

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik

Mikrodosiertechnik und Mikrosensoren zur
pH-Kontrolle in Parallelbioreaktoren

Nils H. Janzen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Maschinenwesen der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Boris Lohmann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen

Die Dissertation wurde am 16.07.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Maschinenwesen am 03.12.2014 angenommen.

Danksagung

Viele Menschen haben zur Entstehung der vorliegenden Arbeit auf unterschiedlichste Weise beigetragen. Ich danke daher im Folgenden:

Meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz für die hervorragende Betreuung, die wertvollen Ratschläge und Diskussionen sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen und die erwiesenen Geduld, um diese Arbeit fertig zu stellen.

Dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. habil. Boris Lohmann und dem Zweitprüfer Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen für die Übernahme der jeweiligen Aufgaben.

Irma Einsle, Ellen Truxius, Norbert Werth, Georg Kojro und Markus Amann für die tatkräftige Unterstützung in der Verwaltung und bei allen technischen Belangen.

Dem ganzen Team der 2mag AG (München) und im Besonderen Herrn Dr. Klaus Kaufmann für die angenehme und konstruktive Atmosphäre bei der iterativen Gestaltung der Mikrodosierttechnik.

Dr. Christian Krause und der PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg) für die freundliche und kompetente Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Themen der Sensorik.

Dr. Matthias Arnold und Guido Ertel der DASGIP GmbH (Jülich) für die Bereitstellung von Soft- und Hardware zur Steuerung des Parallelbioreaktorsystems.

Erhard Krampe vom Lehrstuhl für Medizintechnik der Technischen Universität München für seine theoretische und praktische Expertise in der Elastomerverarbeitung.

Dem Bayerischen Staatsministerium für Wirtschaft, Infrastruktur, Verkehr und Technologie für die finanzielle Unterstützung.

Allen (ehemaligen) Kollegen für die jederzeit gute Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit sowohl am Lehrstuhl wie auch bei diversen gemeinsamen Unternehmungen:

Dr. Georg Faust und Dr. Michael Schmidt für die gemeinsamen Kultivierungen beim Prozesseinsatz der Mikrodosierttechnik und der Mikrosensoren. Dr. Dirk Hebel für die Softwareunterstützung des Parallelbioreaktorsystems vor Ort. Dr. Kathrin Castiglione, Sarah Hintermayer, Andreas Schmideder und Michael Weiner für das intensive Korrekturlesen und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Bei meinen Studenten Sarah Poschenrieder, Kathrin Preuß, Anja Koller, Maria Wolf, Anna Ecker, Sebastian Hirth, Monika Härtle, Alexander Behringer, Anna Lifljandtschik, Yuan Yao und Thomas Sachnik für die gewissenhafte Bearbeitung ihrer Aufgaben.

Unseren Kaffee- und Mensa-Runden für die heiteren Gespräche um wie auch fern der Materie.

Schließlich gilt mein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden für die allzeit andauernde Unterstützung in Wort und Tat sowie dem Verständnis, wenn die Arbeit oftmals im Vordergrund stand. Dies gilt im Besonderen für meine Freundin Julia, die mich wie kein anderer Mensch in den vergangenen Jahren von Anfang bis Ende meiner Dissertation begleitet hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	9
2	Problemstellung und Zielsetzung	11
3	Theoretischer Hintergrund	13
3.1	Betrieb von Bioreaktoren	13
3.1.1	Mikrobielle Kinetik.....	13
3.1.2	Satzverfahren	14
3.1.3	Zulaufverfahren	15
3.2	Dosiertechnik in Parallelbioreaktoren.....	17
3.2.1	Pipettierroboter	17
3.2.2	Peristaltikpumpen und Schlauchpumpen	21
3.2.3	Membranpumpen.....	24
3.3	Mikro-Membranpumpen.....	25
3.3.1	Aufbau von Mikro-Membranpumpen.....	25
3.3.2	Arbeitsweise von Membranpumpen.....	26
3.3.3	Fehlerquellen bei Mikromembranpumpen	28
3.4	Fluorimetrische Mikrosensoren	29
3.4.1	Photolumineszenz	29
3.4.2	Dual lifetime referencing	31
3.5	<i>Escherichia coli</i>	33
3.6	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	34
4	Material und Methoden	35
4.1	Parallelbioreaktorsystem.....	35
4.2	Mikrodosiereinheit.....	36
4.2.1	Integration und Aufbau	36
4.2.2	Modifikationen	38
4.2.3	Modifizierte Version des Labormusters	44
4.3	Fluorimetrische pH-Sensoren	46
4.3.1	Ausleseeinheiten	46
4.3.2	Sensoren, Abschirmung und Blenden.....	47
4.4	Akustische Messung der Aktorfunktion	48
4.5	Reinigung der Mikrodosiereinheit.....	49
4.6	Befüllen der Mikrodosiereinheit.....	50
4.6.1	Befüllen mit hydrostatischem Druck.....	50
4.6.2	Befüllen mit Schlauchpumpe	50
4.7	Bestimmung der Förderraten und Leckageraten.....	50
4.7.1	Einstellen des hydrostatischen Vordrucks.....	50
4.7.2	Einstellen des Vordrucks mit Druckregler	51

4.7.3	Parallele und serielle Bestimmung der Förderraten an einem Kanal.....	51
4.7.4	Parallele Bestimmung der Förderraten an zwei Kanälen.....	53
4.8	Kalibrierung der Mikrodosiereinheit.....	54
4.9	Desinfektion der Mikrodosiereinheit.....	55
4.10	Kalibrierung der fluorimetrischen pH-Sensoren.....	55
4.11	Messung der Signalstabilität der fluorimetrischen pH-Sensoren.....	56
4.12	Langzeitkalibrierung der fluorimetrischen pH-Sensoren.....	56
4.13	Auswertung der Kalibrierung.....	58
4.14	Messung der Emissionsspektren von Medien und Zellen.....	60
4.15	Kultivierung von <i>Clostridium acetobutylicum</i>	60
4.16	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	61
4.17	Medien.....	62
4.17.1	Mineralsalz Medium.....	62
4.17.2	Komplexmedium.....	63
4.17.3	Morpholinethansulfonsäure gepuffertes Mineralsalzmedium.....	63
4.17.4	<i>Clostridial Growth Medium</i>	64
4.17.5	Lösungen und Puffer.....	64
4.18	Software.....	65
5	Ergebnisse und Diskussion.....	66
5.1	Dichtung der Mikrodosiereinheit.....	66
5.1.1	Ursprüngliches Labormuster.....	66
5.1.2	Modifiziertes Labormuster.....	66
5.1.3	Diskussion.....	67
5.2	Kontrolle der Aktorfunktion.....	67
5.2.1	Ursprüngliche Aktoren.....	67
5.2.2	Modifizierte Aktoren.....	68
5.2.3	Austausch der Flussplatte.....	68
5.2.4	Diskussion.....	69
5.3	Einfluss der Betriebsspannung auf die Förderleistung.....	70
5.3.1	Messung der Förderraten bei unterschiedlicher Betriebsspannung.....	70
5.3.2	Diskussion.....	70
5.4	Einfluss des Vordrucks auf die Förderraten.....	71
5.4.1	Messung der Förderraten bei variierendem Vordruck.....	71
5.4.2	Diskussion.....	72
5.5	Kalibrierung der Mikro-Membranpumpen.....	72
5.5.1	Ermittlung der Förderraten der unkalibrierten Pumpen.....	72
5.5.2	Kontrolle der Förderraten der kalibrierten Pumpen.....	73
5.5.3	Diskussion.....	73

5.6	Ermittlung des linearen Förderbereichs	73
5.6.1	Messung der Förderraten bei variierenden Sollwerten	73
5.6.2	Diskussion	74
5.7	Förderung von exponentiellen Dosierprofilen	75
5.7.1	Anpassung des exponentiellen Dosierprofils	75
5.7.2	Vergleich experimenteller Ergebnisse mit den Sollwerten	75
5.7.3	Diskussion	77
5.8	Messung der Förderraten im Mehrkanalbetrieb	77
5.8.1	Förderraten einzeln betriebener Kanäle	77
5.8.2	Förderraten parallel betriebener Kanäle	78
5.8.3	Diskussion	78
5.9	Charakterisierung der Vordruckempfindlichkeit der Lippenrückschlagventile	79
5.9.1	Ergebnisse	79
5.9.2	Diskussion	84
5.10	Autoklavierbarkeit	86
5.10.1	Einfluss auf die Förderraten der Pumpen	86
5.10.2	Einfluss auf die Komponenten	90
5.10.3	Diskussion	90
5.11	Parallele Zulaufverfahren mit <i>Escherichia coli</i>	91
5.11.1	Diskussion	96
5.12	Charakterisierung von fluorimetrischen Niedrig-pH-Sensoren	99
5.12.1	Untersuchung der Querempfindlichkeit durch vergleichende Kalibrierungen	99
5.12.2	Signalstabilität	103
5.12.3	Diskussion	105
5.13	Messung der Photolumineszenz von Medien und Zellen	107
5.13.1	Fluoreszenzmessung von Medium mit komplexen Bestandteilen	107
5.13.2	Fluoreszenzmessung bei der Kultivierung von <i>E. coli</i>	108
5.13.3	Diskussion	109
5.14	Langzeitkalibrierungen von fluorimetrischen Niedrig-pH-Sensoren	110
5.14.1	Signalstabilität	111
5.14.2	Vergleich der alten und optimierten Ausleseeinheiten	113
5.14.3	Anwendungsbereiche	114
5.14.4	Abschirmung der Medienfluoreszenz	117
5.14.5	Diskussion	118
5.15	Parallele Satzverfahren mit <i>Clostridium acetobutylicum</i>	119
5.15.1	pH Messung im Bioprozesseinsatz	119
5.15.2	Diskussion	122
6	Zusammenfassung und Ausblick	123

6.1	Zusammenfassung	123
6.2	Ausblick	128
7	Literaturverzeichnis.....	130
8	Anhang	136
8.1	Modifikation der Kanalplatte.....	136
8.2	Herstellung von Silikonmembranen	136
8.3	Modifikation der Anschlüsse und Zuleitungen der Mikrodosiereinheit	139
8.4	Entwicklung von Mikro-Membranpumpen mit Schirmventilen	139
8.5	Signalstabilität und Querempfindlichkeit in Langzeitkalibrierungen	143
8.6	Kalibrierung mit alten und modifizierten Ausleseeinheiten	146
8.7	Material und Gerätelisten.....	148
8.8	Abbildungsverzeichnis	153
8.9	Tabellenverzeichnis	164

1 Einführung

Prozesse der Bioverfahrenstechnik sind aus dem heutigen Leben nicht mehr wegzudenken: Sie reichen von der Abwasseraufbereitung (Felleisen, 2001) bis zu biogenen Treibstoffen (Lee *et al.*, 2008) und sind allgegenwärtig in der Nahrungsmittelherstellung; sei es bei der seit Jahrhunderten angewendeten alkoholischen Gärung oder modernen Prozessen, wie die Gewinnung von zum Beispiel Vitamin C, Verdickungsmitteln wie Xanthan oder diversen Aminosäuren (Storhas, 2003).

Speziell in der Medizin hat die Bioverfahrenstechnik in den letzten Jahrzehnten stark an Einfluss gewonnen. So werden zum Beispiel Pflanzen- und Tierzellen sowie Mikroorganismen genutzt um verschiedenste biochemische Komponenten mittels rekombinanter DNA herzustellen (Thiemann and Palladino, 2007). Allein in Deutschland waren im Jahr 2012 109 medizinische Wirkstoffe auf dem Markt, die mittels Gentechnologie entwickelt wurden, allen voran der vermutlich bekannteste Vertreter Insulin (Storhas, 2003). Die Einsatzmöglichkeiten der Bioverfahrenstechnik sind noch lange nicht ausgeschöpft, wie zukunftsweisende Forschungsprojekte zum Beispiel für die Herstellung von Biokunststoffen (Lienhard *et al.*, 2010) oder die Herstellung von Spinnenseide (Scheibel, 2009) zeigen.

So unterschiedlich diese industriellen Endprodukte auch sein mögen, so liegt ihnen doch oft der gleiche Prozess zu Grunde, nämlich eine Kultivierung von Mikroorganismen in Bioreaktoren mit möglichst hoher Produktrate. Diese kann nur gewährleistet werden, wenn die Bedingungen für die Zelle so optimal wie möglich gestaltet werden und zusätzlich das Zusammenspiel aller Prozessstufen gesichert ist (Storhas, 1994).

Insbesondere die fortschreitenden Erkenntnisse im Bereich des *metabolic engineering* und der gezielten Züchtung machen es möglich, den Produktausstoß in bereits etablierten Prozessen oder auch die Reaktionen von neuen vielversprechenden Mikroorganismen zu verbessern (Chartrain *et al.*, 2000).

Unter Berücksichtigung des Zeit- und Kostenfaktors erfolgen diese Optimierungen in der Regel im kleinen Maßstab und werden anschließend in den Labor- oder industriellen Maßstab übertragen (Storhas, 1994). Jegliche Aspekte der Bioprozesstechnik in kleinen Reaktionsvolumina werden dabei unter dem Oberbegriff Mikro-Bioverfahrenstechnik zusammengefasst (Weuster-Botz, 2006).

Eine entscheidende Rolle spielen dabei die Beherrschung der Stofftransporte von beispielsweise Substraten oder Gasen in den sehr kleinen Reaktionsräumen sowie die Optimierung der dynamischen Wechselwirkungen zwischen biologischem System und Mikroumgebung, zum Beispiel über die Art des Energieeintrags (Weuster-Botz, 2006).

