu verhindern. Der beschriebene Versuchsaufbau stellt sicher, dass keine weitere Zerkleinerung der Partikel stattfindet.

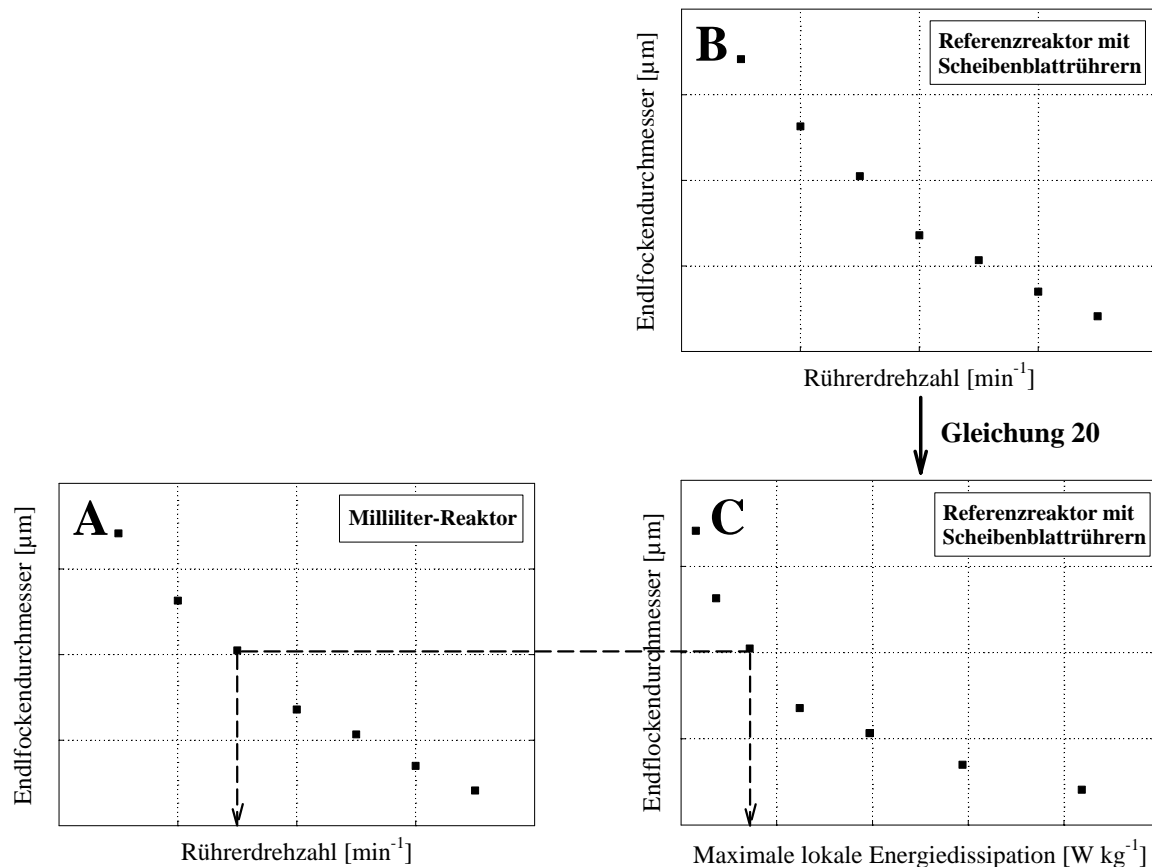


Abb. 4.6: Methode zur Ermittlung der maximalen lokalen Energiedissipation im Milliliter-Bioreaktor mit dem Ton/Polymer-Flockensystem. Aus der Messung der Partikelgröße im Milliliter-Bioreaktor (A), wird mithilfe von Referenzmessungen im Laborrührreaktor über die Partikelgröße (B) mit Gleichung 20 auf die maximale lokale Energiedissipation geschlossen (C).

Zur Messung der Partikelgrößenverteilung kam eine rotierende Lasersonde (3D ORM Sensor, Fa. MTS, Düsseldorf) mit der dazugehörigen Software (WinORm 5.1, Fa. MTS, Düsseldorf) zum Einsatz. Die Sonde kann Partikelgrößen von 1 - 1000 µm messen. Das

Messintervall wurde auf 60 s eingestellt, um eine ausreichende Anzahl an Partikeln (mindestens 4000 Stück) zu vermessen. Die erhaltene Partikelgrößenverteilung entspricht annähernd einer logarithmischen Normalverteilung, so dass der Median der Volumensummenverteilung ($d_{50,3}$) als charakteristischer Parameter der Verteilung herangezogen werden konnte. Für jeden Ansatz wurden 10 Messpunkte (10 min Gesamtmesszeit) erfasst und aus deren Mittelwert der $d_{50,3}$ gebildet. Die Bestimmung für jede Rührerdrehzahl erfolgte im 3-fachen Ansatz.

Um aus den ermittelten Partikelgrößen die maximale lokale Energiedissipation bestimmen zu können, wurden Messungen in einem Referenzrührreaktor, bei dem ε_{max} für jede Rührerdrehzahl bekannt ist, vorgenommen. Die Referenzmessungen wurden im Laborrührreaktor mit 6-Blatt-Scheibenrührern und 1,7 L Arbeitsvolumen (KLF 2000, Fa. Bioengineering, Wald, Schweiz; siehe auch Kapitel 4.1.3) mit der oben beschriebenen Methode durchgeführt. Aufgrund der größeren Abmessungen des Laborrührreaktors, konnte bei den Referenzmessungen eine *online* Bestimmung der Partikelgröße erfolgen, indem die Lasersonde in einen DN19 Stutzen eingebaut wurde. Der $d_{50,3}$ wurde für jede Rührerdrehzahl nach Einstellen eines konstanten Wertes ermittelt (Abb. 4.6B). Jedem ermittelten $d_{50,3}$ des Laborrührreaktors kann mit Gleichung 20 eine maximale lokale Energiedissipation zugeordnet werden (Abb. 4.6C). Aus der erhaltenen Charakteristik kann demzufolge mit den gemessenen Partikelgrößen aus dem Milliliter-Bioreaktor die maximale lokale Energiedissipation für das Paddelrührorgan ermittelt werden (Abb. 4.6A).

4.2.5 Bestimmung der effektiven Schergeschwindigkeit

Die effektive Schergeschwindigkeit für die verschiedenen Betriebsbedingungen des Paddelrührorgans wurde nach der Methode von Peter *et al.* (2004) bestimmt. Die Messmethode beruht auf der Annahme das, bei sonst konstanten Betriebsbedingungen, zwei Flüssigkeiten bei denen die gleiche Rührerdrehzahl zum gleichen volumetrischen Leistungseintrag führt, ebenfalls die gleiche effektive Viskosität vorliegen muss (Metzner und Otto 1957). Demzufolge können aus Messungen des Leistungseintrags und der Rheologie verschiedener Newton'scher und strukturviskoser Fluide, jeweils die Schnittpunkte (Punkte 1 und 2 in Abbildung 4.7) ermittelt werden. Damit ergibt sich ein Zusammenhang aus den ermittelten effektiven Schergeschwindigkeiten zur Rührerdrehzahl des jeweiligen Reaktorsystems (Abb. 4.7C).

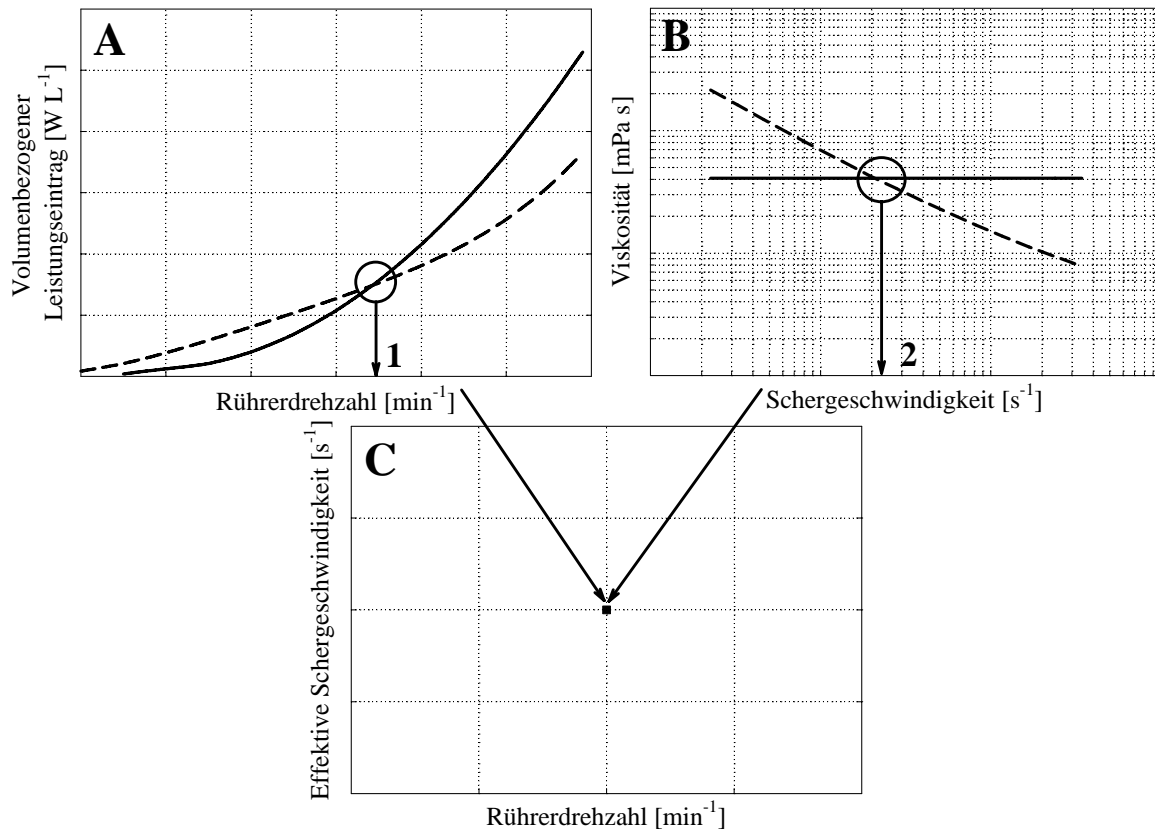


Abb. 4.7: Methode zur Ermittlung der effektiven Schergeschwindigkeit im Milliliter-Bioreaktor. Die Schnittpunkte (1 und 2) des volumenbezogenen Leistungseintrags als Funktion der Rührerdrehzahl (A) und der Viskosität über die Schergeschwindigkeit (B, doppellogarithmische Auftragung) von Newton'schen (durchgezogene Linie) und nicht-Newton'schen (gestrichelte Linie) Flüssigkeiten werden ermittelt und ergeben eine Abhängigkeit der effektiven Schergeschwindigkeit von der Rührerdrehzahl (C).

Die Bestimmung des Leistungseintrags erfolgte mit der in Kapitel 4.2.2 dargestellten Methode und die Rheologie wurde, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, ermittelt. Als Newton'sche Flüssigkeiten wurden 40 – 90 % (v/v) Glycerinlösungen vermessen (siehe Anhang A1) und als strukturviskose Fluide kamen 0,4 – 0,7 % (w/v) Xanthan-Lösungen zum Einsatz (siehe Anhang A1).

4.3 Verfahrenstechnische Charakterisierung des Gas-induzierenden Rührorgans im Milliliter-Bioreaktor

4.3.1 Bestimmung des Leistungseintrags

Die Messung des Leistungseintrags mit dem Gas-induzierenden Rührorgan wurde, bis auf die nachfolgend beschriebenen Unterschiede, analog zu der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Methode vorgenommen. Das Gas-induzierende Rührorgan wurde auf eine Achse in den in Abbildung 4.4 schematisch dargestellten Versuchsaufbau montiert, wobei ein Milliliter-Reaktor mit Strömungsbrechern verwendet wurde. Für die Bestimmung des Leistungseintrags mit Gasinduktion wurde eine Hohlachse verwendet, die für Messungen ohne Gaseintrag durch eine Achse aus Vollmaterial ersetzt wurde.

4.3.2 Bestimmung des k_{La}

Die Bestimmung des k_{La} mit dem Gas-induzierenden Rührorgan erfolgte mit der dynamischen Sulfitmethode und der gleichen Vorgehensweise wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

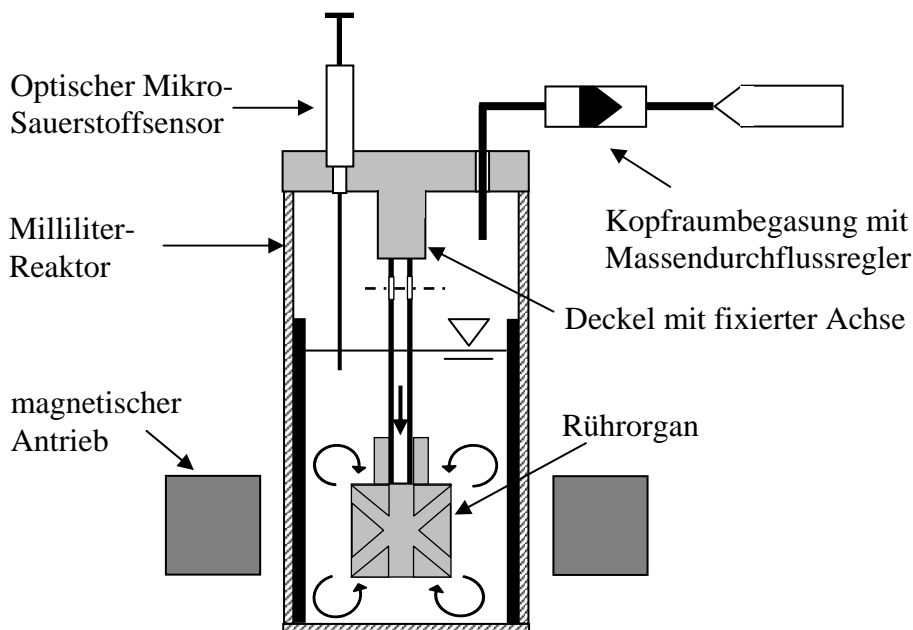


Abb. 4.8: Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des k_{La} im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan.

Aufgrund der anderen Rührergeometrie wurde der Versuchsaufbau, wie in Abbildung 4.8 schematisch aufgezeigt, abgeändert. Die Sauerstoffoptode wurde über den Deckel in den Reaktor eingebracht und das Gas-induzierende Rührorgan im Milliliter-Reaktor mit Strömungsbrechern betrieben. Die Messungen erfolgten unter nicht-koaleszierenden

Bedingungen in unterschiedlich viskosen Flüssigkeiten (siehe auch Tab. 4.1) über einen Rührerdrehzahlbereich von 1800 bis 3000 min^{-1} .

4.3.3 Bestimmung der kritischen Rührerdrehzahl für Gasinduktion

Die Bestimmung der kritischen Rührerdrehzahl, ab der bei Gas-induzierenden Rührern ein Gaseintrag erfolgt, ist eine wichtige Kenngröße, da sie den jeweiligen Betriebsbereich des Rührorgans festlegt. Im Wesentlichen ist die kritische Rührerdrehzahl von Arbeitsvolumen und Viskosität des Kulturmediums abhängig (Sawant und Joshi 1979). Die Bestimmung wurde im Einzelmessstand (siehe Abb. 4.8) nach der optischen Methode für verschieden viskose Fluide vorgenommen (Saravanan und Joshi 1995). Dabei wurde stufenweise die Rührerdrehzahl um 10 min^{-1} erhöht und die Rührerdrehzahl als kritische Rührerdrehzahl definiert, bei der dauerhaft der Eintrag kleiner Gasblasen sichtbar war.

4.3.4 Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation

Die Bestimmung der maximalen lokalen Energiedissipation im Milliliter-Reaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan wurde analog zu der Methode für das Paddelrührorgan (siehe Kapitel 4.2.4) in Reaktoren mit Strömungsbrechern vorgenommen. Die *offline* gemessenen Partikelgrößen wurden mit Messungen aus dem Laborrührreaktor verglichen, um somit ε_{max} bestimmen zu können (siehe auch Abb. 4.6).

4.4 Verfahrenstechnische Charakterisierung des Laborrührreaktors

4.4.1 Bestimmung des Leistungseintrags

Für Referenzmessungen wurde der Leistungseintrag im Laborrührreaktor differentiell über ein direkt an den Servomotor angeschlossenes Wattmeter (Abb. 4.9; 2100 Digital Watt Analyzer, Valhalla Scientific, San Diego, USA) gemessen. Die Messungen wurden zuerst im unbefüllten und danach im mit 1,7 L Arbeitsvolumen befüllten System durchgeführt. Die Differenz der beiden Messungen ergibt die tatsächlich in die Flüssigkeit eingetragene Leistung. Der gesamte Drehzahlbereich von 100 bis 1700 min^{-1} wurde in Intervallen von 100 min^{-1} vermessen.

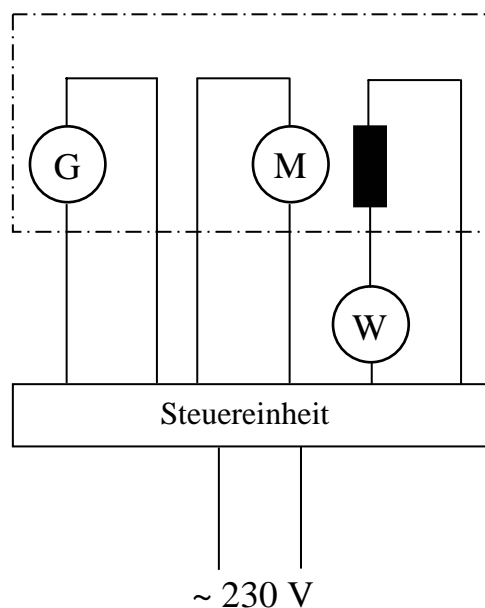


Abb. 4.9: Schematischer Aufbau zur Bestimmung des Leistungseintrags im Laborrührreaktor mit einem Wattmeter (G: Generator, M: Motor, W: Wattmeter).

4.4.2 Bestimmung des $k_L a$

Die Bestimmung des $k_L a$ wurde analog zu der in Kapitel 4.2.3 beschriebenen dynamischen Sulfitmethode mit Mikro-Sauerstoffsensoren (Microx TX, Fa. Presens, Regensburg) durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise sollte eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Messwerte gewährleistet sein. Die Messungen erfolgten unter nicht-koaleszierenden Bedingungen in unterschiedlich viskosen Flüssigkeiten (siehe auch Tab. 4.1) bei einer Begasungsrate von 2 vvm über einen Rührerdrehzahlbereich von 300 bis 1000 min^{-1} .

4.5 Kultivierung von *Streptomyces tendae*

4.5.1 Mikroorganismus und Stammhaltung

Alle Kultivierungen wurden mit *Streptomyces tendae* W42-0 (W42 Industrial Biotechnology GmbH, Marl) durchgeführt. Der Stamm basiert auf dem Wildtyp *S. tendae* Tü901, produziert jedoch nur das pharmazeutisch relevante Nikkomycin Z. Die Nikkomycin X-Bildung ist durch eine *in frame* Deletion im *nikQ*-Gen ausgeschaltet.

Zur Stammhaltung wurden 500 µL einer Kulturlösung auf Agarplatten aus SM-Medium (Tab. 4.2) ausgestrichen und für mehrere Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bis ein gleichmäßiger Sporenrasen erkennbar war. Anschließend wurde die Sporensuspension mit 1,5 mL bidest-H₂O und 1,5 mL Glycerinlösung (80 % v/v) mit einer Impföse gleichmäßig suspendiert und steril durch Watte in einer Einwegspritze filtriert. Die so gewonnene Sporensuspension wurde bei -80 °C gelagert.

Tab. 4.2: Verwendetes SM-Medium zur Herstellung von Sporensuspensionen auf Agarplatten (pH 6,5).

Medienbestandteil	Hersteller	Konzentration
Sojamehl fettarm	Schönenberger	20 g L ⁻¹
D-Mannit	Roth	20 g L ⁻¹
Agar-Agar	Roth	20 g L ⁻¹

4.5.2 Nährmedien

Zur Vorkulturherstellung wurde das NL1-Medium nach Crüger *et al.* (1985) (Tab. 4.3) verwendet, bei dem der pH mit 2 M NaOH auf 6,5 eingestellt wurde.

Tab. 4.3: Verwendetes NL1-Medium zur Vorkulturherstellung nach Crüger *et al.* (1985) (pH 6,5).

Medienbestandteil	Hersteller	Konzentration
Stärke (löslich)	Becton Dickinson GmbH	10 g L ⁻¹
D-Mannit	Roth	30 g L ⁻¹
Sojamehl fett	Schönenberger	20 g L ⁻¹
Hefeextrakt	Deutsche Hefewerke	20 g L ⁻¹
Antischaummittel (Clerol FBA)	Cognis	1 mL L ⁻¹

Alle Satzkultivierungen in den Bioreaktoren wurden im voll löslichen Komplexmedium nach Schüz *et al.* (1993) durchgeführt, das leicht modifiziert wurde (Tab 4.4). Der pH von 5,5 wurde mit 10 % (v/v) HCl eingestellt

Tab. 4.4: Zur Satzkultivierung im Bioreaktor verwendetes Komplexmedium modifiziert nach Schüz *et al.* (1993) (pH 5,5).

Medienbestandteil	Hersteller	Konzentration
Stärke (löslich)	Becton Dickinson GmbH	12 g L ⁻¹
D-Mannit	Roth	43 g L ⁻¹
Hefeextrakt	Deutsche Hefewerke	10 g L ⁻¹
Soja-Pepton	Roth	20 g L ⁻¹
Fe ₂ SO ₄ · 7 H ₂ O	Merck	5 mg L ⁻¹
Sojaöl	Roth	1 mL L ⁻¹
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Roth	100 mM
Antischaummittel (Clerol FBA)	Cognis	1 mL L ⁻¹

Zur Steigerung der Nikkomycin Z-Produktion wurden unterschiedliche Medienzusätze untersucht, die in Tabelle 4.5 angegeben sind. Alle Zusätze wurden dabei dem komplexen Satzmedium (Tab. 4.4) vor dem Autoklavieren zugegeben.

Tab. 4.5: Verwendete Medienzusätze zur Steigerung der Nikkomycin Z-Produktion.

Medienbestandteil	Hersteller	Konzentration
Barbitursäure	Roth	2,5 g L ⁻¹
L-Asparaginsäure	Roth	2,5 g L ⁻¹
L-Lysin-Monohydrat	Roth	2,5 g L ⁻¹
Orotsäure	Roth	2,5 g L ⁻¹
Uracil	AppliChem	2,5 g L ⁻¹

Die verwendeten Zulaufmedien sind in Tabelle 4.6 und Tabelle 4.7 angegeben. Der pH von jeweils 5,5 wurde mit 10 % (v/v) HCl eingestellt

Alle Medienbestandteile wurden in Leitungswasser suspendiert, der entsprechende pH eingestellt und das Medium für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tab. 4.6: Verwendetes Zulaufmedium zur Kultivierung von *Streptomyces tendae* im Laborrührreaktor (pH 5,5).

Medienbestandteil	Hersteller	Konzentration
D-Mannit	Roth	73 g L ⁻¹
Hefeextrakt	Deutsche Hefewerke	17 g L ⁻¹
Soja-Pepton	Roth	34 g L ⁻¹
Fe ₂ SO ₄ · 7 H ₂ O	Merck	8,5 mg L ⁻¹
Sojaöl	Roth	1,7 mL L ⁻¹
Antischaummittel (Clerol FBA)	Cognis	1 mL L ⁻¹

Tab. 4.7: Optimiertes Zulaufmedium mit Orotsäure zur Kultivierung von *Streptomyces tendae* im Laborrührreaktor (pH 5,5).

Medienbestandteil	Hersteller	Konzentration
D-Mannit	Roth	86 g L ⁻¹
Hefeextrakt	Deutsche Hefewerke	20 g L ⁻¹
Soja-Pepton	Roth	40 g L ⁻¹
Fe ₂ SO ₄ · 7 H ₂ O	Merck	10 mg L ⁻¹
Sojaöl	Roth	2 mL L ⁻¹
Orotsäure	Roth	5 g L ⁻¹
Antischaummittel (Clerol FBA)	Cognis	1 mL L ⁻¹

4.5.3 Vorkulturherstellung

Zur Vorkulturherstellung wurden 500 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen verwendet. Die Kolben wurden mit 50 mL NL1-Medium (siehe Tab. 4.3) befüllt und für 48 h bei 29 °C und 200 min⁻¹ im Schüttelinkubator (Multitron II, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz; Exzentrizität 5 cm) inkubiert. Alle Vorkulturen wurden mit 100 µL Sporensuspension beimpft.

4.5.4 Kultivierung im Laborrührreaktor im Satzverfahren

Die Kultivierungen wurden im 3 L-Rührreaktor mit zwei 6-Blatt Scheibenrührern (Labfors 2, Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) und einem Arbeitsvolumen von 2 L bei 29 °C durchgeführt. Der Reaktor wurde mit 5 % (v/v) Vorkultur beimpft. Die Rührerdrehzahl wurde auf 800 min⁻¹ eingestellt und die Begasung erfolgte durch ein Begasungsrohr mit einer Begasungsrate von 1 vvm. Sauerstoffpartialdruck (InPro 6000, Mettler Toledo, Gießen) und pH (SteamLine SL 80-325, Schott, Mainz) wurden kontinuierlich mit den

jeweiligen Sensoren gemessen. Um eine Sauerstofflimitation der Kulturen zu vermeiden, wurde der pO_2 auf $> 30\%$ mittels einer Erhöhung der Rührerdrehzahl beziehungsweise der Begasungsrate geregelt (Regelalgorithmus siehe Anhang A4). Der pH wurde nicht geregelt, um eine Vergleichbarkeit der ermittelten Prozessdaten mit den Kultivierungen im Milliliter-Bioreaktor zu gewährleisten (siehe Kapitel 4.5.6). Gebildetes Kohlenstoffdioxid und verbrauchter Sauerstoff wurden über eine Abgasanalytik (EasyLine, Fa. ABB Automation, Zürich, Schweiz) kontinuierlich gemessen. Bei Bedarf erfolgte über eine Peristaltikpumpe (BVP 7518-00, Fa. Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) manuell die Zugabe von zusätzlichem Antischaummittel (Clerol FBA, Fa. Cognis, Düsseldorf, 1:10 verdünnt).

Die Beprobung des Reaktorinhalts erfolgte über ein in das Medium eingebrachtes Tauchrohr.

4.5.5 Kultivierung im Laborrührreaktor im Zulaufverfahren

Die Zulaufversuche basierten auf dem gleichen Versuchsaufbau des Laborrührreaktors wie bei den Satzkultivierungen (siehe Kapitel 4.5.4). Die Satzphase der Zulaufversuche wurde im Komplexmedium (Tab. 4.4) gestartet und zum jeweiligen Prozesszeitpunkt durch die kontinuierliche Zugabe des entsprechenden Zulaufmediums (Tab. 4.6. und Tab. 4.7) begonnen. Der Zulauf in den Reaktor wurde über eine Schlauchpumpe (501 U, Fa. Watson-Marlow, Rommerskirchen) mit passendem Zulaufschlauch (Marprene II Innendurchmesser 0,5 mm, Fa. Watson-Marlow, Rommerskirchen) realisiert. Das Zulaufmedium wurde mit einer Magnetrührplatte (Variomag, Fa. H+P Labortechnik, Oberschleißheim) homogenisiert und zur besseren Prozessüberwachung auf einer Waage (IP65, Fa. Sartorius, Göttingen) platziert. Im Gegensatz zu den Satzkultivierungen kam bei den Zulaufversuchen eine pH-Regelung zum Einsatz. Die Regelung erfolgte durch eine automatisierte Zugabe von 3 M NaOH und 1 M H_2SO_4 mit den Regelparametern $P = 1$, $I = 0,05$ und einem Totband von 0,03. Um eine zuverlässige Regelung auch in viskosem Medium zu realisieren, wurden beide Titrationsmittel über Tauchrohre direkt in das Medium dosiert.

4.5.6 Kultivierung im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan

Kultivierungen im Milliliter-Maßstab wurden im Bioreaktorblock (Weuster-Botz *et al.* 2005, siehe auch Kapitel 3.2.3) durchgeführt. Dazu wurden die sterilen Einwegreaktoren ohne Strömungsbrecher (Mini-Bioreaktor HTBD, Fa. 2mag AG, München) unter einer Sterilbank in den Bioreaktorblock (bioREACTOR, Fa. 2mag AG, München) gesteckt und mit jeweils 10 mL sterilem Medium befüllt. Die Animpfmenge betrug 5 % (v/v). Nach Befüllen der Reaktoren wurde die zuvor sterilisierte Sterilabdeckung, auf der über Achsen die neu entwickelten Paddelrührorgane befestigt sind, auf den Bioreaktorblock montiert. Der so vorbereitete Bioreaktorblock wurde danach auf die Arbeitsplattform eines Pipettierroboters mit 8 Pipettiernadeln (Freedom EVO, Tecan, Crailsheim; siehe auch Abb. 3.11) platziert und an zwei Thermostate, zur Temperierung des Mediums auf 29 °C und zur Abgaskühlung auf 4 °C, angeschlossen. Um die dennoch auftretende Verdunstung zu kompensieren, wurden 25 $\mu\text{L h}^{-1}$ steriles VE-Wasser automatisch aus einem Vorlagegefäß (Reagenzreservoir PP, nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe) mittels des Laborroboters in die einzelnen Reaktoren zugegeben.

Die Begasungsrate von 1.5 mL min^{-1} (entspricht ca. 0,03 mL min^{-1} in den Kopfraum jedes Reaktors) wurde über einen zentralen Anschluss über einen Sterilfilter mit einer Gasmischstation (MX 4/4, Fa. DASGIP, Jülich) realisiert. Der Antrieb der Rührer erfolgt magnetisch-induktiv über in den Reaktorblock eingebaute Spulen und über ein mit dem Reaktorblock verbundenes Steuergerät (Variomag Control Unit bioReactor, Fa. 2mag, München), an dem die Rührerdrehzahl auf 1200 min^{-1} eingestellt wurde. Sauerstoffpartialdruck und pH wurden über am Boden der Einwegreaktoren aufgebrauchte optische Sensoren (Fa. Presens, Regensburg) und die dazugehörigen Ausleseeinheiten (MCR 8ph+8oxygen v1, Fa. Presens, Regensburg) kontinuierlich aufgezeichnet. Da die optischen pH-Sensoren für $\text{pH} < 6$ keine zuverlässigen Werte liefern (Kusterer *et al.* 2008), wurde das Signal nicht näher ausgewertet und auf eine Regelung verzichtet. Eine genaue Beschreibung der Funktionsweise der optischen Sensorik findet sich in Kusterer (2007). Zu Beginn des Prozesses wurde der pO_2 auf 100 % nachkalibriert und bei einem Abfall unter 30 % wurde über die Gasmischstation dem Gasvolumenstrom zusätzlich reiner Sauerstoff beigemischt.

Die gesamte Prozesssteuerung erfolgte mit der Prozesssoftware fedbatch-XP v.1.0.248 (Fa. DASGIP, Jülich), die über eine Schnittstelle (FBXServer, Fa. DASGIP, Jülich) die Software des Laborroboters (Gemini 4.2, Tecan, Crailsheim) anspricht (Kusterer 2007).

Die Beprobung des Reaktorinhalts erfolgte manuell über eine sterile Kanüle, wobei standardmäßig 0,5 mL Probe entnommen wurden.

4.5.7 Kultivierung im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan

Kultivierungen im Bioreaktorblock mit Gas-induzierendem Rührorgan wurden, bis auf die nachfolgend dargestellten Unterschiede, unter den gleichen Prozessbedingungen und dem gleichen Prozessaufbau wie in Kapitel 4.5.6 vorgenommen. Die Gas-induzierenden Rührorgane wurden an die Sterilabdeckung montiert. Für den Betrieb kamen mit 12 mL sterilem Medium befüllte Einwegreaktoren mit Strömungsbrechern (Mini-Bioreaktor HTBD, Fa. 2mag AG, München) zum Einsatz. Die Rührerdrehzahl bei den Kultivierungen wurde im Bereich von 1800 min^{-1} (Beginn des Gaseintrags) bis 2800 min^{-1} variiert. Durch den erhöhten Gasdurchsatz wurde ein Verdunstungsausgleich von $40 \mu\text{L h}^{-1}$ sterilem VE-Wasser mit dem Laborroboter zugegeben.

4.6 Analytik bei der Kultivierung von *Streptomyces tendae*

4.6.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Aufgrund der Wachstumsmorphologie von Mycel- und Pellet bildenden Mikroorganismen lässt sich photometrisch keine optische Dichte der Kultursuspension bestimmen, um das Wachstum zu verfolgen. Aus diesem Grund wurde das Wachstum ausschließlich über die Bestimmung der Biotrockenmasse erfasst. Dazu wurde ein definiertes Volumen an Kulturlösung in ein, zuvor bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknetes und ausgewogenes, Reaktionsgefäß gefüllt und bei 4500 min^{-1} in einer Standzentrifuge (Rotixa 50 RS, Fa. Hettich, Kirchleingern) für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Analysen entnommen und das Pellet als Waschschrift in PBS resuspendiert und abermals für 20 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Wasch-Überstands wurde das Reaktionsgefäß für mindestens 48 h bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet und nach Abkühlung im Exsikkator, ausgewogen. Die Biotrockenmasse ergibt sich folglich aus der Differenz des Gewichtes aus leeren und gefüllten Reaktionsgefäßen.

4.6.2 HPLC-Bestimmung der Nikkomycin Z-Konzentration

Für die Bestimmung der Nikkomycin Z-Konzentration wurde der Überstand aus dem ersten Zentrifugationsschritt der BTM-Bestimmung (siehe Kapitel 4.6.1) verwendet. Da die Stabilität von Nikkomycin bei höheren pH abnimmt, wurden die Proben mit 10 mL L^{-1} reiner Essigsäure versetzt, durch einen $0,2 \mu\text{m}$ HPLC-Filter filtriert und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Analyse wurde in einer HPLC (Surveyor Plus, Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) mit einer $5 \mu\text{m}$ RP 18-Säule (Hypersil Gold, Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bei $36 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgenommen. Zur Auftrennung kam eine modifizierte Gradientenmethode nach Fiedler (1984) mit folgenden Laufmitteln zum Einsatz:

Laufmittel A:

10 mM Hexansulfonsäure (Fa. Sigma-Aldrich, München)

2 mL L^{-1} Essigsäure

in VE-Wasser gelöst

Laufmittel B:

10 mM Hexansulfonsäure

2 mL L^{-1} Essigsäure

in VE-Wasser/Acetonitril (6:4 v/v) gelöst

Tab. 4.8: Verwendeter Gradient zur Auftrennung von Nikkomycin Z mittels HPLC.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0,0	100	0
2,5	100	0
4,0	85	15
17,5	55	45
22,5	100	0
25,0	100	0

Der in Tabelle 4.8 angegebene Gradient wurde bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} eingestellt und Nikkomycin Z im Diodenarraydetektor (PDA Plus Detector, Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bei 260 nm detektiert. Bei den eingestellten Versuchsbedingungen eluiert Nikkomycin Z bei ungefähr 15 min. Die Konzentration von

Nikkomycin Z wurde anhand einer vorher erstellten Kalibriergeraden (siehe Anhang A5) bei 260 nm bestimmt.

4.6.3 HPLC-Bestimmung der Mannitkonzentration

Zur Bestimmung der Mannitkonzentration wurden die Proben, wie bereits in Kapitel 4.6.2 beschrieben, vorbereitet und unter Verwendung der gleichen HPLC-Anlage untersucht. Die Analyse erfolgte isokratisch mit VE-Wasser als Elutionsmittel auf einer Ca-Monosaccharid-Säule (Rezex RCM, Fa. Phenomenex, Torrance, USA) mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} für 25 min bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Bei den eingestellten Versuchsbedingungen eluiert Mannit bei ungefähr 11,5 min. Die Detektion erfolgte im RI-Detektor (RI Plus Detector, Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) bei $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Konzentration an Mannit wurde anhand einer vorher erstellten Kalibriergeraden (siehe Anhang A5) bestimmt.

4.6.4 Bestimmung der Rheologie

Die Bestimmung der Rheologie konnte aufgrund des notwendigen Probenvolumens von mindestens 12 mL nur für Kultivierungen im Laborrührreaktor durchgeführt werden. Die Messung erfolgte in dem in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Rheometer mit Doppelspalt. Das Rheometer wurde auf $29 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert, die Kulturlösung vorsichtig blasenfrei in den Doppelspalt gegeben und anschließend im Schergeschwindigkeitsbereich von 22 bis 3430 s^{-1} (15 voreingestellte Stufen) vermessen.

4.6.5 Bestimmung der Oberflächenspannung

Bei der Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen ändert sich die Oberflächenspannung teilweise stark (Badino *et al.* 2001), weswegen dieser Prozessparameter für die Kultivierungen im Laborrührreaktor vermessen wurde. Die Bestimmung wurde mit einem Tensiometer (K10, Fa. Krüss GmbH, Hamburg) mit der De Noüy-Ringmethode durchgeführt. Dabei taucht ein Ring in die zu messende Flüssigkeit (20 mL) in einem Reaktionsgefäß ein und wird durch einen Servomotor soweit aus der Flüssigkeit gezogen, bis die sich am Ring bildende Lamelle ihr Spannungsmaximum erreicht hat. Aus dieser Kraft ergibt sich direkt die Oberflächenspannung. Bei der Messung ist darauf

zu achten, dass alle die Flüssigkeit berührenden Materialien vor der Messung ausgeglüht werden, um ein widerstandsfreies Eintauchen des Rings zu gewährleisten.