Die Standardmethoden zur Entwicklung oder Verbesserung von Biokatalysatoren basieren alle auf parallelen, vorzugsweise automatisierten Verfahren vom Nano- bis hin zum Milliliterbereich, um den Arbeitsaufwand, die Kosten für teure Substrate oder Medien sowie die

hohe Anzahl an Testreihen auf ein vertretbares Maß zu beschränken (Freyer *et al.*, 2004; Weuster-Botz, 2006).

Schon seit Jahrzehnten werden Schüttelkolben im Maßstab von Millilitern bis mehreren Litern eingesetzt, um Mikroorganismen im parallelisierten Satzverfahren zu kultivieren, wobei deren einfache Handhabung einer schwierigen Übertragung in den industriellen Maßstab gegenübersteht, da der Gaseintrag über Schütteln und nicht über Rühren erfolgt (Wenk *et al.*, 2012a; Weuster-Botz, 2006).

Das gleiche Problem gilt auch für den Einsatz von Mikrotiterplatten mit 24-1536 Vertiefungen, die als geschüttelte Bioreaktoren eingesetzt werden, auch wenn diese automatisiert befüllt und mit Online-Sensorik ausgestattet werden können sowie einen höheren parallelisierten Durchsatz als Schüttelkolben aufweisen (Wenk *et al.*, 2012a; Weuster-Botz, 2006). Außerdem kann das, in der Industrie häufig verwendete Zulaufverfahren (Pörtner, 2006), bei Mikrotiterplatten nicht eingesetzt werden (Weuster-Botz, 2006), auch wenn es erste Entwicklungsansätze gibt (Zanzotto *et al.*, 2004).

Dies führt zu einem hohen Risiko für den Betreiber, da Vorhersagen über das Verhalten bei der Maßstabsvergrößerung nur schwer möglich sind (Storhas, 1994) oder sogar zum Scheitern bei der Übertragung führen (Chmiel, 2011).

Um die genannten Probleme zu umgehen und da das Standardinstrument zur Kultivierung in der Biotechnologie der Rührkessel ist, geht der Trend auch zu dessen Miniaturisierung, meist im Bereich von 10-100 ml (Weuster-Botz, 2006), wodurch die Vorteile einer exakten Dosierung, sowie parallelisierter und automatisierter Evaluierung mit der Maßstäblichkeit für die Industrie kombiniert werden können (Betts and Baganz, 2006; Storhas, 2013).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Damit vielversprechende Bioreaktionen in kleinen Volumina nicht an der Übertragung auf den industriellen m³-Maßstab scheitern ist die Auslegung und Entwicklung von Miniatur-Bioreaktoren essentiell (Chmiel, 2011). Unter Berücksichtigung der industriellen Anforderungen an eine effiziente und kostengünstige Bioprozessentwicklung wurden am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München entsprechende Miniaturbioreaktoren entwickelt: Bis zu 48 parallele Rührkessel-Bioreaktoren werden im Millilitermaßstab beispielsweise mit magnetisch-induktiv angetriebenen gasinduzierenden Rührorganen betrieben (Knorr *et al.*, 2007; Kusterer, 2007; Puskeiler *et al.*, 2005a, 2005b; Weuster-Botz *et al.*, 2005).

Die Dosierung der Medien in die Milliliter-Bioreaktoren fand dabei mit Hilfe des Pipettierarms eines Laborroboters statt. Da dieser Roboter jedoch parallel noch die individuelle pH-Regelung sowie die Probenahme bewältigen muss, liegen die Abtastraten für jeden Bioreaktor bei rund 10 Minuten, weshalb von einem intermittierenden Zulaufverfahren gesprochen werden muss (Knorr *et al.*, 2007). Ferner sind die Anschaffung und der Betrieb eines Laborroboters mit hohen Kosten verbunden und bergen zudem das Risiko von Kontaminationen durch die Bewegung der Pipettenspitzen in der keimbelasteten Laborumgebung.

Daher wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik in Zusammenarbeit mit 2mag AG, München ein erstes Labormuster einer magnetisch-induktiven Mikrodosiereinheit mit 144 Mikromembranpumpen entwickelt, die vollständig in den Deckel des Parallelbioreaktorsystems integriert ist und gleichzeitig alle Bioreaktoren mit bis zu drei verschiedenen Fluiden individuell im Mikroliterbereich versorgen kann. Erste Charakterisierungen sowie Kultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe dieser neuartigen Dosiertechnik waren erfolgreich (Gebhardt *et al.*, 2011).

Allerdings konnten nicht alle 144 Mikromembranpumpen gleichzeitig und zuverlässig betrieben werden. So konnten beispielsweise nur 6 von 48 Reaktoren parallel im pH-kontrollierten Zulaufverfahren von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich eingesetzt werden (Gebhardt *et al.*, 2011). Weiterhin zeigten sich gerade bei für Bioprozessen im 10 Milliliter-Maßstab üblichen Dosierraten von rund 100 µL h⁻¹ große Standardabweichungen. Damit ist dieses erste Labormuster einer magnetisch-induktiven Mikrodosiereinheit nicht für den Einsatz zur Bioprozessentwicklung im 48-fach Parallelbetrieb geeignet.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit ist daher die Funktionsoptimierung dieses speziellen Mikrodosiersystems für die Bioprozessentwicklung und die Charakterisierung der Einzelkomponenten.

Die Mikrodosiereinheit ist mit 3 Kanälen ausgestattet um beispielsweise neben der Substratversorgung auch zwei Titrationsmittel zur pH-Kontrolle dosieren zu können. Die Überwachung des pH ist ein wichtiger Faktor bei der Prozessführung von Kultivierungen zum

Erreichen hoher Zellzahlen im Bioreaktor, welche vorzugsweise *on-line* stattfindet (Weuster-Botz, 2005). Dafür werden häufig Einstabmessketten mit elektrochemischem Messprinzip eingesetzt. Diese sind jedoch für den Gebrauch in Einwegreaktoren zu teuer und zudem schwierig zu sterilisieren und werden in Miniaturform hauptsächlich in der Diagnostik eingesetzt (*Lab-on-a-Chip*). Eine günstigere und leichter zu miniaturisierende Methode stellen chemische Sensoren dar, die optisch ausgelesen werden können und bereits verstärkt in Miniaturformat eingesetzt werden; sei es bei der pH-Überwachung in Schüttelkolben (Scheidle *et al.*, 2007), in Mikrotiterplatten (John *et al.*, 2003; Kocincova *et al.*, 2008) oder in parallelen Rührkesselreaktoren (Kusterer *et al.*, 2008). Bisher sind diese jedoch nur für den pH-Bereich pH 6,0 bis pH 8,0 verfügbar. Das Fermentationsoptimum liegt in der industriellen Biotechnologie bei der Herstellung von Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen jedoch häufig bei pH 4,0 bis pH 6,0. So ist dieser pH-Bereich wichtig bei der Herstellung organischer Säuren und zur Reduzierung der Kontaminationsgefahr.

Für den Messbereich unterhalb von pH 6,0 sind bislang keine optisch auslesbare chemische Sensoren verfügbar.

Daher ist es das weitere Ziel Niedrig-pH-Sensoren für den pH-Bereich unterhalb von pH 6,0, zu etablieren, die weitgehend kalibrierfrei sowie unempfindlich gegenüber Störungen durch Metabolite und Produkte aus Fermentationsprozessen sind.

Durch folgende Arbeitsschritte sollen die gesetzten Ziele erreicht werden:

- Prüfen und gegebenenfalls optimieren von Einzelkomponenten der magnetisch-induktiven Mikrodosiereinheit
- Messung der Kennlinien der einzelnen Mikrodosierpumpen und Identifikation wesentlicher Betriebsgrößen
- Ermittlung der Betriebscharakteristika im Mehrkanalbetrieb
- Sicherstellung der Autoklavierbarkeit
- Prozesseinsatz der optimierten und charakterisierten Mikrodosiereinheit am Beispiel paralleler Zulaufverfahren mit *Escherichia coli*.

- Prüfen der Kalibrierbarkeit der Niedrig-pH-Sensoren in Nährmedien und Kulturüberständen
- Identifikation möglicher Störgrößen bei der Kalibrierung
- Charakterisierung und Auswahl geeigneter Niedrig-pH-Sensoren für den Prozesseinsatz
- Prozesseinsatz der Niedrig-pH-Sensoren am Beispiel paralleler Satzkultivierung von *Clostridium acetobutylicum* bei pH unterhalb 6,0.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Betrieb von Bioreaktoren

3.1.1 Mikrobielle Kinetik

Die industrielle Kultivierung von Mikroorganismen umfasst ein weites Feld, von der Abwasserbehandlung, über die Produktion von Antibiotika, bis hin zu Herstellung von Proteinen durch rekombinante Bakterien (Nielsen, 2007; Schügerl, 1997). Diesen Produktionsprozessen liegt zu Grunde, dass Mikroorganismen Substrat verbrauchen und sich dadurch vermehren, während es gleichzeitig zu einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten kommt (Storhas, 1994). Der Wachstumsprozess von Mikroorganismen – ausgehend von einer idealen Durchmischung im Reaktionssystem und ohne Eingriff von außen (Satzverfahren) – gliedert sich dabei in mehrere Phasen, dargestellt in Abbildung 3.1 (Pörtner, 2006).

1. In der lag-Phase nach dem Animpfen stagniert das Wachstum und es erfolgt die Anpassung an das neue System, zum Beispiel einhergehend mit der Produktion von Enzymen.
2. Es folgt eine Phase exponentiellen Wachstums mit entsprechendem Substratverbrauch.
3. Auf Grund von Substratlimitierung oder Inhibierung durch Stoffwechselprodukte nimmt der Anstieg der Biomassekonzentration in der Phase des limitierten Zellwachstums ab.
4. In der stationären Phase ist die Absterbe- und Wachstumsrate der Mikroorganismen annähernd gleich, so dass eine konstante Zellkonzentration vorliegt.
5. In der Absterbephase findet kaum noch Wachstum oder Vermehrung statt und die Zellyse setzt ein, was zu einer Abnahme der Biomasse führt. (Pörtner, 2006)

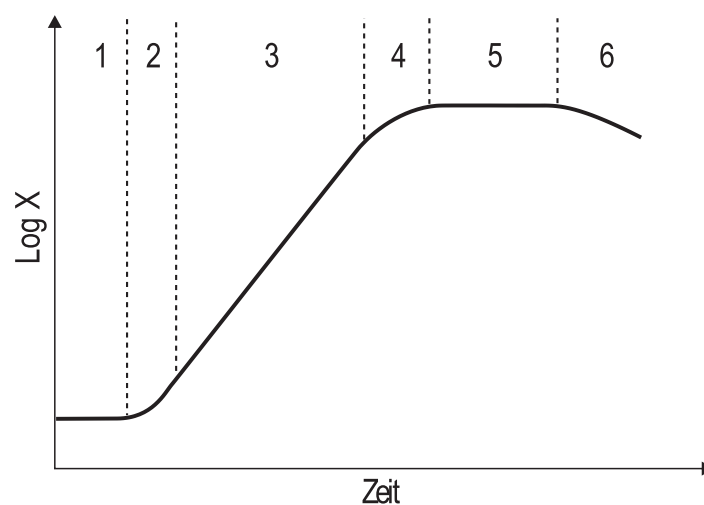


Abbildung 3.1: Mikrobielles Wachstum ohne Eingriffe von außen; X = Zellkonzentration, (1) lag-Phase, (2) Übergangsphase, (3) exponentielles Wachstum, (4) limitiertes Zellwachstum, (5) stationäre Phase, (6) Absterbephase (modifiziert nach Braha & Groza, 2006; Pörtner, 2006)

Mikroorganismen haben sich seit Millionen von Jahren an ihre Umgebung adaptiert, daher ist es nötig diese Umweltbedingungen auch im Reaktor nachzuempfinden, um hohe Wachstumsraten erzielen zu können (Schügerl, 1997). In einer konkurrenzlosen Umgebung werden die vorhandenen Nährstoffe hauptsächlich für das Zellwachstum eingesetzt. Wird bei der Kultivierung jedoch die Produktion darüber hinausgehender Produkte angestrebt, müssen die Umgebungsbedingungen gegebenenfalls entsprechend abgeändert werden. Zu den wichtigsten Parametern gehören dabei pH, Druck, Temperatur, Strömungsgeschwindigkeit, Flüssigkeits- und Gasdurchsatz, sowie Rührerdrehzahl und Leistungseintrag (Schügerl, 1997).

Ziel der Kultivierung im Bioreaktor ist ein effizientes und kostengünstiges Produktionsverfahren mit möglichst wenig Nebenprodukten und hoher Produktausbeute, wobei dafür der mikrobiellen Umsetzung eine wesentliche Bedeutung zukommt. Daher ist nicht nur die Wahl eines geeigneten Reaktortyps (zum Beispiel Strömungsrohr, Rührkessel) sondern auch die Entscheidung über die Art der Prozessführung maßgeblich (Grönke, 2011; Pörtner, 2006). Es werden dabei kontinuierliche und diskontinuierliche (Satz oder Zulauf-) Verfahren unterschieden (Pörtner, 2006), deren Eignung abhängig ist von den eingesetzten Mikroorganismen, der Art der Produktbildung und einer Risikoabschätzung bezüglich Mutation und Kontamination (Storhas, 1994).

Das kontinuierliche Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass sich das Reaktionssystem im Fließgleichgewicht mit konstantem Volumen befindet, bei dem ein ständiger Zulauf von frischem Medium erfolgt, während gleichzeitig verbrauchtes Medium samt Biomasse abgepumpt wird (Pörtner, 2006). Bei einem typischen kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor (Chemostat) werden sämtliche Prozessparameter konstant gehalten, was sich auch in einer stationären Biomasse-, Substrat- und Produktkonzentration niederschlägt (Pörtner, 2006). Diese Betriebsweise wird häufig zur Charakterisierung von Mikroorganismen benutzt, weil der Stoffwechsel der Zellen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden kann (Grönke, 2011). Da kontinuierliche Prozesse aber das Risiko von Mutationen und Kontaminationen bergen (Nielsen, 2007; Storhas, 1994), spielen sie in der industriellen Produktion nur eine untergeordnete Rolle (Grönke, 2011; Nielsen, 2007). Die beiden diskontinuierlichen Verfahren werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

3.1.2 Satzverfahren

Ein industriell sehr weit verbreitetes, einfaches und zuverlässiges Verfahren ist die Satz- (*Batch*) Betriebsweise (Pörtner, 2006), dessen Verlauf in Abbildung 3.2 dargestellt ist und dessen Wachstumsrate weitgehend der Darstellung in Abbildung 3.1 entspricht. Dabei erfolgen nach einer einmaligen Substratzugabe und dem Animpfen keine weiteren Eingriffe in das Reaktionssystem, so dass das Volumen V konstant bleibt. Ausnahmen sind ein

eventueller Gaseintrag sowie die Zugabe von Antischaummittel oder Titrationsmittel zur Einstellung eines konstanten pH (Grönke, 2011; Pörtner, 2006; Storhas, 1994).

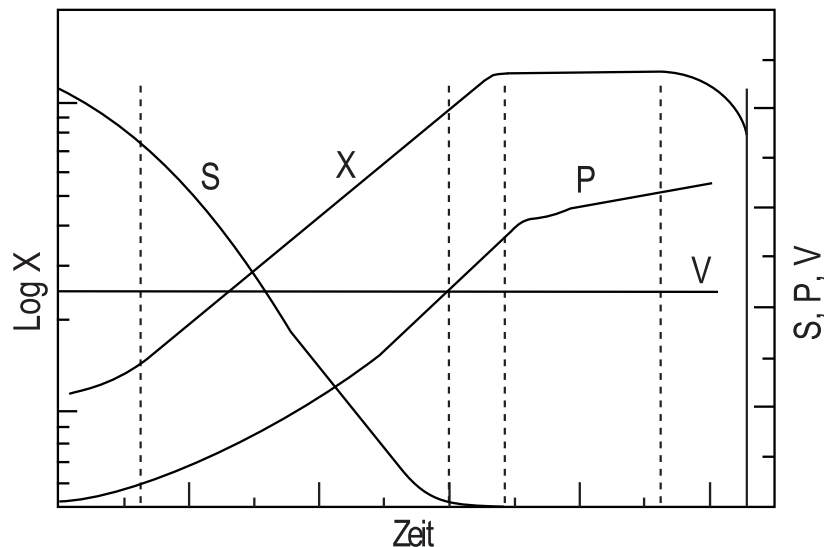


Abbildung 3.2: Verlauf einer Satz-Kultur, X= Zellkonzentration, S = limitierende Substratkonzentration, P = Produktkonzentration, V = Volumen (modifiziert nach Pörtner, 2006)

Abbildung 3.2 zeigt, dass die Zellkonzentration X demnach so lange zunimmt, bis eine Inhibierung durch Stoffwechselprodukte erfolgt oder bis die limitierende Substratkonzentration S einen limitierenden Wert erreicht (Grönke, 2011; Pörtner, 2006). Ein Prozessabbruch kann daher auch bei der maximal erreichbaren Produktkonzentration P erfolgen (Pörtner, 2006).

Da der Betrieb weitgehend ohne externe Regelung erfolgt, führt der spontane Verlauf der Substratumwandlung zu schwer kontrollierbaren Prozessbedingungen, da sowohl die Zusammensetzung des Mediums als auch die Biomasse- und Produktkonzentration fortwährenden Änderungen unterliegt (Storhas, 1994). Die Produktivität des Satz-Verfahrens wird durch die maximal mögliche Substratkonzentration zu Beginn des Prozesses bestimmt, welche sich hemmend auswirken und / oder zu einem überhöhten Ausstoß von ihrerseits inhibierenden Stoffwechselprodukten führen kann (Krahe, 2003; Pörtner, 2006). Ein weiterer Nachteil liegt darin begründet, dass nur bei hoher Biomassekonzentration eine hohe volumenspezifische Produktivität vorliegt, wohingegen diese in der langen Anwuchsphase nur gering ist (Krahe, 2003).

3.1.3 Zulaufverfahren

Um die Wachstumslimitationen des Satz-Betriebes zu umgehen, kann das Zulauf- (*Fed-Batch*) Verfahren genutzt werden. Dabei wird der Bioreaktor mit 30 - 50% des maximalen Volumens befüllt und zunächst im Satz-Betrieb gestartet. Ist das limitierende Substrat verbraucht oder

tritt eine Inhibierung des Wachstums aufgrund der zunehmenden Produktkonzentration auf, wird frisches Medium zugegeben (Grönke, 2011; Pörtner, 2006).

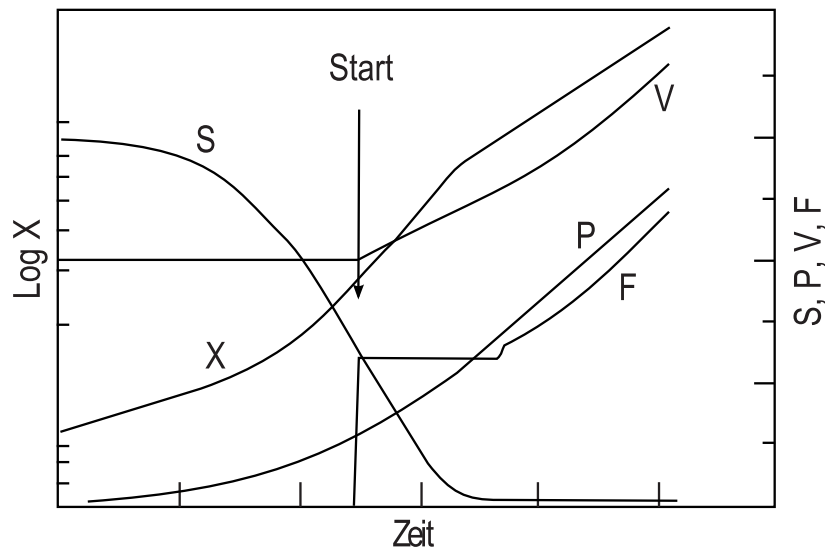


Abbildung 3.3: Verlauf einer Zulauf-Kultur, beginnend als Satz-Verfahren bis zum Start des Zulaufprozesses, X= Zellkonzentration, S = limitierende Substratkonzentration, P = Produktkonzentration, V =Volumen, F = Zulaufkonzentration (Pörtner, 2006)

Dieses Prinzip ist in Abbildung 3.3 dargestellt: Die ursprüngliche Substratkonzentration S nimmt - ebenso wie beim Satz-Verfahren - mit zunehmender Metabolisierung durch die Zellen ab. Allerdings wird bei einer prozessspezifischen Substratkonzentration der Zulauf F gestartet, welcher in dem dargestellten Beispiel erst konstant und mit zunehmendem Biomassewachstum X exponentiell zugeführt wird. Dadurch wird die limitierende Substratkonzentration S konstant gehalten, wodurch auch das Volumen V ansteigt. Durch den Zulaufbetrieb kann die Wachstumsphase verlängert werden, wodurch die Produktkonzentration P und Produktausbeute steigen (Pörtner, 2006). Durch Variation des Volumenstroms ist es möglich, das spezifische Optimum der Substratkonzentration zu ermitteln. Bei konstanter Reaktionsgeschwindigkeit kann der Zulauf (*Feed*) in ebenfalls konstanter Dosierung stattfinden. Alternativ kann dieser beispielsweise an die Konzentration von Substrat oder Produkt gekoppelt sein, sofern eine In-line oder On-line-Messung gegeben ist (Storhas, 1994) Nachteilig ist ein erhöhter apparativer Aufwand, da nicht nur Vorlagebehälter für die Medien, sondern auch Regelungstechnik zur Steuerung des Zulaufs nötig sind (Pörtner, 2006).

An beide vorgestellten diskontinuierlichen Verfahren schließen sich nach jeder Fermentation Reinigungs- und Sterilisationsprozesse an, welche zwar zeit-, kosten und personalintensiv sind, aber andererseits auch Kontaminationen und Mutationen verhindern und damit zum Erfolg der Satz- und Zulauf-Betriebsweise in der industriellen Praxis beitragen (Storhas, 1994).

3.2 Dosiertechnik in Parallelbioreaktoren

Im Rahmen der automatisierten Prozesstechnik sind Dosiervorgänge aus den meisten Produktionsverfahren nicht mehr wegzudenken (Vetter, 2003), wobei sich der Dosierprozess als ein Zusammenspiel von Messen, Fördern und Regeln darstellt (Vetter, 2001). In der Medizin, Biologie und anderen ähnlichen Bereichen sind insbesondere Mikrofluidikprozesse in den Fokus gelangt (El-Sadi and Esmail, 2006), bei denen häufig Medien in sehr kleinen Mengen zum Einsatz kommen, typischerweise mit nur wenigen Mikrolitern (Ashraf *et al.*, 2011; Schlücker, 2001). Um auch unter diesen Bedingungen eine optimale Dosierung zu gewährleisten, nimmt der Förderprozess eine Schlüsselrolle ein, denn je geringer die Dosiermenge, desto schwieriger gestaltet sich die Einhaltung der volumetrischen Genauigkeiten (Schlücker, 2001). Dies erklärt die intensive Entwicklung von Mikropumpen seit Mitte der 1970er Jahre mit ganz unterschiedlichen Wirkprinzipien, wie zum Beispiel Kolben-, Schlauch- oder Membranpumpen (Schlücker, 2001; Woias, 2005). Entsprechend zeigen Mikropumpen eine große Variation an Funktionsprinzipien. Ein Ansatz ist die Miniaturisierung von etablierten mechanischen Prinzipien aus dem makroskopischen Bereich. Des Weiteren können auch neue Pumpeffekte genutzt werden, die im Mikromaßstab effektiver sind als im makroskopischen Maßstab (Nguyen and Wereley, 2002). Im Folgenden wird eine kurze Übersicht verschiedener Dosierkonzepte für miniaturisierte Bioreaktorsysteme wiedergegeben.

3.2.1 Pipettierroboter

Mit einer Vielzahl am Markt verfügbarer Modelle bieten sich Pipettierroboter für die Dosierung in verschiedensten Parallelbioreaktorsysteme an. Grundlegend können zwei Arten von Pipettierrobotern unterschieden werden. Einmal gibt es Roboter mit fest montierten Pipetten, welche im Prozess zur Vermeidung einer Kontamination gereinigt und sterilisiert werden können. Eine andere Lösung sind Roboter mit sterilen Einwegpipettenspitzen, welche bei Bedarf im Prozess gewechselt werden können. Allen Systemen gemein ist der Nachteil einer iterativen Dosierung, da die in der Regel mit Kolbenpumpen versehenen Roboter nur begrenzt Flüssigkeit mit den Pipetten aufnehmen können. Besonders bei Parallelreaktorsystemen mit kleinen Arbeitsvolumen stellen zudem die Mindestvolumina mit denen der Roboter präzise Flüssigkeitsmengen dosieren kann eine Limitierung dar. So müssen oftmals zusätzlich enzymatische Systeme für eine präzisere Kontrolle der Substratfreisetzung verwendet werden (Wenk *et al.*, 2012b).

Das am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelte Parallelbioreaktorsystem bioREACTOR (2mag AG, München) im 10 mL Maßstab ist mit herkömmlichen Pipettierrobotersystemen, wie beispielsweise dem Freedom EVO (Tecan, Crailsheim) kompatibel. Dabei können über fest montierte Pipetten Volumen von 10 bis 500 μL mit einer

Schrittzeit von gewöhnlich 10 bis 20 Minuten gefördert werden (Hoefel *et al.*, 2012). Das System ist in einer 8-fach und einer 48-fach Version erhältlich wobei in beiden Systemen Einwegreaktoren mit und ohne Schikanen eingesetzt werden können. Über in den Deckel des Bioreaktorblocks integrierte Kanäle kann der Kopfraum jedes Reaktors begast werden. An der Unterseite des Deckels sind die Achsen zur Führung verschiedener magnetisch induktiv betriebener Rührer befestigt. Je nach gewähltem Rührer erfolgt der Gaseintrag in die Flüssigphase über deren Oberfläche oder kann beispielsweise bei erhöhtem Sauerstoffbedarf drehzahlabhängig über auf einer Hohlachse gelagerte gasinduzierende Rührer erfolgen. Je nach Rührerart können Drehzahlen von 400 bis 3000 U min⁻¹ eingestellt werden. Mit Hilfe von zwei integrierten Wärmetauschern können der Reaktionsraum und der Kopfraum der Reaktoren temperiert werden. Am Boden jedes Bioreaktors befinden sich zwei optisch auslesbare Sensoren zur Bestimmung des pH und der gelösten Sauerstoffkonzentration. Das in Abbildung 3.4 dargestellte System wurde bereits erfolgreich für die Kultivierung verschiedenster Mikroorganismen wie *Streptomyces tendae*, *Escherichia coli* und *Clostridium acetobutylicum* eingesetzt (Hortsch, 2011; Puskeiler, 2004; Schmidt, 2013).