Der am Tensiometer abgelesene Wert muss nach Harkins und Jordan (1930) noch in Abhängigkeit der Dichte und der Höhe der Lamelle im Spannungsmaximum korrigiert werden. Für die vorliegenden Versuche wurde die Korrekturfaktortabelle für die Grenzfläche Wasser/Luft des Geräteherstellers verwendet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Referenzkultivierung von *Streptomyces tendae* im Laborrührreaktor

5.1.1 Kultivierung und Morphologie

Für die Entwicklung miniaturisierter Bioreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen müssen zunächst, anhand eines Referenzprozesses, die notwendigen Anforderungen an das Reaktorsystem ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde eine Referenzkultivierung im Laborrührreaktor etabliert. Anhand dieser Kultivierung können die wichtigsten Prozessparameter und -charakteristika abgeschätzt werden, um eine Auslegung der Milliliter-Bioreaktoren zu ermöglichen. Dazu wurde in dieser Arbeit *Streptomyces tendae* als geeigneter Modellmikroorganismus verwendet, da dessen Wachstum die typischen Eigenschaften morphologisch veränderlicher Mikroorganismen zeigt (siehe Kapitel 3.3). Als Referenzprozess wurde eine pH-ungeregelte Satzkultivierung bei 29 °C mit Komplexmedium (siehe auch Tab. 4.4) durchgeführt.

Während der Satzkultivierung konnte reproduzierbar Mycelwachstum von *S. tendae* im Laborrührreaktor beobachtet werden. Wachstum in Pelletform fand unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen im Laborrührreaktor nicht statt.

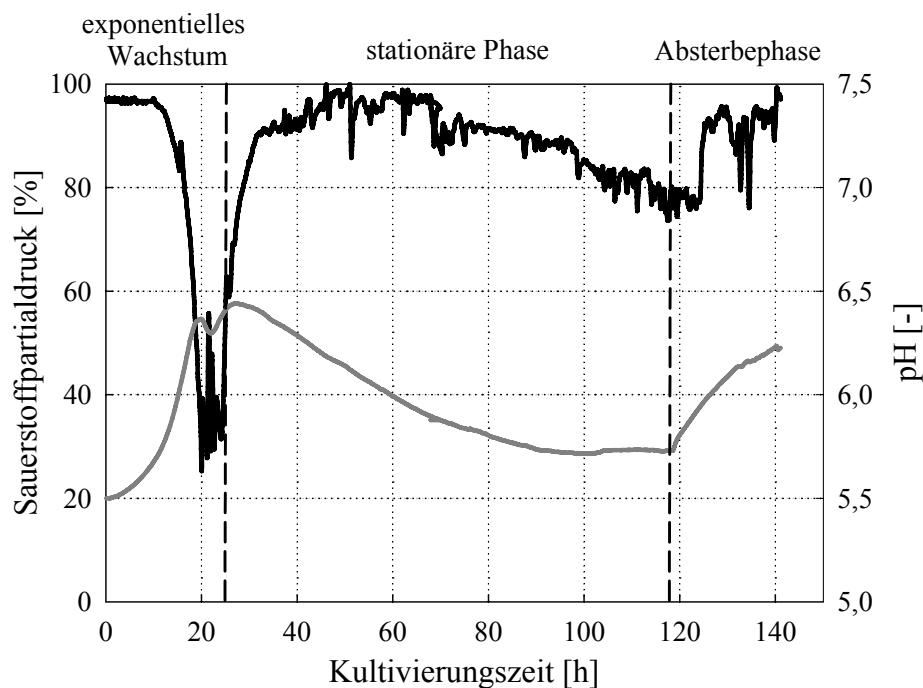


Abb. 5.1: Zeitlicher Verlauf von Sauerstoffsättigung (schwarze Linie) und pH (graue Linie), sowie charakteristische Wachstumsphasen bei der Satzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$).

Abbildung 5.1 zeigt den Verlauf der *online* ermittelten Werte (pO_2 und pH) und Abbildung 5.2 die *offline* während der Kultivierung bestimmten Größen. Anhand des Prozessverlaufs sind deutlich die drei wesentlichen Wachstumsphasen bei der Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen erkennbar. Die exponentielle Wachstumsphase ist nach ca. 25 h beendet. Das Wachstum findet mit Stärke als Kohlenstoffquelle statt. Während dieser Phase ist der größte Sauerstoffverbrauch durch die Mikroorganismen zu verzeichnen, so dass der pO_2 durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl beziehungsweise der Begasungsrate auf über 30 % geregelt werden musste. Der pH steigt in dieser Phase von 5,5 auf $> 6,4$ und die Biotrockenmassekonzentration (BTM) nimmt auf ca. 15 g L^{-1} zu.

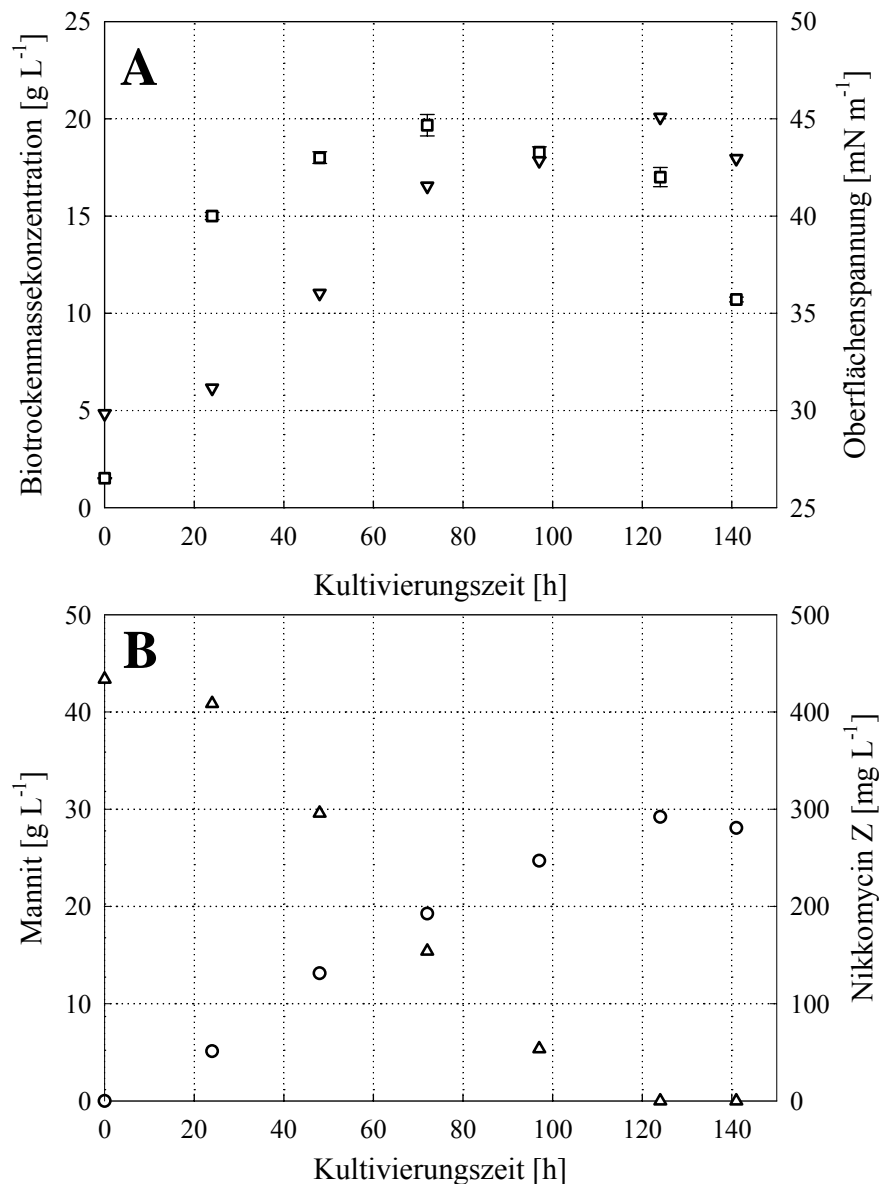


Abb. 5.2: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und Oberflächenspannung (umgedrehte Dreiecke) (A), sowie Mannitkonzentration (Dreiecke) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) (B) bei der Satzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; $V = 2000 \text{ mL}$).

Während der stationären Phase (bis ca. 120 h) ist der Sauerstoffverbrauch der Mikroorganismen gering, wobei die BTM auf ca. 20 g L^{-1} zunimmt. Die gemessenen Werte stimmen dabei sehr gut mit denen von Schüz *et al.* (1993) überein, die in einem ähnlichen Kultivierungsmedium fast identische Biotrockenmassekonzentrationen ermittelten. Die weitere Zunahme der BTM nach der exponentiellen Wachstumsphase muss nicht ausschließlich wachstumsassoziiert sein. Demain (1968) und Bu'Lock (1975) fanden in ihren Untersuchungen, dass ein großer Teil der BTM während der stationären Phase aus intrazellulären Speicherstoffen besteht, weswegen es zu einem „scheinbaren Wachstum“ in dieser Phase kommen kann. Der etwas unstetige Verlauf des $p\text{O}_2$ während der stationären Phase ist auf die zunehmende Viskosität (siehe auch Kapitel 5.1.2) und auf teilweise auftretendes Wandwachstum zurückzuführen. Weiterhin sinkt während der stationären Phase der pH auf ca. 5,7.

Nach ca. 115 h Kultivierungszeit beginnt die Absterbephase und es kommt zur Abnahme der BTM, sowie zu einem starken Anstieg des pH in den basischen Bereich.

Abbildung 5.2B zeigt, dass die Nikkomycinbildung weitestgehend mit dem Mannitverbrauch korreliert. Während der exponentiellen Wachstumsphase findet wenig Bildung von Nikkomycin Z statt. Die Hauptproduktbildung erfolgt, wie bei Sekundärmetaboliten üblich, während der stationären Phase. Maximal wurden nach ca. 120 h Prozesszeit 300 mg L^{-1} Nikkomycin Z gebildet. Nach dieser Prozesszeit war ebenfalls das im Medium vorhandene Mannit verbraucht. Die leichte Abnahme des Nikkomycin Z am Ende des Prozesses lässt sich mit einem Zerfall bei $\text{pH} > 6$ erklären (siehe Abb. 5.1, Crüger *et al.* 1985).

Während des gesamten Prozesses bis zur Absterbephase bei ca. 120 h ist ein Anstieg der Oberflächenspannung zu erkennen (Abb. 5.2A), wie dies auch von Badino *et al.* (2001) bei der Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen beobachtet wurde.

Da in der exponentiellen Wachstumsphase unlimitiertes Wachstum vorliegt, kann die maximale spezifische Wachstumsrate aus einer Linearisierung der Messwerte, zum Beispiel des $p\text{O}_2$ oder der Abgasdaten, abgeschätzt werden. Für den verwendeten Stamm *S. tendae* W42-0 wurde diese zu $\mu_{max} = 0,18 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den in der Literatur gefundenen spezifischen maximalen Wachstumsraten für *S. tendae* überein, die je nach Stamm zwischen $0,12$ und $0,3 \text{ h}^{-1}$ liegen (Lohr *et al.* 1989, Schüz *et al.* 1993).

Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase ist der Sauerstoffverbrauch durch die Mikroorganismen während der gesamten Kultivierung am größten. Demzufolge kann aus dem im Medium gemessenen $p\text{O}_2$ und dem Sauerstoffverbrauch im Abgasstrom der

maximale $k_L a$ abgeschätzt werden (siehe Kapitel 3.1.3, Gleichung 17 und 18). Für die vorliegende Kultivierung wurde $k_L a_{max} \approx 0,12 \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Dieser Wert ist demzufolge zur Auslegung der Prozesse im Milliliter-Bioreaktor heranzuziehen.

5.1.2 Charakterisierung des rheologischen Verhaltens

Bei der Kultivierung von *S. tendae* ändert sich die Viskosität des Kulturmediums stark. Eine genauere Kenntnis des rheologischen Verhaltens des Kulturmediums ist vor allen Dingen für die Skalierung der Prozesse von großer Bedeutung, da wichtige verfahrenstechnische Parameter (zum Beispiel Leistungseintrag, $k_L a$) stark beeinflusst werden (siehe auch Kapitel 3.1.5).

Zur Betrachtung der rheologischen Eigenschaften des Kulturmediums wurden in regelmäßigen Abständen während der Kultivierung die jeweiligen Fließkurven bestimmt (Abb. 5.3). Zu Beginn des Prozesses zeigt sich ein niedrigviskoses Newton'sches Verhalten der Kulturlösung mit einer Viskosität von ca. 1 mPa s.

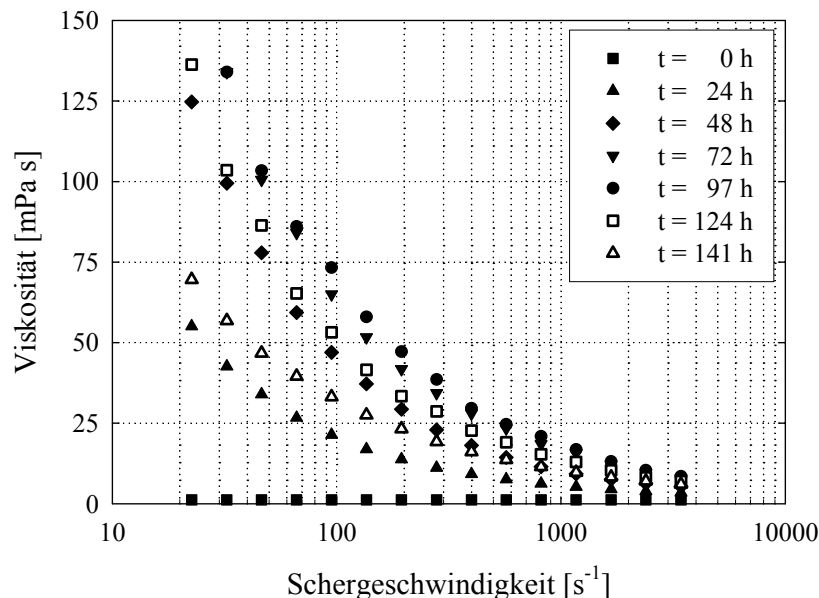


Abb. 5.3: Fließkurven der Kulturlösung für unterschiedliche Prozesszeitpunkte bei der Satzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; $V = 2000 \text{ mL}$).

In der exponentiellen Phase erhöht sich aufgrund des Wachstums der Mikroorganismen die Viskosität des Kulturmediums stark und es liegt ein strukturviskoses nicht-Newton'sches Verhalten vor. Bis zu einer Prozesszeit von 100 h steigt die Viskosität weiter an. Danach ist, analog zur Abnahme der BTM, ebenfalls eine Abnahme der Viskosität zu verzeichnen (offene Symbole, Abb. 5.3).

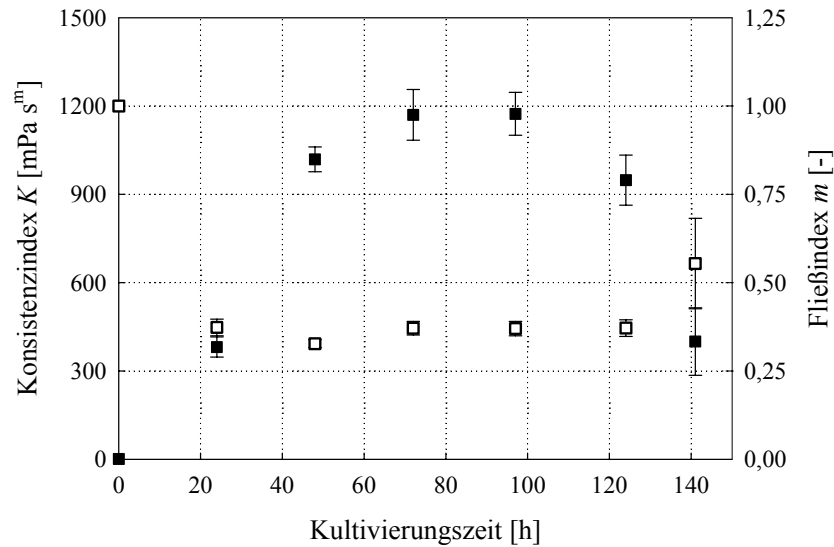


Abb. 5.4: Ermittelte rheologische Parameter Konsistenzindex (schwarze Quadrate) und Fließindex (weiße Quadrate) bei der Satzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$).

Durch eine Modellierung der Fließkurven mit dem Ostwald-de-Waele Gesetz (Gleichung 25) kann der zeitliche Verlauf des Konsistenzindex K und des Fließindex m über die Kultivierungszeit dargestellt werden (Abb. 5.4). Der Konsistenzindex steigt dabei zunächst stark an, bis er während der stationären Phase mit ca. 1200 mPa s^m ein Plateau erreicht. Der Fließindex sinkt zunächst stark und bleibt anschließend relativ konstant. Am Ende der Kultivierung sinkt der Konsistenzindex und der Fließindex steigt wieder an. Der Verlauf beider Parameter entspricht dabei qualitativ sehr gut dem für andere Actinomyceten aus der Literatur bekannten Verhalten (Warren *et al.* 1995).

Zur Auslegung von Reaktoren und zur Maßstabsübertragung der Ergebnisse wird das strukturviskose Verhalten der Kulturlösung vereinfachend mittels einer effektiven Viskosität (η_{eff}) beschrieben. Dazu muss für die Betriebsbedingungen des Laborrührreaktors eine effektive Schergeschwindigkeit (γ_{eff}) bestimmt werden (siehe Kapitel 3.1.6).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzepte nach Kelly und Gigas (2003, Gleichung 31) und Perez *et al.* (2006, Gleichung 33) zur Bestimmung der effektiven Schergeschwindigkeit verwendet, da beide Gleichungen auch für den turbulenten Strömungsbereich Gültigkeit besitzen. Für eine Rührerdrehzahl von 800 min^{-1} im Laborrührreaktor ergibt sich demnach ein Schergeschwindigkeitsbereich von 444 bis 1243 s^{-1} . Die relativ große Schwankungsbreite der Schergeschwindigkeiten zeigt bereits, dass nur eine grobe Abschätzung der auftretenden effektiven Viskositäten möglich ist. Abbildung 5.5 zeigt den Bereich der mit den beiden Schergeschwindigkeitskonzepten berechneten effektiven

Viskositäten während der in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Kultivierung von *S. tendae*. Die höchsten Viskositäten von 15 bis 25 mPa s liegen während der stationären Phase vor. Dieser Viskositätsbereich muss für den Betrieb des Milliliter-Bioreaktorsystems berücksichtigt werden.

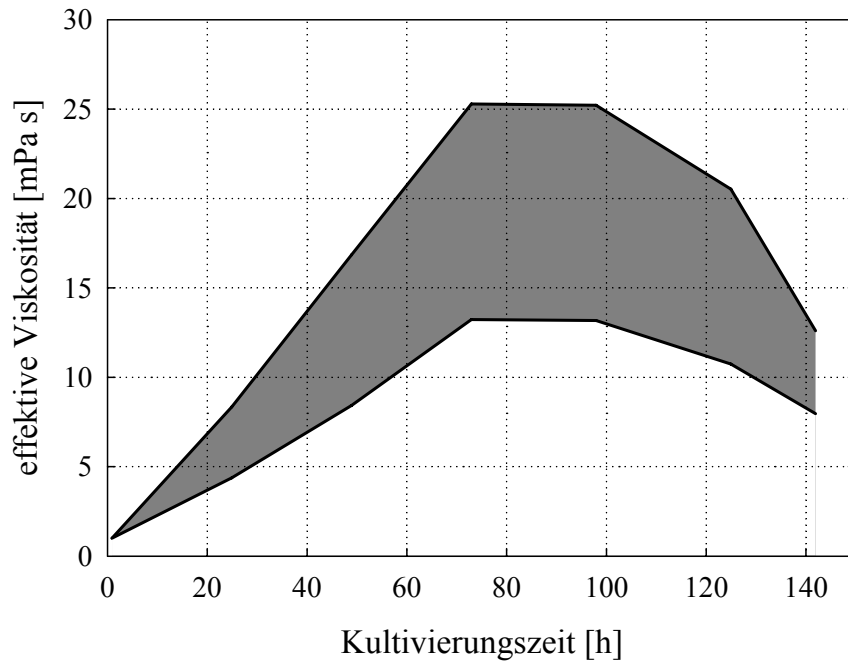


Abb. 5.5: Ermittelter Bereich der effektiven Viskositäten bei der Satzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Laborrührreaktor unter Anwendung der Schergeschwindigkeitskonzepte nach Perez *et al.* (2006) (Untergrenze des Datenbereichs) und Kelly und Gigas (2003) (Obergrenze des Datenbereichs) ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$).

In Tabelle 5.1 sind zusammenfassend die wichtigsten Prozesscharakteristika der Referenzkultivierung von *S. tendae* W42-0 im Laborrührreaktor angegeben. Anhand der ermittelten Parameter kann die Auslegung der Prozesse im Milliliter-Bioreaktor erfolgen.

Tab. 5.1 Ermittelte Prozessparameter bei der Referenzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$).

Prozessparameter	ermittelter Referenzwert
$k_L a_{max}$ [s^{-1}]	0,12
μ_{max} [h^{-1}]	0,18
effektive Schergeschwindigkeit [s^{-1}]	444 - 1243
Maximale effektive Viskosität [mPa s]	15 - 25

5.1.3 Identifikation geeigneter Modellfluide

Wie bereits in Kapitel 5.1.2 gezeigt, ändert bei der Kultivierung von *Streptomyces tendae* das Kulturmedium mit steigender Biomassekonzentration seine Fließeigenschaften von Newton'schem zu strukturviskosem nicht-Newton'schen Verhalten. Damit dieses Verhalten bei der verfahrenstechnischen Charakterisierung von Bioreaktoren abgebildet werden kann, ist es praktikabel, Modellfluide zu verwenden, die ähnliche rheologische Eigenschaften wie die Kulturlösung besitzen. Häufig werden dazu Pullulan, Carboxymethylcellulose, Polyacrylamid (Henzler und Schäfer 1987) und Xanthan (Henzler 2007, Campesi *et al.* 2009) als Modellfluide in der Literatur genannt.

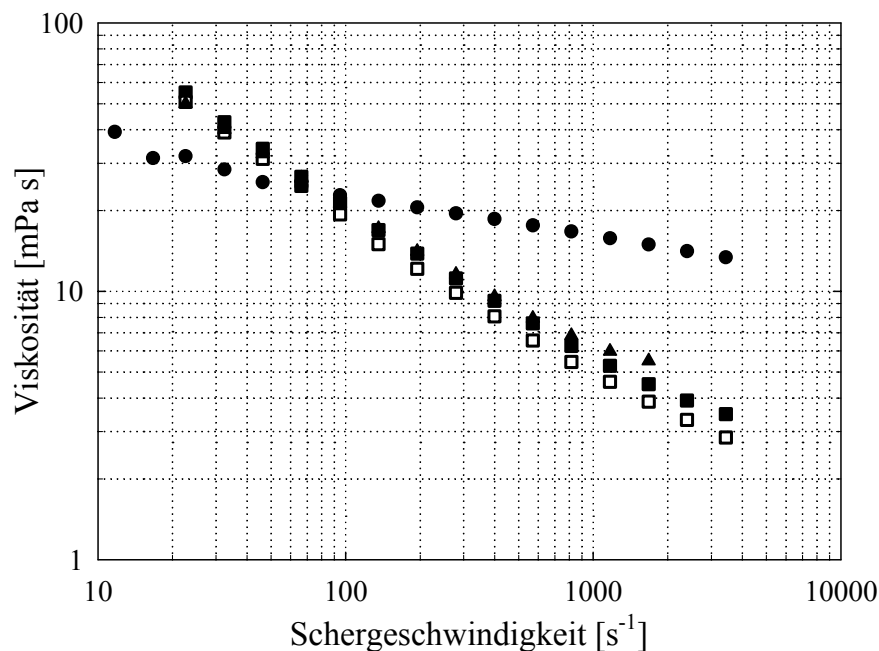


Abb. 5.6: Fließkurven einer Xanthan-Lösung (0,2 % schwarze Quadrate), Polyacrylamid-Lösung (0,1 % Dreiecke), sowie Carboxymethylcellulose-Lösung (1 % Kreise) im Vergleich zu einer *Streptomyces tendae* Kulturlösung bei einer Kultivierungszeit von 24 h (weiße Quadrate).

Abbildung 5.6 zeigt experimentell, dass Xanthan-Lösungen und Polyacrylamid-Lösungen das strukturviskose Verhalten von *S. tendae* sehr gut nachbilden. Der Verlauf der gemessenen Viskositäten deckt sich über den gesamten messtechnisch erfassten Schergeschwindigkeitsbereich. Carboxymethylcellulose zeigt ein nur gering ausgeprägtes strukturviskoses Verhalten und kommt deshalb als Modellfluid nicht in Frage. In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Polyacrylamid bei der Bestimmung des k_{La} mit der dynamischen Sulfitmethode (siehe auch Kapitel 4.2.3) chemisch mit Natriumsulfit reagiert.

Aus diesem Grund wurde Xanthan als geeignetes strukturviskoses Modellfluid für die folgenden Untersuchungen festgelegt.

Durch Modellierung der Fließkurven mit dem Ostwald-de-Waele Gesetz (Gleichung 25) lässt sich das Fließverhalten (Fließindex m über Konsistenzindex K aufgetragen) für die Xanthan-Lösungen unterschiedlicher Konzentration bestimmen. Abbildung 5.7 zeigt, dass das Fließverhalten der Xanthan-Lösungen gut mit den *S. tendae*-Kulturlösungen über einen breiten Bereich von $1 - 1200 \text{ mPa s}^m$ (Konsistenzindex) und $0,3 - 1$ (Fließindex) übereinstimmt. Damit kann der gesamte Bereich der Kultivierung von *S. tendae* durch die Modellfluide gut abgebildet werden. Die ermittelten Parameter des Ostwald-de-Waele Gesetzes für die jeweilige Xanthan-Lösung sind in Anhang A1 angegeben.

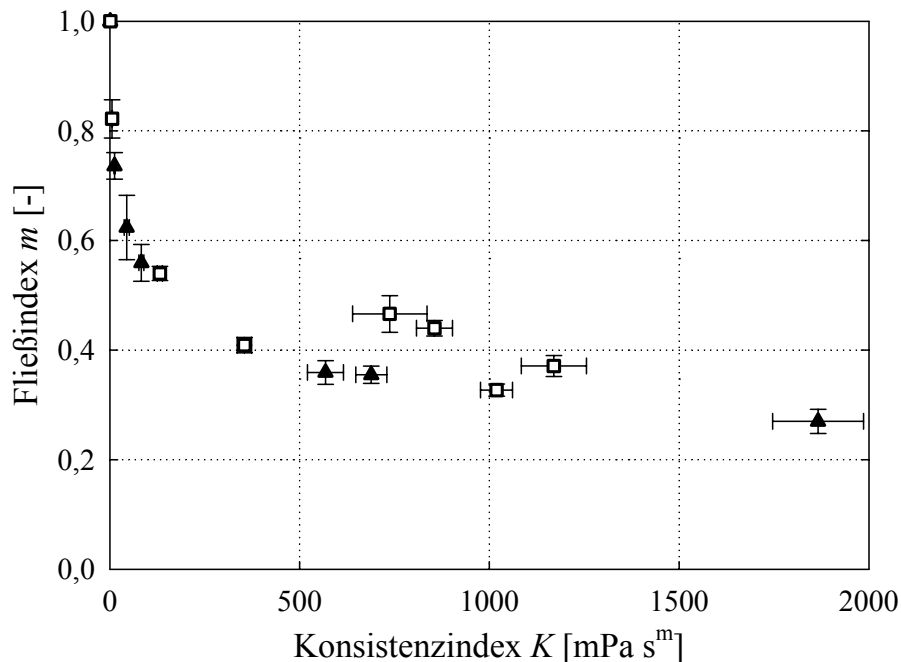


Abb. 5.7: Fließverhalten von Xanthan-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (Dreiecke) im Vergleich zu *Streptomyces tendae* Kulturlösungen (Quadrate).

Für die Durchführung weitergehender verfahrenstechnischer Charakterisierungen wurden ebenfalls Modellfluide mit Newton'schen Eigenschaften näher betrachtet. Dazu wurde die Viskosität von Polyethylenglykol-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen im Rheometer bestimmt (Tab. 5.2). Die Viskosität des Modellfluids liegt dabei mit $3 - 30 \text{ mPa s}$ in dem im Modellversuch abgeschätzten Bereich (siehe auch Abb. 5.5). Folglich stehen für nachfolgende verfahrenstechnische Charakterisierungen sowohl Newton'sche, als auch strukturviskose Modellfluide zur Abbildung viskoser Kulturmedien zur Verfügung.

Tab. 5.2: Gemessene Viskosität für Newton'sche Polyethylenglykol-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Anteil (w/v)	Viskosität [mPa s]
5 %	3,0
10 %	7,3
15 %	10,9
17,5 %	14,0
20 %	30,2

5.2 Kultivierung von *Streptomyces tendae* im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan

5.2.1 Parallele Kultivierung

Nach Etablierung eines Referenzprozesses zur Satzkultivierung von *S. tendae* im Laborrührreaktor wurden Kultivierungsversuche im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan (Puskeiler *et al.* 2005a) vorgenommen. Ziel der Untersuchung war es zu ermitteln, ob eine Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen in dem für einzellige Mikroorganismen konstruierten Milliliter-Bioreaktorsystem möglich ist.

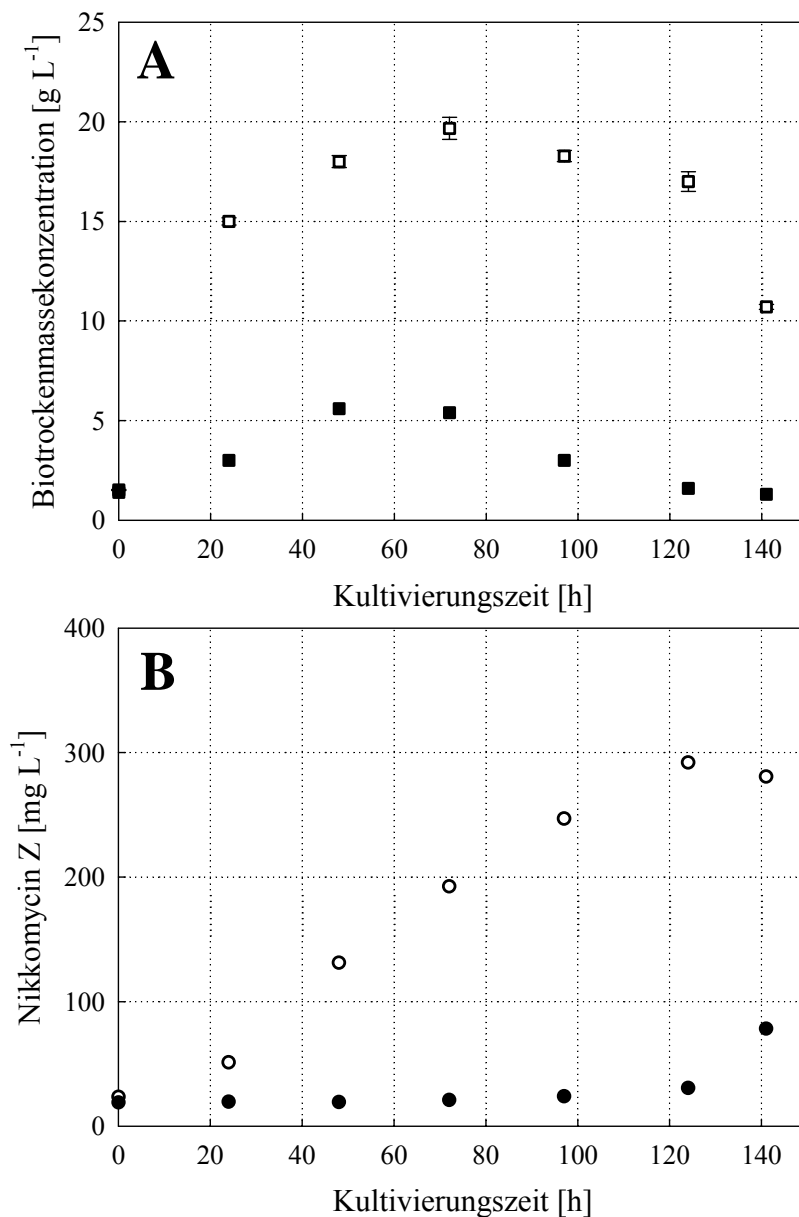


Abb. 5.8: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) (A) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) (B) bei der Satzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 in 12 parallelen Milliliter-Bioreaktoren mit Gas-induzierendem Rührorgan (geschlossene Symbole; $T = 29\text{ °C}$; $V = 12\text{ mL}$; $n = 2000\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zu einer Referenzkultivierung im Laborrührreaktor (offene Symbole; $T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$).

Üblicherweise wird das Gas-induzierende Rührorgan mit einer Rührerdrehzahl von 2800 min^{-1} betrieben, um einen möglichst hohen Sauerstoffeintrag zu ermöglichen (Kusterer *et al.* 2008). Da bei der Kultivierung von *S. tendae* ein geringerer Sauerstoffbedarf vorliegt (siehe Kapitel 5.1.1) und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften besteht, wurde die Drehzahl für diese Kultivierungen auf 2000 min^{-1} abgesenkt.

Abbildung 5.8 zeigt die *offline* gemessenen Werte von 12 parallelen Milliliter-Bioreaktoren im Vergleich zur Referenzkultivierung im Laborrührreaktor. Es konnte nur wenig Wachstum mit einer maximalen BTM von 5 g L^{-1} in den Milliliter-Bioreaktoren gemessen werden. Dieser Wert ist ca. 4-mal niedriger, als die im Referenzsystem ermittelte Biotrockenmassekonzentration (Abb. 5.8A). Bei Betrachtung des Kulturmediums unter dem Mikroskop zeigte sich nur vereinzelt Mycel und folglich eine niedrigviskose Kulturflüssigkeit. Aufgrund des geringen Wachstums wurde im Vergleich zum Laborrührreaktor fast kein Nikkomycin Z gebildet (Abb. 5.8B).

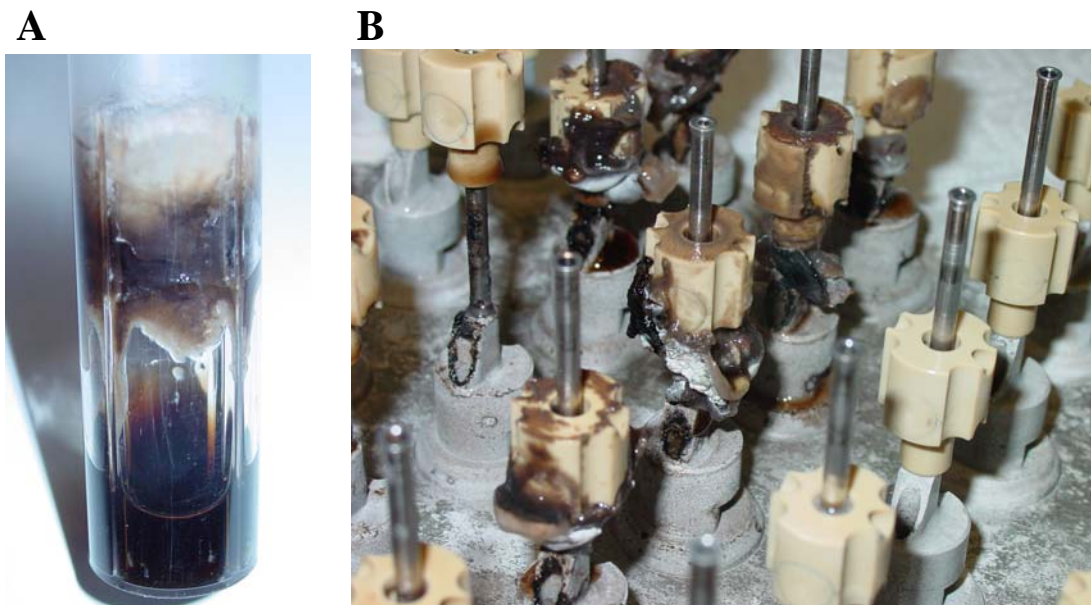


Abb. 5.9: Wachstum an Reaktorwand (A) und Rührerachse (B) nach 48 h bei der Kultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan ($T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; $V = 12 \text{ mL}$; $n = 2000 \text{ min}^{-1}$).

Eines der größten Probleme während der Kultivierung war das starke Wachstum der Mikroorganismen an der Reaktorwand. Bereits nach 48 h Kultivierungszeit befand sich ein Großteil der Biomasse oberhalb der Kulturflüssigkeit (Abb. 5.9A). Weiterhin wurde ebenfalls ein Bewuchs der Rührorgane und -achsen festgestellt (Abb. 5.9B). Ein weiteres Absenken der Rührerdrehzahl weit unter 2000 min^{-1} war nicht möglich, da bei dem Gas-induzierenden Rührorgan erst ab 1800 min^{-1} ein messbarer Gaseintrag stattfindet, welcher

für die Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff notwendig ist. Auch bei einer Rührerdrehzahl von 1800 min^{-1} konnte kein ausreichendes Wachstum von *S. tendae* beobachtet werden.