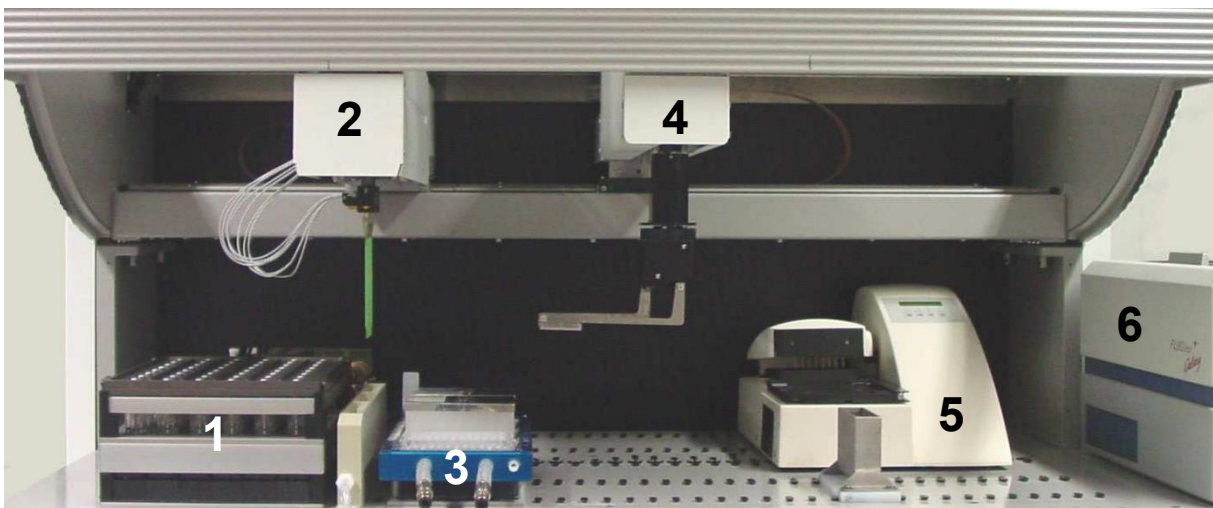


Abbildung 3.4: In ein Laborrobotersystem integriertes des 48-fach bioREACTOR Parallelbioreaktorsystem (1). Jede der 48 Positionen des Reaktorblocks kann individuell vom Pipettierarm (2) des Roboters angefahren werden, wobei im Regelfall eine Pipette eine Zeile mit 6 Reaktoren anfährt. Weiterhin stehen Vorlagegefäße für Flüssigkeiten (3) zur Verfügung. Der Greifarm (4) kann Mikrotiterplatten zur Waschstation (5) oder zum Photometer (6) befördern (Gebhardt, 2010).

Das ebenfalls im 10 mL Maßstab dimensionierte Parallelbioreaktorsystem ambr™ (The Automation Partnership, Herts, England) mit 24 oder 48 Rührkesselreaktoren wird dagegen mit Einwegpipettenspitzen versorgt. Es stehen 1 mL und 5 mL Spitzen zur Verfügung mit denen Volumen von 20 µL bis 4 mL zu dosiert werden können. Im Gegensatz zum bioREACTOR ist das ambr System nur mit dem integrierten Pipettierroboter verwendbar. Ein Wechsel der Pipettierroboters ist nicht vorgesehen. Die Reaktoren sind mit Begasungsrohren für den Gaseintrag von bis zu 1 mL min⁻¹ versehen. Der Energieeintrag erfolgt über Schrägblattrührer welche mit 300 bis 2000 U/min betrieben werden können. Am Boden jedes Bioreaktors befinden sich optisch auslesbare Sensoren zur Bestimmung des pH und der

Gelöstsauerstoffkonzentration. Das System wurde erfolgreich für die Kultivierung von Suspensionzellen wie Blutstammzellen, Chinesische Hamster Ovarialzellen und die Produktion monoklonaler Antikörper eingesetzt (Hsu *et al.*, 2012; Moses *et al.*, 2012; Ratcliffe *et al.*, 2012). Ebenfalls liegt am Beispiel von *Escherichia coli* eine erste Arbeit über die erfolgreiche Kultivierung von Mikroorganismen in dem System vor (Lee *et al.*, 2006).

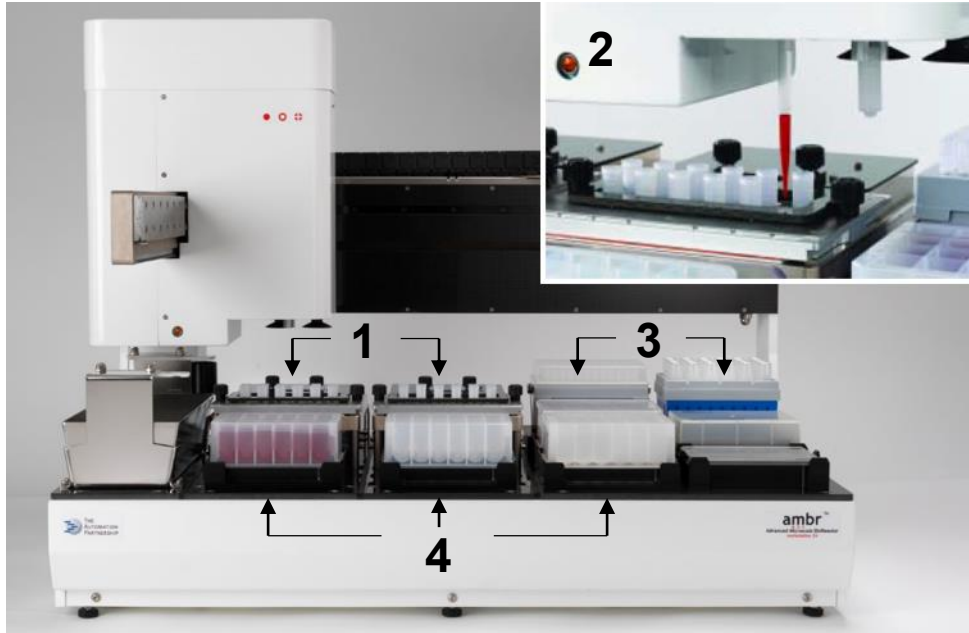


Abbildung 3.5: ambr System mit zwei temperierbaren Kultureinheiten (1) mit je 12 Reaktoren, welche über den integrierten Pipettierroboter (2) angefahren werden können. Hierfür stehen auf der Arbeitsfläche sterile Einwegpipettenspitzen (3) und Vorlagegefäße für Flüssigkeiten (4) zur Verfügung.

Das Mikrotiterplatten basierende RoboLector® Bioreaktorsystem (m2p-labs GmbH, Baesweiler) bietet 48 mit Schikanen versehene Kulturkammern pro Mikrotiterplatte. Es werden Platten für Volumen von 800 μL bis 2400 μL angeboten, wobei der Energieeintrag durch einen orbitalen Schüttler mit 3 mm Exzentrizität und mit bis 1500 U min^{-1} erfolgt. Am Boden jeder Kulturkammer befinden sich optisch auslesbare Sensoren zur Bestimmung des pH und der Gelöstsauerstoffkonzentration. Für die Dosierung werden verschiedene Pipettierroboter mit 2 bis 8 Pipetten angeboten, wobei sowohl Einweg- als auch fest montierte Pipettenspitzen verwendet werden. Das Pipettiervolumen beträgt dabei in allen Fällen 10 – 1000 μL . Mit *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, und *Hansenula polymorpha* wurden bereits mehrere Mikroorganismen erfolgreich in diesem System kultiviert.



Abbildung 3.6: RoboLector mit in einen Laborrobotersystem (Tecan) integrierter BioLector Inkubationseinheit (1). Über eine Öffnung kann ein Pipettierarm (2) die Reaktionskammern des Mikrotiterplatten basierenden Systems (3) mit Flüssigkeiten versorgen. Hierfür stehen auf der Arbeitsfläche des Laborrobotersystems mehrere Vorlagebehälter zur Verfügung (4).

Ein weiteres Mikrotiterplatten basierendes System wurde am Lehrstuhl für medizinische Elektronik der Technischen Universität München entwickelt. Jede Mikrotiterplatte bietet 24 Kulturkammern mit einem Volumen von etwa 23 μL . Je zwei seitliche Behälter sind über Kanäle mit der Kulturkammer verbunden. Über einen Pipettierroboter kann Flüssigkeit aus den seitlichen Behältern entnommen oder hinzu dosiert werden. Der Roboter ist mit 24 Pipetten, welche ein Volumen von bis zu 250 μL aufnehmen können, ausgestattet. Durch Aufnahme von Flüssigkeit aus dem ersten Behälter und Zugabe von Flüssigkeit in den zweiten Behälter erfolgt über die Kanäle ein hydrostatischer Druckausgleich. Dabei wird das Medium in der Kulturkammer ausgetauscht. Die minimal mögliche Schrittzeit beträgt 2 Minuten. Jedoch werden für die Kultivierung typische Schrittzeiten mit 10 bis 30 Minuten angegeben, in denen über optisch auslesbare Sensoren am Boden der Kulturkammer pH und Gelöstsauerstoffkonzentration überwacht werden können. Zusätzlich befinden sich am Boden der Kulturkammer Impedanzsensoren, um beispielsweise die Adhärenz der Zellen zu messen. Das System wurde erfolgreich für die Kultivierung der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 eingesetzt (Kleinhans *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2013)

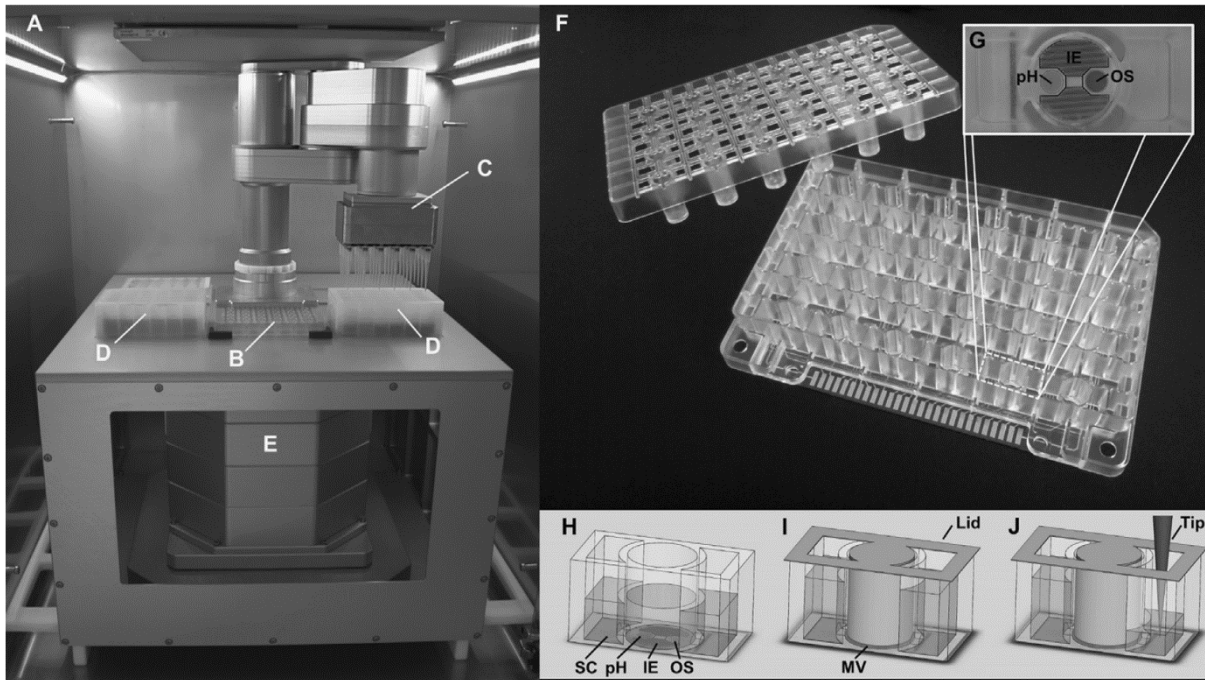


Abbildung 3.7: Übersicht des in einen Inkubationsschrank integrierten Mikrotiterplatten basierenden Systems (A) mit eingelegerter Sensorplatte (B; Detailansicht F). Der Pipettierarm (C) kann gleichzeitig alle Positionen der Sensorplatte anfahren und mit Flüssigkeiten aus bis zu sieben Vorlagebehältern (D) austauschen. Über eine automatisierte Ausleseeinheit (E) erfolgen mikroskopische Aufnahmen und das Auslesen der optischen Sensoren. Die zweiteilige Sensorplatte (F) besitzt 24 Positionen mit je drei Kammern (G). Die mittig angeordnete Kulturkammer (H) besitzt optischen Sensoren für pH (pH) und Gelöstsauerstoffkonzentration (OS) sowie Impedanzelektroden (IE). Die Kulturkammer wird über einen Einsatz (I) auf ein Mikrovolumen (MV) reduziert. Mit der Kulturkammer verbundene Seitenkammern (SC) erlauben den Flüssigkeitstransfer durch den Pipettierroboter (Wolf *et al.*, 2013).

3.2.2 Peristaltikpumpen und Schlauchpumpen

Da sie keine Ventile besitzen, eignen sich Peristaltikpumpen aufgrund ihrer einfachen Bauweise zur Miniaturisierung für maßstabsverkleinerte Parallelbioreaktorsysteme. In Form von Schlauchpumpen findet zudem bereits im Labormaßstab ein breiter Einsatz dieses Pumpentyps statt. Das größte Problem von Peristaltikpumpen ist Leckage. Schon ein kleiner Druckunterschied zwischen Eingang und Ausgang führt zu einem Rückfluss, wenn die Pumpe nicht betrieben wird. In Systemen bei denen ein Rückfluss nicht stattfinden darf, wird dieser entweder durch die Kopplung mit einem Ventil oder Betrieb der nicht angesteuerten Pumpe bei minimaler Förderrate verhindert. Damit werden jedoch eine erhöhte Komplexität oder eine herbeigeführte permanente Minimaldosierung des Systems in Kauf genommen (DASGIP, 2014; Nguyen and Wereley, 2002).

Das DASbox® System (DASGIP GmbH, Jülich) ist modular aufgebaut und kann mit 4 bis 32 oder mehr Bioreaktoren parallel betrieben werden. Die wiederverwendbaren Reaktoren aus Glas besitzen ein Arbeitsvolumen von 60 bis 250 mL. Der Energieeintrag erfolgt wahlweise über Scheiben- oder Propeller-Rührer, die mit 20 bis 3000 U min⁻¹ betrieben werden können. Wahlweise kann die Begasung über den Kopfraum als auch über eingetauchte Gasverteiler gewährleistet werden. Durch den Reaktordeckel können handelsübliche Sensoren für die Messung von pH und Gelöstsauerstoffkonzentration eingeführt werden. In der Standardausführung besitzt jeder Reaktordeckel zwei Anschlüsse für die Dosierung von

Flüssigkeiten. Diese erfolgt über Schlauchpumpen in 4-fach oder 8-fach Modulen, wobei je nach Ausführung ein Volumenstrom von $0,3 \text{ mL h}^{-1}$ bis $5,0 \text{ L h}^{-1}$ eingestellt werden kann. Das System wurde bereits erfolgreich für die Kultivierung zahlreicher Mikroorganismen wie beispielsweise *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (Seibold *et al.*, 2007; Seibold and Eikmanns, 2007).

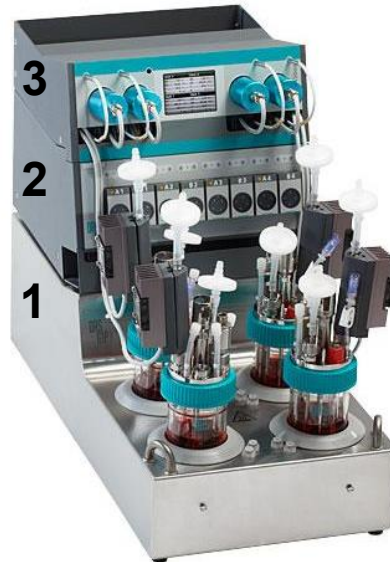


Abbildung 3.8: DASbox® System mit vier Rührkesselreaktoren (1) und einem Dosiermodul mit 8 Schlauchpumpen (2), sowie einer Gasmischstation (3).

Aufbauend auf dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen geschüttelten Mikrotiterplatten-basierenden RoboLector® System wurde der Mikrofluidik BioLector® entwickelt. Hierbei wird der Boden der Mikrotiterplatte durch einen aufgeklebten Mikrofluidik-Chip aus Polystyrol (ChipShop GmbH, Jena) ersetzt. Der aufgeklebte Chip bedeckt die 6 in einer Reihe liegenden Positionen der Mikrotiterplatte. Zwei dieser 800 bis 1500 μL fassenden Gefäße dienen als Vorlagebehälter zur Versorgung der 4 übrigen Positionen über in den Chip eingebrachte Fluidkanäle. Die Kanäle sind mit einer Polystyrolmembran versiegelt, welche gleichzeitig pneumatisch zur Betätigung der Pumpenfunktion eingesetzt wird. Beide Vorlagebehälter werden für den Betrieb unter Druck gesetzt. Das Hubvolumen der Pumpkammern beträgt etwa 250 bis 300 nL und muss vor der Kultivierung kalibriert werden. Die Dosierung konstanter Förderraten von $4 \mu\text{L h}^{-1}$, was einer Abtastzeit von etwa 5 min entspricht, wie auch die Dosierung von exponentiellen Zulaufprofilen mit einer Wachstumsrate von $0,2 \text{ h}^{-1}$ wurden für die Kultivierung von *Escherichia coli* berichtet (Funke, 2010; Funke *et al.*, 2010).

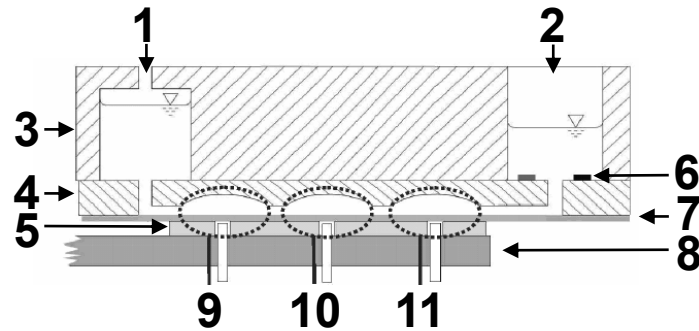


Abbildung 3.9: Schnittzeichnung des Mikrofluidik BioLectors® mit in der Flowerplate® (3) integrierter mit Druckanschluss versehener Vorlagekammer (1) und mit optischen Sensoren für pH und Gelöstsauerstoffkonzentration (6) versehener Kulturkammer (2). Beide Kammern sind über einen Mikrofluidik Chip (4) verbunden, welcher durch eine Membran (7) abgedichtet ist. Diese liegt auf dem mit einer Silikondichtung (5) und Druckanschlüssen für die Ventilkammern (9 und 11) und die Pumpkammer (10) versehenen Schütteltisch (8) auf (modifiziert nach Funke *et al.*, 2010).

Das Intelligent Mobile Lab (IMOLA) System (Cellasys GmbH, München) ist modular aufgebaut und kann mit 1 bis 6 Einweg-Bioreaktoren betrieben werden. Dabei kann das Einzelmodul dank einer Batterie sogar mobil betrieben werden. Die Reaktoren besitzen ein Volumen von 7 μL oder mehr bei 6 mm Durchmesser. Am Reaktorboden befinden sich zwei Metalloxid pH-Sensoren, ein amperometrischer Sensor zur Gelöstsauerstoffkonzentrationsmessung, zwei Strukturen zur Impedanzmessung und ein Temperatursensor. Über Membranpumpen (ISMATEC IPC ISM931, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim) kann die Reaktorkammer mit einer Förderrate von mindestens $120 \mu\text{L h}^{-1}$ durchspült werden. Der Standardzyklus sieht 3-minütiges Pumpen mit einer Förderrate von $3,6 \text{ mL h}^{-1}$ gefolgt von einer 7-minütigen Pause vor. Das System wurde sowohl für die Kultivierung von Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* und *Chromera velia*, als auch für adhärenzte Krebszelllinien wie MCF-7 und HeLa sowie Gewebeproben erfolgreich getestet (Weiss *et al.*, 2013).

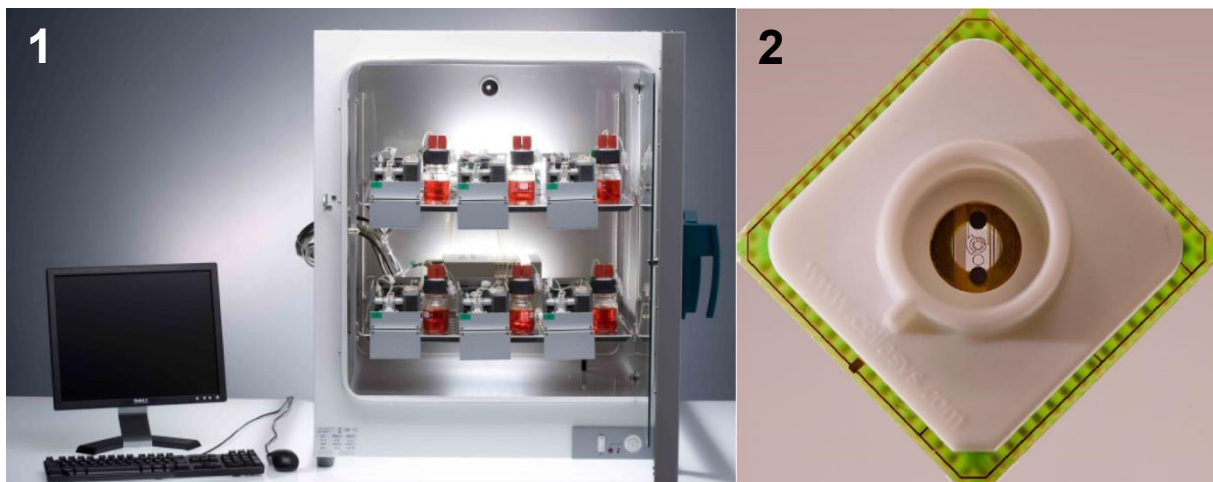


Abbildung 3.10: In einem Schrankkubator installiertes 6-fach IMOLA System (1). Jedes Modul versorgt eine der mit zwei elektrischen Impedanzsensoren, zwei pH-Sensoren, einem amperometrischen Sensor und einem Temperatursensor versehenen Kulturkammern der sechs BioChip-D (2) (Weiss *et al.*, 2013).

3.2.3 Membranpumpen

Mit einem Einlassventil und einem Auslassventil versehene Membranpumpen sind der häufigste Pumpentyp im makroskopischen Maßstab. Aus diesem Grund wurde auch mit der Entwicklung miniaturisierter Membranpumpen für parallele Bioreaktorsysteme begonnen (Nguyen and Wereley, 2002).

Für das in Kapitel 3.2.1 beschriebene Parallelreaktorsystem bioREACTOR 48 (2mag AG, München) wurde ein mit magnetisch-induktiven Mikro-Membranpumpen versehenes Labormuster einer Mikrodosiereinheit entwickelt. Abbildung 3.11 zeigt den schematischen Aufbau einer magnetisch-induktiven Mikro-Membranpumpe. Diese sind vollständig in den Deckel des Bioreaktorblocks integriert. Ausgestattet mit 144 Mikro-Membranpumpen erlaubt die Mikrodosiereinheit die Durchführung von individuellen parallelen Zulaufprozessen mit bis zu drei Substraten oder Titrationsmitteln. Das minimale Dosiervolumen der mit bis zu 2 Hz ansteuerbaren Mikropumpen beträgt etwa 1,6 μL pro Pumpenhub. Daraus resultierend sind Förderraten von bis zu 11,5 mL h^{-1} möglich. Die Charakterisierung der Pumpen erfolgte über die Bestimmung des Dosiervolumens je Pumpenhub bei der Förderung von Glycerinlösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Hierdurch wurde zugleich das Förderverhalten der Pumpen bei Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Viskosität wie beispielsweise glucosehaltigen Substratlösungen untersucht.

Bei mit 1 und 2 Hz angesteuerten Mikropumpen konnte Flüssigkeit bis zu einer Viskosität von 8,2 mPa s gefördert werden, ohne dass eine Beeinträchtigung des Hubvolumens gemessen wurde. Jedoch zeigte sich bei Frequenzen unterhalb von 1,25 Hz eine Zunahme der Dosierfehler. Für den Bioprozesseinsatz sind jedoch gerade niedrige Förderraten unterhalb einer Frequenz von 1 Hz erforderlich. So wurde das System für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt, wobei Förderraten zwischen 75 und 150 $\mu\text{L h}^{-1}$ für den Substratzulauf angegeben wurden. Hierbei erfolgte jedoch nur an je drei Reaktoren für ein konstantes und ein exponentielles Zulaufprofil eine Auswertung. Auch bei der pH-Reglung einer Satzkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte die Auswertung nur an acht Reaktoren.

Durch die kontaktfreie magnetisch-induktive Kraftübertragung der Pumpe kann die mit der Spule versehene Steuereinheit einfach von der autoklavierbaren Mikrofluidikeinheit getrennt werden. Die kompakte Konstruktion erlaubt weiterhin die Integration in kommerziell erhältliche Laborrobotersysteme für eine automatisierte Probenahme (Gebhardt *et al.*, 2011).

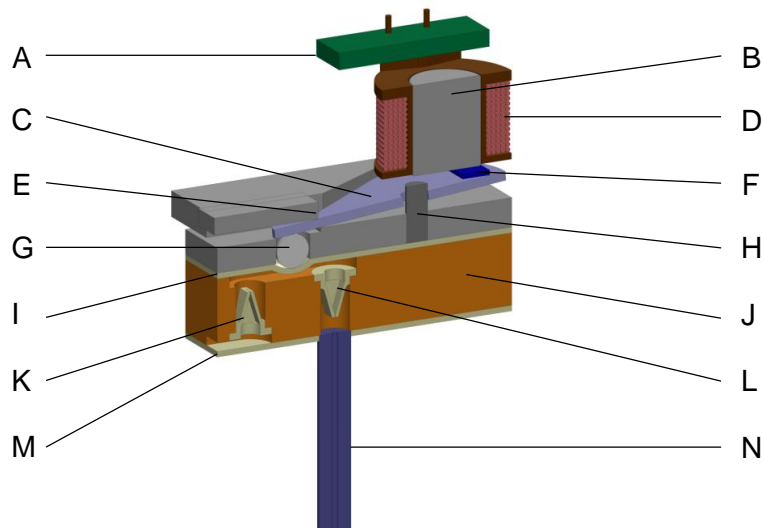


Abbildung 3.11: Querschnitt des schematischen Aufbaus einer magnetisch-induktiven Mikromembranpumpe. Über die in der Platine (A) der Steuereinheit angeschlossene elektromagnetische Spule (D) mit Stahlkern (B) wird der magnetische Aktor (C) angezogen. Durch die Führung (E) in der Metallfassung wird dabei die Hebelkraft über eine Metallkugel (G) auf die obere Silikondichtung (I) übertragen, welche gleichzeitig als Pumpmembran dient. Durch einen Führungsstift (H) und einen von einem Deckblech (F) definierten Anschlagpunkt wird dabei ein gleichbleibendes Hubvolumen bei der Hebelauslenkung gewährleistet. Über ein zuführendes Lippenrückschlagventil (K) und ein abführendes Lippenrückschlagventil (L) aus Silikon welche in die mit Pumpkammer und Kanalsystem versehene Fluidikplatte aus PEEK (J) eingebracht sind wird die Flüssigkeit in den Injektor (N) befördert. Eine zweite Silikondichtung (M) schließt das Kanalsystem an der Unterseite ab (modifiziert nach Gebhardt et al. 2011).