Eine Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen im Milliliter-Bioreaktorsystem mit dem Gas-induzierenden Rührorgan ist demzufolge nicht möglich. Aufgrund der Kultivierungsversuche können die folgenden Ursachen identifiziert werden, die sich wahrscheinlich gegenseitig bedingen:

- zu hohe Scherkräfte im Milliliter-Reaktor so dass wenig Wachstum im Medium stattfindet
- unvorteilhaftes Oberflächen-Volumen-Verhältnis im Milliliter-Reaktor, welches Wachstum an der Reaktorwand begünstigt
- zu wenig Turbulenz/Kräfte im Flüssigkeitsbereich oberhalb des Rührorgans, so dass sich Biomasse sukzessive im Kopfraum anreichern kann

5.2.2 Sauerstoffübergang bei viskosen Fluiden

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass eine Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen mit dem Gas-induzierenden Rührorgan im Bioreaktorblock nicht möglich ist. Durch eine weitere verfahrenstechnische Charakterisierung des Rührorgans sollte ermittelt werden, ob das bestehende Gas-induzierende Prinzip für den Sauerstoffeintrag in viskose Fluide geeignet ist. Zur Modellierung Newton'scher Medien wurden Polyethylenglykol-Lösungen (PEG) unterschiedlicher Konzentration eingesetzt. Für nicht-Newton'sche Medien kamen Xanthan-Lösungen (XG) zum Einsatz (siehe Kapitel 5.1.3).

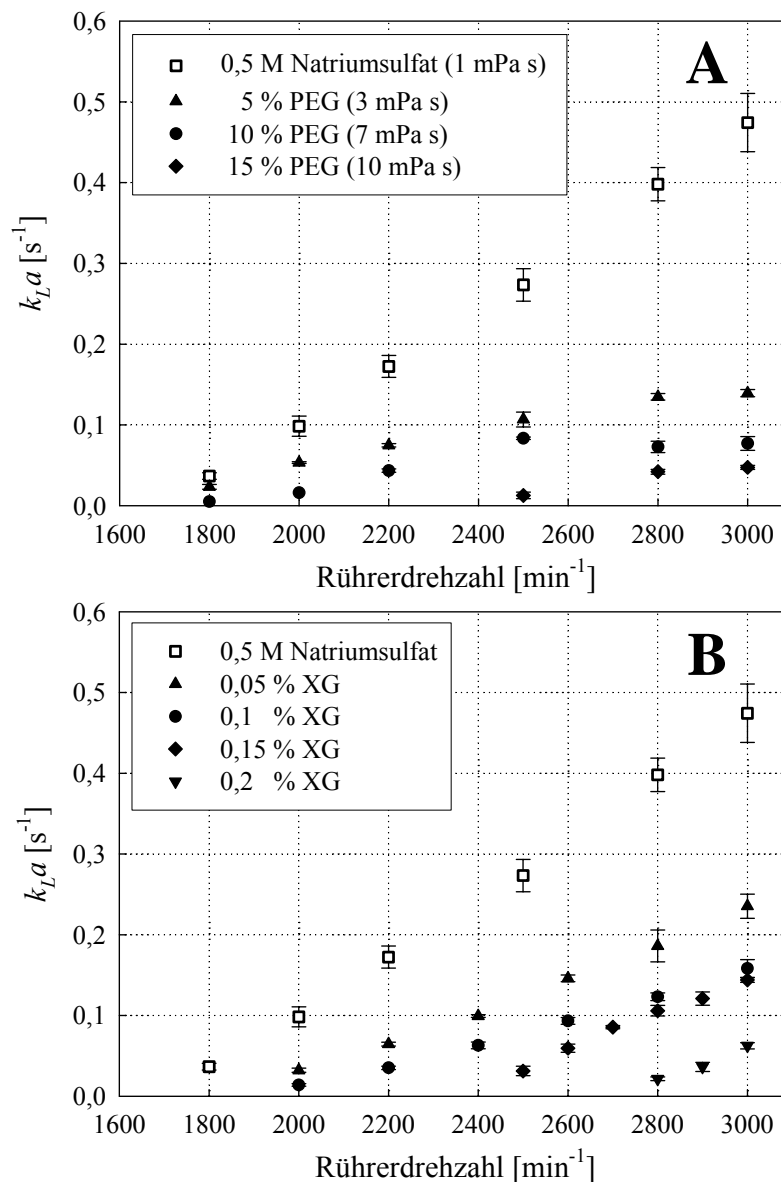


Abb. 5.10: Mittels der dynamischen Sulfitmethode ermittelte k_{La} für unterschiedliche viskose Newton'sche (A; Polyethylenglykol-Lösungen; PEG) und nicht-Newton'sche Medien (B; Xanthan-Lösungen; XG) für das Gas-induzierende Rührorgan im Vergleich zu wässriger Natriumsulfat-Lösung als Referenz ($T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $V = 12 \text{ mL}$).

Abbildung 5.10 zeigt die mit der dynamischen Sulfitmethode ermittelten $k_L a$ für unterschiedliche viskose Newton'sche und nicht-Newton'sche Fluide unter nicht-koaleszierenden Bedingungen. In wässrigen Fluiden sind, abhängig von der Rührerdrehzahl, sehr hohe Werte von $k_L a > 0,4 \text{ s}^{-1}$ messbar. Diese liegen deutlich über dem in Laborbioreaktoren unter Standardbedingungen erreichbaren $k_L a$ und zeigen, dass das Gas-induzierende Rührorgan für hohe Sauerstoffeinträge optimiert ist. Sobald die Viskosität des Mediums ansteigt, ist ein starker Abfall des $k_L a$ zu beobachten. Ab Viskositäten $> 10 \text{ mPa s}$ ist bei den Newton'schen Fluiden der Sauerstoffübergang messtechnisch nicht mehr erfassbar (Abb. 5.10A). Bei den nicht-Newton'schen Xanthan-Lösungen ist ab 0,2 % (w/v) über den gesamten Drehzahlbereich kein Sauerstoffeintrag mehr messbar. Im Vergleich zu $k_L a$ -Messungen in den Newton'schen Fluiden zeigt sich bei den Xanthan-Lösungen für alle Konzentrationen ein deutlich steilerer Anstieg der Messwerte über die Drehzahl (Abb. 5.10B). Dieser Unterschied ist mit der bei höheren Rührerdrehzahlen abnehmenden Viskosität des strukturviskosen Fluids zu erklären und bestätigt den erwarteten Messwertverlauf.

Da anhand des Referenzprozesses ein Viskositätsbereich von 15 – 25 mPa s bei den Kultivierungen abgeschätzt wurde (siehe Abb. 5.5) beziehungsweise das strukturviskose Verhalten Xanthan-Lösungen $> 0,2 \%$ entspricht, zeigt dies, dass das Gas-induzierende Rührorgan nicht für den Einsatz in höher viskosen Fluiden geeignet ist.

Damit in dem ermittelten Einsatzbereich dennoch eine Vorhersage des $k_L a$ möglich ist, wurden die Werte durch ein empirisches Modell beschrieben. Da für das Gas-induzierende Rührorgan keine Gasleerrohrgeschwindigkeit bekannt ist, kann Gleichung 27 zur Modellierung nicht verwendet werden. Weiterhin ist keine effektive Schergeschwindigkeit bekannt, so dass keine repräsentative Viskosität bestimmt werden kann. Aus diesem Grund wurde der Ansatz nach Campesi *et al.* (2009) gewählt:

Newton'sche Fluide:

$$k_L a = a \cdot n^b \cdot \eta^c \quad (37)$$

nicht-Newton'sche Fluide:

$$k_L a = d \cdot n^e \cdot K^f \quad (38)$$

$a - f$... empirische Parameter [-]

n ... Rührerdrehzahl [min^{-1}]

K ... Konsistenzindex [mPa s^m]
 η ... dynamische Viskosität [mPa s]

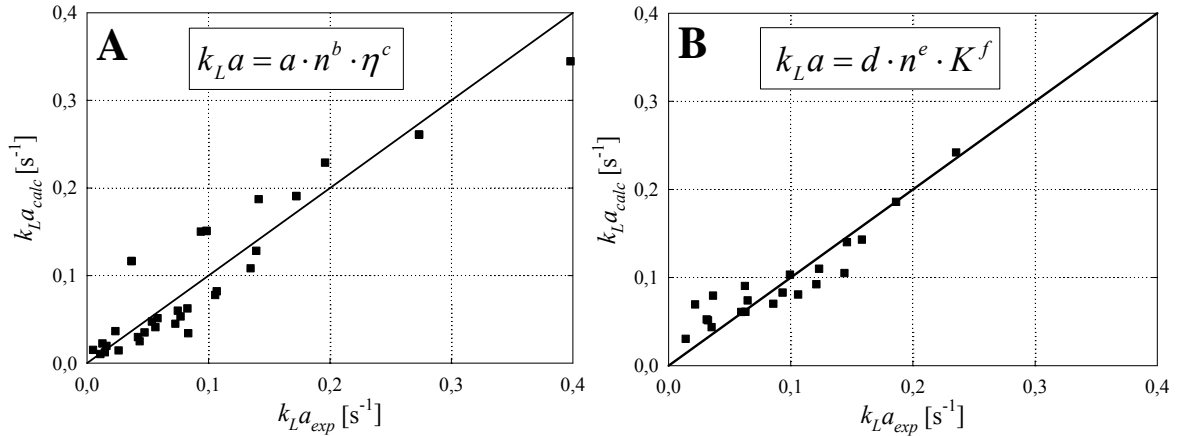


Abb. 5.11: Paritätsplot der experimentell ermittelten und mit der mit Gleichung 37 für Newton'sche (A) und Gleichung 38 für nicht-Newton'sche Fluide (B) modellierten $k_L a$ im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan ($a = 2,5 \times 10^{-11}$; $b = 2,950$; $c = -1,171$; $d = 8,1 \times 10^{-14}$; $e = 3,707$; $f = -0,397$).

Nachteil von Gleichung 37 und 38 ist, dass sie nur systemspezifisch anwendbar sind und keine skalierbaren Aussagen ermöglichen. Dennoch können die ermittelten experimentellen Werte sehr gut mit den Modellen beschrieben werden (Abb. 5.11), so dass beide Korrelationen zukünftig zur Vorhersage des $k_L a$ im niedrig viskosen Bereich verwendet werden können.

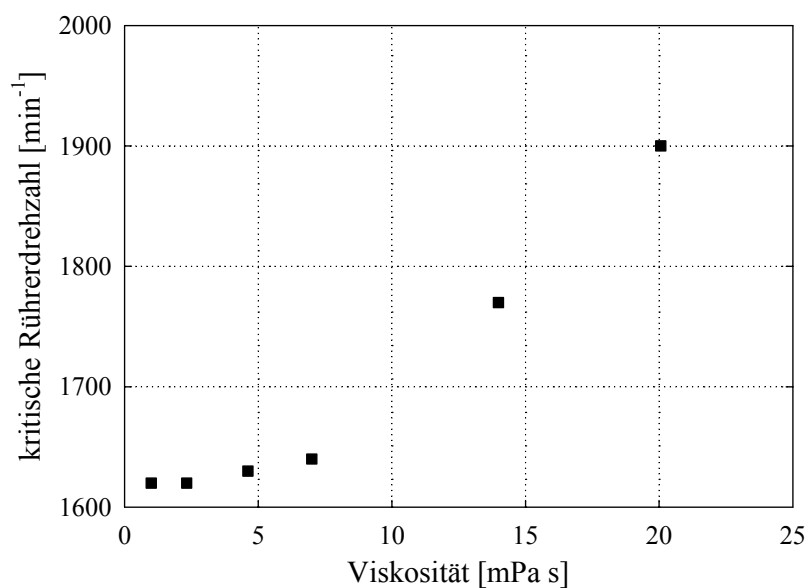


Abb. 5.12: Ermittelte kritische Rührerdrehzahl für das Gas-induzierende Rührorgan für unterschiedlich viskose Newton'sche Fluide ($V = 12$ mL).

Die kritische Rührerdrehzahl – die Drehzahl, ab der bei Gas-induzierenden Rührern Gaseintrag erfolgt – stellt eine weitere wichtige Prozessgröße für derartige Rührorgane dar. Nach Sawant und Joshi (1979) steigt die kritische Rührerdrehzahl bei dem Einsatz in viskosen Fluiden stark an und verändert somit maßgeblich den Betriebsbereich des Rührorgans. Abbildung 5.12 zeigt die ermittelten Werte für die kritische Rührerdrehzahl in unterschiedlich viskosen Fluiden. Es ist ein starker Anstieg von ca. 1620 min^{-1} bei annähernd wässrigen Fluiden ($1 - 5 \text{ mPa s}$) bis auf über 1900 min^{-1} bei 20 mPa s zu erkennen. Die Bestimmung der Gasinduktion bei Fluiden mit höherer Viskosität gestaltete sich als schwierig, da sich nur noch vereinzelt große Blasen aus dem Rührer lösten und keine Laufstabilität mehr gewährleistet war. Da nach Liepe *et al.* (1988) mit zunehmender Rührerdrehzahl auch die maximale lokale Energiedissipation steigt (Gleichung 20), hat dies eine weitere Erhöhung der Scherbeanspruchung der Mikroorganismen zur Folge.

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits durch $k_L a$ -Messungen und Kultivierungen gewonnene Erkenntnis, dass Gas-induzierende Rührorgane nicht für den Einsatz in höher viskosen Medien geeignet sind.

5.3 Entwicklung eines neuartigen Paddelrührorgans für Milliliter-Bioreaktoren

5.3.1 Rührerkonzept

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich das Gas-induzierende Rührorgan nicht zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen eignet. Folglich wurde ein neues Rührerkonzept entwickelt, das nachfolgend beschrieben wird:

Die Entwicklung umfasst ein neuartiges Paddelrührorgan in Kombination mit einem Bioreaktor ohne Strömungsbrecher. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Dabei dreht sich das paddelförmig ausgebildete Rührorgan um eine Achse, die in ein unbewehrtes Reaktionsgefäß eingebracht wird, wobei ein möglichst wandnaher Einbau des Rührorgans vorteilhaft ist. Die Ausführung des Paddels kann sowohl einseitig, als auch beidseitig der Achse ausgebildet sein. Im Ruhezustand taucht das Rührorgan nur teilweise in die Flüssigkeit ein. Der Antrieb des Rührorgans erfolgt magnetisch-induktiv durch in das Rührorgan eingebrachte Magnete, in Kombination mit einem Magnetantrieb außerhalb des Bioreaktors. Weiterhin ist das Rührorgan doppelt gelagert, um eine stabile Rotation zu gewährleisten.

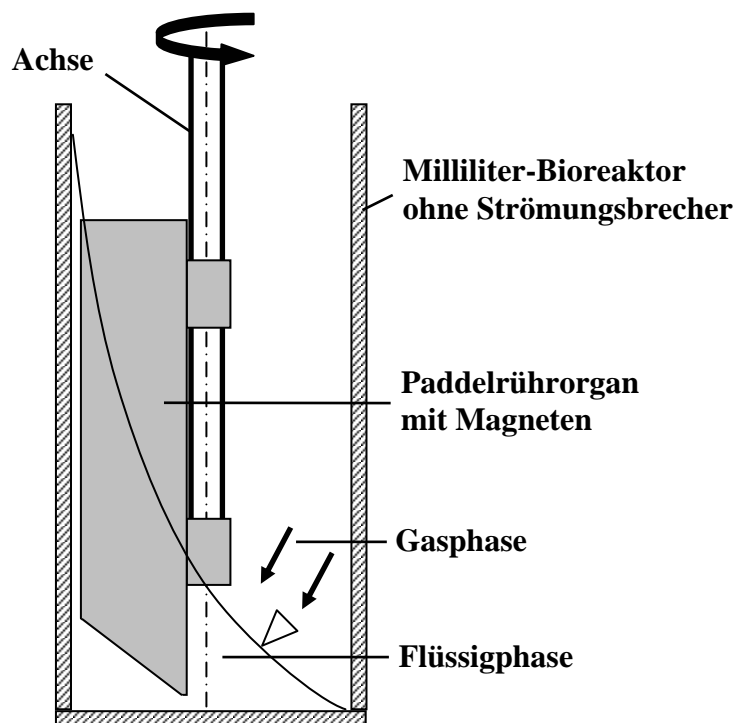


Abb. 5.13: Prinzipskizze des neu entwickelten Paddelrührorgans.

Wird das Rührorgan in schnelle Rotation versetzt, bewegt sich die Flüssigphase mit dem Rührorgan und es bildet sich eine rotierende Flüssigkeitslamelle, die sich entlang der

Reaktorwand ausbreitet. Mit steigender Rührgeschwindigkeit nimmt die Höhe der Flüssigkeitslamelle zu und vergrößert so das Oberflächen/Volumen-Verhältnis. Durch die entstehende Oberfläche kann über Oberflächenbegasung Sauerstoff in das Kulturmedium eingetragen werden. Aufgrund der Oberflächenbegasung wird ebenfalls die Schaumbildung stark minimiert, da keine Gasblasen im Reaktionsmedium vorliegen.

Weiterhin soll die schnell rotierende Lamelle Anlagerung/Wachstum von Feststoffen und Biomasse oberhalb der Flüssigkeit verhindern, vor allen Dingen durch die konstant am oberen Flüssigkeitsrand wirkende radiale Kraft der rotierenden Lamelle.

Übliche Einbaugeometrien des Rührorgans in den Reaktor sind dabei:

$$D / d < 1,1 \quad (39)$$

$$B / d \approx 0,3 \quad (40)$$

$$h / d \approx 3 \quad (41)$$

$$H / h \approx 0,5 \quad (42)$$

B ...Bodenabstand zwischen Reaktor und Rührorgan [m]

D ...Reaktordurchmesser [m]

d ...Rührerdurchmesser [m]

H ...Höhe der Flüssigkeitssäule im ungerührten Zustand [m]

h ...Höhe des Rührerblatts [m]

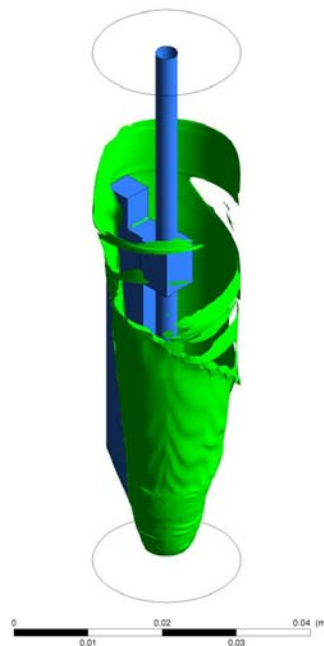


Abb. 5.14: CFD-Strömungssimulation der entstehenden freien Flüssigkeitsoberfläche des neuartigen Paddelrührorgans bei 1200 min^{-1} (Simulation: Stefanie Brüning).

Abbildung 5.14 zeigt die mittels *Computational Fluid Dynamics* (CFD) von Dipl.-Ing. Stefanie Brüning (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TU München) simulierte Flüssigkeitsbewegung des neuartigen Paddelrührorgans bei einer Rührerdrehzahl von 1200 min^{-1} . Die entlang der Reaktorwand rotierende Flüssigkeitslamelle ist gut erkennbar. Im quasi-stationären Zustand entspricht die Flüssigkeit annähernd einem Ausschnitt eines unsymmetrischen Rotationsparaboloids, der sich bis zum Reaktorboden ausbreitet. Die Simulation zeigt ebenfalls, dass ein sehr großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis durch das Rührorgan generiert wird.

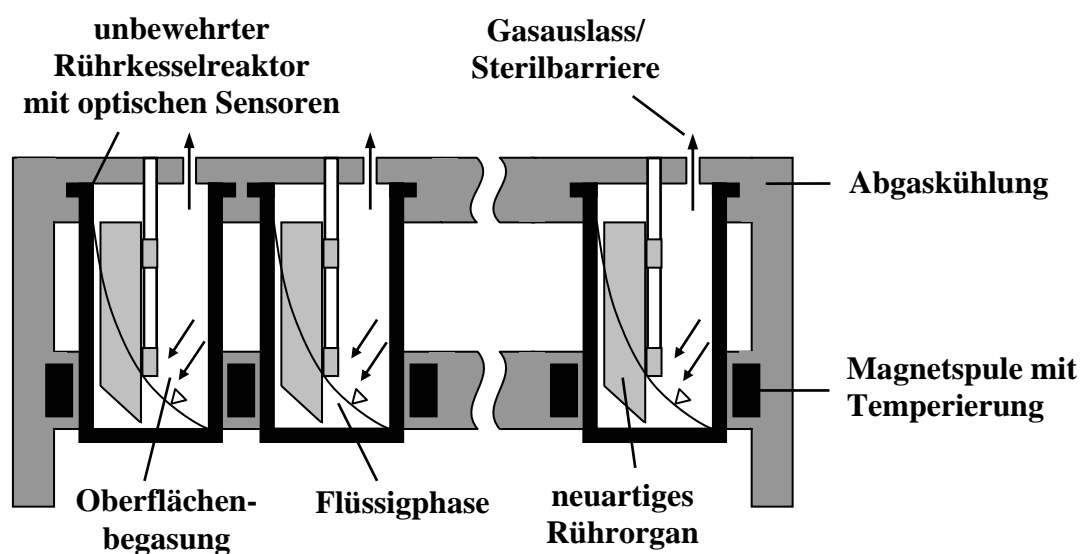


Abb. 5.15: Schematischer Aufbau der Parallelisierung der neu entwickelten Paddelrührorgane im Bioreaktorblock.

Zur Parallelisierung und Automatisierung der Bioreaktoren können diese im Bioreaktorblock (Weuster-Botz *et al.* 2005) betrieben werden (Abb. 5.15). Die im Bioreaktorblock enthaltenen Magnetspulen erzeugen ein rotierendes Magnetfeld, über das die einzelnen Rührorgane in Rotation versetzt werden. Weiterhin sorgen zwei vorhandene Wärmetauscher für die Temperierung des Reaktionsmediums beziehungsweise für die Kühlung des Abgasstroms zur Verminderung von Verdunstungseffekten. Für die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen wird Sterilgas über einen zentralen Anschluss in den Kopfraum jedes Reaktors eingebracht. Die Gasauslässe stellen dabei gleichzeitig einen sterilen Betrieb sicher, da ständig ein Luftstrom von den Reaktoren nach außen gelangt.

Zur *online* Prozessüberwachung sind die unbewehrten Einwegbioreaktoren weiterhin mit optischen Sensoren für pH und pO_2 ausgestattet (Kusterer *et al.* 2008). Damit ist ein

paralleler und automatisierter Betrieb von bis zu 48 Rührreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung gewährleistet.

5.3.2 Optimierung der Rührergeometrie

Nach der theoretischen Konzeption des neuen Rührerprinzips zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen im Milliliter-Maßstab wurden mehrere Rührerprototypen entworfen, die nachfolgend beschrieben und charakterisiert werden sollen. Die wichtigsten Evolutionsschritte bei der Prototypenentwicklung sind durch die Prototypen I – IV in Abbildung 5.16 zu erkennen.

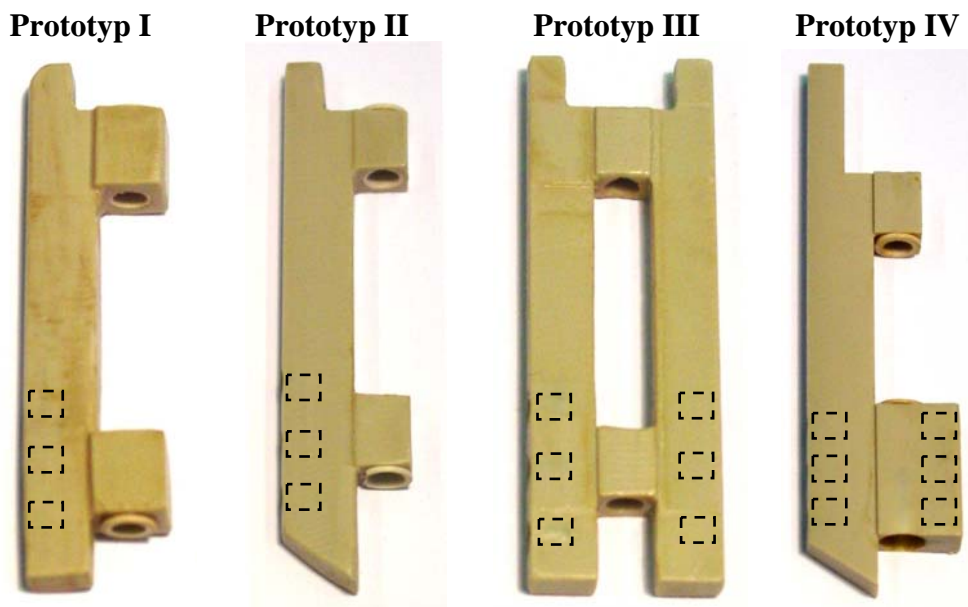


Abb. 5.16: Verschiedene Prototypen des Paddelrührorgans zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Die jeweils eingebauten Magnete sind schematisch angedeutet.

Prototyp I ist die erste Umsetzung des in Kapitel 5.3.1 vorgestellten Rührerprinzips. Das Rührorgan besteht aus einem einseitigen Paddel mit einfacher Rechtecksgeometrie und doppelter Lagerung für die Achse. In das Rührerpaddel sind drei Dauermagnete (3 x 3 mm) aus Samarium-Cobalt seitlich eingebracht. Messungen des $k_L a$ mit diesem Rührorgan ergaben im Drehzahlbereich von 400 bis 1400 min^{-1} Werte von 0,01 bis 0,13 s^{-1} (Abb. 5.17). Dies liegt in der im Referenzprozess ermittelten Größenordnung, die für ein Sauerstoff unlimitiertes Wachstum von Mycel bildenden Mikroorganismen notwendig ist (siehe Tab. 5.1). Damit konnte anhand von Prototyp I gezeigt werden, dass das Rührerprinzip

funktioniert und ein ausreichender Sauerstoffübergang durch die Oberflächenbegasung realisiert werden kann. Demzufolge wurde die Geometrie des Rührorgans weiter optimiert.

Bei Prototyp II ist die untere Kante des Rührpaddels in einem Winkel von 40° abgeschrägt, um die Turbulenz im unteren Bereich der Flüssigkeitslamelle zu verbessern. Dieser Prototyp erreicht über den gesamten Drehzahlbereich annähernd den gleichen k_{La} wie Prototyp I (Abb. 5.17).

Eine beidseitige Ausführung des Rührpaddels ist in Prototyp III realisiert. Der Vorteil dieser achsensymmetrischen Ausführung ist zum einen, dass durch ein geringeres auf die Achse wirkendes Moment ein stabileres Langzeitlaufverhalten vorliegt. Weiterhin können bei der doppelten Ausführung auf beiden Seiten des Paddels Magnete eingebaut werden, so dass durch eine gleichmäßigere Übertragung der Kraft des Magnetfeldes auf das Rührorgan ein stabileres Anfahr- und Laufverhalten vorliegt.

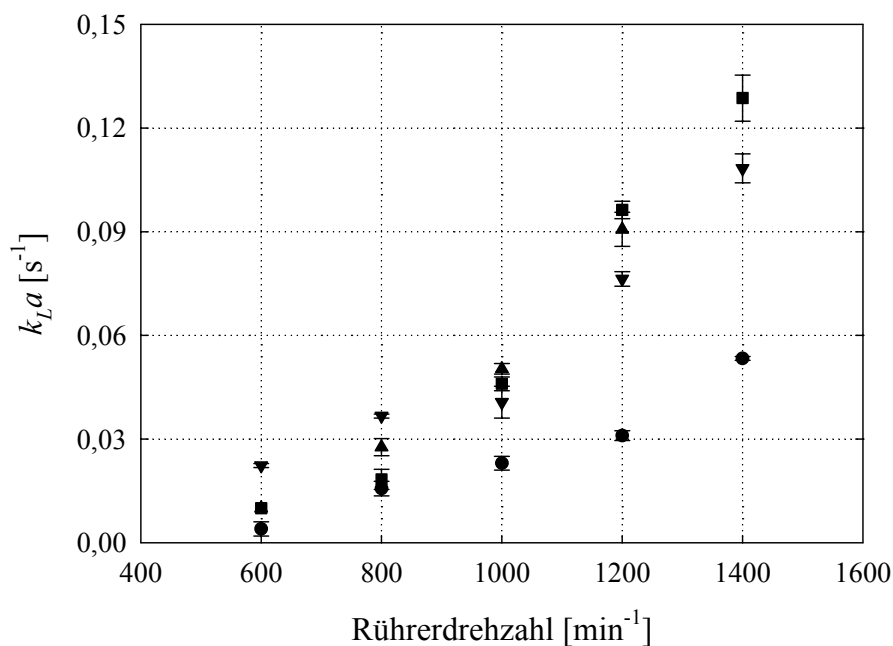


Abb. 5.17: Mittels der dynamischen Sulfitmethode gemessener k_{La} verschiedener Prototypen des Paddelrührorgans zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Prototyp I (Quadrate), Prototyp II (Dreiecke), Prototyp III (Kreise) und Prototyp IV (umgedrehte Dreiecke) ($T = 25^\circ\text{C}$; $V = 8\text{ mL}$; $0,5\text{ M Na}_2\text{SO}_4$).

Der Prototyp zeigte, wie gewünscht, ein deutlich stabileres Anfahr- und Laufverhalten auch über längere Prozesszeiten. Der gemessene k_{La} liegt allerdings signifikant unter den für einseitige Paddelrührorgane gemessenen Werten und erreicht nur maximal $\approx 0,05\text{ s}^{-1}$ bei 1400 min^{-1} (Abb. 5.17). Die entstehende Flüssigkeitslamelle ist bei diesem Prototyp sichtbar niedriger ausgeprägt. Der Grund dafür ist, dass das zweite symmetrisch angebrachte Paddel die komplette Ausbreitung der Flüssigkeitslamelle über den gesamten Reaktorumfang

verhindert. Damit vermindert sich auch das für die Oberflächenbegasung entscheidende Oberflächen/Volumen-Verhältnis und dies führt zu einem deutlich geringeren $k_L a$.

Um die Vorteile aus den Prototypen I und II (hohe erreichbare $k_L a$ und gute Durchmischung) sowie Prototyp III (stabileres Anfahr- und Laufverhalten) zu kombinieren, wurden Paddelrührorgane nach Prototyp IV konstruiert. Dabei ist dem einseitig ausgeprägten optimierten Paddel 180° um die Achse versetzt ein Gegengewicht vorgesehen. In dieses Gegengewicht sind ebenfalls Magnete eingebaut. Dadurch ist im Vergleich zu Prototyp I und II ein stabilerer Anfahrvorgang und eine gleichmäßigere Übertragung der Kraft des Magnetfeldes gewährleistet. Weiterhin sorgt das Gegengewicht für ein nutationsfreies und damit stabileres Laufverhalten. Damit der Verschleiß bei längeren Laufzeiten minimiert wird, wurden in die beiden Achsenlagerungen Lagerbuchsen aus einer Spezialkeramik eingepresst (Kusterer 2007).

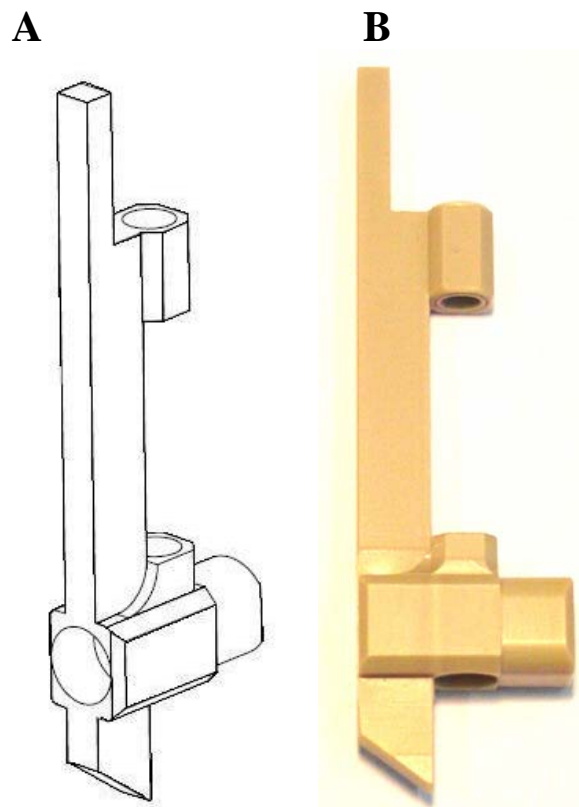


Abb. 5.18: Isometrische Darstellung (A) und Abbildung (B) des serienmäßiges Paddelrührorgans.

Der gemessene $k_L a$ ist trotz des angebrachten Gegengewichtes nur geringfügig niedriger als der von Prototyp I und II (Abb. 5.17). Bei niedrigen Rührerdrehzahlen von 600 bis 800 min^{-1} wird sogar ein etwas höherer $k_L a$ erreicht. Damit zeigt sich, dass dieser Prototyp sowohl bezüglich des erreichbaren Sauerstoffeintrags, als auch des Laufverhaltens zur Kultivierung von morphologisch veränderlichen Mikroorganismen auch über längere Prozesslaufzeiten

gut geeignet ist. Von diesem Prototyp wurde deshalb eine Kleinserie von 16 Stück gefertigt und sowohl verfahrenstechnische Charakterisierungen, als auch Kultivierungen in den Milliliter-Bioreaktoren vorgenommen.

Nach Optimierung und erfolgreichem Einsatz der Rührergeometrie gemäß Prototyp IV, wurde ein Konzept zur serienmäßigen, industriellen Fertigung des Rührorgans erarbeitet. Eine zentrale Problemstellung ist dabei eine Verkapselung der eingebauten Magnete zu ermöglichen, da diese bei längerem Einsatz nicht frei im Kulturmedium vorliegen sollten. Der Grund dafür ist zum einen die Korrosion der Magnete bei dauerhaftem Kontakt mit wässrigem Medium und zum anderen, dass freigesetzte Schwermetallionen aus den Magneten das Wachstum der Mikroorganismen beeinträchtigen könnten. Für die in Prototyp IV eingebauten 6 Rundmagnete konnte durch deren kleine Abmessung von 3 mm x 3 mm keine Möglichkeit zur Verkapselung gefunden werden. Aus diesem Grund wurde die Rührergeometrie im Bereich der unteren Achsenlagerung abgeändert, damit auf jeder Seite des Rührorgans ein Magnet mit den Abmessungen 6 mm x 3 mm eingebaut werden kann (Abb. 5.18). Diese größeren Magnete können durch eine Kunststoffkappe aus PEEK zuverlässig abgedichtet werden, die zusammen mit den Magneten in das Rührorgan eingepresst wird.

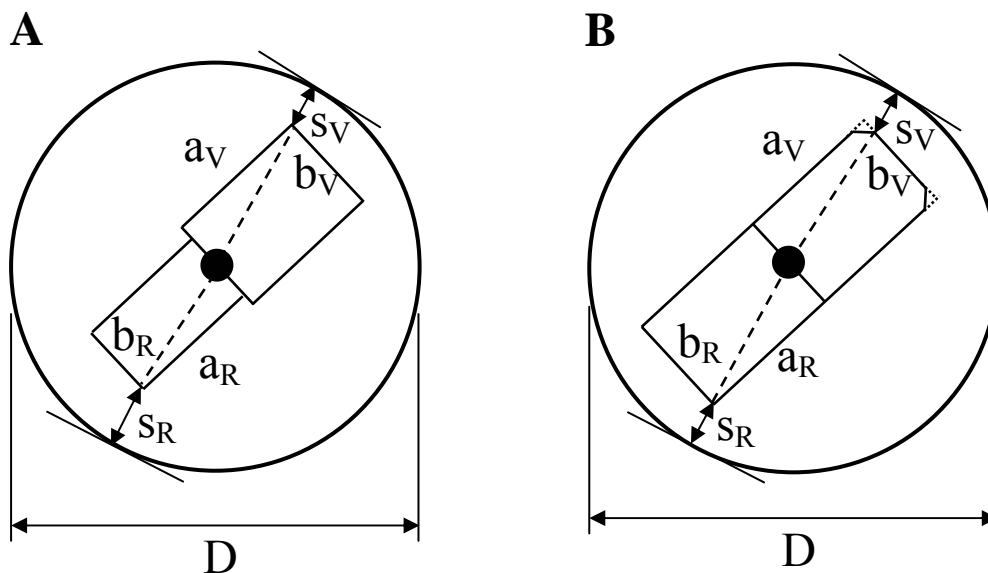


Abb. 5.19: Schematische Darstellung zur Berechnung des Spaltmaßes von Prototyp IV (A) und des serienmäßigen Paddelrührorgans (B) nach Gleichung 43.

Da vor allen Dingen im Milliliter-Maßstab vergleichsweise viel Flüssigkeit durch das Rührorgan selbst verdrängt wird, wurde bei der Konstruktion auf eine materialsparende Geometrie geachtet. Das Paddel ist demnach möglichst schmal ausgeführt und im Bereich

der Magnete ist ebenfalls wenig Material verbaut. Das entworfene Rührorgan ermöglicht somit Kultivierungen in einem breiten Bereich des Arbeitsvolumens von 8 bis 12 mL, so dass problemlos auch Zulaufverfahren realisiert werden können.