Die beschriebenen Ergebnisse sind der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Daher wird im Folgenden näher auf die Funktionsweise von Mikro-Membranpumpen eingegangen.

3.3 Mikro-Membranpumpen

Auf Grund ihrer hohen volumetrischen Präzision und ihrem breiten Betriebsbereich in Bezug auf Förderdrücke und Viskosität (Vetter, 2003) zählen die Mikromembranpumpen zu den wichtigsten Ansätzen für fluidfördernde Mikrodosiersysteme (Richter *et al.*, 1998; Vetter, 1998) und werden nachfolgend näher vorgestellt.

3.3.1 Aufbau von Mikro-Membranpumpen

In Abbildung 3.12 ist der grundlegende Aufbau einer Mikro-Membranpumpe dargestellt. Es handelt sich meist um eine einzige Pumpkammer, die mit einer Membran verschlossen ist (Ashraf *et al.*, 2011) und Ein- und Auslassventile aufweist, welche die Flussrichtung des geförderten Mediums bestimmen (Cheng *et al.*, 2005). Dabei kann zwischen aktiven Ventilen und passiven Ventilen unterschieden werden, wobei passive Ventile auf Druckdifferenz reagieren und meist nur eine Fließrichtung haben, während aktive Ventile mittels externem Antrieb geöffnet und geschlossen werden können (Ashraf *et al.*, 2011). Aufgrund ihrer einfachen Bauweise bieten sich passive Rückschlagventile für die Verwendung in miniaturisierten Membranpumpen an.

Der Antriebsmechanismus oder Aktor ist in den meisten Fällen mit der Membran verbunden und setzt Energie in Bewegung um. Dadurch bewirkt er die Wölbung der Membran und löst

die Volumenänderung der Kammer aus (Ashraf *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2005). Es existieren vielfältige Antriebsverfahren, wie zum Beispiel piezoelektrische, thermopneumatische oder elektromagnetische Aktoren (Ashraf *et al.*, 2011; Woias, 2005).

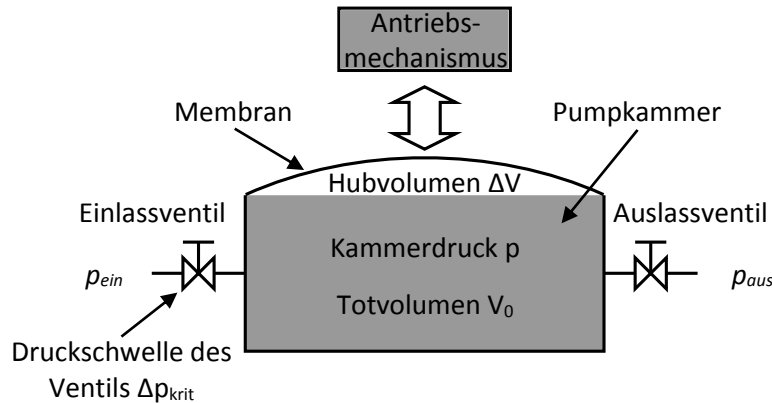


Abbildung 3.12 Beispielhafte Darstellung einer Membranpumpe modifiziert nach (Woias, 2005)

Das von den Membranen und Ventilen eingeschlossene Kammervolumen im Ruhezustand wird auch als Totvolumen V_0 bezeichnet. Die Volumenänderung oder auch das Hubvolumen ΔV wird durch die maximale Auslenkung der Membran bestimmt und verändert den Kammerdruck p (Cheng *et al.*, 2005).

3.3.2 Arbeitsweise von Membranpumpen

Grundlegend basiert die Arbeitsweise von Membranpumpen auf einem zyklischen Prozess aus den alternierenden Vorgängen Befüllen und Pumpen, wobei durch die Membranbewegung ein ständiger Wechsel zwischen Über- und Unterdruck Δp in der Pumpkammer erzeugt wird. Das Überschreiten der kritischen Druckdifferenz Δp_{krit} löst dabei abwechselnd die Öffnung der Ventile aus (Richter *et al.*, 1998).

Der vereinfachte Arbeitszyklus einer Mikro-Membranpumpe zur Förderung eines kompressiblen Mediums ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Der Zyklus beginnt mit der Auslenkung der Membran durch den Aktor, wodurch das Volumen der Pumpkammer vergrößert wird. Bei geschlossenem Auslassventil erfolgt das Einströmen des Mediums durch das geöffnete Einlassventil bis zum Erreichen der Maximalauslenkung der Membran (1). Anschließend kommt es zur Entspannung der Membran, wodurch das Pumpkammervolumen reduziert wird und ein Überdruck entsteht. Dieser sorgt für die Schließung des Einlassventils bei gleichzeitiger Öffnung des Auslassventils (2). Durch die Rückkehr der Membran in die Ruheposition – dem Zustand des geringsten Volumens (3) wird das Medium bei konstantem Druck aus der Pumpkammer gefördert. Durch die Auslenkung der Membran (4) kommt es zu einer Volumenvergrößerung der Pumpkammer und damit zu einem Druckabfall, was zum Umschalten der Ventile führt, so dass erneut Medium einströmen kann, bis der Zustand der

Vollauslenkung erreicht ist (5) und sich der Zyklus mit (6) wiederholt. Die maximale Membranauslenkung bestimmt die Volumenänderung und damit den Volumenstrom während der Förderung (Cheng *et al.*, 2005).

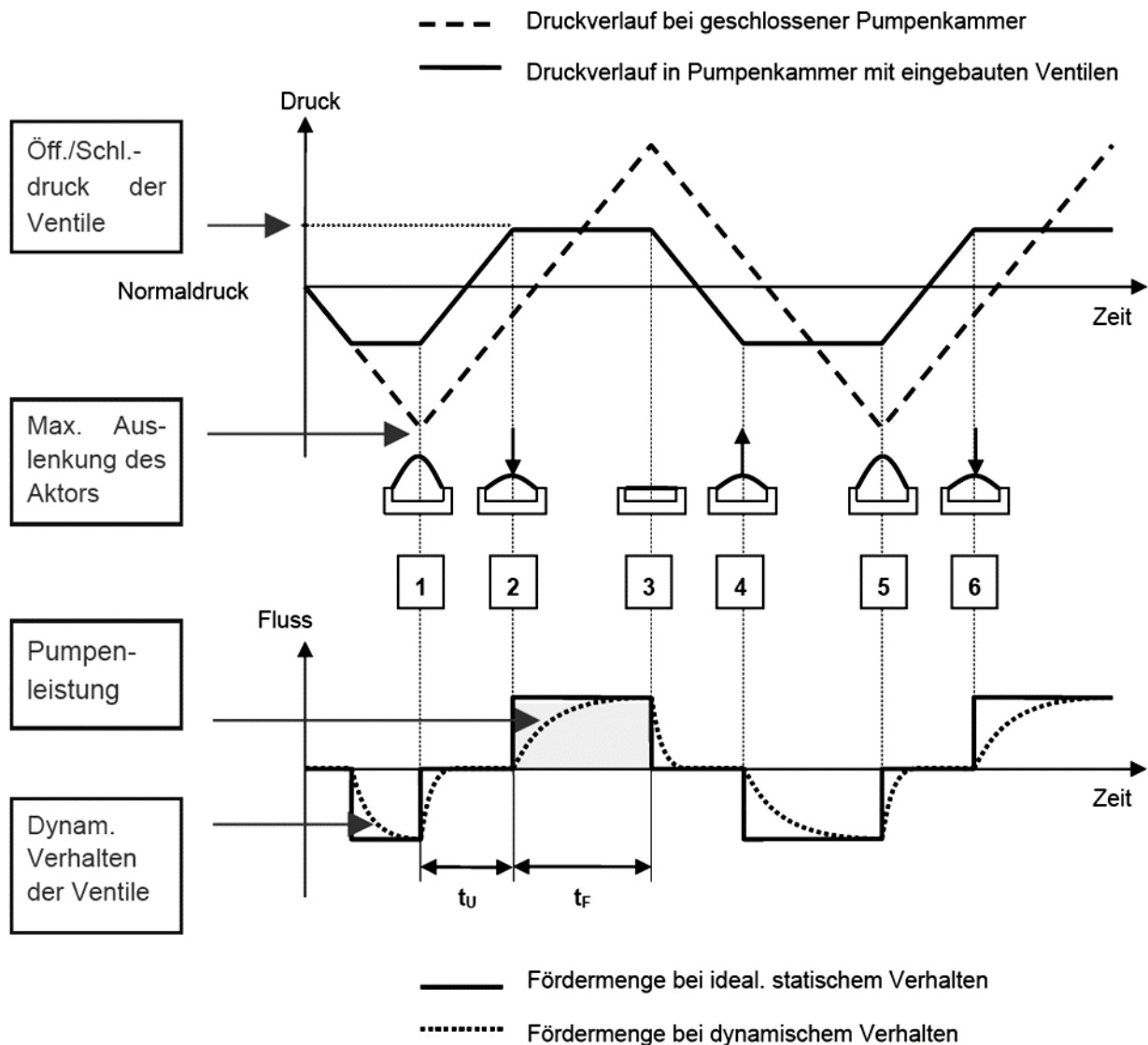


Abbildung 3.13: Arbeitszyklus einer Mikro-Membranpumpe bei der Förderung eines kompressiblen Mediums (Cheng *et al.*, 2005)

Mit passiven Rückschlagventilen versehene Membranpumpen funktionieren unter der Bedingung einer geringen Kompressionsrate in Verbindung mit einem ausreichend hohen Kammerdruck. Die Kompressionsrate Ψ ist das Verhältnis von Hubvolumen ΔV und Totvolumen V_0 :

$$\Psi = \frac{\Delta V}{V_0} \quad \text{Gleichung 3-1}$$

ΔV	Hubvolumen	m^3
V_0	Totvolumen oder Kammervolumen	m^3
Ψ	Kompressionsrate	-

Dabei ist ein ausreichend hoher Kammerdruck von dem kritischen Druck zum Öffnen der Rückschlagventile Δp_{krit} abhängig:

$$\begin{cases} |p - p_{aus}| > \Delta p_{krit} \\ |p - p_{ein}| > \Delta p_{krit} \end{cases} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

p	Kammerdruck	Pa
p_{aus}	Druck hinter dem Auslassventil	Pa
p_{ein}	Druck vor dem Einlassventil	Pa
p_{krit}	Kritischer Öffnungsdruck der Ventile	Pa

Funktionskriterium für eine Flüssigkeit fördernde Membranpumpe ist eine Kompressionsrate, welche über der minimalen zur Förderung der Flüssigkeit notwendigen Kompressionsrate $\Psi_{flüssig}$ liegt:

$$\Psi_{flüssig} > \Theta |\Delta p_{krit}| \quad \text{Gleichung 3-3}$$

$\Psi_{flüssig}$	Kompressionsrate Flüssigkeitsförderung	-
Θ	Kompressibilität der Flüssigkeit	Pa^{-1}
P_{krit}	Kritischer Öffnungsdruck der Ventile	Pa

Da die Werte der Kompressibilität von Flüssigkeiten, wie etwa Wasser mit $\Theta_{Wasser} = 0,5 \text{ GPa}^{-1}$, im Vergleich zu den von verschiedenen Aktoren verursachten Drücken sehr gering sind, kann diese Voraussetzung leicht erfüllt werden. Dies gilt jedoch nur, wenn die Pumpkammer vollständig mit Flüssigkeit gefüllt ist. Im praktischen Betrieb gibt es jedoch häufig durch die geförderte Flüssigkeit eingetragene oder durch Ausgasen entstandene Gasblasen in der Pumpkammer (Nguyen and Wereley, 2002).

3.3.3 Fehlerquellen bei Mikromembranpumpen

Eine typische Fehlerquelle mit Auswirkung auf die Funktionalität der Pumpe stellen Gasblasen in der Pumpkammer dar. Diese absorbieren, wie in Abbildung 3.14 dargestellt, aufgrund ihrer Kompressibilität die Volumenänderung, welche das Medium während des Pumpvorgangs fördern soll. Dadurch wird der Volumenstrom verringert und die Förderleistung der Pumpe unvorhersehbar gemindert (Wijngaart, 2002). Im Extremfall reduziert die Gasblase den Druck der Kammer derart, dass die Druckschwelle Δp_{krit} der Ventile nicht mehr erreicht wird, was zu einem Totalausfall der Pumpe führt (Richter *et al.*, 1998).