Ein weiterer zentraler Punkt bei der Konstruktion des serienmäßigen Rührorgans ist das Spaltmaß zwischen Rührorgan und Reaktorwand. Bei einem zu geringen Spaltmaß entstehen große Scherkräfte, die das Wachstum der Mikroorganismen verringern beziehungsweise ganz verhindern. Da durch den Einbau der größeren Magnete die Rührergeometrie abgeändert werden musste, wurden die entstehenden Spaltmaße näher betrachtet. Abbildung 5.19 zeigt schematisch die Draufsicht auf das Rührorgan nach Prototyp IV und des serienmäßigen Rührorgans. Die entsprechenden Spaltmaße auf Vorder- und Rückseite des Rührorgans lassen sich wie folgt berechnen:

$$s_{V/R} = \frac{D}{2} - \sqrt{a_{V/R}^2 + \left(\frac{b_{V/R}}{2}\right)^2} \quad (43)$$

$a_{V/R}$... Abstand der äußeren Kante des Rührorgans zum Achsenmittelpunkt auf der Vorder- beziehungsweise Rückseite des Rührorgans [m]

$b_{V/R}$... Breite des Rührorgans auf der Vorder- beziehungsweise Rückseite [m]

D ... Reaktordurchmesser [m]

$s_{V/R}$... Spaltmaß zwischen Rührorgan und Reaktorwand auf der Vorder- beziehungsweise Rückseite des Rührorgans [m]

Für Prototyp IV ergibt sich ein minimales Spaltmaß von 1,9 mm auf der Vorderseite des Rührpaddels. Für das serienmäßige Rührorgan ergibt sich durch die eingebrachten 45 ° Fasen ein minimales Spaltmaß von 1,6 mm (durchgezogene Linie, Abb. 5.19B). Ohne die eingebrachten Fasen wäre der Abstand zwischen Rührpaddel und Reaktorwand nur 0,9 mm und damit weniger als die Hälfte von Prototyp IV (gepunktete Linie, Abb. 5.19B). Dieser geringe Abstand würde unter Umständen zu großen Kräften im Reaktor und damit zu einer Limitierung des Wachstums der Mikroorganismen führen. Auf der Rückseite der Rührorgane ist jeweils ein größerer Wandabstand (4 mm bei Prototyp IV; 2 mm bei dem serienmäßigen Rührorgan) vorhanden, so dass diesbezüglich keine Probleme bei der Kultivierung auftreten können.

Damit steht eine optimierte Rührergeometrie mit verkapselten Magneten zur Verfügung, die industriell gefertigt werden kann.

5.3.3 Einbindung des Rührorgans in den Bioreaktorblock

Nach Optimierung der Geometrie musste das Rührorgan in den Bioreaktorblock nach Weuster-Botz *et al.* (2005) eingebunden werden, so dass 48 parallele Reaktoren zur kontrollierten, automatisierten Kultivierung verwendet werden konnten. Die Zielsetzung war dabei, möglichst keine Änderungen am Bioreaktorblock vorzunehmen, so dass dieser universell für mehrere biotechnologische Prozesse einsetzbar ist.

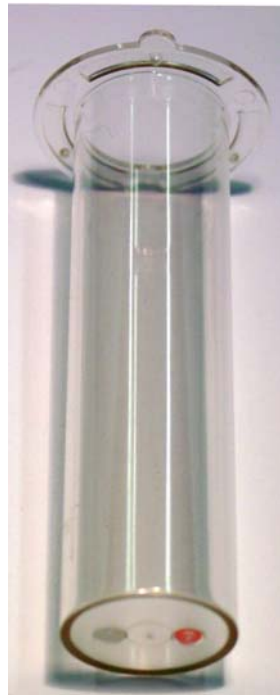


Abb. 5.20: Unbewehrter Milliliter-Reaktor mit optischen Sensoren.

Zunächst wurden unbewehrte Milliliter-Bioreaktoren industriell gefertigt, die für ein Funktionieren des neuen Rührerprinzips notwendig sind. Die Außenmaße der neuen Reaktoren entsprechen dabei den Reaktoren mit Strömungsbrechern (Puskeiler *et al.* 2005a; sie auch Abb. 4.1), so dass ein einfacher Einbau in den Bioreaktorblock möglich ist. Weiterhin sind die Reaktoren mit optischen Sensoren für pH und pO₂ am Boden ausgestattet, so dass eine *online* Messung dieser wichtigen Parameter, wie bei Kusterer *et al.* (2008) beschrieben, durchgeführt werden kann. Abbildung 5.20 zeigt einen per Spritzguss gefertigten Milliliter-Bioreaktor aus Polystyrol, wie er zur Kultivierung mit dem Paddelrührorgan verwendet wird.

Weiterhin wurden 48 einzelne Paddelrührorgane mit der optimierten Geometrie gefertigt. Diese können über einen einfachen Steckmechanismus an der Sterilabdeckung des Bioreaktorblocks montiert werden. Durch die Steckachse ist dabei ein einfacher Austausch

verschiedener Rührorgane möglich, ohne dass eine Veränderung am Bioreaktorblock selbst vorgenommen werden muss. Abbildung 5.21 zeigt ein an die Sterilabdeckung montiertes Paddelrührorgan.



Abb. 5.21: An die Sterilabdeckung des Bioreaktorblocks montiertes Paddelrührorgan.

Für einen zuverlässigen magnetisch-induktiven Antrieb der Rührorgane ist deren exakte Positionierung im Bioreaktorblock notwendig. Abbildung 5.22 zeigt den schematischen Aufbau der Position eines Milliliter-Bioreaktors mit Rührorgan im Bioreaktorblock mit den dazugehörigen Polschuhen des magnetischen Antriebs.

Eine optimale Übertragung des Drehmoments ist in den Mittelpunkten der jeweiligen Polschuhe gegeben. Aus diesem Grund wurden die Paddelrührorgane so konstruiert, dass die beiderseitig eingebauten Dauermagnete sich in einer Ebene mit den Polschuhen befinden. Folglich ergibt sich ein Abstand der Unterkante des Rührorgans zum Reaktorboden von 5,5 mm. Mit dem beschriebenen Aufbau ist ein zuverlässiger Betrieb der Rührorgane in einem Drehzahlbereich von 600 bis 1600 min^{-1} mit dem magnetisch-induktiven Antrieb gegeben.

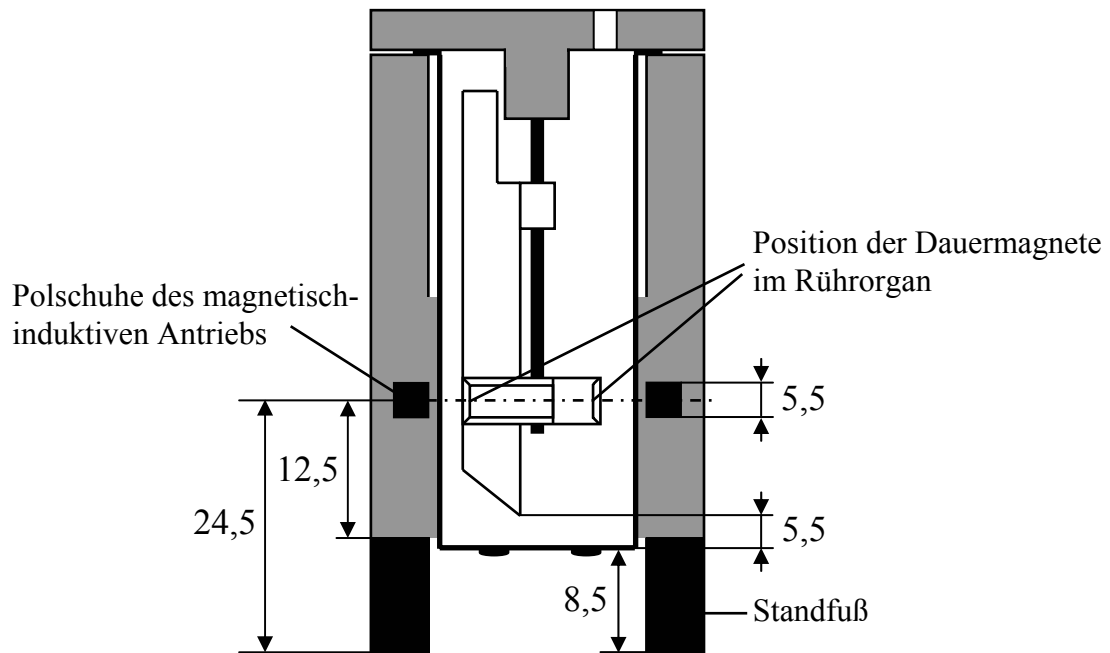


Abb. 5.22: Schematische Darstellung der Positionierung eines Paddelrührorgans im Milliliter-Bioreaktor zur optimalen Übertragung des Drehmoments des Magnetfeldes auf das Rührorgan.

5.4 Verfahrenstechnische Charakterisierung des Paddelrührorgans

5.4.1 Leistungseintrag

Der Leistungseintrag ist eine der wichtigsten verfahrenstechnischen Kenngrößen, die häufig zur Maßstabsübertragung bei Bioprozessen verwendet wird. In Reaktoren des Pilot- und Produktionsmaßstabs kann die durch das Rührorgan eintragbare Leistung unter Umständen zur limitierenden Größe werden. Dies ist vor allen Dingen bei viskosen Kulturmedien häufig der Fall (Junker *et al.* 2008). Deshalb ist es wichtig, dass in miniaturisierten Reaktoren ein ähnlicher Leistungseintrag vorliegt, um Probleme bei der Maßstabsübertragung zu vermeiden.

Die Leistungseinträge im Milliliter-Bioreaktor wurden über den gesamten Drehzahlbereich in Schritten von 50 min^{-1} in einem neu entwickelten Messaufbau mit einem speziellen Drehmomentsensor gemessen (Hortsch und Weuster-Botz 2010a; siehe auch Kapitel 4.2.2). Die Ergebnisse wurden sowohl mit dem Gas-induzierenden Rührorgan, als auch mit einem Laborrührreaktor mit 6-Blatt-Scheibenrührern verglichen. Abbildung 5.23 zeigt die gemessenen Leistungseinträge der drei Reaktorsysteme.

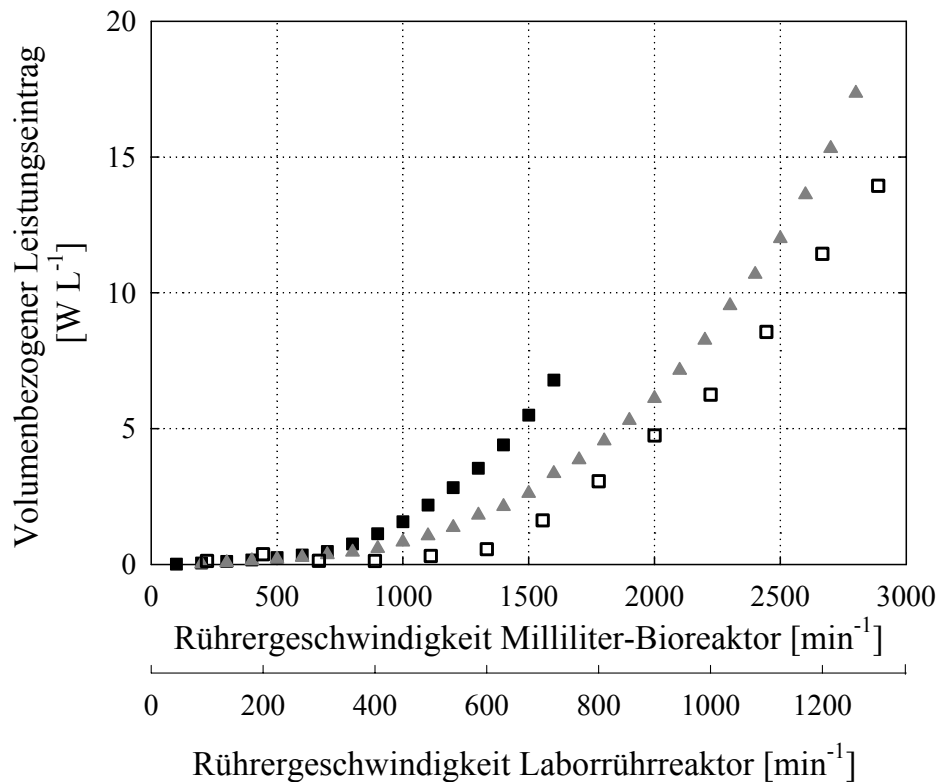


Abb. 5.23: Volumenbezogener Leistungseintrag in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl für das Paddelrührorgan (schwarze Quadrate), im Vergleich zum Gas-induzierenden Rührorgan (graue Dreiecke) und Laborrührreaktor (weiße Quadrate) (Messung in $0,5 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$).

Der Leistungseintrag nimmt, wie erwartet, mit steigender Rührerdrehzahl bei allen drei Reaktorsystemen zu. Das Paddelrührorgan erreicht dabei Leistungseinträge bis ca. 7 W L^{-1} bei 1600 min^{-1} . Die Leistungseinträge liegen in der gleichen Größenordnung wie im Laborrührreaktor. Der höchste erreichbare Leistungseintrag von 7 W L^{-1} entspricht ungefähr einer Rührerdrehzahl von $1000 - 1100 \text{ min}^{-1}$ im Referenzsystem. Im Vergleich dazu, werden beim Gas-induzierenden Rührorgan, durch die für eine Gasinduktion notwendigen hohen Rührerdrehzahlen Leistungseinträge bis 17 W L^{-1} bei 2800 min^{-1} erreicht. Im Laborrührreaktor sind diese hohen Leistungseinträge nur bei Rührerdrehzahlen $> 1300 \text{ min}^{-1}$ realisierbar.

Mit Hilfe der erstellten Charakteristik kann eine zuverlässige Maßstabsübertragung mit Bezug auf den Leistungseintrag von Prozessen aus den Milliliter-Reaktoren in Reaktoren des Labor- und Pilotmaßstabs erfolgen, indem die Rührerdrehzahlen entsprechend dem gewünschten Leistungseintrag angepasst werden.

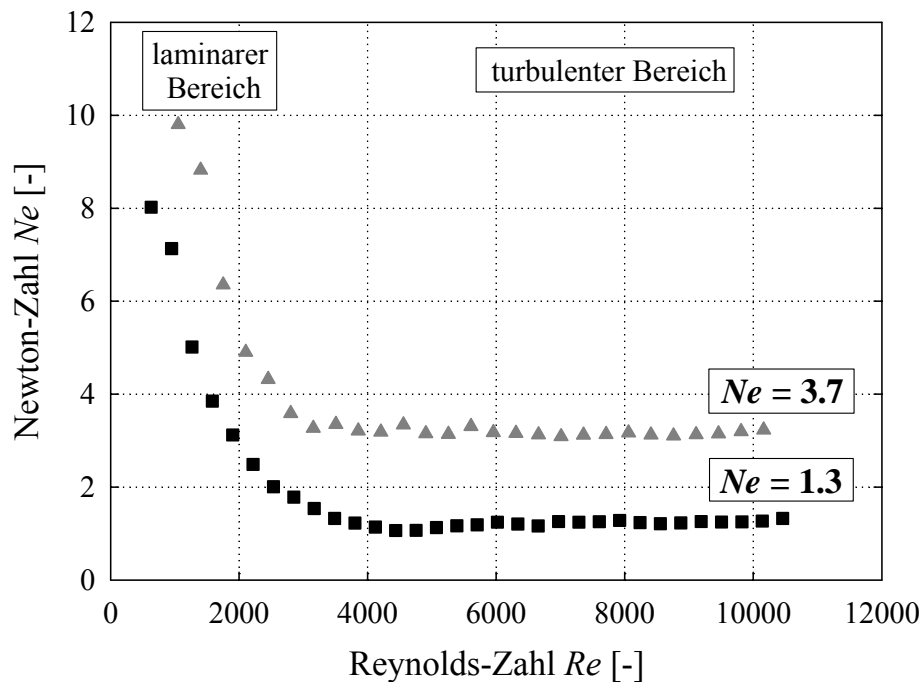


Abb. 5.24: Leistungscharakteristik des Paddelrührorgans (Quadrate), im Vergleich zum Gas-induzierenden Rührorgan (graue Dreiecke).

Aus den gemessenen Leistungseinträgen lässt sich die Leistungscharakteristik für die verschiedenen Rührorgane in den Milliliter-Bioreaktoren erstellen. Abbildung 5.24 zeigt, dass der Verlauf der Ne -Zahl über die Re -Zahl ähnlich dem aus Standardrührreaktoren bekannten Verhalten ist. Für beide Rührorgane lässt sich deutlich ein laminarer ($Ne \cdot Re = const.$) und turbulenter ($Ne = const.$) Strömungsbereich bestimmen. Für das

Paddelrührorgan ist zwischen $Re = 2000$ und 4000 ein Übergangsbereich zu erkennen, wie es für unbewehrte Reaktoren ebenfalls in der Literatur beschrieben ist (Zlokarnik 2005).

Die Ne -Zahl des Gas-induzierenden Rührorgans ist im turbulenten Bereich ca. $3,7$ und ist damit ähnlich der Ne -Zahl von 6-Blatt-Scheibenrührern, die mit 4 bis 5 angegeben wird (Zlokarnik 2005, Betts *et al.* 2006). Für das Paddelrührorgan liegt im turbulenten Bereich ab $Re > 4000$ eine Ne -Zahl von ca. $1,3$ vor. Dieser Wert ist nur schwer mit anderen aus der Literatur bekannten Werten für Rührorgane vergleichbar da ein neues Rührprinzip vorliegt. Am ehesten kann das Paddelrührorgan mit ebenfalls wandnah laufenden Rührorganen wie zum Beispiel Ankerrührern verglichen werden. Diese haben laut Kraume (2003) eine Ne -Zahl im turbulenten Bereich zwischen $0,2$ und 2 .

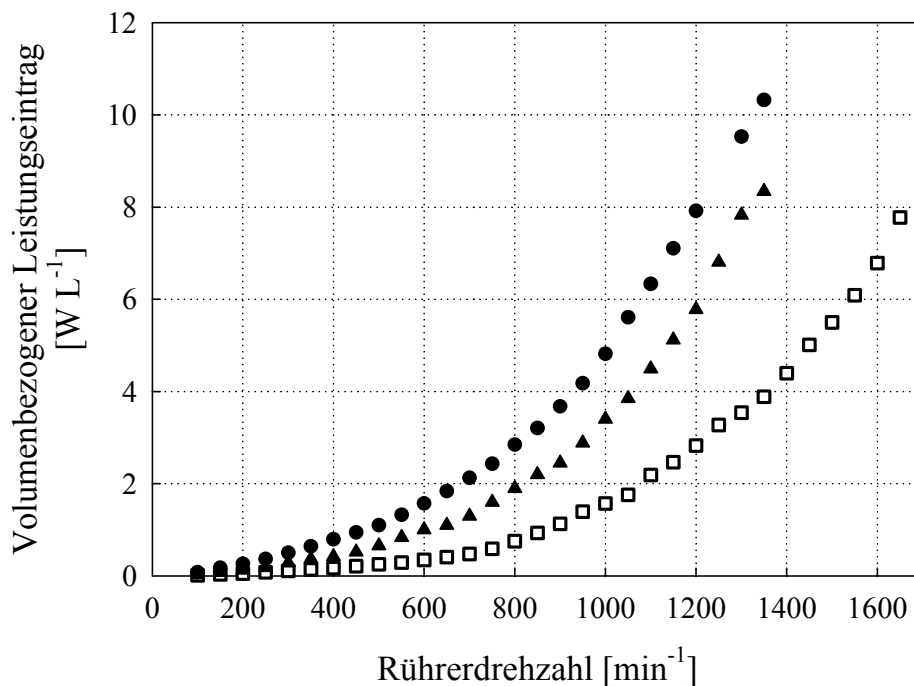


Abb. 5.25: Leistungseintrag des Paddelrührorgans in nicht-Newton'sche Xanthan-Lösungen (0,4 % Dreiecke; 0,7 % Kreise) im Vergleich zu wässrigem Medium (0,5 M Na_2SO_4 weiße Quadrate).

Für die Maßstabsübertragung von Prozessen mit viskosem Kulturmedium muss der Leistungseintrag in solche Fluide bekannt sein. Wie bereits in Kapitel 5.1.3 beschrieben, bilden Xanthan-Lösungen unterschiedlicher Konzentration sehr gut das strukturviskose Verhalten bei der Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen ab. Abbildung 5.25 zeigt beispielhaft den Leistungseintrag des Paddelrührorgans in zwei höher viskose Xanthan-Lösungen im Vergleich zu wässrigem Medium. Wie erwartet steigt der Leistungseintrag für die gleiche Rührerdrehzahl bei einer höheren Viskosität an. Mit Hilfe

der in den Modellfluiden ermittelten Werte lassen sich zukünftig auch Prozesse, in denen höher viskose Kulturmedien vorliegen, zuverlässig anhand des Leistungseintrags skalieren.

Weiterhin zeigt sich anhand der Leistungseintragsmessungen, dass auch bei höher viskosen Medien kein „Außer-Phase“ Zustand vorliegt, wie er in geschüttelten Systemen auftreten kann (Büchs *et al.* 2001, Peter *et al.* 2004). Der Grund für den „Außer-Phase“ Zustand ist, dass die Flüssigkeit bei hoher Viskosität der Schüttelbewegung des Reaktionsgefäßes nicht mehr folgen kann, woraus eine Verringerung des Leistungseintrags bei hohen Drehzahlen resultiert. Im Milliliter-Bioreaktor kann dies nicht auftreten, da durch das Rührorgan eine Zwangsförderung der Flüssigkeit vorliegt. Damit wird die Flüssigkeit auch bei hoher Viskosität ständig in Rotation gehalten.

5.4.2 Sauerstoffeintrag

Eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen ist bei aeroben Prozessen für eine kontrollierte Prozessführung unbedingt notwendig. Der Sauerstoffeintrag im Milliliter-Bioreaktor erfolgt über reine Oberflächenbegasung und ist damit vom Oberflächen/Volumen-Verhältnis abhängig.

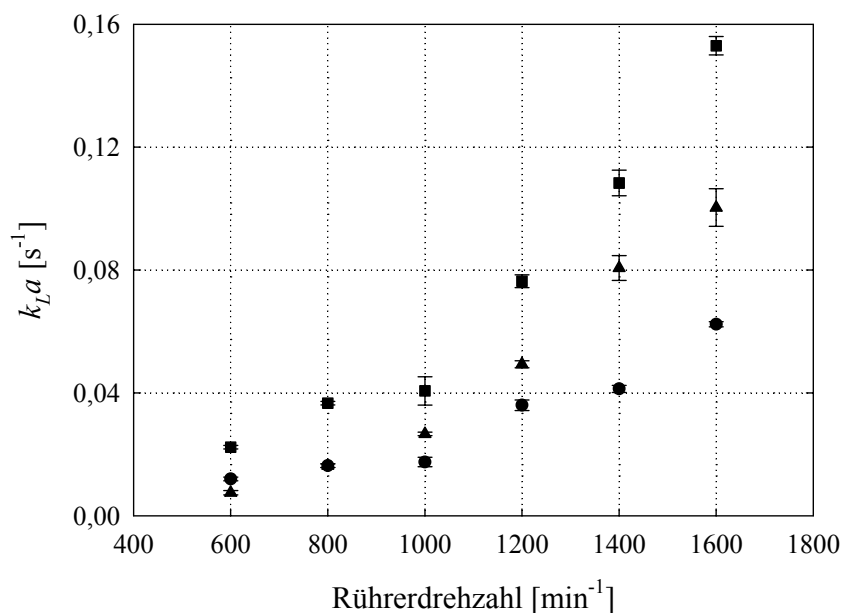


Abb. 5.26: Mittels der dynamischen Sulfitmethode ermittelte k_La für unterschiedliche Reaktionsvolumina im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan: 8 mL (Quadrate), 10 mL (Dreiecke) und 12 mL (Kreise) ($T = 25\text{ °C}$; Messung in 0,5 M Na_2SO_4).

Bereits bei der Konstruktion der Paddelrührorgane wurde der k_La für ein Arbeitsvolumen von 8 mL bestimmt. Nachfolgend wird eine nähere Charakterisierung des Sauerstoffeintrags

des finalen Rührorgans beschrieben. Als Bestimmungsmethode wurde die dynamische Sulfitmethode gewählt, da sie für einen breiten Betriebsbereich als korrekt geltende k_{La} ermittelt und die dynamischen Druckmethode apparativ nicht in den Milliliter-Bioreaktoren realisierbar ist (siehe auch Kapitel 3.1.3).

Abbildung 5.26 zeigt den mit der dynamischen Sulfitmethode für unterschiedliche Reaktionsvolumina gemessenen k_{La} . Je nach Füllvolumen sind $k_{La} > 0,15 \text{ s}^{-1}$ erreichbar. Damit liegt der mit dem neuen Rührorgan erreichbare Sauerstoffeintrag in dem aus den Referenzkultivierungen ermittelten Bereich (siehe Tab. 5.1). Der gemessene k_{La} ist deutlich höher als in anderen Bioreaktoren mit Oberflächenbegasung wie MTPs oder Schüttelkolben, bei denen meist k_{La} deutlicher kleiner als $0,1 \text{ s}^{-1}$ vorliegen (Weuster-Botz 2005, Marques *et al.* 2010).

Mit steigendem Reaktionsvolumen sinkt der k_{La} , da sich das Oberflächen/Volumen-Verhältnis verkleinert. Dies muss insbesondere bei Zulaufprozessen, bei denen sich das Volumen während des Prozesses ändert, berücksichtigt werden. Durch die *online* Erfassung des pO_2 kann eine mögliche Sauerstofflimitation jedoch rechtzeitig erkannt und beispielsweise durch eine Erhöhung der Rührerdrehzahl behoben werden.

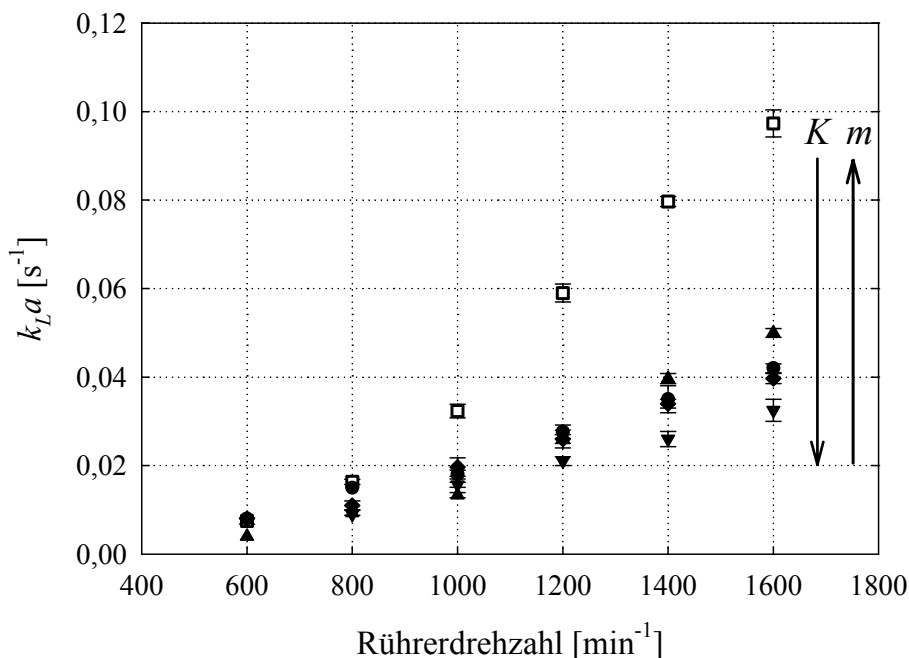


Abb. 5.27: Mittels der dynamischen Sulfitmethode ermittelte k_{La} im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan für strukturviskose Xanthan-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (0,1 % Dreiecke; 0,15 % Kreise; 0,2 % Rauten; 0,3 % umgedrehte Dreiecke) im Vergleich zu wässrigem Medium (0,5 M Na_2SO_4 weiße Quadrate) ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $V = 10 \text{ mL}$). Zu- beziehungsweise Abnahme von Konsistenzindex K und Fließindex m sind zur besseren Veranschaulichung durch Pfeile gekennzeichnet.

Der Sauerstoffeintrag in strukturviskose Kulturmedien wurde durch Messungen in Xanthan-Lösungen unterschiedlicher Konzentration untersucht (Abb. 5.27). Bereits bei 0,1 % Xanthan ist ein starker Abfall des $k_L a$ zu verzeichnen. Der Grund dafür ist hauptsächlich die starke Abnahme des Diffusionskoeffizienten bei viskosen Fluiden (Henzler 1980, siehe auch Gleichung 10).

Bei einer weiteren Zunahme der Xanthan-Konzentration verringert sich der $k_L a$ nur noch geringfügig. Dieses Verhalten ist charakteristisch für oberflächenbegaste Prozesse. Durch das auch bei höherer Viskosität relativ konstante Oberflächen/Volumen-Verhältnis ändert sich auch die spezifische Phasengrenzfläche zwischen Gas- und Flüssigphase nur geringfügig.

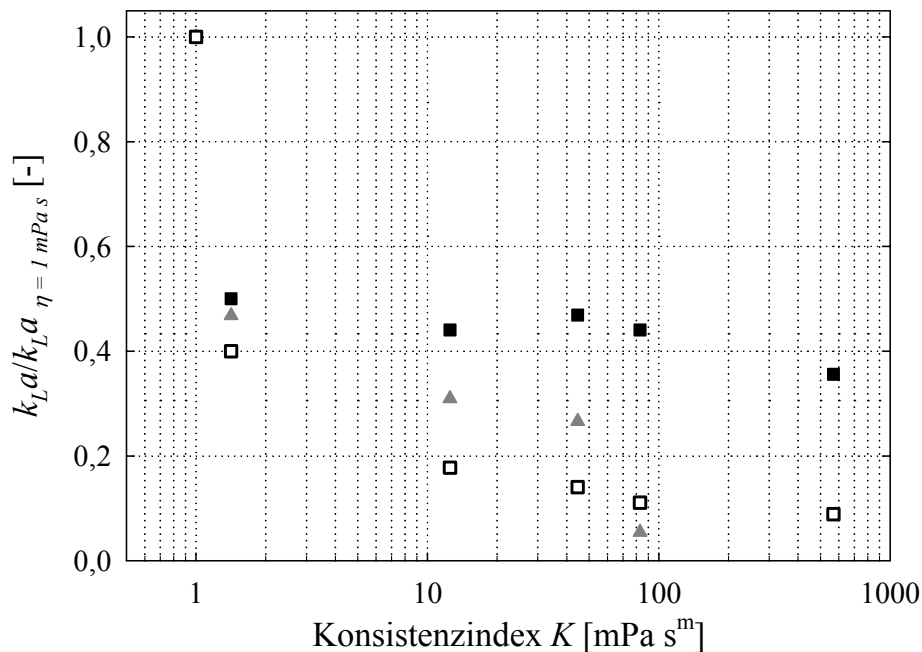


Abb. 5.28: Auf den $k_L a$ in wässrigem Medium ($\eta = 1 \text{ mPa s}$) normierter $k_L a$ in unterschiedlichen strukturviskosen Medien für das Paddelrührorgan (schwarze Quadrate; $n = 1200 \text{ min}^{-1}$), das Gas-induzierende Rührorgan (graue Dreiecke; $n = 2800 \text{ min}^{-1}$) im Vergleich zum Laborrührreaktor (weiße Quadrate $n = 700 \text{ min}^{-1}$; 2 vvm).

Im Gegensatz dazu ist bei blasenbegasten Prozessen ein starker Abfall des $k_L a$ mit zunehmender Viskosität zu erkennen. Abbildung 5.28 zeigt den Verlauf des normierten $k_L a$ für zunehmend strukturviskose Medien für das Paddelrührorgan im Vergleich zum Gas-induzierenden Rührorgan und Laborrührreaktor. Das Gas-induzierende Rührorgan zeigt einen mit zunehmender Viskosität stark sinkenden $k_L a$, der ab $K = 100 \text{ mPa s}^m$ gegen Null abfällt, da die Gasinduktion zum Erliegen kommt (siehe auch Abb. 5.10). Bei dem aktiv blasenbegasten Prozess im Laborrührreaktor ist ebenfalls eine starke Abnahme des $k_L a$ über die Viskosität zu verzeichnen, da die eingebrachten Gasblasen immer weniger durch das

Rührorgan zerkleinert werden und damit die spezifische Phasengrenzfläche sinkt. Trotzdem ist durch die aktive Begasung auch in höher viskosen Medien weiterhin Sauerstoffeintrag möglich.

Der vergleichsweise geringe Abfall des k_{La} im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan zeigt, dass das Rührprinzip sehr gut für den Einsatz in viskosen Medien geeignet ist. Weiterhin sorgt die Geometrie des Rührorgans für einen relativ homogenen Leistungseintrag, so dass keine Zonen mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt entstehen, wie sie teilweise in Laborrührreaktoren bei höherer Viskosität auftreten (Nienow 1990).

5.4.3 Maximale lokale Energiedissipation

Bei der Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen haben die im Reaktorsystem auftretenden Kräfte einen entscheidenden Einfluss auf die Wachstumsmorphologie und folglich auch auf die Produktivität der Mikroorganismen (Smith *et al.* 1990, Jüsten *et al.* 1996, Cui *et al.* 1997). Die Kenntnis der maximalen lokalen Energiedissipation (ε_{max}) ist demzufolge entscheidend für die Auslegung dieser biotechnologischen Prozesse.

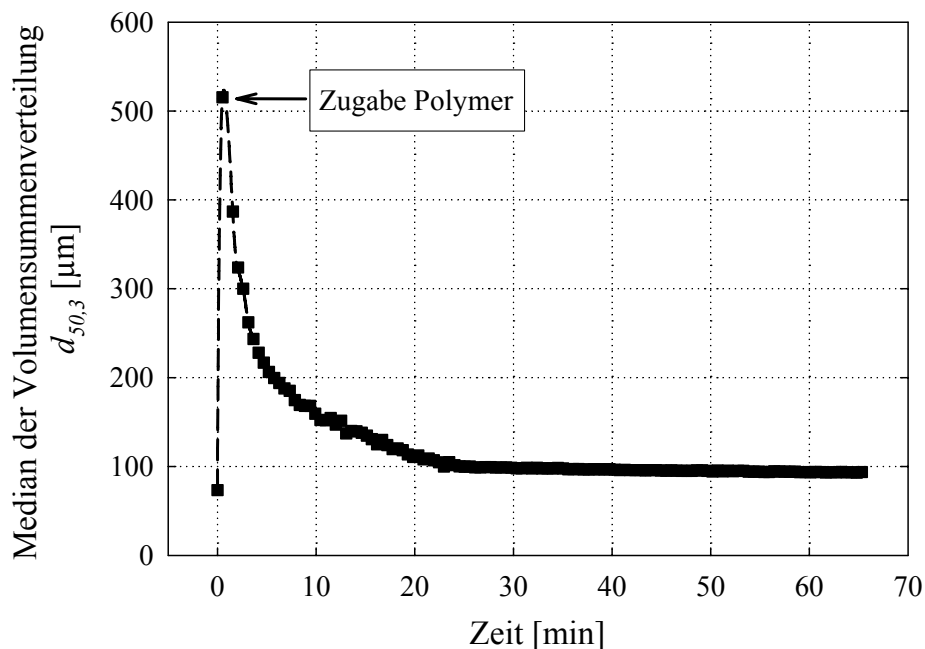


Abb. 5.29: Kinetik der Flockenzerkleinerung des Ton/Polymer-Flockensystems im Laborrührreaktor nach Zugabe des Polymers als Flockungsmittel ($n = 300 \text{ min}^{-1}$).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ton/Polymer-Flockensystem von Hoffmann *et al.* (1992) zur Messung von ε_{max} verwendet. Das Messprinzip musste dabei zuerst auf die

kleinen Abmessungen im Milliliter-Bioreaktor angepasst werden (Hortsch und Weuster-Botz 2010a; siehe auch Kapitel 4.2.4). Zunächst wurde die Partikelbeanspruchung im Laborrührreaktor als Referenz gemessen. Die gemessene Partikelgrößenverteilung entspricht annähernd einer logarithmischen Normalverteilung, so dass der Median der Volumensummenverteilung ($d_{50,3}$) als charakteristischer Parameter der Verteilung herangezogen wurde. Abbildung 5.29 zeigt beispielhaft die Kinetik der Flockenzerkleinerung für eine Rührergeschwindigkeit von 300 min^{-1} im Laborrührreaktor. Nach Zugabe des Polymers zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ h}$ ist eine sofortige starke Zunahme des $d_{50,3}$ durch die einsetzende Flockenbildung zu erkennen. Mit fortlaufender Zeit nimmt der Partikeldurchmesser durch die im Reaktor auftretenden Kräfte ab und es stellt sich ein drehzahlabhängiger Enddurchmesser der Flocken ein.

In Abbildung 5.30A ist der ermittelte Endflockendurchmesser für verschiedene Rührerdrehzahlen im Laborrührreaktor aufgezeigt. Bis 800 min^{-1} ist eine signifikante Abnahme des Durchmessers über die Rührerdrehzahl zu erkennen. Bei höheren Drehzahlen werden die Flocken zunehmend bis zur ihrer Primärpartikelgröße zerkleinert, so dass keine genaue Zuordnung des Endpartikeldurchmessers mehr möglich ist. Aus den so ermittelten Messwerten kann mit Gleichung 20 eine Abhängigkeit des Endflockendurchmessers von der maximalen lokalen Energiedissipation erstellt werden (Abb. 5.30B). Mit Hilfe dieses Zusammenhangs lässt sich aus den gemessenen Endflockendurchmessern des zu charakterisierenden Reaktorsystems die maximale lokale Energiedissipation bestimmen.