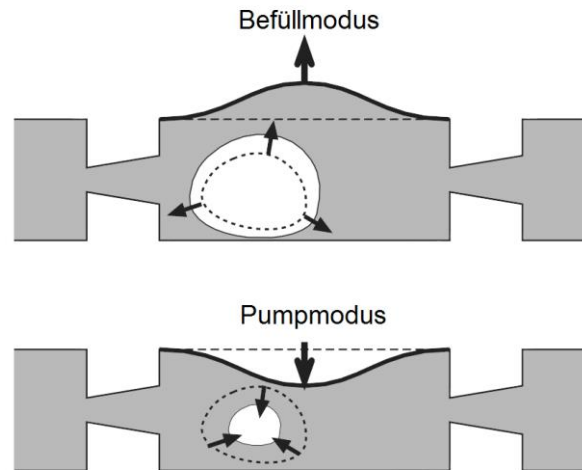


Abbildung 3.14: Auswirkung von Gasblasen in Mikro-Membranpumpen modifiziert nach (Wijngaart, 2002)

Ferner können Gasblasen sich an Ein- und Auslässen festsetzen und verändern dadurch deren Geometrie. Um diese negativen Einflüsse zu verhindern und die Funktionsfähigkeit der Membranpumpe zu gewährleisten, ist die Entgasung des Mediums nötig, sowie die gasdichte Auslegung der Anschlüsse und Leitungen (Wijngaart, 2002).

Alternativ kann bei der Auslegung und Fertigung von Membranpumpen durch folgende Maßnahmen die Anfälligkeit gegen Gasblasen reduziert werden (Nguyen and Wereley, 2002):

- Minimierung des kritischen Drucks zum Öffnen der Ventile Δp_{krit} durch Verwendung flexibler Ventile mit geringem Elastizitätsmodul.
- Maximierung des Hubvolumens ΔV durch Verwendung von Aktoren mit großem Hubvolumen oder flexiblere Pumpenmembranen.
- Minimierung des Totvolumens V_0 durch feinere Fertigungstechniken.
- Maximierung des Kammerdrucks p durch kräftigere Aktoren.

3.4 Fluorimetrische Mikrosensoren

3.4.1 Photolumineszenz

Die verwendeten Sensoren basieren auf den Prinzipien der Fluoreszenz und Phosphoreszenz, also auf Lichtemissionen, welche aufgrund von Elektronensprüngen von kernnahen auf kernferne Bahnen entstehen und durch Absorption von Photonen ausgelöst werden (Kuchling, 1999; Meister, 2012). Beide Prozesse können daher unter dem Oberbegriff Photolumineszenz zusammengefasst werden, weisen aber Unterschiede im photophysikalischen Mechanismus auf (Meister, 2012), die nachfolgend näher erläutert werden.

Sowohl Fluoreszenz als auch Phosphoreszenz werden in der Analytik zur Detektion, quantitativen Bestimmung oder auch Charakterisierung von Stoffen eingesetzt. So erlauben

zum Beispiel mit lichtleitenden Fasern versehene ionenselektive und pH-empfindliche Fluorophore *in-situ* Analysen auch an schwer zugänglichen Orten (Meister, 2012).

Fluoreszenz

Die Grundvoraussetzung für Fluoreszenz ist die Absorption eines Photons durch ein geeignetes Molekül, wodurch es zu einer Energieübertragung an ein Elektron kommt. Das Molekül wird dadurch von seinem Singulett-Grundzustand S_0 in einen energetisch höhergelegenen Singulett-Zustand, zum Beispiel S_1 überführt (Cox, 2012; Meister, 2012). Um in den Ursprungszustand zurückzukehren, gibt es mehrere Möglichkeiten, welche in Abbildung 3.15 vereinfacht in einem Jablonski-Diagramm zu sehen sind.

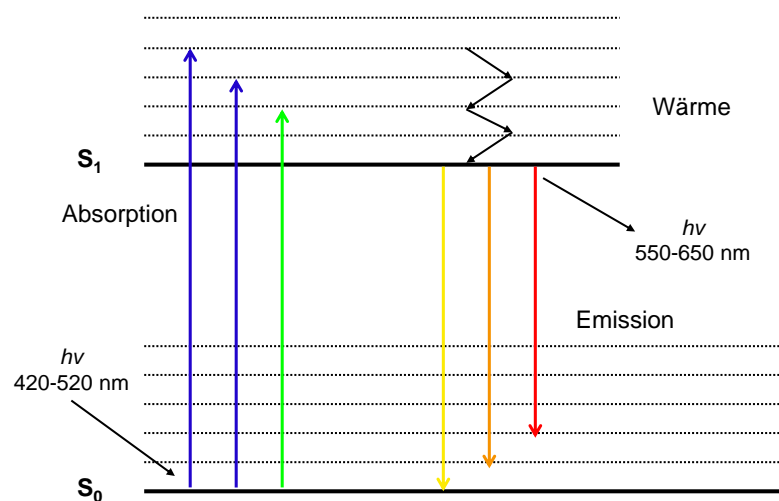


Abbildung 3.15 Jablonski-Diagramm; schematische Darstellung der Fluoreszenz, ausgehend vom Singulett Grundzustand S_0 zum energiereicheren Zustand S_1 (und höher) und der anschließenden Rückkehr in den Ausgangszustand und Aussendung von Wärme und Licht (modifiziert nach Cox 2012)

Das Molekül befindet sich in der Regel nicht im niedrigsten energetischen Level, da die absorbierte Energie meist höher ist, als zum Erreichen dieses Zustandes nötig wäre (Cox, 2012). Da eine Rückkehr zum Grundzustand jedoch nur über dieses Level möglich ist, erfolgt zunächst eine Abgabe von überschüssiger Energie durch emissionslose innere Konversion (*Internal Conversion*) (Meister, 2012), also Stöße an die umgebenden Teilchen, dargestellt als Zick-Zack-Linien im Jablonski-Diagramm (Cox, 2012). Die Rückkehr in den metastabilen Ausgangszustand erfolgt anschließend entweder durch strahlungslose Desaktivierung oder durch spontane Emission von Fluoreszenz-Strahlung mit einer Dauer von 10^{-12} bis 10^{-8} s (Meister, 2012). Fluoreszenz entsteht dabei stets in einem langwelligeren Spektrum als die Absorption, da ein Teil der aufgenommenen Energie strahlungslos umgewandelt wurde (Cox, 2012).

Phosphoreszenz

Neben dem Singulett-Zustand, in dem alle Elektronen *spin*-gepaart vorliegen, existiert noch der ebenfalls energetisch angeregte Triplett- Zustand mit *spin*-ungepaarten Elektronen (Cox, 2012). Wie in Abbildung 3.16 ersichtlich, kann eine Überführung des Moleküls vom Singulett-Zustand S_1 in den Triplettzustand T_1 (auch T_2 oder höher) durch strahlungslose Spin-Umkehr (*Intersystem Crossing*) erreicht werden (Lakowicz, 2006; Meister, 2012). Die Rückkehr zum Grundzustand S_0 erfolgt dann entweder über weitere strahlungslose Spin-Umkehrprozesse oder über die Abgabe von Phosphoreszenz-Strahlung (Meister, 2012), die im Vergleich zu entsprechender Fluoreszenz in einem energieärmeren Wellenlängenspektrum stattfindet (Lakowicz, 2006).

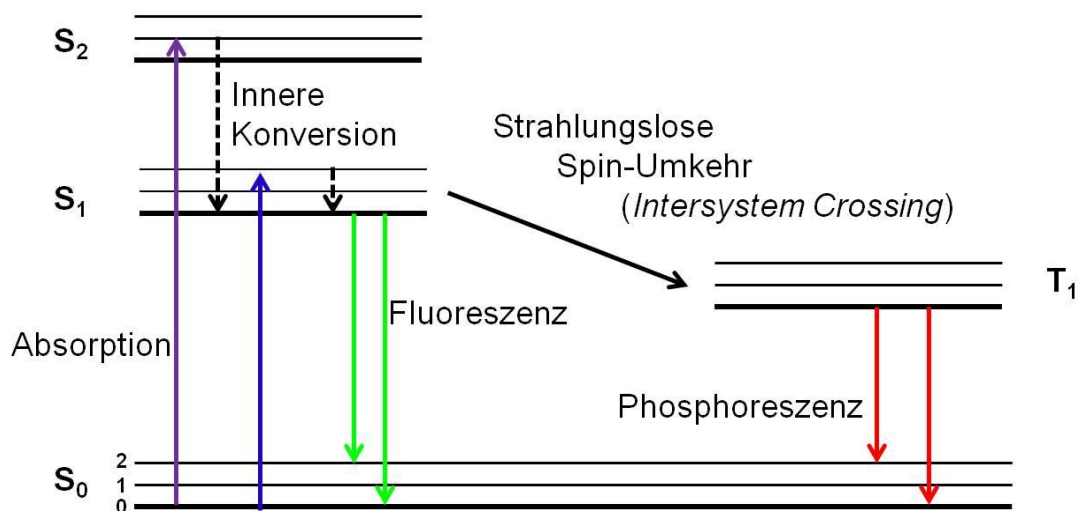


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der Unterschiede von Fluoreszenz und Phosphoreszenz (modifiziert nach Lakowicz 2006)

Der T_1 -Zustand ist um mehrere Zehnerpotenzen langlebiger als der S_1 -Zustand. Der Übergang von T_1 zu S_1 ist aufgrund der Spin-Auswahlregel verboten, daraus folgend sind die Strahlungsübergangsarten eingeschränkt. Daher dauert das Nachleuchten einer Phosphoreszenz in der Regel Millisekunden bis Sekunden, es findet also in einem deutlich längeren Zeitraum als Fluoreszenz statt (Kuchling, 1999; Meister, 2012).

3.4.2 Dual lifetime referencing

Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität wird in der quantitativen Analytik häufig verwendet, sie weist aber einige Nachteile auf, wie zum Beispiel die Beeinflussung durch die Fluorophor-Konzentration, die Farbgebung der Probe oder den Brechungsindex (Klimant *et al.*, 2001).

Das Prinzip des *Dual Lifetime Referencing* (DLR) nutzt einen optischen Sensor, der per Fluorometrie verschiedene chemische, physikalische oder biologische Parameter bestimmen kann, basierend auf einer Umwandlung der Fluoreszenzintensität in eine Phasenverschiebung (*Frequency Domain*) oder einen Zeit-abhängigen Parameter (*Time Domain*), welche von den

genannten negativen Faktoren weitgehend unbeeinflusst bleibt (Klimant and Leiner, 2002). Nachfolgend soll nur auf das verwendete Prinzip der Phasenmodulation näher eingegangen werden.

Dafür werden zwei Luminophore auf einem Sensor co-immobilisiert (Klimant, 1999): Ein fluoreszierender Indikator, dessen Intensität von dem zu messenden Parameter abhängt und eine kurze Abklingzeit aufweist, sowie eine phosphoreszierende Referenz mit langer Abklingzeit (Huber *et al.*, 2001; Klimant and Leiner, 2002), welche als konstantes Hintergrundsignal dient, da seine Lumineszenz nicht auf die Analytkonzentration reagiert (Huber *et al.*, 2001; Klimant, 1999). Beide Luminophoren haben überlagerte Anregungs- und Emissionsspektren, so dass die Anregung bei der gleichen Wellenlänge stattfinden kann und die Emission mit einem einzigen Photodetektor erfasst werden kann (Huber *et al.*, 2001; Klimant, 1999).

Zur Anregung des Sensors dienen blaue oder grüne LED, welche mit handelsüblichen Oszillatoren sinusmoduliertes Licht aussenden (Klimant *et al.*, 2001). Wie in Abbildung 3.17 ersichtlich, stellt das erzeugte analytische Gesamtsignal eine Überlagerung der verzögerten Sinuswelle der phosphoreszierenden Referenz und der Sinuswelle des fluoreszierenden Indikators dar, welche in niedrigen Modulationsfrequenzen (d.h. im kHz Bereich) keine Phasenverschiebung Φ aufweist.

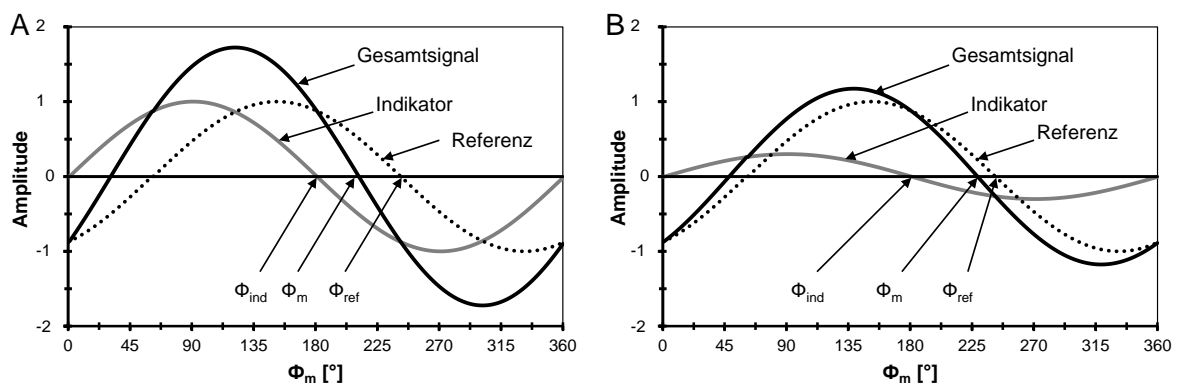


Abbildung 3.17: Veränderung der Phasenverschiebung der Gesamtlumineszenz Φ_m , der Referenz Φ_{ref} und der Indikatorfluoreszenz Φ_{ind} (A) ohne Analyt und (B) mit Analyt (Weidegans, 2004).