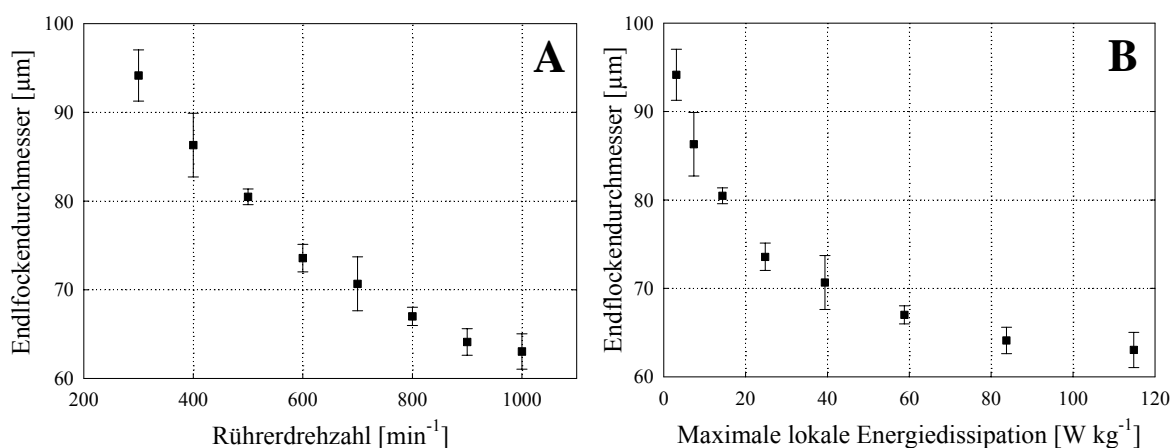


Abb. 5.30: Mittels des Ton/Polymer-Flockensystems bestimmter Endflockendurchmesser für den Laborrührreaktor in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl (A) und der mit Gleichung 20 bestimmten maximalen lokalen Energiedissipation (B).

Abbildung 5.31 zeigt die im Milliliter-Bioreaktor mit dem Paddelrührorgan ermittelten Endflockendurchmesser für die jeweilige Drehzahl. Bis auf einen Ausreißer bei 800 min^{-1} ist

eine stetige Abnahme des Flockendurchmessers zu beobachten. Aus den Endflockendurchmessern kann mit der in Abbildung 5.30B erstellten Charakteristik die maximale lokale Energiedissipation für den Milliliter-Bioreaktor abgeschätzt werden.

Zum Vergleich der verschiedenen Rührorgane sind in Abbildung 5.32 die ermittelten maximalen lokalen Energiedissipationen des Paddelrührorgans und des Gas-induzierenden Rührorgans, sowie des Laborrührreaktors als Referenzsystem als Funktion des Leistungseintrags dargestellt. Der Quotient aus maximaler und mittlerer Energiedissipation ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\varnothing}$) ist beim Paddelrührorgan mit einem Wert von 6 am geringsten. Dieser Wert entspricht von der Größenordnung her dem in Schüttelkolben ermitteltem Quotienten (Peter 2007). Folglich zeigt sich aus den Messwerten, dass das Paddelrührorgan die Leistung am gleichmäßigsten in das Reaktionsmedium einträgt und das neu entwickelte Rührerprinzip einen scherarmen Betrieb ermöglicht.

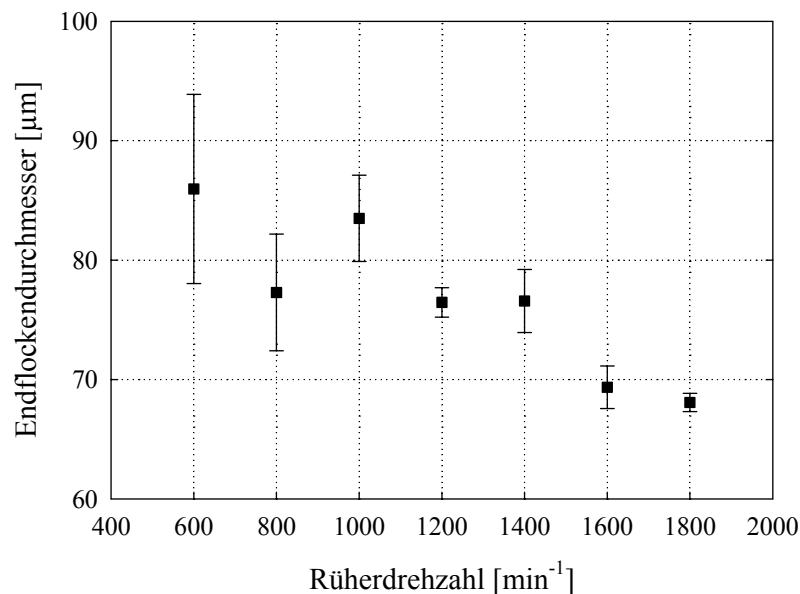


Abb. 5.31: Mittels des Ton/Polymer-Flockensystems bestimmter Endflockendurchmesser für den Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl.

Im Gegensatz dazu ist das Verhältnis beim Laborrührreaktor mit 6-Blatt-Scheibenrührern deutlich größer ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\varnothing}=16$). Der ermittelte Wert liegt in dem in der Literatur beschriebenen Bereich von $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\varnothing}=10-30$ (Liepe *et al.* 1988, Kresta 1998, Kraume 2003).

Das Gas-induzierende Rührorgan ($\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\varnothing}=10$) trägt die Leistung ebenfalls gleichmäßiger in das Reaktionsmedium ein als der Laborrührreaktor. Durch die für eine Gasinduktion hohen notwendigen Leistungseinträge (siehe auch Abb. 5.23) ist der Absolutwert von ε_{max} dennoch sehr groß und damit nicht zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen

geeignet. Generell wird in der Literatur ein abnehmendes Verhältnis von $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\phi}$ mit zunehmendem Durchmesser des Rührorgans im Vergleich zum Reaktordurchmesser beschrieben (Henzler 2000), was sehr gut mit den ermittelten Messergebnissen übereinstimmt.

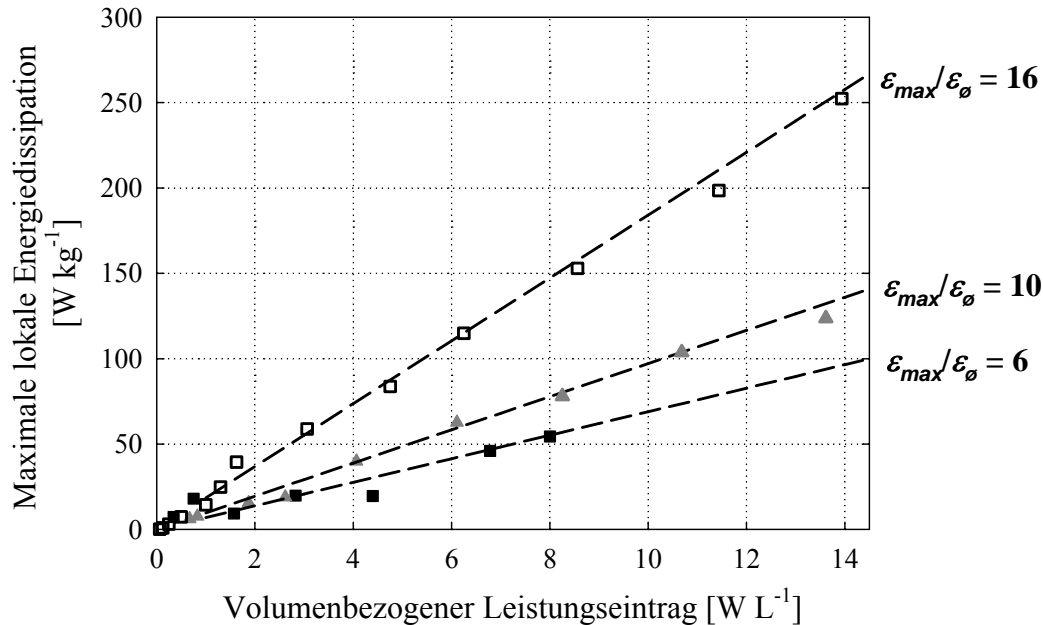


Abb. 5.32: Experimentell bestimmte maximale lokale Energiedissipation in Abhängigkeit des volumenbezogenen Leistungseintrags für das Paddelrührorgan (schwarze Quadrate), das Gas-induzierende Rührorgan (graue Dreiecke) im Vergleich zum Laborrührreaktor (weiße Quadrate).

Da die maximale lokale Energiedissipation nur aufwendig über indirekte Messverfahren für den Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan ermittelt werden kann, wurde ein empirisches Konzept zu deren Abschätzung erarbeitet. Als Grundlage diente dabei das für Rührreaktoren standardmäßig verwendete Konzept nach Liepe *et al.* (1988, Gleichung 20). Der Nenner in dieser Gleichung entspricht der „Länge des Turbulenzerzeugers senkrecht zur Hauptströmungsrichtung“ (Kraume 2003). Bei 6-Blatt-Scheibenrührern, die eine vorwiegend radiale Strömung aufweisen, wird folglich die Höhe des Rührerblatts zur Berechnung verwendet (Abb. 5.33). Wird Gleichung 20 entsprechend für das Paddelrührorgan mit vorwiegend tangentialer Strömung modifiziert, folgt die Breite des Paddelrührorgans als Nenner zur Berechnung (Abb. 5.33). Es ergibt sich nachfolgende Gleichung:

$$\varepsilon_{max} = \frac{c_D \cdot u_{tip}^3}{b} \quad (44)$$

b ... Breite des Paddelrührorgans [m]

c_D ... Dissipationsbeiwert = 0,1 [-]

u_{tip} ... Rührerumfangsgeschwindigkeit (siehe Gleichung 21) [m s⁻¹]

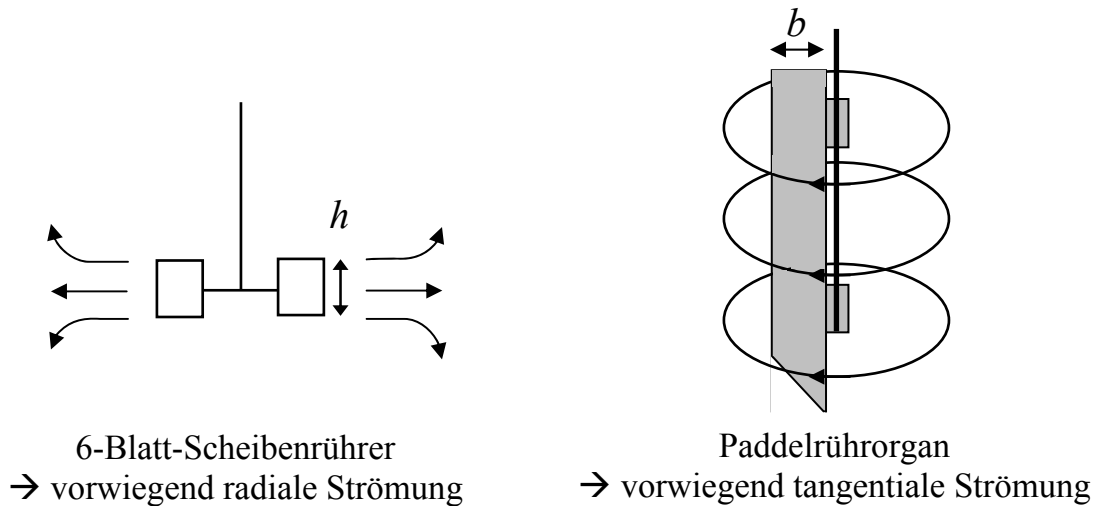


Abb. 5.33: Ansatz für die Berechnung der maximalen lokalen Energiedissipation für das Paddelrührorgan durch Modifikation der für Rührreaktoren geltenden Gleichung 20 nach Liepe *et al.* (1988).

Abbildung 5.34 zeigt die nach Gleichung 44 berechneten Werte im Vergleich zu den gemessenen maximalen lokalen Energiedissipationen. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Werte, so dass Gleichung 44 zukünftig zur Abschätzung von ϵ_{max} für das Paddelrührorgan verwendet werden kann.

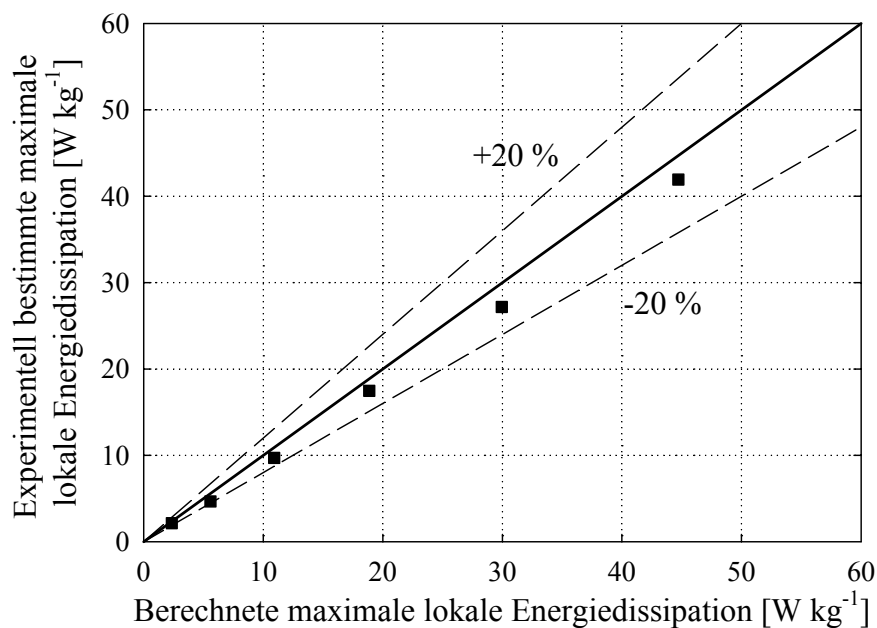


Abb. 5.34: Paritätsplot der experimentell ermittelten und mit Gleichung 44 berechneten maximalen lokalen Energiedissipation des Paddelrührorgans. Ober- und Untergrenze von 20 % Standardabweichung sind im Diagramm angegeben.

5.4.4 Effektive Schergeschwindigkeit

Bei der Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen liegt häufig ein strukturviskoses Verhalten des Kulturmediums vor. Zur Auslegung der Reaktoren und für Maßstabsübertragungen wird vereinfachend eine effektive Viskosität für die jeweiligen Betriebsbedingungen ermittelt. Dazu ist ein Kenntnis der zur entsprechenden Rührerdrehzahl gehörenden effektiven Schergeschwindigkeit (γ_{eff}) nötig.

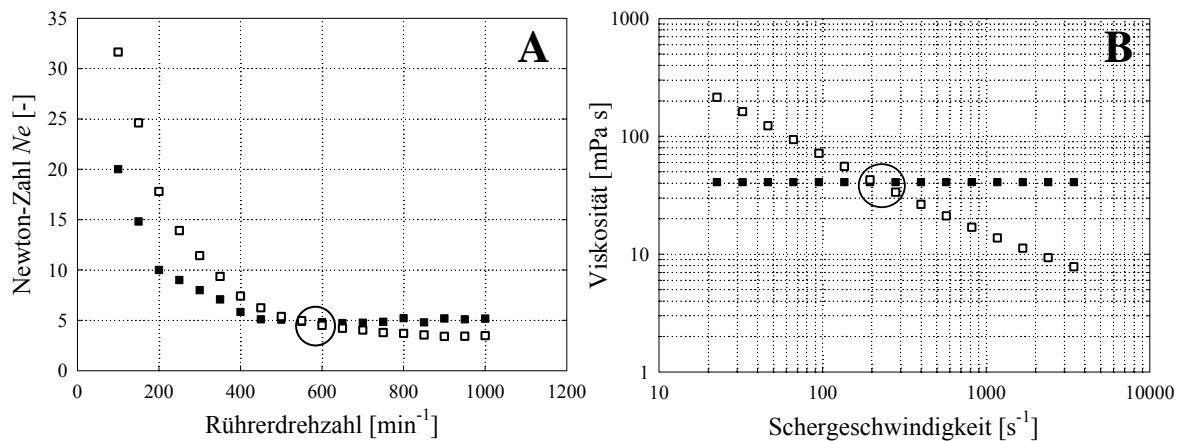


Abb. 5.35: Ermittlung der effektiven Schergeschwindigkeit für das Paddelrührorgan zur Bestimmung der Rührerdrehzahl anhand der Schnittpunkte der Ne -Zahlen (A) und durch Bestimmung der Schergeschwindigkeit mithilfe der Schnittpunkte der Viskositäten (B), beispielhaft für 80 % Newton'sche Glycerinlösung (schwarze Quadrate) und eine strukturviskose 0,6 % Xanthan-Lösung (weiße Quadrate) aufgetragen.

Zur Ermittlung der effektiven Schergeschwindigkeit für das Paddelrührorgan wurde die von Peter *et al.* (2004) vorgeschlagene Methode verwendet (siehe auch Kapitel 4.2.5). Dabei wurden der Leistungseintrag und die Viskosität von mehreren Newton'schen und strukturviskosen Flüssigkeiten gemessen. Abbildung 5.35A zeigt beispielhaft den Schnittpunkt der Leistungseinträge (ausgedrückt als Ne -Zahlen) einer 80 % Glycerinlösung mit einer strukturviskosen 0,6 % Xanthan-Lösung. Durch die unterschiedlichen rheologischen Eigenschaften der Flüssigkeiten ergibt sich ein Schnittpunkt, in dem beide Fluide im selben hydrodynamischen Zustand sind. Diesem Zustand kann eine Rührerdrehzahl zugeordnet werden. Weiterhin ergibt sich aus den rheologischen Messungen der beiden Flüssigkeiten ebenfalls ein Schnittpunkt, aus dem die Schergeschwindigkeit bestimmt werden kann (Abb. 5.35B). Aus der Kombination dieser beiden Messungen, folgt eine Abhängigkeit der Schergeschwindigkeit von der Rührerdrehzahl beziehungsweise des Leistungseintrags. Abbildung 5.36 zeigt die für das Paddelrührorgan ermittelte Abhängigkeit aus der Messung mehrerer Flüssigkeiten.

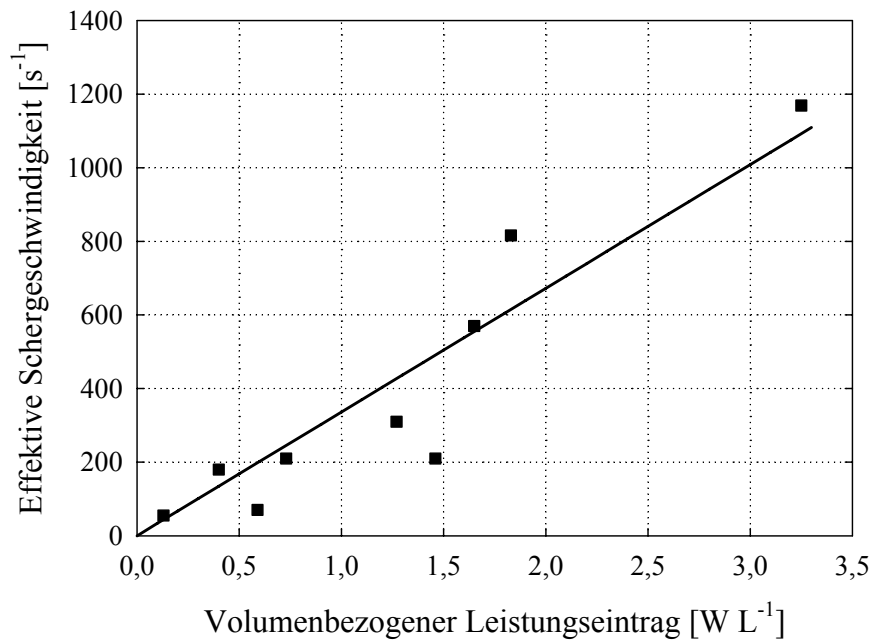


Abb. 5.36: Ermittelte effektive Schergeschwindigkeit (Symbole) als Funktion des Leistungseintrags für den Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan sowie Modellierung der Werte mit Gleichung 45 (schwarze Linie).

Mit steigendem Leistungseintrag steigt ebenfalls die Schergeschwindigkeit und es ist ein linearer Zusammenhang erkennbar, der mit der nachfolgenden Gleichung beschrieben werden kann:

$$\gamma_{eff} = 336,21 \cdot \frac{P}{V} \quad (45)$$

P ... Leistung [W]

V ... Reaktionsvolumen [L]

γ_{eff} ... effektive Schergeschwindigkeit [s⁻¹]

Die teilweise recht starke Streuung der Messwerte folgt aus der begrenzten Genauigkeit, mit der die Schnittpunkte der Fluide bestimmt werden können. Trotz der vorhandenen Abweichung kann die erstellte Charakteristik zur Abschätzung der Schergeschwindigkeit für den Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan genutzt werden. Dadurch ist für Prozesse mit nicht-Newton'schen Flüssigkeiten die Bestimmung der effektiven Viskosität möglich.

5.5 Kultivierung von *Streptomyces tendae* im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan

5.5.1 Parallele Kultivierung

Nach der verfahrenstechnischen Charakterisierung des Paddelrührorgans im Milliliter-Bioreaktor wurde der Bioreaktorblock zu parallelen Kultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 verwendet. Die Kultivierungen fanden unter den gleichen Versuchsbedingungen (pH-ungeregelte Satzkultivierung bei 29 °C) wie der Referenzprozess im 200-fach größeren Laborrührreaktor (siehe Kapitel 5.1) statt, um die Ergebnisse direkt miteinander vergleichen zu können. Zur Maßstabsübertragung wurde der Leistungseintrag in beiden Reaktorsystemen konstant gehalten, wie es häufig für industrielle Prozesse mit Mycelbildnern Anwendung findet (Junker *et al.* 2008). Im Laborrührreaktor werden bei einer Rührerdrehzahl von 800 min⁻¹ ca. 3 W L⁻¹ Leistung eingetragen (siehe Abb. 5.23). Im Milliliter-Bioreaktor wurde demzufolge eine Rührerdrehzahl von 1200 min⁻¹ gewählt, bei der ein sehr ähnlicher Leistungseintrag von 2,8 W L⁻¹ vorliegt (siehe Abb. 5.23). Eine Übersicht der in den beiden Reaktionssystemen vorliegenden Parameter findet sich in Tabelle 5.3. Bei den gewählten Versuchsbedingungen wurde zu jeder Zeit Mycelwachstum in den Milliliter-Bioreaktoren beobachtet.

Tab. 5.3 Betriebsbedingungen des Laborrührreaktors im Vergleich zu den Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan zur Kultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0.

	Laborrührreaktor mit zwei 6-Blatt-Scheibenrührern	Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan
Reaktionsvolumen [mL]	2000	10
Rührerdrehzahl [min ⁻¹]	800	1200
Volumenbezogener Leistungseintrag [W L ⁻¹]	3,0	2,8
Effektive Schergeschwindigkeit [s ⁻¹]	1243 ^a	940

^a berechnet nach dem Konzept von Perez *et al.* (2006)

In Abbildung 5.37 ist der Verlauf des gelösten Sauerstoffs im Medium eines Milliliter-Bioreaktors über die gesamte Kultivierungsdauer von 140 h aufgetragen. Der Verlauf des pO₂ entspricht dabei sehr gut dem des Referenzprozesses (siehe Abb. 5.1) und die drei wesentlichen Wachstumsphasen sind deutlich identifizierbar. Zu keinem Prozesszeitpunkt ist

eine Sauerstofflimitation erkennbar, da der pO_2 immer über 40 % liegt. Damit trägt das Paddelrührorgan, auch bei viskosem Kultivierungsmedium, genügend Sauerstoff ein, um unlimitiertes Wachstum bei aeroben Prozessen sicherzustellen. Aus der Sauerstoffabnahme während der exponentiellen Wachstumsphase wurde eine maximale spezifische Wachstumsrate $\mu_{max} \approx 0,2 \text{ h}^{-1}$ abgeschätzt. Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem im Referenzprozess ermittelten μ_{max} von $0,18 \text{ h}^{-1}$ überein. Eine *online* Messung des pH war im Milliliter-Bioreaktor nicht möglich, da die optischen Sensoren bei $\text{pH} < 6$ ihr Detektionslimit besitzen (Kusterer *et al.* 2008).

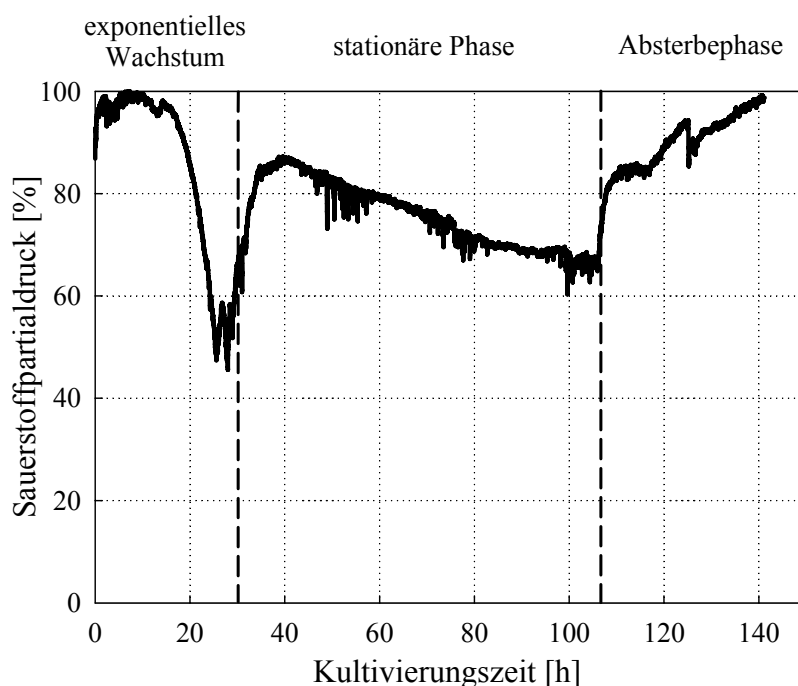


Abb. 5.37: Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffsättigung und charakteristische Wachstumsphasen eines beispielhaft ausgewählten Milliliter-Bioreaktors mit Paddelrührorgan bei der Satzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 ($T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; $V = 10 \text{ mL}$).

Weiterhin wurde durch die ständige Rotation der Flüssigkeitslamelle an der Reaktorwand während der gesamten Kultivierungszeit kein signifikantes Wandwachstum festgestellt (Abb. 5.38A). Dies zeigt, dass die mit dem Gas-induzierendem Rührorgan stark auftretenden Probleme bezüglich des Wandwachstums (Abb. 5.38B) durch das Paddelrührorgan effizient behoben werden.

Zur genaueren Charakterisierung der parallelen Kultivierungen im Milliliter-Bioreaktor wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und analysiert. Die Verläufe der Biotrockenmassekonzentration in den Milliliter-Bioreaktoren im Vergleich zum Laborrührreaktor als Referenz sind in Abbildung 5.39A aufgetragen. Über die gesamte

Kultivierungszeit zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Biotrockenmassekonzentrationen zwischen Milliliter-Bioreaktor ($V = 10$ mL) und dem Laborrührreaktor ($V = 2000$ mL). Die geringen Fehlerbalken der einzelnen Datenpunkte zeigen außerdem die gute parallele Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die relativ hohe BTM von ca. 20 g L^{-1} während der stationären Phase bedeutet außerdem, dass ein höher viskoses Kulturmedium vorliegt (siehe auch nachfolgendes Kapitel 5.5.2) und das neue Rührprinzip erfolgreich zur Kultivierung eingesetzt werden kann.

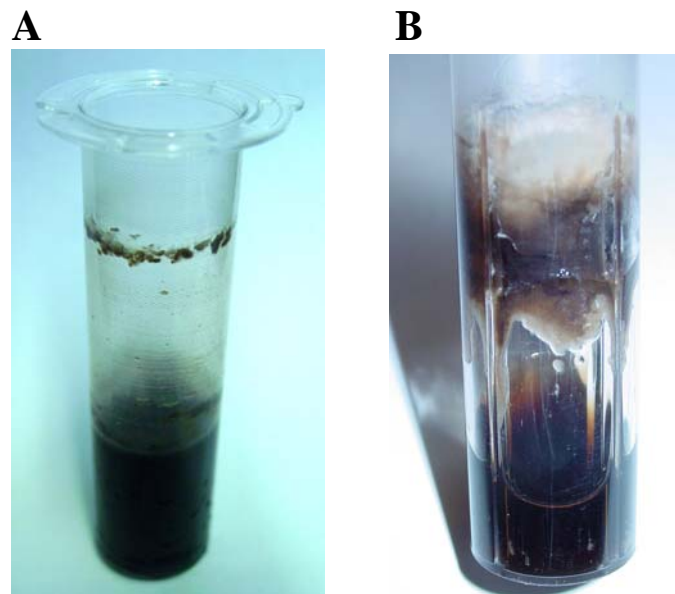


Abb. 5.38: Optische Betrachtung der Reaktorwand der Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan (A; $V = 10$ mL; $n = 1200 \text{ min}^{-1}$) im Vergleich zum Gas-induzierenden Rührorgan (B; $V = 12$ mL; $n = 2000 \text{ min}^{-1}$) nach 48 h bei der Kultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 ($T = 29$ °C).

Die Verbrauchs- und Bildungskinetiken von Mannit und Nikkomycin Z in den Milliliter-Bioreaktoren entsprechen sehr gut denen der Referenzkultivierung (Abb. 5.39B). Wie im Laborrührreaktor findet in den Milliliter-Bioreaktoren während der stationären Phase die meiste Nikkomycin Z-Bildung statt und endet nach Verbrauch des Mannits im Medium. Die leichte Abweichung der Nikkomycin Z-Konzentration bei $t > 120$ h zwischen Milliliter-Bioreaktor und Laborrührreaktor lässt sich mit dem Zerfall des Produktes bei $\text{pH} > 6$ erklären, wie er von Crüger *et al.* (1985) und Fiedler *et al.* (1982) beobachtet wurde. Dies könnte zukünftig durch eine Regelung des pH vermieden werden, sobald entsprechende optische Sensoren verfügbar sind.

Durch die erfolgreiche parallele Kultivierung von *Streptomyces tendae* zeigt sich, dass die entwickelten Milliliter-Bioreaktoren eine Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung mit morphologisch veränderlichen Mikroorganismen ermöglichen. Weiterhin ist durch die

verfahrenstechnische Auslegung des Bioreaktorsystems eine direkte und zuverlässige Maßstabsübertragung der Prozesse in Reaktoren des Labor- und Pilotmaßstabs möglich.

Teile der vorgestellten Ergebnisse wurden in Hortsch *et al.* (2010) publiziert.

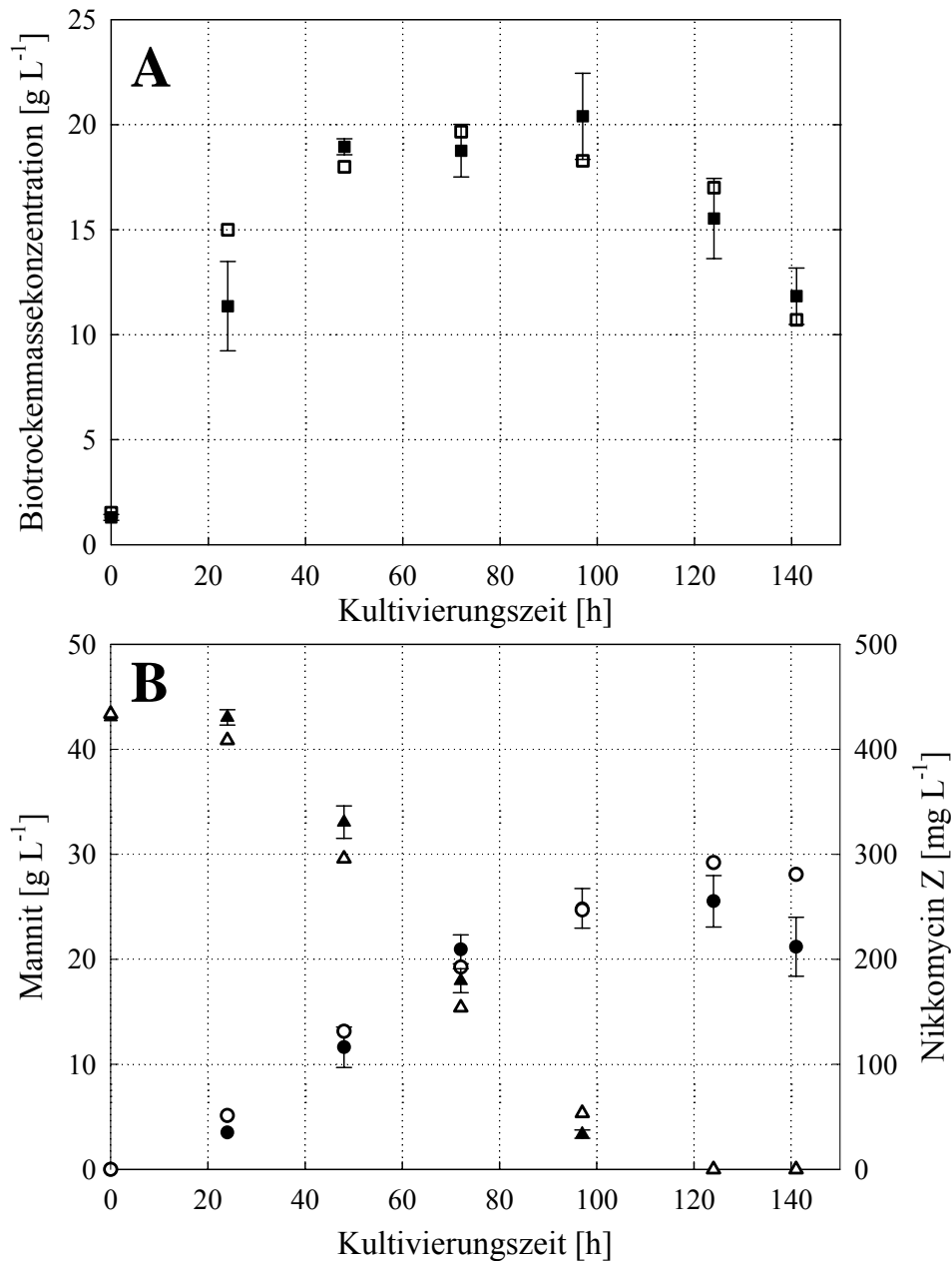


Abb. 5.39: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) (A), sowie Mannitkonzentration (Dreiecke) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) (B) bei der Satzkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 in 12 parallelen Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan (geschlossene Symbole; $T = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V = 10\text{ mL}$; $n = 1200\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zu einer Referenzkultivierung im Laborrührreaktor (offene Symbole; $T = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$).

5.5.2 Ermittlung der repräsentativen Viskosität

In der Referenzkultivierung im Laborrührreaktor konnte gezeigt werden, dass sich bei der Kultivierung von *S. tendae* die Viskosität des Kulturmediums stark erhöht und ein strukturviskoses Verhalten vorliegt (siehe Kapitel 5.1.2). Aufgrund des geringen Füllvolumens ist das rheologische Verhalten der Kulturlösung in den Milliliter-Bioreaktoren messtechnisch nicht erfassbar. Da eine Kenntnis der vorliegenden Viskosität jedoch für die Auslegung und Skalierung von Prozessen wichtig ist, wird im Folgenden eine neu entwickelte Methode zur indirekten Abschätzung des rheologischen Verhaltens in Milliliter-Bioreaktoren beschrieben.

Abbildung 5.40A zeigt eine Korrelation des Konsistenzindex K mit der Biotrockenmassekonzentration. Die Daten wurden dabei aus mehreren Kultivierungen im Laborrührreaktor erhoben. Es besteht ein exponentieller Zusammenhang, der durch die folgende Gleichung gut beschrieben werden kann:

$$K \propto c_X^{2,8} \quad (46)$$

K ... Konsistenzindex [mPa s^m]

c_X ... Biotrockenmassekonzentration [g L⁻¹]

Der ermittelte Exponent von 2,8 liegt dabei sehr gut in dem in der Literatur berichteten Bereich von 2 bis 4 (Henzler und Schäfer 1987, Allen und Robinson 1990, Olsvik und Kristiansen 1994, Riley *et al.* 2000). Die ermittelte Korrelation gilt jedoch nur für Prozesse, bei denen das strukturviskose Verhalten der Kulturlösung ausschließlich aus dem Wachstum der Mikroorganismen folgt, wie es bei *S. tendae* der Fall ist (Warren *et al.* 1995). In Abbildung 5.40B ist das Fließverhalten der *S. tendae* Kulturlösung dargestellt. Das Verhalten kann durch die folgende empirische Gleichung abgebildet werden:

$$m \propto K^{-0,117} \quad (47)$$

m ... Fließindex [-]

Aus den erstellten Beziehungen lässt sich, anhand der im Milliliter-Bioreaktor gemessenen Biotrockenmasse das rheologische Verhalten der Kulturlösung abschätzen, indem aus Gleichung 46 und 47 Konsistenzindex und Fließindex berechnet werden. Damit ist es erstmals möglich, die Viskosität in Milliliter-Bioreaktoren einfach zu bestimmen, ohne neue Messmethoden entwickeln zu müssen.

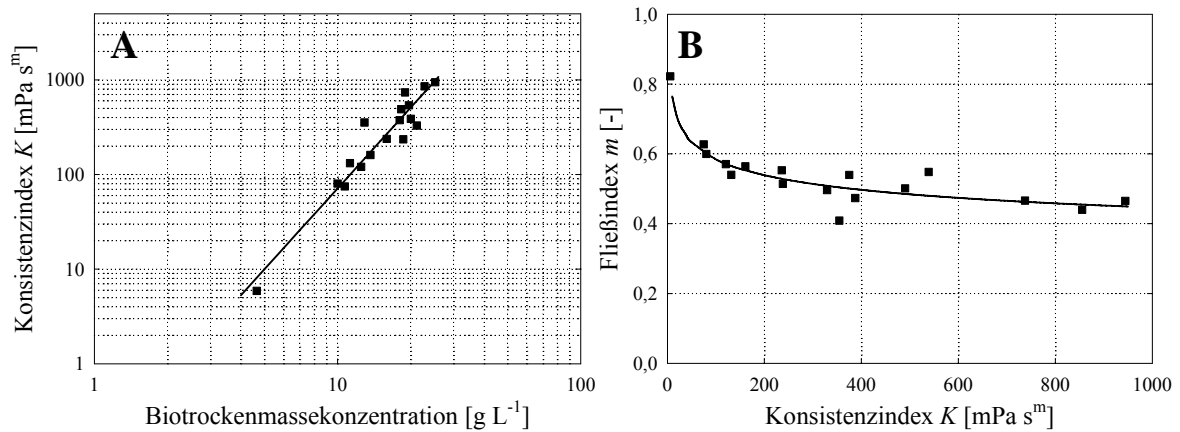


Abb. 5.40: Abhängigkeit zwischen Konsistenzindex und Biotrockenmassekonzentration (A), sowie Fließverhalten (B) von *Streptomyces tendae* Kulturlösungen ($T = 29$ °C).

Die Gültigkeit der in Gleichung 46 und 47 ermittelten Parameter ist jedoch nur gesichert, wenn sich die Kultivierungsbedingungen nicht signifikant ändern. Falls sich zum Beispiel der pH um mehrere Einheiten, oder die Osmolalität um mehrere Zehnerpotenzen ändert, kann dies die Rheologie beeinflussen (Pollard *et al.* 2002).

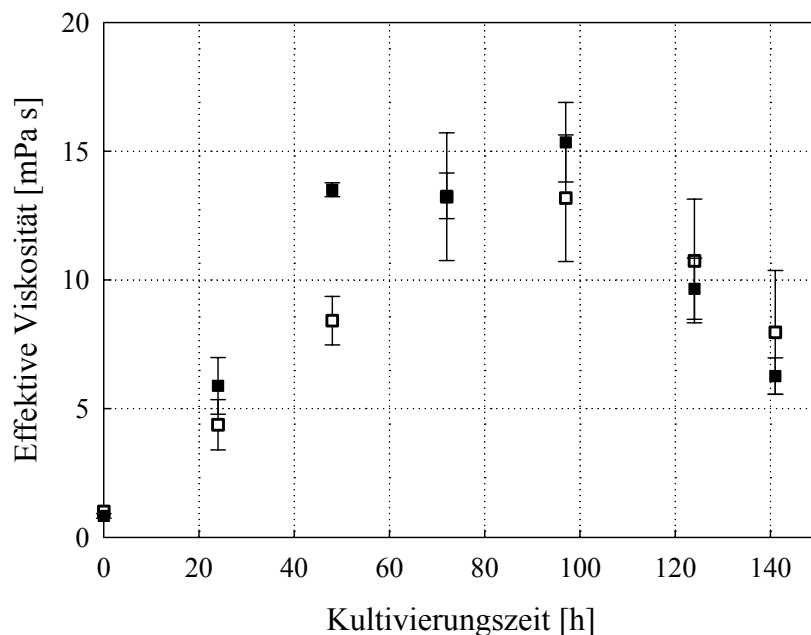


Abb. 5.41: Effektive Viskosität bei der Kultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan (schwarze Quadrate; $T = 29$ °C; $V = 10$ mL; $\gamma = 940$ s⁻¹) im Vergleich zum Laborrührreaktor (weiße Quadrate; $T = 29$ °C; $V = 2000$ mL; $\gamma = 1243$ s⁻¹).

Aus dem ermittelten rheologischen Verhalten lässt sich mit der zur entsprechenden Rührerdrehzahl gehörenden effektiven Schergeschwindigkeit die effektive Viskosität berechnen (Gleichung 25). In Abbildung 5.41 sind die effektiven Viskositäten der Milliliter-

Bioreaktoren im Vergleich zum Laborrührreaktor aufgetragen. Für den Laborrührreaktor wurde dabei das Konzept nach Perez *et al.* (2006; Gleichung 33) zur Berechnung verwendet. Die effektive Viskosität in den Milliliter-Reaktoren steigt während der exponentiellen Wachstumsphase stark an und erreicht in der stationären Phase ein Plateau. Am Ende des Prozesses, nach Verbrauch der Nährstoffe im Medium, ist ein Absinken der Viskosität zu beobachten. Bis auf einen Ausreißer bei $t = 48$ h stimmen die effektiven Viskositäten zwischen Milliliter-Bioreaktor und Laborrührreaktor sehr gut überein. Es liegen maximale effektive Viskositäten von ca. 15 mPa s vor. Dies zeigt den Vorteil gerührter Milliliter-Bioreaktoren im Vergleich zu geschüttelten Systemen, bei denen teilweise bis zu doppelt so hohe effektive Viskositäten unter sonst gleichen Versuchsbedingungen vorliegen (Hortsch *et al.* 2011). Die ermittelten Werte können somit zur Maßstabsübertragung von Prozessen verwendet werden.

5.6 Reaktionstechnische Untersuchung der Nikkomycin Z-Bildung durch *Streptomyces tendae*

5.6.1 Untersuchung von Nährmedienzusätzen im Milliliter-Bioreaktor

Die erfolgreiche Entwicklung des Milliliter-Bioreaktors mit Paddelrührorgan eröffnet die Möglichkeit, Bioprozessoptimierung unter kontrollierten und skalierbaren Bedingungen durchführen zu können. Um die Anwendbarkeit des Bioreaktorblocks zur Prozessoptimierung zu zeigen, wurde die Nikkomycin Z-Bildung von *Streptomyces tendae* W42-0 näher untersucht. Ziel der Experimente war dabei, durch die Zugabe von Vor- und Zwischenstufen der Nikkomycin Z-Synthese eine Steigerung der Nikkomycin-Bildung zu erreichen, da in den bisherigen Satzkultivierungen lediglich 300 mg L^{-1} gebildet wurden.

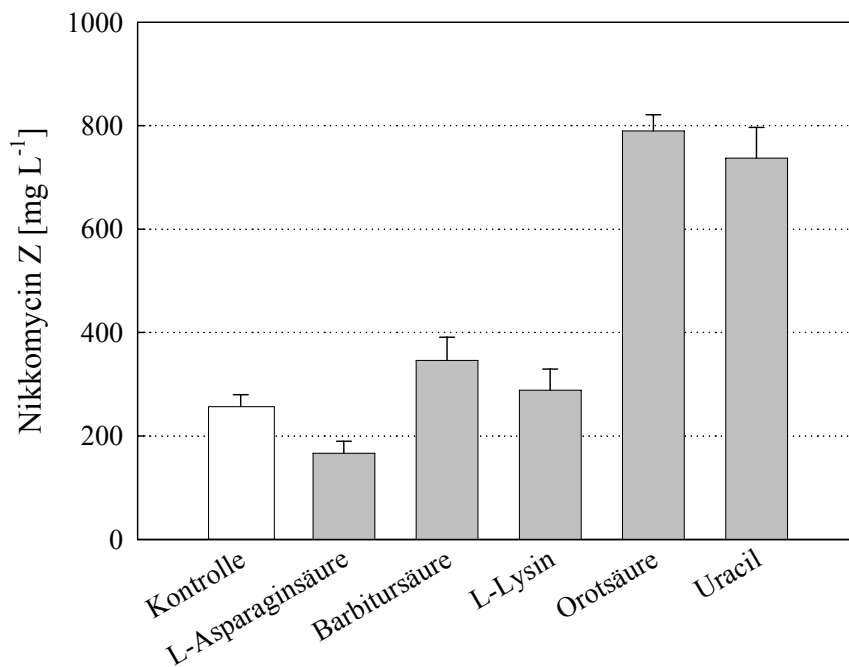


Abb. 5.42: Nach ca. 120 h Kultivierungszeit gebildetes Nikkomycin Z bei der Kultivierung von *Streptomyces tendae* mit unterschiedlichen Medienzusätzen in jeweils drei parallelen Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan ($T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; $V = 10 \text{ mL}$; $n = 1200 \text{ min}^{-1}$).

Bisher ist in der Literatur lediglich die Steigerung der Nikkomycin Z-Bildung durch eine Zugabe von Uracil (Vorläufer von Uridinmonophosphat; UMP) experimentell bekannt (Fiedler *et al.* 1982, Crüger *et al.* 1985, Schüz *et al.* 1993). Deswegen wurde zusätzlich die Auswirkung einer Zugabe von Barbitursäure und Orotsäure (Vorläufer von UMP), sowie von L-Lysin und L-Asparaginsäure (Vorläufer von Hydroxypyridylhomothreonin; HPHT) auf die Nikkomycin Z-Bildung untersucht. Als Kontrolle wurde das Nährmedium ohne

Zusätze verwendet. Weiterhin wurde durch die *online* Messung des pO_2 eine Sauerstofflimitation in allen Reaktoren ausgeschlossen.

Die in den verschiedenen Ansätzen im Milliliter-Bioreaktor gebildete Menge Nikkomycin Z nach 120 h Kultivierungszeit ist in Abbildung 5.42 zu erkennen. Durch die Zugabe von Uracil und Orotsäure wird die Nikkomycin Z Produktion von etwa 300 mg L^{-1} auf ca. 800 mg L^{-1} signifikant gesteigert. Dabei bietet sich vor allen Dingen der Einsatz von Orotsäure als Zusatzstoff für zukünftige Prozesse an, da es um den Faktor drei günstiger als Uracil ist. Die Zugabe von Barbitursäure und L-Lysin bewirkt hingegen nur eine leichte Steigerung der Produktion, während durch die Zugabe von L-Asparaginsäure sogar weniger Nikkomycin Z im Vergleich zur Kontrolle gebildet wird.

Durch eine tägliche Probenahme konnte weiterhin die Kinetik der Nikkomycin-Bildung erfasst werden (Abb. 5.43). Es zeigt sich, dass bereits ab einer Kultivierungszeit von 72 h in den Medien Medien mit Orotsäure und Uracil deutlich mehr Nikkomycin Z gebildet wurde als in der Kontrolle ohne Zusatzstoffe. Der Zeitpunkt der maximalen Nikkomycin-Konzentration liegt in allen Ansätzen bei ca. 120 h Kultivierungszeit.

Eine weitere Steigerung der Nikkomycin Z-Bildung durch eine Kombination von Orotsäure oder Uracil mit einem anderen der untersuchten Zusatzstoffe ist durch die bereits erzielte große Steigerung und aufgrund der im Überschuss vorliegenden Substanzen unwahrscheinlich.

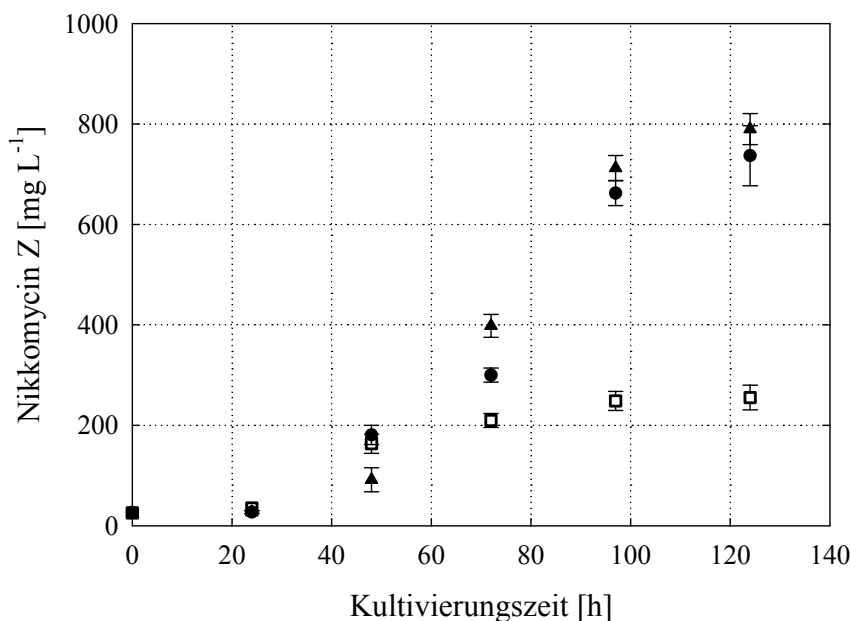


Abb. 5.43: Gebildetes Nikkomycin Z bei der Kultivierung von *Streptomyces tendae* in jeweils drei parallelen Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan mit unterschiedlichen Medienzusätzen: Kontrolle (weiße Quadrate), Orotsäure (Dreiecke) und Uracil (Kreise) ($T = 29 \text{ }^\circ\text{C}$; $V = 10 \text{ mL}$; $n = 1200 \text{ min}^{-1}$).

Die durchgeführten Kultivierungen zeigen die Nutzbarkeit des Bioreaktorblocks zur Optimierung von Bioprozessen. Die 48-fache Parallelisierung ermöglicht bei jeweils drei parallelen Ansätzen pro Versuchsbedingung, die Durchführung von 16 Experimenten unter kontrollierten Bedingungen vergleichbar mit Reaktoren des Labor- und Pilotmaßstabs. Drei parallele Ansätze sind dabei ausreichend, um bei einer relativen Standardabweichung der Versuche in den Milliliter-Bioreaktoren von ca. 4 bis 8 % eine Differenz von ca. 15 bis 20 % zwischen den erhaltenen Versuchsergebnissen statistisch signifikant bestimmen zu können (Vester *et al.* 2009).

5.6.2 Zulaufkultivierung im Laborrührreaktor

Die Bildung von Nikkomycin Z ist wesentlich vom Mannitgehalt des Nährmediums abhängig, das während der stationären Phase verstoffwechselt wird (siehe auch Kapitel 5.1.1). Da in Satzkultivierungen aufgrund der Löslichkeit nur begrenzte Mengen Mannit vorgelegt werden können, bietet sich der Einsatz einer Zulaufkultivierung zur Verlängerung der stationären Phase und damit der Produktbildung an.

Schüz *et al.* (1993) konnten durch Einsatz von Zulaufkultivierungen bereits eine wesentliche Steigerung der Nikkomycin-Bildung zeigen. Die Kultivierungen wurden dabei allerdings in feststoffhaltigen Medien durchgeführt, welches die Analytik und Aufarbeitung erschwert. Folglich wurden in dieser Arbeit die Zulaufversuche in volllöslichem Komplexmedium durchgeführt. Damit eine Limitation durch andere Medienbestandteile sicher ausgeschlossen werden konnte, wurden neben dem Mannit auch andere komplexe Medienbestandteile dem Zulaufmedium beigelegt (siehe Kapitel 4.5.2). Weiterhin wurde der pH während des gesamten Prozesses geregelt, da Nikkomycin Z bei $\text{pH} > 6$ zerfällt (siehe auch Abb. 5.2; Crüger *et al.* 1985) und eine optimale Ausbeute erzielt werden sollte.

Zulaufversuche in den Milliliter-Bioreaktoren, in denen im Parallelansatz effizient eine Optimierung des Zulaufs erfolgen könnte, wurden nicht vorgenommen, da durch die Limitationen der optischen pH-Sensoren keine Regelung unter $\text{pH} < 6$ möglich ist (Kusterer *et al.* 2008). Dadurch würden sich Nikkomycinbildung und -zerfall überlagern und es könnten keinen verlässlichen und skalierbaren Werte zu einer Zulaufkultivierung ermittelt werden.

Anhand der bisherigen Satzkultivierungen konnte die Mannitverbrauchsrate während der stationären Phase zu $0,03 \text{ g}_{\text{Mannit}} \text{ g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ abgeschätzt und der Zulaufvolumenstrom

entsprechend eingestellt werden. Der Zulauf wurde bei einer Prozesszeit von 120 h gestartet, da zu diesem Zeitpunkt das im Satzmedium gelöste Mannit verbraucht sein sollte (siehe Abb. 5.2). Weiterhin wurde die Zulaufkultivierung zunächst im Standardmedium durchgeführt, um die grundsätzliche Durchführbarkeit zu zeigen.

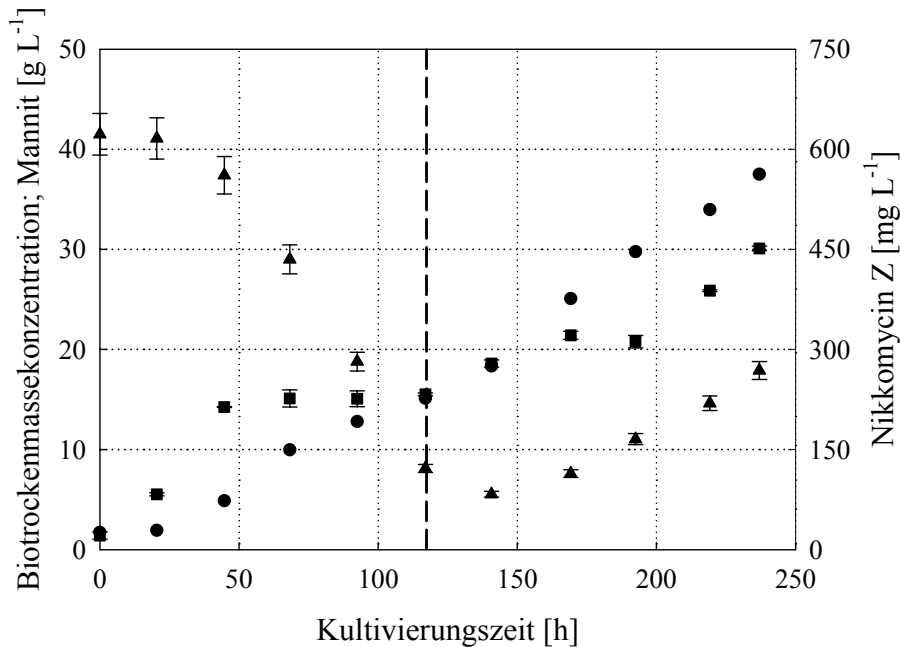


Abb. 5.44: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrat), Mannitkonzentration (Dreiecke) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) während der Zulaufkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Laborrührreaktor ($F_{\text{Mannit}} = 0,67 \text{ g h}^{-1}$; $T = 29 \text{ °C}$; $n = 800 \text{ min}^{-1}$, pH 5,5). Die schwarze Linie markiert den Beginn der Zulaufphase.

Abbildung 5.44 zeigt, dass durch das Zulaufverfahren die Produktbildung von Nikkomycin Z erfolgreich auf bis zu 250 h Kultivierungszeit mit annähernd gleichbleibender Produktbildungsrate verlängert werden konnte. Insgesamt wurden ca. 600 mg L^{-1} Nikkomycin Z gebildet. Während der Zulaufphase ist ein Anstieg der Biotrockenmasse zu beobachten. Der Grund dafür ist einerseits ein geringfügiges Wachstum auf den im Zulauf enthaltenen komplexen Bestandteilen (zum Beispiel Hefeextrakt), als auch die Zunahme an intrazellulären Akkumulationen (Demain 1968, Bu'Lock 1975). Über die gesamte Dauer des Zulaufs kam es allmählich zur Anreicherung von Mannit im Kulturmedium. Demzufolge wurde die Mannitverbrauchsrate etwas zu hoch abgeschätzt.

Die durchgeführte Kultivierung zeigt, dass eine deutliche Verlängerung der stationären Phase und demzufolge eine Steigerung der Nikkomycin Z-Bildung möglich ist.

Anhand der aus dem zuvor beschriebenen Zulaufversuch gewonnenen Erkenntnisse wurde ein optimiertes Zulaufverfahren erarbeitet. Dabei wurde sowohl dem Kultivierungsmedium als auch dem Zulauf Orotsäure hinzugefügt, da diese die Nikkomycin Z-Bildung deutlich

steigert (siehe Kapitel 5.6.1). Weiterhin erfolgte ein Absenken des Volumenstroms des Mannit-Zulaufs, um eine Akkumulation von Mannit im Kulturmedium zu vermeiden.

Durch den optimierten Zulauf konnten nach ca. 260 h Kultivierungszeit mehr als 3 g L^{-1} Nikkomycin Z produziert werden (Abb. 5.45). Weiterhin war zu keinem Zeitpunkt während der Zulaufphase Mannit im Kulturmedium nachweisbar und wurde damit vollständig von den Mikroorganismen verstoffwechselt. Die bisher höchste Produktkonzentration an Nikkomycin Z wurde von Schüz *et al.* (1993) mit $6,7 \text{ g L}^{-1}$ nach 330 h im Zulaufverfahren mit feststoffhaltigem Medium mit Uracil publiziert. Die Arbeitsgruppe verwendete dabei jedoch die Leistungsmutante *S. tendae* Tü 901/S 2566 (BAYER AG).

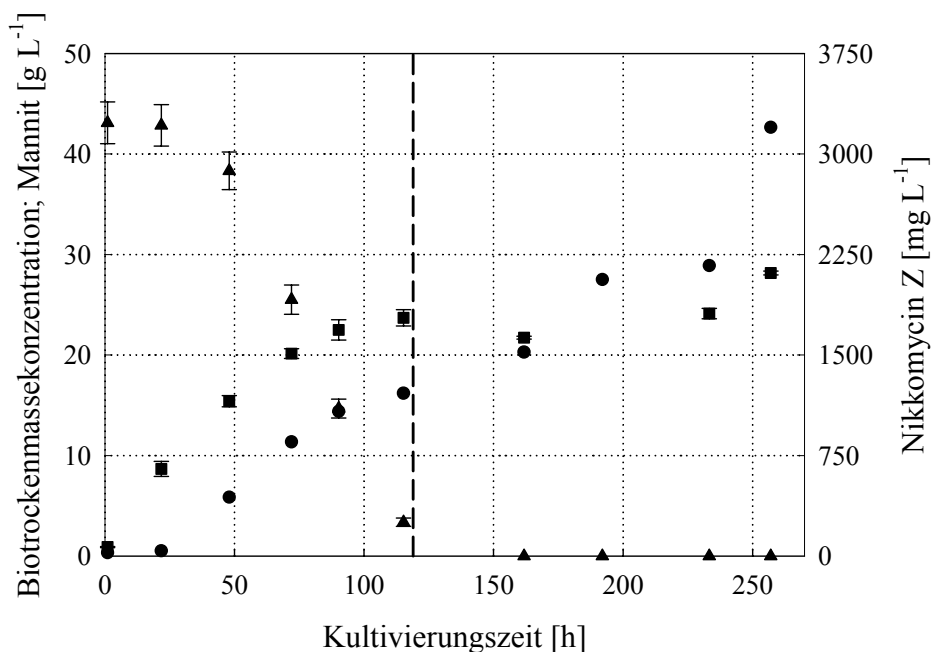


Abb. 5.45: Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), Mannitkonzentration (Dreiecke) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) während der optimierten Zulaufkultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 im Laborrührreaktor ($F_{\text{Mannit}} = 0,4 \text{ g h}^{-1}$; $T = 29 \text{ °C}$; $n = 800 \text{ min}^{-1}$, pH 5,5). Die schwarze Linie markiert den Beginn der Zulaufphase.

Die dargestellte Kultivierung zeigt, dass mit einer Optimierung des Nährmediums, sowie der Prozessführung eine signifikante Steigerung der Nikkomycin Z-Bildung in volllöslichem Medium möglich ist. Dies eröffnet in Kombination mit dem entwickelten Milliliter-Bioreaktorsystem die Möglichkeit einer effizienten Bioprozessentwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von Nikkomycin Z mit *Streptomyces tendae*.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Für die Entwicklung biotechnologischer Produktionsverfahren ist eine große Anzahl an Parallelversuchen notwendig. Besonders die Optimierung der Prozesse, sowie deren Übertragung in den Produktionsmaßstab erfordern zusätzliche Versuchsreihen, die zeitlich, apparativ und personell sehr aufwendig sind und damit die Entwicklung des gesamten Produktionsprozesses verlangsamen. Geeignete miniaturisierte Parallelreaktoren können diese Entwicklungszeiten erheblich verkürzen. In zahlreichen industriell relevanten biotechnologischen Prozessen finden mycel- und pelletbildende Mikroorganismen Anwendung, für die bisher kein gerührtes Parallelsystem zur effizienten Bioprozessentwicklung verfügbar war. Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war deshalb die Entwicklung eines parallelen miniaturisierten Bioreaktorsystems für die Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Als geeigneter Modellmikroorganismus wurde *Streptomyces tendae* (*S. tendae*) verwendet.

Aus der Etablierung und Charakterisierung einer Referenzkultivierung von *S. tendae* im Laborrührreaktor, konnte eine maximale spezifische Wachstumsrate von $\mu_{max} = 0,18 \text{ h}^{-1}$, sowie ein maximaler Sauerstoffübergang von $k_L a_{max} \approx 0,12 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden. Auf Grund des während des gesamten Prozesses vorliegenden Mycelwachstums und der erreichten maximalen Biotrockenmassekonzentration von ca. 20 g L^{-1} zeigte die Kulturlösung ein stark strukturviskoses nicht-Newton'sches Fließverhalten mit einer effektiven Viskosität im Bereich von 15 - 25 mPa s. Während der Kultivierungszeit von 140 h wurden ca. 300 mg L^{-1} des pharmazeutisch relevanten Fungizids Nikkomycin Z gebildet.

Nach der Etablierung des Referenzprozesses wurden Kultivierungsversuche in einem Milliliter-Bioreaktorsystem mit Gas-induzierenden Rührorganen nach Puskeiler *et al.* (2005a) durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich diese Milliliter-Bioreaktoren nicht zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen eignen, da vor allen Dingen das extensive Wandwachstum und die hohe Viskosität des Kulturmediums zu Problemen führten. Eine genauere verfahrenstechnische Charakterisierung zeigte weiterhin, dass Gas-induzierende Rührorgane generell nur eingeschränkt in viskosen Medien einsetzbar sind.

Aus diesem Grund wurde ein neuartiges Rührerkonzept entwickelt, das schematisch in Abbildung 6.1A aufgezeigt ist. Ein paddelförmiges Rührorgan rotiert hierbei auf einer Achse in einem unbewehrten Reaktor und erzeugt eine sich entlang der Reaktorwand ausbreitende Flüssigkeitslamelle. Das Rührorgan wird dabei durch ein rotierendes Magnetfeld im Rührerdrehzahlbereich von 600 bis 1600 min^{-1} angetrieben. Dadurch entsteht ein stark erhöhtes Oberflächen/Volumen-Verhältnis, so dass ein ausreichender Sauerstoffeintrag über die Oberfläche erfolgen kann. Ein weiterer Vorteil der schnell rotierenden Lamelle ist, dass sie Wandwachstum und Schaumbildung effektiv verhindert.

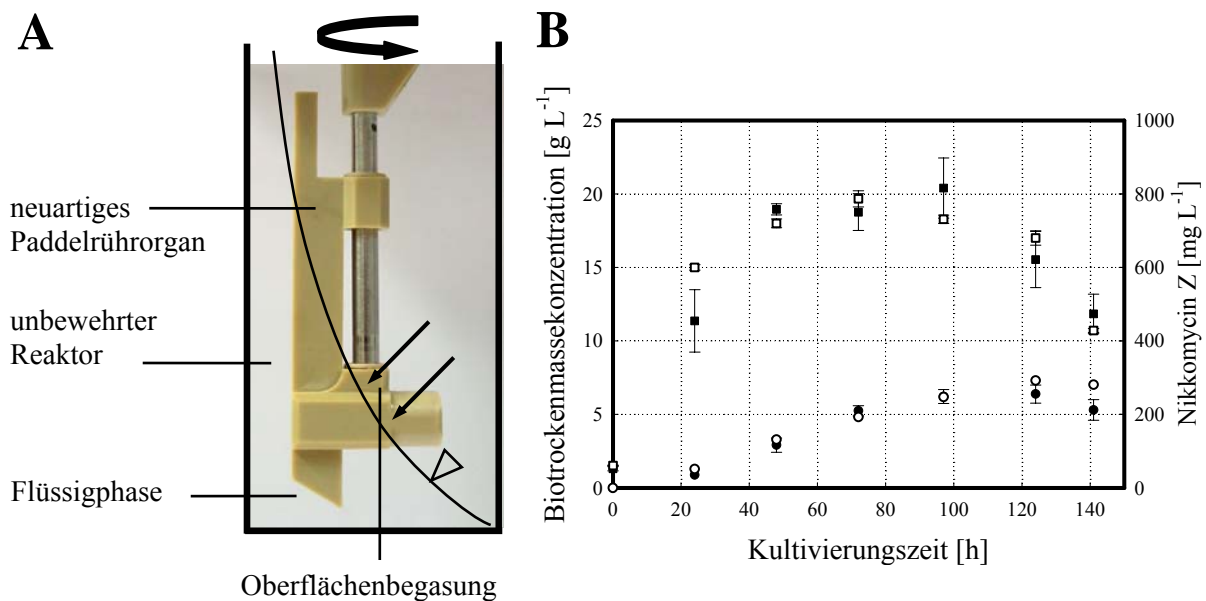


Abb. 6.1: Photo und schematischer Aufbau des entwickelten Milliliter-Bioreaktors mit Paddelrührorgan zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen (A), sowie gemessene Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und gebildete Menge des Fungizids Nikkomycin Z (Kreise) bei der parallelen Kultivierung von *Streptomyces tendae* W42-0 in 12 gerührten Milliliter-Reaktoren (geschlossene Symbole; $T = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V = 10\text{ mL}$; $n = 1200\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zu einer Referenzkultivierung im Laborrührreaktor (offene Symbole; $T = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$) (B).

Zur Optimierung der Durchmischung und des Sauerstoffeintrags, wurden mehrere verschiedene Geometrien des Paddelrührorgans konstruiert und evaluiert. Das finale Rührorgan ist dabei so konstruiert, dass es optimal mit dem Bioreaktorblock nach Weuster-Botz *et al.* (2005) betrieben werden kann und damit eine kontrollierte Kultivierung in 48 parallelen Bioreaktoren ermöglicht.

Für eine zuverlässige Prozessauslegung und -skalierung der Kultivierungen aus dem Milliliter-Maßstab in Reaktoren des Labor- und Pilotmaßstabs wurde das neue Rührorgan verfahrenstechnisch charakterisiert. Messungen des Leistungseintrags mittels eines neu entwickelten Messaufbaus im Milliliter-Bioreaktor zeigten vergleichbare Werte mit einem

Laborrührreaktor als Referenz. Im turbulenten Strömungsbereich ab $Re > 4000$ liegt eine Newton-Zahl von 1,3 vor.

Messungen des Sauerstoffübergangskoeffizienten ($k_L a$) ergaben, dass mit dem neuen Paddelrührorgan durch Oberflächenbegasung ein $k_L a > 0,15 \text{ s}^{-1}$ bei 8 mL Füllvolumen erreicht werden kann. Mit steigendem Füllvolumen sinkt der $k_L a$, da das Oberflächen/Volumen-Verhältnis abnimmt. Weiterhin ist durch das neue Rührerprinzip auch ein ausreichender Sauerstoffeintrag in viskosen Medien gesichert, da durch die vorliegende Oberflächenbegasung der $k_L a$ bei höherer Viskosität weniger stark sinkt, als dies in blasenbegasteten Prozessen der Fall ist.

Zur näheren Charakterisierung der im Milliliter-Bioreaktor auftretenden Kräfte wurde die maximale lokale Energiedissipation (ε_{max}) mit einer neu entwickelten Methode gemessen. Dabei wurde die Partikelgröße eines Ton/Polymer-Flockensystems in den Milliliter-Bioreaktoren gemessen und mit einem Referenzsystem verglichen, woraus dann ε_{max} abgeschätzt werden konnte. Dabei ergab sich ein Quotient aus maximaler und mittlerer Energiedissipation $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\varnothing} = 6$, im Vergleich zu $\varepsilon_{max}/\varepsilon_{\varnothing} = 16$ bei 6-Blatt-Scheibenrührern im Referenz-Laborrührreaktor. Folglich konnte nachgewiesen werden, dass das neue Rührorgan die Leistung sehr gleichmäßig in das Reaktionsmedium einträgt.

Durch die verfahrenstechnische Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass in den neu entwickelten miniaturisierten Reaktoren vergleichbare Werte wie in gerührten Bioreaktoren im Labor- und Pilotmaßstab vorliegen, so dass eine zuverlässige Prozessauslegung und Maßstabsübertragung möglich ist. Dies wurde in der Arbeit anhand der parallelen Kultivierung von *S. tendae* beispielhaft gezeigt. Wachstum und Produktbildung im Milliliter-Bioreaktor ($V = 10 \text{ mL}$) zeigten über die gesamte Kultivierungszeit einen nahezu identischen Verlauf mit der Referenzkultivierung im Laborrührreaktor ($V = 2000 \text{ mL}$) (Abb. 6.1B). In beiden Maßstäben wurde Nikkomycin Z in gleicher Konzentration von den Mikroorganismen produziert. Weiterhin lag durch eine Biotrockenmassekonzentration von ca. 20 g L^{-1} eine hohe Viskosität in den Reaktoren vor. Unter Verwendung einer neu entwickelten Methode konnte das strukturviskose Verhalten in den Milliliter-Reaktoren aus der Biomasse abgeschätzt werden. Mit Hilfe der zuvor ermittelten repräsentativen Schergeschwindigkeit für das Paddelrührorgan wurden die repräsentativen Viskositäten der Kultivierung berechnet und mit der Referenzkultivierung verglichen. Dabei zeigte sich, dass in beiden Systemen nahezu die gleichen maximalen repräsentativen Viskositäten von ca.

15 mPa s vorliegen, was vor allen Dingen für die Maßstabsübertragung von Prozessen mit morphologisch veränderlichen Mikroorganismen wichtig ist.

Abschließend wurden die neu entwickelten Bioreaktoren zur reaktionstechnischen Charakterisierung der Nikkomycinbildung verwendet. Aus der parallelen Untersuchung mehrerer Medienzusatzstoffe konnten Uracil und die preisgünstigere Orotsäure als Nikkomycin Z steigernde Substanzen identifiziert werden. Durch die Zugabe von Orotsäure wurde die Nikkomycin Z-Bildung von 300 mg L^{-1} auf ca. 800 mg L^{-1} gesteigert. Die Etablierung eines Zulaufprozesses mit dem optimierten Kulturmedium im Laborrührreaktor, führte zu einer weiteren Steigerung der Produktion von Nikkomycin Z auf ca. 3 g L^{-1} über eine Kultivierungszeit von 260 h.

Das entwickelte Milliliter-Bioreaktorsystem ermöglicht erstmals die parallele Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung mit morphologisch veränderlichen Mikroorganismen. Damit kann die Entwicklung biotechnologischer Prozesse wesentlich effizienter stattfinden, da bereits zu einem früheren Zeitpunkt in der Prozessentwicklung viele parallele Kultivierungen unter kontrollierten technischen Bedingungen durchgeführt werden können. Weiterhin ist durch die verfahrenstechnische Auslegung des Bioreaktorsystems eine zuverlässige Maßstabsübertragung gewährleistet.

Ausblick

Die erfolgreiche Kultivierung von *S. tendae* in den neu entwickelten Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan zeigt, dass diese zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen eingesetzt werden können. Zukünftig könnten Studien zu weiteren Wachstumsmorphologien wie zum Beispiel Pelletwachstum durchgeführt werden.

Weiterhin kann der mit 48 Rührorganen ausgestattete Bioreaktorblock zur Optimierung der Nikkomycin Z Produktion mit *S. tendae* oder auch zur Optimierung anderer Produktionsprozesse mit morphologisch veränderlichen Mikroorganismen eingesetzt werden. Hierzu kann sowohl die Untersuchung verschiedener Mutanten, die zielgerichtete Medienoptimierung, als auch die Optimierung der Prozessführung im Parallelansatz durchgeführt werden.

Damit eine pH-Regelung für Prozesse mit Actinomyceten oder Pilzen zukünftig möglich ist, wäre die Entwicklung von pH-Sensoren für den Bereich $\text{pH} < 6$ wünschenswert.

Um eine weitergehende verfahrenstechnische Charakterisierung des Paddelrührorgans zu ermöglichen, könnte eine Modellierung der Flüssigkeitsbewegung per *Computational Fluid Dynamics* eingesetzt werden. Das erstellte Modell sollte mit den ermittelten Messdaten verifiziert werden, womit beispielsweise genauere Aussagen über die generierte Stoffaustauschfläche der Flüssigkeit möglich wären.

7 Literatur

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.

Allen DG, Robinson CW. 1990. Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. *Chem Eng Sci* 45:37-48.

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* 22:1051-1058.

Badino AC, Facciotti MCR, Schmidell W. 2001. Volumetric oxygen transfer coefficients (k_{La}) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. *Biochem Eng J* 8:111-119.

Bareither R, Pollard D. 2011. A review of advanced small scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need. *Biotechnol Prog* 27:2-14.

Barrett TA, Wu A, Zhang H, Levy MS, Lye GJ. 2010. Microwell engineering characterization for mammalian cell culture process development. *Biotechnol Bioeng* 105:260-275.

Betts JI, Doig SD, Baganz F. 2006. Characterization and application of a miniature 10 mL stirred-tank bioreactor, showing scale-down equivalence with a conventional 7 L reactor. *Biotechnol Prog* 22:681-688.

Biedermann A, Henzler HJ. 1994. Beanspruchung von Partikeln in Rührreaktoren. *Chem Ing Tech* 66:209-211.

Binnie C, Cossar JD, Stewart DI. 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol* 15:315-320.

Bormann C. 2002. Biosynthesis of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin in *Streptomyces tendae* Tü901 deduced from the analysis of the gene cluster and mutational studies. In: Fierro F, Martin JF. (Ed.). *Microbial Secondary Metabolites: Biosynthesis, Genetics and Regulation*. Research Signpost, Kerala India: 43-61.

Bowen RL. 1986. Unraveling the mysteries of shear-sensitive mixing systems. *Chem Eng* 93:55-63.

Braun S, Vecht-Lifshitz SE. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends Biotechnol* 9:63-68.

Brethauer S, Held M, Panke S. 2007. Online medium-throughput respirometry-based OTR measurements in magnetically stirred cultures. *Biotechnol Bioeng* 98:356-367.

- Bruntner C, Lauer B, Schwarz W, Möhrle V, Bormann C. 1999. Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tü901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Mol Gen Genet* 262:102-114.
- Bu'Lock J. 1975. Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development. In: Smith JE, Berry DR. (Ed.). *The Filamentous Fungi*. John Wiley and Sons, New York: 33-58.
- Buchenauer A, Hofmann MC, Funke M, Büchs J, Mokwa W, Schnakenberg U. 2009. Microbioreactors for fed-batch fermentations with integrated online monitoring and microfluidic devices. *Biosens Bioelectron* 24:1411-1416.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng* 68:589-593.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng* 68:594-601.
- Büchs J. 2001. Introduction to advances and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J* 7:91-98.
- Büchs J, Lotter S, Milbradt C. 2001. Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 7:135-141.
- Calderbank PH, Moo-Young MB. 1959. The prediction of power consumption in the agitation of non-Newtonian fluids. *Chem Eng Res* 37:26-33.
- Campesi A, Cerri MO, Hokka CO, Badino AC. 2009. Determination of the average shear rate in a stirred and aerated tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:241-248.
- Cerri MO, Futiwaki L, Jesus CDF, Cruz AJG, Badino AC. 2008. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. *Biochem Eng J* 39:51-57.
- Chmiel H. 2006. *Bioprozesstechnik*. Elsevier GmbH, München.
- Cooper CM, Fernstrom GA, Miller SA. 1944. Performance of agitated gas-liquid contactors. *Ind Eng Chem* 36:504-509.
- Crueger W, Crueger A. 1989. *Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*. Oldenburg Verlag, München.
- Crüger W, Frommer W, Goelker C, Kaiser JW, Moeschler HF, Salcher O, Schedel M, Wehlmann H. 1985. Neue Pflanzenschutzwirkstoffe aus Mikroorganismen: Ausarbeitung von Herstellungsverfahren für Nikkomycine. *Pflanzenschutz-Nachrichten BAYER* 38:305-348.
- Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KCAM. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng* 55:715-276.

- Cutter LA. 1966. Flow and turbulence in a stirred tank. *AIChE J* 12:35-45.
- Dähn U, Hagenmaier H, Höhne H, König WA, Wolf G, Zähler H. 1976. Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen. *Arch Microbiol* 107:143-160.
- Demain A. 1968. Regulatory mechanisms and the industrial production of microbial metabolites. *Lloydia* 31:395-418.
- Doig SD, Diep A, Baganz F. 2005. Characterisation of a novel miniaturised bubble column bioreactor for high throughput cell cultivation. *Biochem Eng J* 23:97-105.
- Ducla JM, Desplanches H, Chevalier JL. 1983. Effective viscosity of non-Newtonian fluids in a mechanically stirred tank. *Chem Eng Commun* 21:29-36.
- Fiedler HP, Kurth R, Langhärig J, Delzer J, Zähler H. 1982. Nikkomycins: Microbial inhibitors of chitin synthase. *J Chem Tech Biotechnol* 32:271-280.
- Fiedler HP. 1984. Screening for new microbial products by high-performance liquid chromatography using a photodiode array detector. *J Chromatogr* 316:487-494.
- Frachon E, Bondet V, Munier-Lehmann H, Bellalou J. 2006. Multiple microfermentor battery: a versatile tool for use with automated parallel cultures of microorganisms producing recombinant proteins and for optimization of cultivation protocols. *Appl Environ Microbiol* 72:5225-5231.
- Fuchs R, Ryu DDY. 1971. Effect of surface aeration on scale-up procedures for fermentation processes. *Ind Eng Chem Process Des Dev* 10:190-196.
- Funke M, Diederichs S, Kensy F, Müller C, Büchs J. 2009. The baffled microtiter plate: increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnol Bioeng* 103:1118-1128.
- Funke M, Buchenauer A, Schnakenberg U, Mokwa W, Diederichs S, Mertens A, Müller C, Kensy F, Büchs J. 2010a. Microfluidic BioLector – microfluidic bioprocess control in microtiter plates. *Biotechnol Bioeng* 107:497-505.
- Funke M, Buchenauer A, Mokwa W, Kluge S, Hein L, Muller C, Kensy F, Büchs J. 2010b. Bioprocess control in microscale: Scalable fermentations in disposable and user-friendly microfluidic systems. *Microb Cell Fact* 9:86.
- Gaddis ES. 1999. Mass transfer in gas-liquid contactors. *Chem Eng Process* 38:503-510.
- Galgiani JN. 2007. Coccidioidomycosis: Changing perceptions and creating opportunities for its control. *Ann NY Acad Sci* 1111:1-18.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E. 1998. Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. *Biochem Eng J* 1:1-10.
- Gill NK, Appleton M, Baganz F, Lye GJ. 2008a. Design and characterisation of a miniature stirred bioreactor system for parallel microbial fermentations. *Biochem Eng J* 39:164-176.

- Gill NK, Appleton M, Baganz F, Lye GJ. 2008b. Quantification of power consumption and oxygen transfer characteristics of a stirred miniature bioreactor for predictive fermentation scale-up. *Biotechnol Bioeng* 100:1144-1155.
- Goldberg J, Connolly P, Schnizlein-Bick C, Durkin M, Kohler S, Smedema M, Brizendine E, Hector R, Wheat J. 2000. Comparison of nikkomycin Z with ampho-tericin B and itraconazole for treatment of histoplasmosis in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1624-1629.
- Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A. 2007. Biocatalytic ketone reduction - A powerful tool for the production of chiral alcohols - Part II: Whole-cell reductions. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:249-255.
- Graybill JR, Najvar LK, Bocanegra R, Hector RF, Luther MF. 1998. Efficacy of nikkomycin Z in the treatment of murine histoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2371-2374.
- Guez JS, Müller CH, Danze PM, Büchs J, Jacques P. 2008. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *J Biotechnol* 134:121-126.
- Harkins WD, Jordan HF. 1930. A method for the determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring. *J Am Chem Soc* 52:1751-1772.
- Harms P, Kostov Y, French JA, Soliman M, Anjanappa M, Ram A, Rao G. 2006. Design and performance of a 24-station high throughput microbioreactor. *Biotechnol Bioeng* 93:6-13.
- Havel J, Franco-Lara E, Weuster-Botz D. 2008. A parallel bubble column system for the cultivation of phototrophic microorganisms. *Biotechnol Lett* 30:1197-1200.
- 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.
- Hector RF, Zimmer BL, Pappagianis D. 1990. Evaluation of nikkomycins X and Z in murine models of coccidioidomycosis, histoplasmosis, and blastomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 34:587-593.
- Hector RF. 1993. Compounds Active against Cell Walls of Medically Important Fungi. *Clin Microbiol Rev* 6:1-21.
- Hege-Treskatis D, King R, Wolf H, Gilles ED. 1992. Nutritional control of nikkomycin and juglomycin production by *Streptomyces tendae* in continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 36:440-445.
- Henzler HJ. 1980. Begasen höherviskoser Flüssigkeiten. *Chem Ing Tech* 52:643-652.
- Henzler HJ. 1982. Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter. *Chem Ing Tech* 54:461-476.

Henzler HJ. 2000. Particle stress in bioreactors. In: Scheper T. (Ed.). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 67:35–82.

Henzler HJ. 2007. Auslegung von Rührfermentern – Berücksichtigung der nicht-Newton'schen Eigenschaften von Fermentationslösungen. *Chem Ing Tech* 79:951-965.

Henzler HJ, Kauling J. 1985. Scale-up of mass transfer in highly viscous liquids. *Fifth European Conference on Mixing, Würzburg, Germany* 303-312.

Henzler HJ, Schäfer EE. 1987. Viskose und elastische Eigenschaften von Fermentationslösungen. *Chem Ing Tech* 59:940-944.

Henzler HJ, Biedermann A. 1996. Modelluntersuchungen zur Partikelbeanspruchung in Reaktoren. *Chem Ing Tech* 68:1546-1561.

Hinze JO. 1955. Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion processes. *AIChE Journal* 1:289-295.

Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H. 2005. Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioeng* 92:614-623.

Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H. 2009. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnol Bioeng* 103:1202-1213.

Höfel T, Wittmann E, Reinecke L, Weuster-Botz D. 2010. Reaction engineering studies for the production of 2-hydroxyisobutyric acid with recombinant *Cupriavidus necator* H 16. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:477-484.

Hoffmann J, Tralles S, Hempel DC. 1992. Testsystem zur Untersuchung der mechanischen Beanspruchung von Partikeln im Bioreaktor. *Chem Ing Tech* 64:953-956.

Hoffmann J, Büscher K, Hempel DC. 1995. Ermittlung von maximalen Scherspannungen in Rührbehältern. *Chem Ing Tech* 67:210-214.

Hortsch R, Weuster-Botz D. 2010a. Power Consumption and Maximum Energy Dissipation in a Milliliter-Scale Bioreactor. *Biotechnol Prog* 26:595-599.

Hortsch R, Weuster-Botz D. 2010b. Milliliter-scale stirred tank reactors for the cultivation of microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 73:59-80.

Hortsch R, Stratmann A, Weuster-Botz D. 2010. New Milliliter-Scale Stirred Tank Bioreactors for the Cultivation of Mycelium Forming Microorganisms. *Biotechnol Bioeng* 106:443-451.

Hortsch R, Weuster-Botz D. 2011. Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:69-76.

Hortsch R, Krispin H, Weuster-Botz D. 2011. Process performance of parallel bioreactors for batch cultivation of *Streptomyces tendae*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 34:297-304.

- Huber R, Ritter D, Hering T, Hillmer AK, Kensity F, Müller C, Wang L, Büchs J. 2009. Robo-Lector - a novel platform for automated high-throughput cultivations in microtiter plates with high information content. *Microb Cell Fact* 8:42.
- Isett K, George H, Herber W, Amanullah A. 2007. Twenty-four-well plate miniature bioreactor high-throughput system: assessment for microbial cultivations. *Biotechnol Bioeng* 98:1017-1028.
- Ishige T, Honda K, Shimizu S. 2005. Whole organism biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* 9:174-180.
- Jeude M, Dittrich B, Niederschulte H, Anderlei T, Knocke C, Klee D, Büchs J. 2006. Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnol Bioeng* 95:433-445.
- 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* 81:829-836.
- Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 52:672-684.
- Junker B, Walker A, Hesse M, Lester M, Vesey D, Christensen J, Burgess B, Connors N. 2008. Pilot-scale process development and scale up for antifungal production. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:445-458.
- Kelly W, Gigas B. 2003. Using CFD to predict the behaviour of power law fluids near axial-flow impellers operation in the transitional flow regime. *Chem Eng Sci* 58:2141-2152.
- Kensity F, John GT, Hofmann B, Büchs J. 2005. Characterisation of operation conditions and online monitoring of physiological culture parameters in shaken 24-well microtiter plates. *Bioprocess Biosyst Eng* 75:75-81.
- Kensity F, Zang E, Faulhammer CH, Tan RK, Büchs J. 2009. Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microb Cell Fact* 8:31.
- King R. 1997. A structured mathematical model for a class of organisms: I. Development of a model for *Streptomyces tendae* and application of model-based control. *J Biotechnol* 52:219-234.
- Knorr B, Schlieker H, Hohmann HP, Weuster-Botz D. 2007. Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochem Eng J* 33:263-274.
- Kolmogorov AN. 1958. Die lokale Struktur der Turbulenz in einer inkompressiblen zähen Flüssigkeit bei sehr großen Reynoldsschen Zahlen. In: Goering H. (Ed.). Sammelband zur statistischen Theorie der Turbulenz. Akademie-Verlag, Berlin: 71-76.
- Kostov Y, Harms P, Randers-Eichhorn L, Rao G. 2001. Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnol Bioeng* 72:346-352.

- Kraume M. 2003. Mischen und Rühren. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kresta S. 1998. Turbulence in Stirred Tanks: Anisotropic, and Applied. *Can J Chem Eng* 76:563-576.
- Kusterer A. 2007. Reaktionstechnische Optimierung von Parallelbioreaktoren für kontrollierte Bioprozesse. Dissertation TU München, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Kusterer A, Krause C, Kaufmann K, Arnold M, Weuster-Botz D. 2008. Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess Biosyst Eng* 31:207-215.
- Larsen B, Rask Poulsen B, Eriksen NT, Lonsmann Iversen JJ. 2004. Homogeneous batch cultures of *Aspergillus oryzae* by elimination of wall growth in the Variomixing bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:192–198.
- Lauer B, Russwurm R, Schwarz W, Kálmánchelyi A, Bruntner C, Rosemeier A, Bormann C. 2001. Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tü901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety and assembly of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Mol Gen Genet* 264:662-673.
- Lamping SR, Zhang H, Allen B, Shamlou PA. 2003. Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing. *Chem Eng Sci* 58:747-758.
- Lee PJ, Hung PJ, Rao VM, Lee LP. 2006. Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology. *Biotechnol Bioeng* 94:5–14.
- Liepe F, Meusel W, Möckel HO, Platzer B, Weißgärber H. 1988. Stoffvereinigung in Fluiden Phasen. In: Weiß S, Berghoff W, Grahn E, Gruhn G, Güsewell G, Plötner W, Robel H, Schubert M. (Ed.). Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim: Band 4.
- 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* 34:11-34.
- Linek V, Benes P, Vacek, V. 1989. Dynamic pressure method for k_{La} measurement in large-scale bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 33:1406–1412
- Linek V, Sinkule J, Benes P. 1991. Critical assessment of gassing-in methods for measuring k_{La} in fermenters. *Biotechnol Bioeng* 38:323-330.
- Lohr D, Buschulte T, Gilles ED. 1989. Continuous cultivation of *Streptomyces tendae* in different media. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:274-279.
- Marques MPC, Cabral JMS, Fernandes P. 2010. Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *J Chem Technol Biotechnol* 85:1184-1198.
- Metz B, Kossen NWF. 1977. The growth of molds in the form of pellets - A literature review. *Biotechnol Bioeng* 19:781-799.

- Metzner AB, Otto RE. 1957. Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE J* 3:3-10.
- Micheletti M, Lye GJ. 2006. Microscale bioprocess optimisation. *Curr Opin Biotech* 17:611–618.
- Middleton JC. 1985. Gas–liquid dispersion and mixing. In: Harnby N, Edwards MF, Nienow AW. (Ed.). *Mixing in the process industry*. Butterworth & Co, London: 322–355.
- Mundry C, Kuhn KP. 1991. Modelling and parameter identification for batch fermentations with *Streptomyces tendae* under phosphate limitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:306-311.
- Nevalainen KMH, Te’o VSJ, Bergquist PL. 2005. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol* 23:468–474.
- Nienow AW. 1990. Agitators for mycelial fermentations. *Trends Biotechnol* 8:224-233.
- Nix DE, Swezey RR, Hector R, Galgiani JN. 2009. Pharmacokinetics of Nikkomycin Z after single rising oral doses. *Antimicrob Agents Ch* 53:2517-2521.
- Olsvik E, Kristiansen B. 1994. Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnol Adv* 12:1-39.
- Oolman T, Walitza E, Chmiel H. 1986. Zur Rheologie von Biosuspensionen. *Rheol Acta* 25:433-439.
- Panula-Perälä J, Siurkus J, Vasala A, Wilmanowski R, Casteleijn MG, Neubauer P. 2008. Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microb Cell Fact* 7:31.
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22:189-259.
- Perez JAS, Porcel EMR, Lopez JLC, Sevilla JMF, Chisti Y. 2006. Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chem Eng J* 124:1-5.
- Peter CP. 2007. Auslegung geschüttelter Bioreaktoren für hochviskose und hydromechanisch empfindliche Fermentationssysteme. Dissertation RWTH Aachen, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.
- Peter CP, Lotter S, Maier U, Büchs J. 2004. Impact of out-of-phase conditions on screening results in shaking flask experiments. *Biochem Eng J* 17:205-215.
- Peter CP, Suzuki Y, Büchs J. 2006. Hydromechanical stress in shake flasks: correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnol Bioeng* 93:1164-1176.
- Pollard DJ, Hunt G, Kirschner TK, Salmon PM. 2002. Rheological characterization of a fungal fermentation for the production of pneumocandins. *Bioprocess Biosyst Eng* 24:373–383.

Puskeiler R. 2004. Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung. Dissertation TU München, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik.

Puskeiler R, Kaufmann K, Weuster-Botz D. 2005a. Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnol Bioeng* 89:512-523.

Puskeiler R, Kusterer A, John GT, Weuster-Botz D. 2005b. Miniature bioreactors for automated high-throughput bioprocess design (HTBD): reproducibility of parallel fed-batch cultivations with *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 42:227-235.

Reichl U, King R, Gilles ED. 1992a. Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnol Bioeng* 39:164-170.

Reichl U, King R, Gilles ED. 1992b. Effect of temperature and medium composition on mycelial growth of *Streptomyces tendae* in submerged culture. *J Basic Microbiol* 3:193-200.

Riley GL, Tucker KG, Paul GC, Thomas CR. 2000. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnol Bioeng* 68:161-172.

Ryu DY, Humphrey AE. 1972. A reassessment of oxygen transfer rates in antibiotics fermentations. *J Ferment Technol* 50:424-431.

Samorski M, Müller-Newen G, Büchs J. 2005. Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: A novel measurement technique for shaken microtiter plates. *Biotechnol Bioeng* 92:61-68.

Saravanan K, Joshi JB. 1995. Gas-Inducing-Type Mechanically Agitated Contactors: Hydrodynamic Characteristics of Multiple Impellers. *Ind Eng Chem Res* 34:2499-2514.

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.

Schlegel HG. 1992. Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Schneider K, Schütz V, John GT, Heinzle E. 2009. Optical device for parallel online measurement of dissolved oxygen and pH in shake flask cultures. *Bioprocess Biosyst Eng* 33:541-547.

Schüz T. 1990. Pelletbildung bei *Streptomyces tendae* Tü901/S2566 und verfahrenstechnische Optimierung der Nikkomycin-Fermentation. Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Biologie.

Schüz T, Fiedler HP, Zähler H. 1993. Optimized nikkomycin production by fed-batch and continuous fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:433-437.

Smith JJ, Lilly MD, Fox RI. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 35:1011-1023.

- Sheng J, Meng H, Fox RO. 2000. A large eddy PIV method for turbulence dissipation rate estimation. *Chem Eng Sci* 55:4423-4434.
- Szita N, Boccazzi P, Zhang Z, Boyle P, Sinskey AJ, Jensen KF. 2005. Development of a multiplexed microbioreactor system for high-throughput bioprocessing. *Lab Chip* 5:819-826.
- Tang YJ, Laidlaw D, Gani K, Keasling JD. 2006. Evaluation of the effects of various culture conditions on Cr(VI) reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 in a novel high-throughput mini-bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 95:176-184.
- Thomasi SS, Cerri MO, Badino AC. 2010. Average shear rate in three pneumatic bioreactors. *Bioprocess Biosyst Eng* 33:979-988.
- Treskatis SK, Orgeldinger V, Wolf H, Gilles ED. 1997. Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol Bioeng* 53:191-201.
- Van Leeuwen M, Heijnen JJ, Gardeniers H, van der Wielen LAM, van Gulik WM. 2009. Development of a system for the on-line measurement of carbon dioxide production in microbioreactors: Application to aerobic batch cultivations of *Candida utilis*. *Biotechnol Prog* 25:892-897.
- Van Leeuwen M, Krommenhoek E, Heijnen JJ, Gardeniers H, van der Wielen LAM, van Gulik WM. 2010. Aerobic batch cultivation in micro bioreactor with integrated electrochemical sensor array. *Biotechnol Prog* 26:293-300.
- 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* 18:357-364.
- Vecht-Lifhsitz SE, Magdassi S, Braun S. 1990. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnol Bioeng* 35:890-896.
- Vester A, Hans M, Hohmann HP, Weuster-Botz D. 2009. Discrimination of riboflavin producing *Bacillus subtilis* strains based on their fed-batch process performances on a millilitre-scale. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:71-76.
- Waldraff W, King R, Gilles ED. 1997. Optimal feeding strategies by adaptive mesh selection for fed-batch bioprocesses. *Bioproc Eng* 17:221-227.
- Warren SJ, Keshavaz-Moore E, Shamlou PA, Lilly MD, Thomas CR, Dixon K. 1995. Rheologies and morphologies of three actinomycetes in submerged culture. *Biotechnol Bioeng* 45:80-85.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176:386-390.
- Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Arnold M. 2001a. Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochem Eng J* 7:163-170.

- Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Hawrylenko A. 2001b. Process-engineering characterization of small-scale bubble columns for microbial process development. *Bioprocess Biosyst 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.
- Weuster-Botz D. 2005. Parallel reactor systems for the bioprocess development. In: Scheper T. (Ed.). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 92:125-143.
- Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M. 2005. Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst Eng* 28:109-119.
- Weuster-Botz D, Hekmat D, Puskeiler R, Franco-Lara E. 2007. Enabling technologies: Fermentation and downstream processing. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 105:205–247.
- Wittmann C, Kim HM, John G, Heinzle E. 2003. Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnol Lett* 25:377-380.
- Wu H, Patterson GK. 1989. Laser-Doppler measurements of turbulent-flow parameters in a stirred mixer. *Chem Eng Sci* 44:2207-2221.
- Wucherpennig T, Kiep KA, Driouch H, Wittmann C, Krull R. 2010. Morphology and rheology in filamentous cultivations. *Adv Appl Microbiol* 72:89-136.
- Zanzotto A, Szita N, Boccazzi P, Lessard P, Sinskey AJ, Jensen KF. 2004. Membrane-aerated micro-bioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnol Bioeng* 87:243–254.
- Zanzotto A, Boccazzi P, Gorret N, van Dyk T, Sinskey A, Jensen K. 2006. In situ measurement of bioluminescence and fluorescence in an integrated microbioreactor. *Biotechnol Bioeng* 93:40–47.
- Zhang Z, Szita N, Boccazzi P, Sinskey AJ, Jensen KV. 2006. A well-mixed, polymer-based microbioreactor with integrated optical measurements. *Biotechnol Bioeng* 93:286-296.
- Zhang H, Lamping SR, Pickering SCR, Lye GJ, Shamlou PA. 2008. Engineering characterisation of a single well from 24-well and 96-well microtitre plates. *Biochem Eng J* 40:138-149.
- Zhou G, Kresta M. 1996. Impact of tank geometry on the maximum turbulence energy dissipation rate for impellers. *AIChE J* 42:2476–2490.
- Zhou GW, Kresta SM. 1998. Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. *Chem Eng Sci* 53:2063-2079.
- Zlokarnik M. 1973. Rührleistung in begasten Flüssigkeiten. *Chem Ing Tech* 45:689-692.
- Zlokarnik M. 1999. Rührtechnik. Springer Verlag, Berlin Heidelberg..

Zlokarnik M. 2005. Stirring. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Verlag Chemie, Weinheim: 1-40.

Abkürzungen und Formelzeichen

Abkürzungen	Bezeichnung
A/D	Analog/Digital
BTM	Biotrockenmassekonzentration
CFD	<i>Computational Fluid Dynamics</i>
CTR	<i>Carbon Transfer Rate</i>
Fr	Froude-Zahl
G	Generator
HPHT	Hydroxypyridylhomothreonin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HTBD	<i>High Throughput Bioprocess Design</i>
LDA	Laser-Doppler-Anemometrie
M	Motor
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MTP	Mikrotiterplatte
Ne	Newton-Zahl
OD	optische Dichte
OTR	<i>Oxygen Transfer Rate</i>
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEEK	Poly-(Ether-Ether-Keton)
PEG	Polyethylenglykol-Lösungen
PEP	Phosphoenolpyruvat
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PIV	<i>Particle Image Velocimetry</i>
Re	Reynolds-Zahl
Re _{eff}	effektive Reynolds-Zahl
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
W	Wattmeter
XG	Xanthan-Lösungen

Formelzeichen	Bezeichnung	Einheit
$A_{L/G}$	Phasengrenzfläche gasförmig/flüssig	$[m^2]$
a	spezifische Phasengrenzfläche	$[m^{-1}]$
a	empirischer Parameter	$[-]$
a_R	Abstand der äußeren Kante des Rührorgans zum Achsenmittelpunkt auf der Rückseite des Rührorgans	$[m]$
a_V	Abstand der äußeren Kante des Rührorgans zum Achsenmittelpunkt auf der Vorderseite des Rührorgans	$[m]$
B	Bodenabstand zwischen Reaktor und Rührorgan	$[m]$
BTM_{max}	maximale Biotrockenmassekonzentration	$[g L^{-1}]$
b	empirischer Parameter	$[-]$
b	Breite des Rührorgans	$[m]$
b_R	Breite des Rührorgans auf der Rückseite	$[m]$
b_V	Breite des Rührorgans auf der Vorderseite	$[m]$
C_1	empirischer Parameter	$[W^{-\alpha_1} L^{\alpha_1} m^{-\beta_1} s^{\beta_1-1}]$
C_2	empirischer Parameter	$[W^{-\alpha_2} L^{\alpha_2} m^{-\beta_2} s^{\beta_2-\gamma_2-1} Pa^{-\gamma_2}]$
c	empirischer Parameter	$[-]$
c_D	Dissipationsbeiwert	$[-]$
c_{O_2}	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase	$[g L^{-1}]$
$c_{O_2,G}$	Sauerstoffkonzentration in der Gasphase	$[g L^{-1}]$
$c_{O_2,L}$	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase	$[g L^{-1}]$
$c^*_{O_2}$	Sauerstoffkonzentration an der Phasengrenze	$[g L^{-1}]$
$c^*_{O_2,G}$	Sauerstoffkonzentration in der Gasphase an der Phasengrenze	$[g L^{-1}]$
$c^*_{O_2,L}$	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase an der Phasengrenze	$[g L^{-1}]$
c_X	Biotrockenmassekonzentration	$[g L^{-1}]$
D	Reaktordurchmesser	$[m]$
D	Diffusionskoeffizient	$[m^2 s^{-1}]$
$D_{O_2,G}$	Sauerstoff Diffusionskoeffizient in Gas	$[m^2 s^{-1}]$
$D_{O_2,L}$	Sauerstoff Diffusionskoeffizient in Flüssigkeit	$[m^2 s^{-1}]$
d	Rührerdurchmesser	$[m]$
d	empirischer Parameter	$[-]$
$d_{50,3}$	Medianwert der Volumensummenverteilung	$[\mu m]$
e	empirischer Parameter	$[-]$
F_G	Gasvolumenstrom	$[L h^{-1}]$
F_{Mannit}	Volumenstrom des zudosierten Mannits	$[g h^{-1}]$
f	empirischer Parameter	$[-]$
H	Höhe der Flüssigkeitssäule im ungerührten Zustand	$[m]$
h	Höhe des Rührerblatts	$[m]$
h_1	Abstand vom Reaktorboden zur Mitte des ersten Rührerblatts	$[m]$

h_2	Abstand vom Reaktorboden zur Mitte des zweiten Rührerblatts	[m]
h_3	Abstand vom Reaktorboden zur Mitte des dritten Rührerblatts	[m]
K	Konsistenzindex	[mPa s ^m]
k	empirische Konstante	[-]
k_H	Henry-Konstante	[mol m ⁻³ bar ⁻¹]
k_L	Stoffübergangskoeffizient	[m s ⁻¹]
$k_L a$	Sauerstoffübergangskoeffizient	[s ⁻¹]
$k_L a_{\text{calc}}$	modellierter Sauerstoffübergangskoeffizient	[s ⁻¹]
$k_L a_{\text{exp}}$	experimentell bestimmter Sauerstoffübergangskoeffizient	[s ⁻¹]
$k_L a_{\text{max}}$	maximaler Sauerstoffübergangskoeffizient	[s ⁻¹]
L	Anpassungsparameter	[-]
M	Drehmoment	[N m]
M_{O_2}	Molmasse von Sauerstoff	[g mol ⁻¹]
m	Fließindex	[-]
$m_{\text{O}_2, \text{G/L}}$	Sauerstoffmassenstrom über die Grenzfläche	[g h ⁻¹]
Ne	Newton-Zahl	[-]
n	Rührerdrehzahl; Schüttelfrequenz	[min ⁻¹]
P	Leistung	[W]
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck	[bar]
Q	Gasdurchsatzkennzahl	[-]
Re	Reynolds-Zahl	[-]
Re_{eff}	effektive Reynolds-Zahl	[-]
s_R	Spaltmaß zwischen Rührorgan und Reaktorwand auf der Rückseite des Rührorgans	[m]
s_V	Spaltmaß zwischen Rührorgan und Reaktorwand auf der Vorderseite des Rührorgans	[m]
T	Temperatur	[°C]
t	Zeit	[s, h]
t_E	Ansprechzeit	[s]
u_G	Gasleerrohrgeschwindigkeit	[m s ⁻¹]
u_{tip}	Rührerspitzen geschwindigkeit	[m s ⁻¹]
V	Reaktionsvolumen	[L]
V_L	Volumen der Flüssigphase	[L]
V_M	Molvolumen des idealen Gases	[mol L ⁻¹]
v	Geschwindigkeit	[m s ⁻¹]
v_0	Geschwindigkeit an der Systemgrenze	[m s ⁻¹]
x	Koordinate in x-Richtung	[-]
x	Dicke der laminaren Grenzschicht	[m]
x_G	Dicke der laminaren Grenzschicht der Gasphase	[m]
x_L	Dicke der laminaren Grenzschicht der Flüssigphase	[m]
y	Koordinate in y-Richtung	[-]

$y_{O_2,In}$	Molanteil des Sauerstoffs in der Zuluft	[-]
$y_{O_2,Out}$	Molanteil des Sauerstoffs in der Abluft	[-]
α_1	empirischer Parameter	[-]
α_2	empirischer Parameter	[-]
β_1	empirischer Parameter	[-]
β_2	empirischer Parameter	[-]
γ	Schergeschwindigkeit	[s ⁻¹]
γ_2	empirischer Parameter	[-]
γ_{eff}	effektive Schergeschwindigkeit	[s ⁻¹]
δ	empirischer Parameter	[-]
ε_{\emptyset}	mittlere Energiedissipation	[W kg ⁻¹]
ε_{max}	maximale lokale Energiedissipation	[W kg ⁻¹]
η	dynamische Viskosität	[Pa s]
η_0	Viskosität bei Schergeschwindigkeit $\rightarrow 0$	[mPa s]
η_{∞}	Viskosität bei Schergeschwindigkeit $\rightarrow \infty$	[mPa s]
η_{eff}	effektive Viskosität	[Pa s]
Λ	Makromaßstab der Turbulenz	[m]
λ	Mikromaßstab der Turbulenz	[m]
μ	spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
ν	kinematische Viskosität	[m ² s ⁻¹]
ρ	Dichte	[kg m ⁻³]
τ	Schubspannung	[N m ⁻²]
τ_0	Fließgrenze	[N m ⁻²]
ω	Winkelgeschwindigkeit	[s ⁻¹]

Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht über die wichtigsten Konzepte zur Berechnung der effektiven Schergeschwindigkeit γ_{eff} in Rührreaktoren	22
3.2	Übersicht über die wichtigsten parallelen Milliliter-Rührreaktoren und deren Eigenschaften.	27
4.1	Verwendete Modellfluide zur Abbildung unterschiedlich viskoser Biosuspensionen.	43
4.2	Verwendetes SM-Medium zur Herstellung von Sporensuspensionen auf Agarplatten (pH 6,5)	53
4.3	Verwendetes NL1-Medium zur Vorkulturherstellung nach Crüger <i>et al.</i> (1985) (pH 6,5)	53
4.4	Zur Satzkultivierung im Bioreaktor verwendetes Komplexmedium modifiziert nach Schüz <i>et al.</i> (1993) (pH 5,5)	54
4.5	Verwendete Medienzusätze zur Steigerung der Nikkomycin Z-Produktion	54
4.6	Verwendetes Zulaufmedium zur Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> im Laborrührreaktor (pH 5,5)	55
4.7	Optimiertes Zulaufmedium mit Orotsäure zur Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> im Laborrührreaktor (pH 5,5)	55
4.8	Verwendeter Gradient zur Auftrennung von Nikkomycin Z mittels HPLC	59
5.1	Ermittelte Prozessparameter bei der Referenzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$)	67
5.2	Gemessene Viskosität für Newton'sche Polyethylenglykol-Lösungen unterschiedlicher Konzentration	70
5.3	Betriebsbedingungen des Laborrührreaktors im Vergleich zu den Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan zur Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0	102

Abbildungsverzeichnis

3.1	Schematische Darstellung der Wirbelgrößen und des Energietransports bei Turbulenzbewegungen im Rührreaktor (modifiziert nach Kraume (2003))	4
3.2	Strömungsbahnen im bewehrten Rührkesselreaktor mit Propellerrührer (A) und Scheibenblattrührer (B) (Zlokarnik 2005)	6
3.3	Leistungscharakteristik für verschiedene Rührorgane im bewehrten Rührreaktor (Chmiel 2006)..	7
3.4	Sauerstoffkonzentration in der Gas- und Flüssigphase in der Umgebung der Phasengrenze nach dem Zweifilmmodell (modifiziert nach Chmiel 2006)	8
3.5	Isoenergetische Linien eines 6-Blatt-Scheibenrührers (A) und eines 3-Blatt-Propellerrührers (B) im turbulenten Bereich (Kraume 2003)	13
3.6	Scherbeanspruchung einer Flüssigkeit zwischen zwei planparallelen sich gegeneinander bewegender Platten	17
3.7	Prinzipielles rheologisches Verhalten verschiedener Fluide.....	18
3.8	Schematische Darstellung des volumenspezifischen Leistungseintrags beim Rühren Newton'scher Fluide mit niedriger (graue Linie) und erhöhter Viskosität (schwarze Linie) im Vergleich zu einem nicht-Newton'schen strukturviskosen Fluid (schwarze gestrichelte Linie)	20
3.9	Photo der parallelen Blasensäulen nach Tang <i>et al.</i> (2006)	25
3.10	Gerührtes Parallelreaktorsystem im Milliliter-Maßstab nach Puskeiler <i>et al.</i> (2005a): Photo des Parallelreaktorsystems mit 48 Rührkesselreaktoren (A) und schematischer Aufbau der Milliliter-Reaktoren (B)	29
3.11	Bioreaktorblock integriert in einen Laborroboter. 1: Pipettierarm, 2: Bioreaktorblock, 3: Vorlagengefäße für Flüssigkeiten, 4: MTP-Greifer, 5: MTP-Waschstation, 6: MTP-Lesegerät, 7: Rührersteuerung (modifiziert nach Kusterer 2007)	30
3.12	Elektronenmikroskopische Aufnahme des Mycels (A; Quelle: University of Strathclyde, Glasgow, Schottland) und lichtmikroskopische Aufnahme der Pellets (B) von <i>Streptomyces spp.</i>	34
3.13	Strukturformel von Nikkomycin Z	36
3.14	Idealisierte Wachstumskurve einer Mikroorganismenkultur im Satzverfahren	37
4.1	Verwendete Einwegbioreaktoren ohne Strömungsbrecher für den Betrieb des Paddelrührorgans (in Kooperation mit der 2mag AG, München erarbeitet).....	41
4.2	Photo (A) und geometrische Abmessungen (B) des verwendeten Gas-induzierenden Rührorgans	42
4.3	Schematische Abbildung und Geometrie des verwendeten Laborrührreaktors	43
4.4	Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des Leistungseintrags im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan	44
4.5	Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des k_{La} im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan.....	46

4.6	Methode zur Ermittlung der maximalen lokalen Energiedissipation im Milliliter-Bioreaktor mit dem Ton/Polymer-Flockensystem. Aus der Messung der Partikelgröße im Milliliter-Bioreaktor (A), wird mithilfe von Referenzmessungen im Laborrührreaktor über die Partikelgröße (B) mit Gleichung 20 auf die maximale lokale Energiedissipation geschlossen (C)	47
4.7	Methode zur Ermittlung der effektiven Schergeschwindigkeit im Milliliter-Bioreaktor. Die Schnittpunkte (1 und 2) des volumenbezogenen Leistungseintrags als Funktion der Rührerdrehzahl (A) und der Viskosität über die Schergeschwindigkeit (B, doppellogarithmische Auftragung) von Newton'schen (durchgezogene Linie) und nicht-Newton'schen (gestrichelte Linie) Flüssigkeiten werden ermittelt und ergeben eine Abhängigkeit der effektiven Schergeschwindigkeit von der Rührerdrehzahl (C).....	49
4.8	Schematischer Versuchsaufbau zur Bestimmung des $k_L a$ im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan	50
4.9	Schematischer Aufbau zur Bestimmung des Leistungseintrags im Laborrührreaktor mit einem Wattmeter (G: Generator, M: Motor, W: Wattmeter).....	52
5.1	Zeitlicher Verlauf von Sauerstoffsättigung (schwarze Linie) und pH (graue Linie), sowie charakteristische Wachstumsphasen bei der Satzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$).....	62
5.2	Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und Oberflächenspannung (umgedrehte Dreiecke) (A), sowie Mannitkonzentration (Dreiecke) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) (B) bei der Satzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$)	63
5.3	Fließkurven der Kulturlösung für unterschiedliche Prozesszeitpunkte bei der Satzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$)	65
5.4	Ermittelte rheologische Parameter Konsistenzindex (schwarze Quadrate) und Fließindex (weiße Quadrate) bei der Satzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Laborrührreaktor ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$)	66
5.5	Ermittelter Bereich der effektiven Viskositäten bei der Satzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Laborrührreaktor unter Anwendung der Schergeschwindigkeitskonzepte nach Perez <i>et al.</i> (2006) (Untergrenze des Datenbereichs) und Kelly und Gigas (2003) (Obergrenze des Datenbereichs) ($T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$).....	67
5.6	Fließkurven einer Xanthan-Lösung (0,2 % schwarze Quadrate), Polyacrylamid-Lösung (0,1 % Dreiecke), sowie Carboxymethylcellulose-Lösung (1 % Kreise) im Vergleich zu einer <i>Streptomyces tendae</i> Kulturlösung bei einer Kultivierungszeit von 24 h (weiße Quadrate)	68
5.7	Fließverhalten von Xanthan-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (Dreiecke) im Vergleich zu <i>Streptomyces tendae</i> Kulturlösungen (Quadrate).....	69
5.8	Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) (A) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) (B) bei der Satzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 in 12 parallelen Milliliter-Bioreaktoren mit Gas-induzierendem Rührorgan (geschlossene Symbole; $T = 29\text{ °C}$; $V = 12\text{ mL}$; $n = 2000\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zu einer Referenzkultivierung im Laborrührreaktor (offene Symbole; $T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$)	71

5.9	Wachstum an Reaktorwand (A) und Rührerachse (B) nach 48 h bei der Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan ($T = 29\text{ °C}$; $V = 12\text{ mL}$; $n = 2000\text{ min}^{-1}$).....	72
5.10	Mittels der dynamischen Sulfitmethode ermittelte k_La für unterschiedliche viskose Newton'sche (A; Polyethylenglykol-Lösungen; PEG) und nicht-Newton'sche Medien (B; Xanthan-Lösungen; XG) für das Gas-induzierende Rührorgan im Vergleich zu wässriger Natriumsulfat-Lösung als Referenz (weiße Quadrate) ($T = 25\text{ °C}$; $V = 12\text{ mL}$).....	74
5.11	Paritätsplot der experimentell ermittelten und mit der mit Gleichung 37 für Newton'sche (A) und Gleichung 38 für nicht-Newton'sche Fluide (B) modellierten k_La im Milliliter-Bioreaktor mit Gas-induzierendem Rührorgan ($a = 2,5 \times 10^{-11}$; $b = 2,950$; $c = -1,171$; $d = 8,1 \times 10^{-14}$; $e = 3,707$; $f = -0,397$).....	76
5.12	Ermittelte kritische Rührerdrehzahl für das Gas-induzierende Rührorgan für unterschiedlich viskose Newton'sche Fluide ($V = 12\text{ mL}$).....	76
5.13	Prinzipskizze des neu entwickelten Paddelrührorgans.....	78
5.14	CFD-Strömungssimulation der entstehenden freien Flüssigkeitsoberfläche des neuartigen Paddelrührorgans bei 1200 min^{-1} (Simulation: Stefanie Brüning).....	79
5.15	Schematischer Aufbau der Parallelisierung der neu entwickelten Paddelrührorgane im Bioreaktorblock.....	80
5.16	Verschiedene Prototypen des Paddelrührorgans zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Die jeweils eingebauten Magnete sind schematisch angedeutet.....	81
5.17	Mittels der dynamischen Sulfitmethode gemessener k_La verschiedener Prototypen des Paddelrührorgans zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Prototyp I (Quadrate), Prototyp II (Dreiecke), Prototyp III (Kreise) und Prototyp IV (umgedrehte Dreiecke) ($T = 25\text{ °C}$; $V = 8\text{ mL}$; $0,5\text{ M Na}_2\text{SO}_4$).....	82
5.18	Isometrische Darstellung (A) und Abbildung (B) des serienmäßiges Paddelrührorgans.....	83
5.19	Schematische Darstellung zur Berechnung des Spaltmaßes von Prototyp IV (A) und des serienmäßigen Paddelrührorgans (B) nach Gleichung 43.....	84
5.20	Unbewehrter Milliliter-Reaktor mit optischen Sensoren.....	86
5.21	An die Sterilabdeckung des Bioreaktorblocks montiertes Paddelrührorgan.....	87
5.22	Schematische Darstellung der Positionierung eines Paddelrührorgans im Milliliter-Bioreaktor zur optimalen Übertragung des Drehmoments des Magnetfeldes auf das Rührorgan.....	88
5.23	Volumenbezogener Leistungseintrag in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl für das Paddelrührorgan (schwarze Quadrate), im Vergleich zum Gas-induzierenden Rührorgan (graue Dreiecke) und Laborrührreaktor (weiße Quadrate) (Messung in $0,5\text{ M Na}_2\text{SO}_4$).....	89
5.24	Leistungscharakteristik des Paddelrührorgans (Quadrate), im Vergleich zum Gas-induzierenden Rührorgan (graue Dreiecke).....	90
5.25	Leistungseintrag des Paddelrührorgans in nicht-Newton'sche Xanthan-Lösungen (0,4 % Dreiecke; 0,7 % Kreise) im Vergleich zu wässrigem Medium ($0,5\text{ M Na}_2\text{SO}_4$ weiße Quadrate) ...	91
5.26	Mittels der dynamischen Sulfitmethode ermittelte k_La für unterschiedliche Reaktionsvolumina im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan: 8 mL (Quadrate), 10 mL (Dreiecke) und 12 mL (Kreise) ($T = 25\text{ °C}$; Messung in $0,5\text{ M Na}_2\text{SO}_4$).....	92

5.27	Mittels der dynamischen Sulfitmethode ermittelte $k_L a$ im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan für strukturviskose Xanthan-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (0,1 % Dreiecke; 0,15 % Kreise; 0,2 % Rauten; 0,3 % umgedrehte Dreiecke) im Vergleich zu wässrigem Medium (0,5 M Na_2SO_4 weiße Quadrate) ($T = 25\text{ °C}$; $V = 10\text{ mL}$). Zu-beziehungsweise Abnahme von Konsistenzindex K und Fließindex m sind zur besseren Veranschaulichung durch Pfeile gekennzeichnet	93
5.28	Auf den $k_L a$ in wässrigem Medium ($\eta = 1\text{ mPa s}$) normierter $k_L a$ in unterschiedlichen strukturviskosen Medien für das Paddelrührorgan (schwarze Quadrate; $n = 1200\text{ min}^{-1}$), das Gas-induzierende Rührorgan (graue Dreiecke; $n = 2800\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zum Laborrührreaktor (weiße Quadrate $n = 700\text{ min}^{-1}$; 2 vvm)	94
5.29	Kinetik der Flockenzerkleinerung des Ton/Polymer-Flockensystems im Laborrührreaktor nach Zugabe des Polymers als Flockungsmittel ($n = 300\text{ min}^{-1}$)	95
5.30	Mittels des Ton/Polymer-Flockensystems bestimmter Endflockendurchmesser für den Laborrührreaktor in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl (A) und der mit Gleichung 20 bestimmten maximalen lokalen Energiedissipation (B).....	96
5.31	Mittels des Ton/Polymer-Flockensystems bestimmter Endflockendurchmesser für den Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl.....	97
5.32	Experimentell bestimmte maximale lokale Energiedissipation in Abhängigkeit des volumenbezogenen Leistungseintrags für das Paddelrührorgan (schwarze Quadrate), das Gas-induzierende Rührorgan (graue Dreiecke) im Vergleich zum Laborrührreaktor (weiße Quadrate).	98
5.33	Ansatz für die Berechnung der maximalen lokalen Energiedissipation für das Paddelrührorgan durch Modifikation der für Rührreaktoren geltenden Gleichung 20 nach Liepe <i>et al.</i> (1988)	99
5.34	Paritätsplot der experimentell ermittelten und mit Gleichung 44 berechneten maximalen lokalen Energiedissipation des Paddelrührorgans. Ober- und Untergrenze von 20 % Standardabweichung sind im Diagramm angegeben.....	99
5.35	Ermittlung der effektiven Schergeschwindigkeit für das Paddelrührorgan zur Bestimmung der Rührerdrehzahl anhand der Schnittpunkte der Ne -Zahlen (A) und durch Bestimmung der Schergeschwindigkeit mithilfe der Schnittpunkte der Viskositäten (B), beispielhaft für 80 % Newton'sche Glycerinlösung (schwarze Quadrate) und eine strukturviskose 0,6 % Xanthan-Lösung (weiße Quadrate) aufgetragen.....	100
5.36	Ermittelte effektive Schergeschwindigkeit (Symbole) als Funktion des Leistungseintrags für den Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan sowie Modellierung der Werte mit Gleichung 45 (schwarze Linie)	101
5.37	Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffsättigung und charakteristische Wachstumsphasen eines beispielhaft ausgewählten Milliliter-Bioreaktors mit Paddelrührorgan bei der Satzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 ($T = 29\text{ °C}$; $V = 10\text{ mL}$).....	103
5.38	Optische Betrachtung der Reaktorwand der Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan (A; $V = 10\text{ mL}$; $n = 1200\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zum Gas-induzierenden Rührorgan (B; $V = 12\text{ mL}$; $n = 2000\text{ min}^{-1}$) nach 48 h bei der Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 ($T = 29\text{ °C}$).....	104

5.39	Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) (A), sowie Mannitkonzentration (Dreiecke) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) (B) bei der Satzkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 in 12 parallelen Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan (geschlossene Symbole; $T = 29\text{ °C}$; $V = 10\text{ mL}$; $n = 1200\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zu einer Referenzkultivierung im Laborrührreaktor (offene Symbole; $T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$)	105
5.40	Abhängigkeit zwischen Konsistenzindex und Biotrockenmassekonzentration (A), sowie Fließverhalten (B) von <i>Streptomyces tendae</i> Kulturlösungen ($T = 29\text{ °C}$)	107
5.41	Effektive Viskosität bei der Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Milliliter-Bioreaktor mit Paddelrührorgan (schwarze Quadrate; $T = 29\text{ °C}$; $V = 10\text{ mL}$; $\gamma = 940\text{ s}^{-1}$) im Vergleich zum Laborrührreaktor (weiße Quadrate; $T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $\gamma = 1243\text{ s}^{-1}$)	107
5.42	Nach ca. 120 h Kultivierungszeit gebildetes Nikkomycin Z bei der Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> mit unterschiedlichen Medienzusätzen in jeweils drei parallelen Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan ($T = 29\text{ °C}$; $V = 10\text{ mL}$; $n = 1200\text{ min}^{-1}$).....	109
5.43	Gebildetes Nikkomycin Z bei der Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> in jeweils drei parallelen Milliliter-Bioreaktoren mit Paddelrührorgan mit unterschiedlichen Medienzusätzen: Kontrolle (weiße Quadrate), Orotsäure (Dreiecke) und Uracil (Kreise) ($T = 29\text{ °C}$; $V = 10\text{ mL}$; $n = 1200\text{ min}^{-1}$)	110
5.44	Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), Mannitkonzentration (Dreiecke) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) während der Zulaufkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Laborrührreaktor ($F_{\text{Mannit}} = 0,67\text{ g h}^{-1}$; $T = 29\text{ °C}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$, pH 5,5). Die schwarze Linie markiert den Beginn der Zulaufphase.....	112
5.45	Zeitlicher Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (Quadrate), Mannitkonzentration (Dreiecke) und gebildetes Nikkomycin Z (Kreise) während der optimierten Zulaufkultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 im Laborrührreaktor ($F_{\text{Mannit}} = 0,4\text{ g h}^{-1}$; $T = 29\text{ °C}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$, pH 5,5). Die schwarze Linie markiert den Beginn der Zulaufphase	113
6.1	Photo und schematischer Aufbau des entwickelten Milliliter-Bioreaktors mit Paddelrührorgan zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen (A), sowie gemessene Biotrockenmassekonzentration (Quadrate) und gebildete Menge des Fungizids Nikkomycin Z (Kreise) bei der parallelen Kultivierung von <i>Streptomyces tendae</i> W42-0 in 12 gerührten Milliliter-Reaktoren (geschlossene Symbole; $T = 29\text{ °C}$; $V = 10\text{ mL}$; $n = 1200\text{ min}^{-1}$) im Vergleich zu einer Referenzkultivierung im Laborrührreaktor (offene Symbole; $T = 29\text{ °C}$; $V = 2000\text{ mL}$; $n = 800\text{ min}^{-1}$) (B).....	115

Anhang

A1 Rheologische Daten der verwendeten Modellfluide

Tab. A.1: Bestimmte Parameter des Ostwald-de-Waele Gesetzes für strukturviskose Xanthan-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Anteil (w/v)	Konsistenzindex [mPa s ^m]	Fließindex [-]
0,1 %	12,5	0,736
0,15 %	44,6	0,624
0,2 %	83,0	0,559
0,3 %	568,2	0,359
0,4 %	688,8	0,355
0,5 %	1866,1	0,272
0,7 %	3105,2	0,246

Tab. A.2: Gemessene Viskosität für Newton'sche Glycerin-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Anteil (w/v)	Viskosität [mPa s]
10 %	1,2
30 %	2,1
50 %	4,3
60 %	8,2
70 %	16,5
75 %	22,7
80 %	40,9
85 %	92,6
90 %	137,0

A2 Technische Zeichnungen der Prototypen des Paddelrührorgans

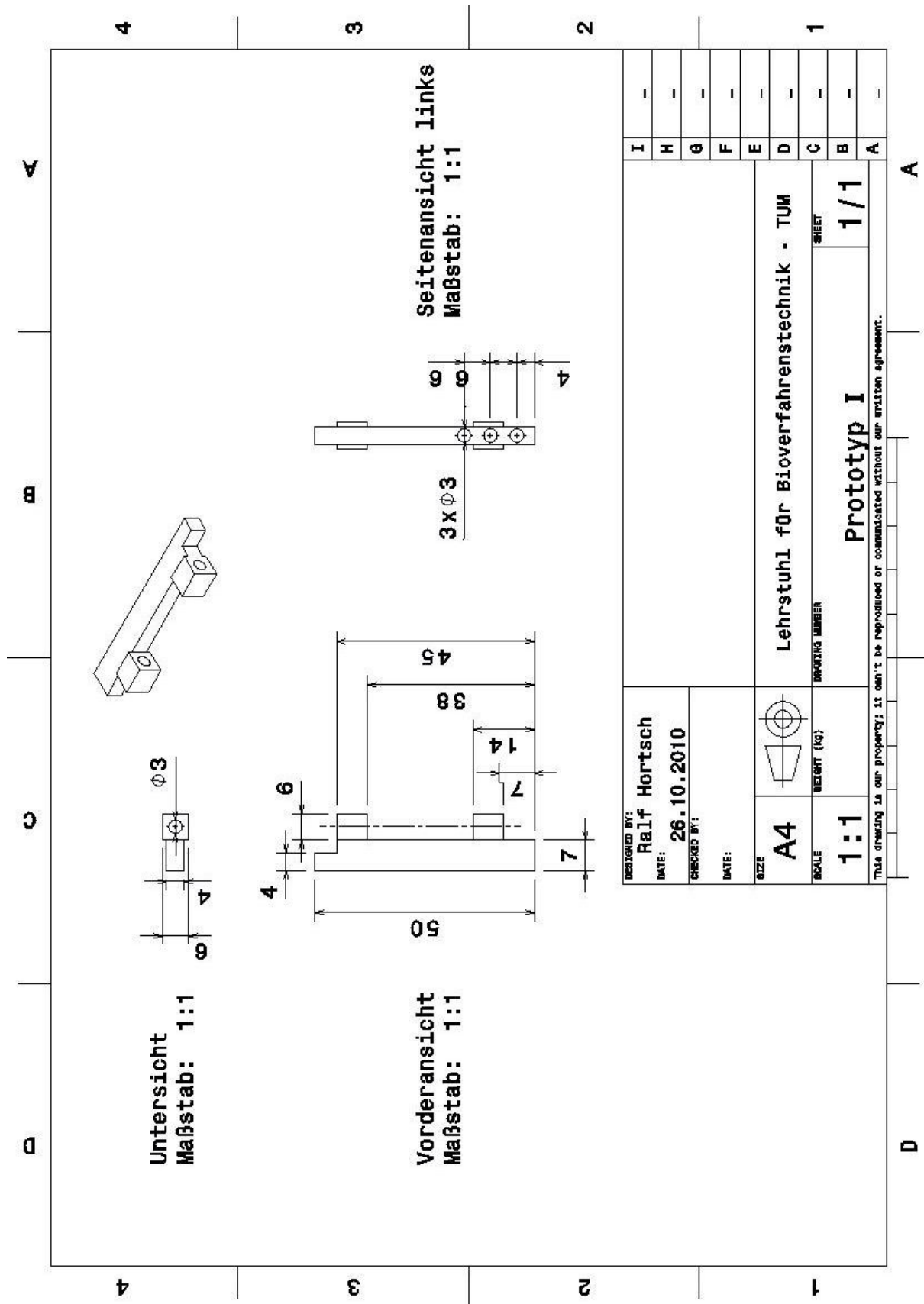


Abb. A.1: Technische Zeichnung von Prototyp I des Paddelrührorgans.

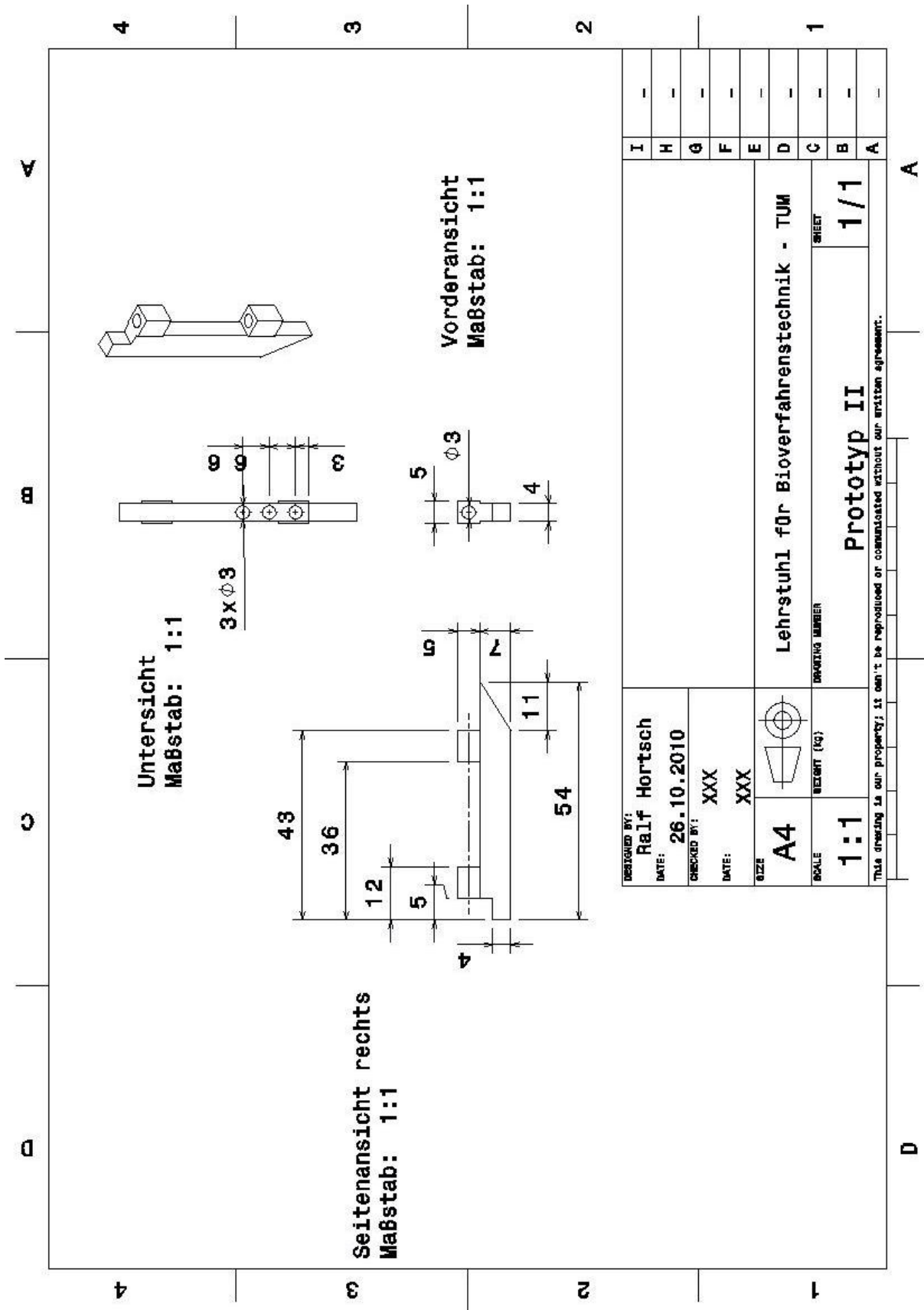


Abb. A.2: Technische Zeichnung von Prototyp II des Paddelrührorgans.

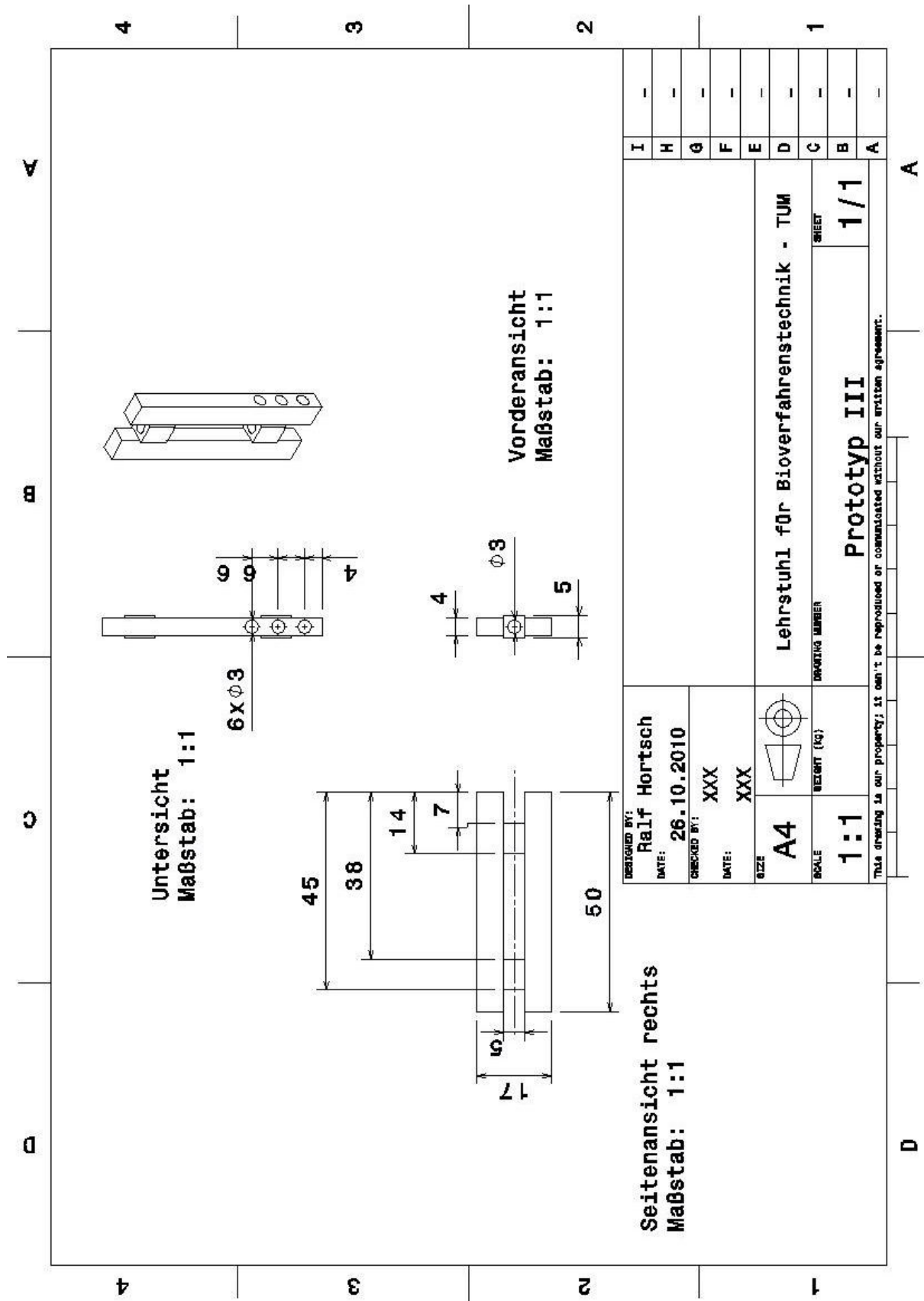


Abb. A.3: Technische Zeichnung von Prototyp III des Paddelrührorgans.

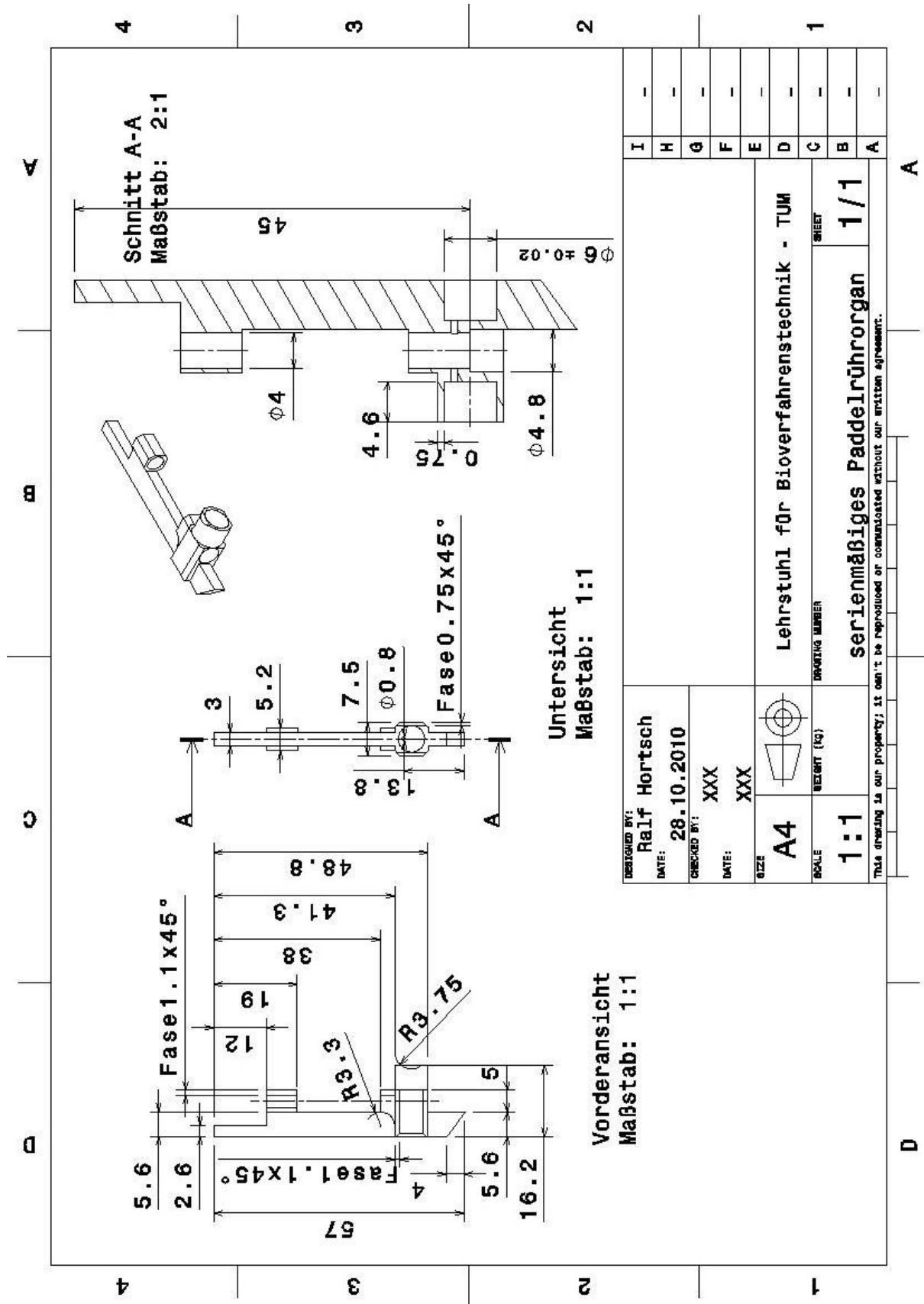


Abb. A.5: Technische Zeichnung des serienmäßig Paddelrührorgans (in Kooperation mit der 2mag AG, München erarbeitet).

A3 Sonstige technische Zeichnungen

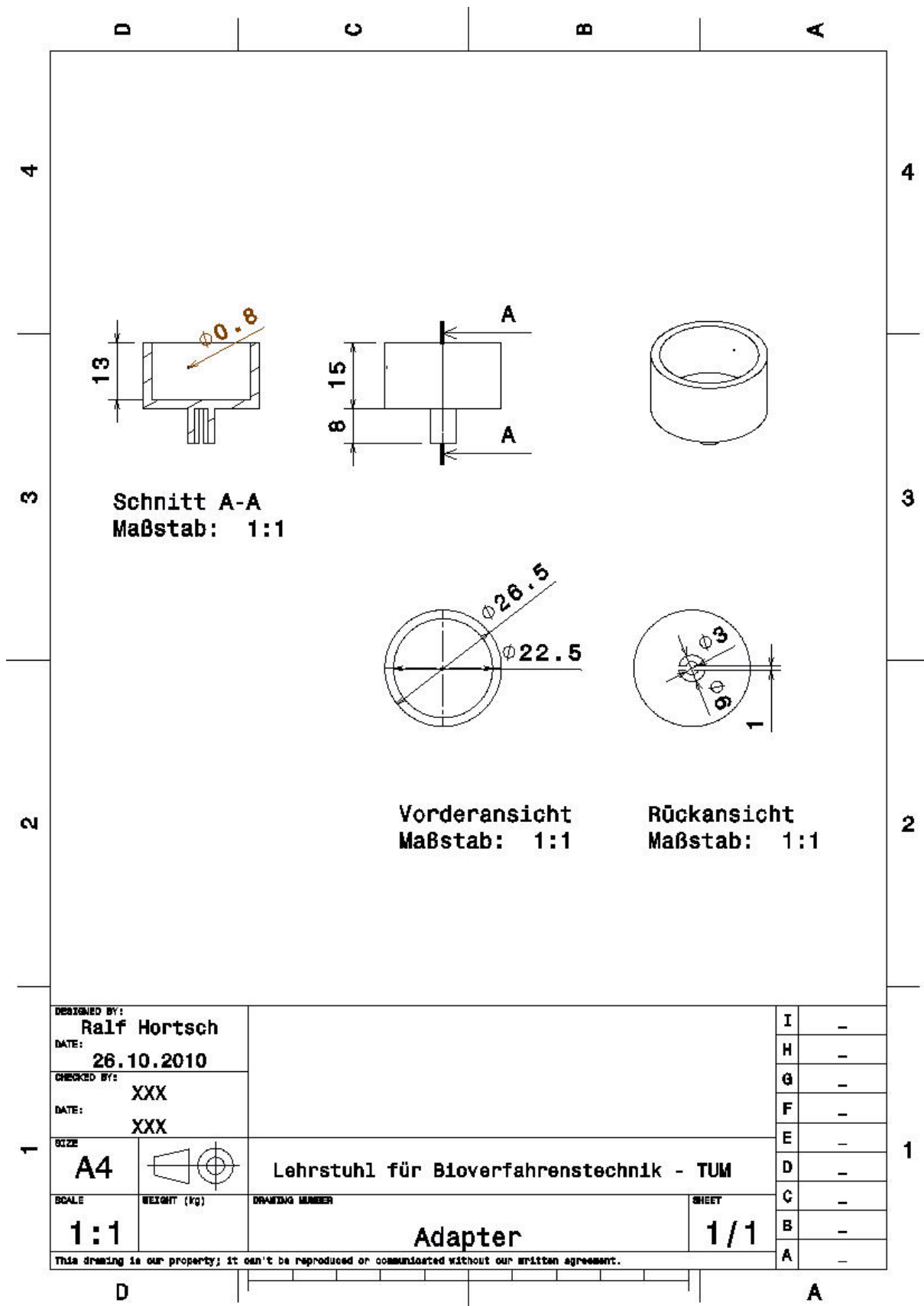


Abb. A.6: Technische Zeichnung des zur Messung des Leistungseintrags im mL-Bioreaktor verwendeten Adapters.

A4 Algorithmus zur Regelung des Sauerstoffpartialdrucks im Laborrührreaktor

#0, stirrer, 30

if(pO2.v<30) {Stirrer.sp=Stirrer.sp+50}

if(Stirrer.sp>1000) {Stirrer.sp=1000}

if(pO2.v>80) {Stirrer.sp=Stirrer.sp-50}

if(Stirrer.sp<800) {Stirrer.sp=800}

if(Stirrer.sp==1000 and pO2.v<30) {seq=1}

#1, oxygen_flow, 30

if(pO2.v<30) {Mass Flow.sp=Mass Flow.sp+0.5}

if(Mass Flow.sp>4) {Mass Flow.sp=4}

if(pO2.v>80) {Mass Flow.sp=Mass Flow.sp-0.5}

if(Mass Flow.sp<2) {Mass Flow.sp=2}

if(Mass Flow.sp==2 and pO2.v>80) {seq=0}

A5 Kalibriergeraden für HPLC-Analytik

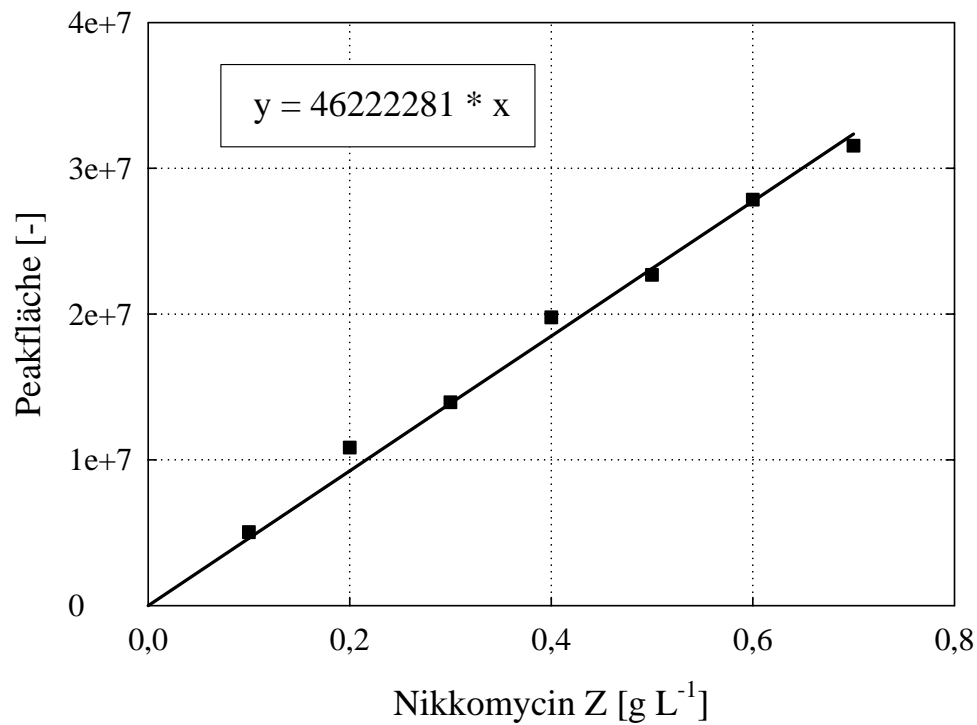


Abb. A.7: Ermittelte Kalibriergerade zur Bestimmung von Nikkomycin Z mittels HPLC nach der in Kapitel 4.6.2 beschriebenen Methode.

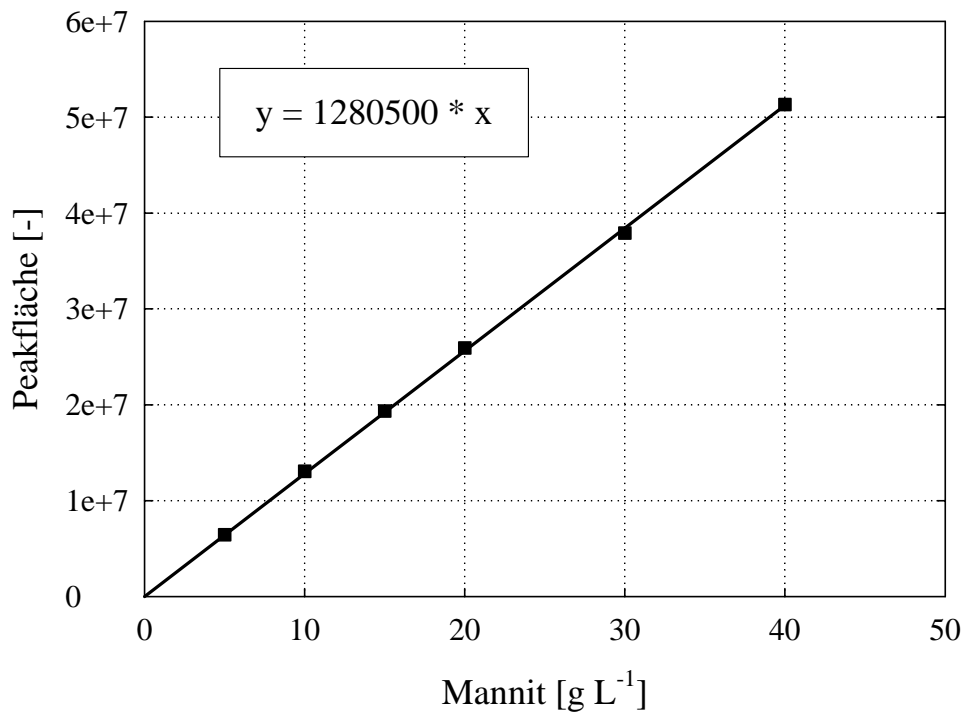


Abb. A.8: Ermittelte Kalibriergerade zur Bestimmung von Mannit mittels HPLC nach der in Kapitel 4.6.3 beschriebenen Methode.