Da nur die Intensität des Indikators veränderlich ist, bestimmt diese auch das Verhältnis. Somit ist die Phasenverschiebung Φ_m nur von der Konzentration des zu messenden Analyts abhängig (Klimant and Leiner, 2002). Während sich die Amplitude der Referenz nicht ändert, zeigt der Indikator eine hohe Amplitude in Abwesenheit eines Analyten (Abbildung 3.17 A) und eine niedrige in Anwesenheit des Analyten (Abbildung 3.17 B), wodurch sich das Gesamtsignal ebenfalls ändert.

Die Überlagerung der Signal-Amplituden wird nach (Klimant *et al.*, 2001) dargestellt als:

$$A_m \cos \Phi_m = A_{ref} \cos \Phi_{ref} + A_{ind} \cos \Phi_{ind} \quad \text{Gleichung 3-4}$$

$$A_m \sin \Phi_m = A_{ref} \sin \Phi_{ref} + A_{ind} \sin \Phi_{ind} \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Φ_m	der Phasenwinkel des Superpositionssignals	[°]
Φ_{ref}	der Phasenwinkel des Referenzfarbstoffs	[°]
Φ_{ind}	der Phasenwinkel des Indikatorfarbstoffs	[°]
A_m	die Signalintensität des Superpositionssignals	[cd]
A_{ref}	die Signalintensität des Referenzfarbstoffs	[cd]
A_{ind}	die Signalintensität des Indikatorfarbstoffs	[cd]

Da die die Referenz vom Analyt nicht beeinflusst wird, gilt:

$$\Phi_{ref} = \textit{konstant}$$

Φ_{ref}	der Phasenwinkel des Referenzfarbstoffs	[°]
--------------	---	-----

Da der Indikator eine deutlich kürzere Abklingzeit aufweist als die Referenz, geht die Phasenverschiebung gegen Null:

$$\Phi_{ind} \rightarrow 0$$

Φ_{ind}	der Phasenwinkel des Indikatorfarbstoffs	[°]
--------------	--	-----

Damit können die Gleichungen 3-4 und 3-5 vereinfacht werden, und es ergibt sich nach (Klimant, 1999):

$$\cot \Phi_m = \frac{\cos \Phi_{ref} + \frac{A_{ind}}{A_{ref}}}{\sin \Phi_{ref}} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

Nach Klimant *et al.*, 2001 konnte in einem DLR Versuch mit einem pH-empfindlichen Indikator nachgewiesen werden, dass bei konstantem pH Veränderungen wie Farbgebung, Verdünnung, Streuung oder Lichtintensität zwar Veränderungen der Lumineszenzintensität auslösten, jedoch der Phasenwinkel konstant blieb, die Messung also nicht beeinflusste. Die Stabilität des Phasenwinkels wurde nur durch intrinsische Hintergrundfluoreszenz gestört, da diese nicht von der Fluoreszenz des Indikators unterschieden werden konnte.

3.5 *Escherichia coli*

Pharmazeutische Produkte, wie Insulin, die auf rekombinanten Proteinen von Pro- und Eukaryoten basieren, spielen eine wichtige Rolle im Gesundheitswesen. Einer der meistbenutzten Prozesse, um diese rekombinanten DNA-Produkte herzustellen, ist die Hochzelldichtekultivierung von *Escherichia coli* (Riesenberg *et al.*, 1991; Shiloach and Fass,

2005), einem der bestuntersuchteten Lebewesen der Welt (Riesenberg *et al.*, 1991). Es handelt sich dabei um ein gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium der Familie *Enterobacteriaceae* mit circa 2,5 µm Länge und einem Durchmesser von 0,8 µm, das mit Pili und Flagellen ausgestattet ist (Schügerl, 1997; Sussmann, 1997).

Sein Temperaturoptimum liegt bei 37°C, da es natürlicherweise im Darm von Warmblütern vorkommt und es wächst auf einer großen Bandbreite einfacher Kulturmedien (Sussmann, 1997). Sein Vorteil liegt zudem in der Abwesenheit von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren, einem schnellen Wachstum mit einer Zellteilung von bis zu 20 min (Berg, 2004) sowie einer hohen volumenbezogenen Produktivität (Shiloach and Fass, 2005). Da *E. coli* fakultativ anaerob ist, kann es sowohl einen fermentativen als auch einen respirativen Stoffwechsel aufrechterhalten und ist dabei unter anaeroben Bedingungen auf fermentierbare Kohlehydrate wie Glucose angewiesen (Sussmann, 1997), und es kommt zur Bildung von Nebenprodukten wie Acetat, Ethanol, Laktat und Formiat (Riesenberg *et al.*, 1991).

3.6 *Clostridium acetobutylicum*

Wie alle Mitglieder der Familie der *Bacillaceae* gehören auch Clostridien zu den gram-positiven, sporenbildenden Bakterien. Sie wachsen strikt anaerob wobei *Clostridium acetobutylicum* als eine der wenigen Ausnahmen aerotolerant ist (Grote and Antranikian, 2006). Der Mikroorganismus ist beweglich, stäbchenförmig und weist eine Länge von 2,4 bis 4,7 µm und einen Durchmesser von 0,6 bis 0,9 µm auf. Sein Temperaturoptimum liegt bei 37°C (Schragg, 2009) und es kann eine große Anzahl an verschiedenen Substraten verwerten, zum Beispiel Stärke, Xylose, Glykogen oder Glukose (Grote and Antranikian, 2006; Schragg, 2009).

C. acetobutylicum verfügt in Satzverfahren über einen zweistufigen Gärungsmechanismus: Während des exponentiellen Wachstums werden unter neutralen pH-Bedingungen Essig- und Buttersäure gebildet, wodurch der pH sinkt. Zu Beginn der stationären Phase wird die Produktion der Säuren eingestellt und im nun sauren Milieu stattdessen Butanol und Aceton hergestellt, teilweise unter Aufnahme und Umwandlung der vorher produzierten Säuren. Dadurch kommt es wieder zu einer Erhöhung des pH des Mediums. Auf Grund dieser pH-Abhängigkeit ist die Überwachung und Steuerung des pH bei der Kultivierung ein wichtiger Faktor (Bahl, 2006; Schönheit, 2006; Schragg, 2009).

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde die Aceton-Butanol-Gärung großindustriell betrieben, bevor in den 1960er Jahren aufgrund niedrigerer Rohölpreise die petrochemische Gewinnung massiv an Bedeutung gewann (Bahl, 2006; Grote and Antranikian, 2006).

Unter Betrachtung des Nachhaltigkeitsaspektes sowie knapper werdenden Erdölreserven, gerät die Aceton- und Butanolherstellung mittels *Clostridium acetobutylicum* wieder in den wirtschaftlichen Fokus (Bahl, 2006; Grote and Antranikian, 2006; Millat *et al.*, 2011).

4 Material und Methoden

4.1 Parallelbioreaktorsystem

Das am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelte Parallelbioreaktorsystem bioREACTOR (2mag AG, München) in seiner Version mit 48 Rührkesselreaktoren im 10 mL Maßstab ist in Abbildung 4.1 zu sehen. Zum Einsetzen der Einwegreaktoren kann die autoklavierbare Abgashaube abgenommen werden.



Abbildung 4.1: Mit Einwegreaktoren bestückter Bioreaktorblock mit aufgesetzter Begasungshaube. An der Kopfseite des Bioreaktorblocks befinden sich die Anschlüsse für die zwei Wärmetauscher zur Temperierung der Reaktoren und des Kopfraumes. Am unteren Wärmetauscher befindet sich zudem der Anschluss für die Spannungsversorgung und Steuerung des integrierten magnetisch-induktiven Rührerantriebs. Die Begasungshaube besitzt Anschlüsse für die Gasversorgung, sowie den Ablauf von gegebenenfalls auftretendem Kondenswasser. 48 mit Teflonbuchsen versehene Öffnungen in der Begasungshaube erlauben Abgas auszutreten und die Probenahme oder auch Flüssigkeitsdosierung.

Die im Parallelbioreaktorsystem verwendeten Einwegreaktoren sind mit und ohne Schikanen erhältlich. Abbildung 4.2 zeigt einen Einwegreaktor an dessen Kopfende sich ein Kragen zum Dichtschluss mit der aufgesetzten Begasungshaube befindet. Am Fußende besitzt der Reaktor zwei konkave Linsen zur Aufnahme von fluorimetrisch auslesbaren Sensoren zur Messung des pH und der Gelöstsauerstoffkonzentration.

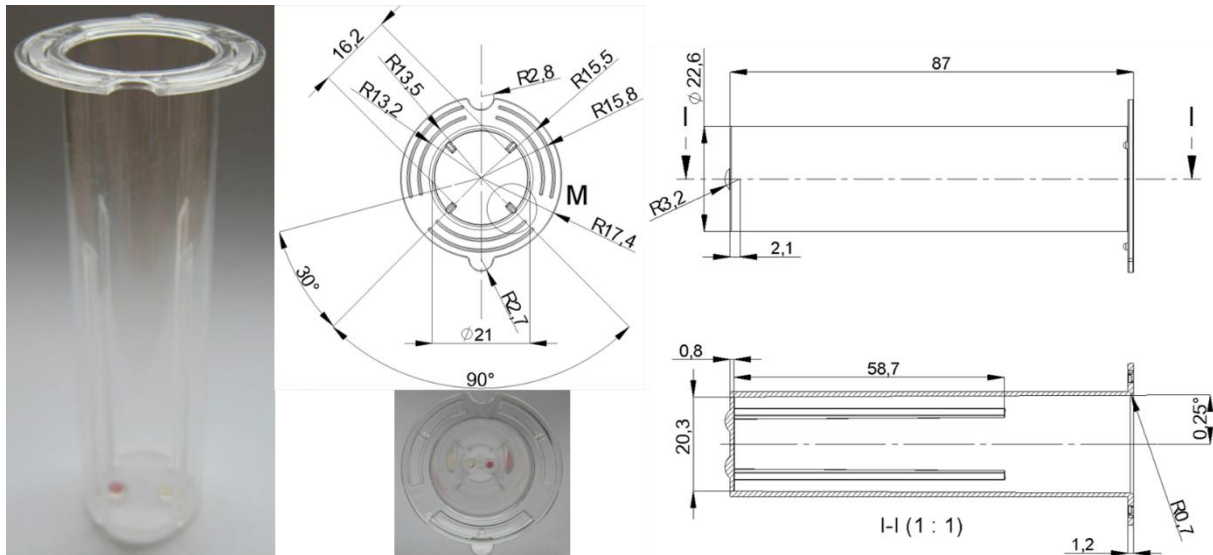


Abbildung 4.2: Mit Schikanen versehener Einwegreaktor mit fluorimetrisch auslesbaren Sensoren

4.2 Mikrodosiereinheit

4.2.1 Integration und Aufbau

Die in Zusammenarbeit mit der 2mag AG, München am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik entwickelte Mikrodosiereinheit wurde komplett in die Begasungshaube integriert, um eine vollständige Kompatibilität mit dem bestehenden Parallelbioreaktorsystem zu gewährleisten. Die Mikrodosiereinheit besitzt wie Abbildung 4.3 zu entnehmen ist oberhalb der von der Begasungshaube übernommenen Kammern und Gasverteiler ein Kanalsystem mit 144 Mikro-Membranpumpen sowie eine mit elektromagnetischen Spulen bestückte Steuerplatine.

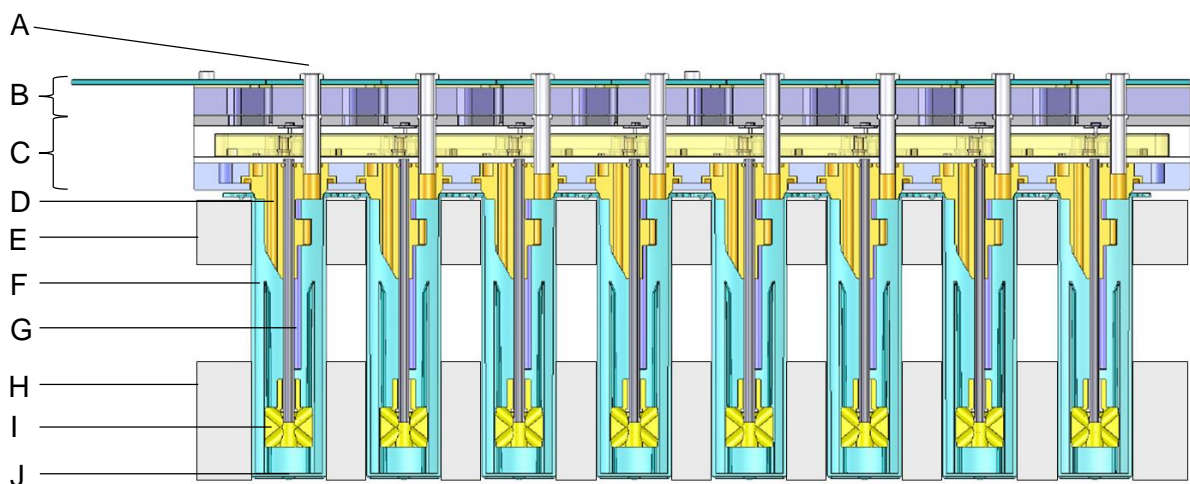


Abbildung 4.3: Schematischer Querschnitt der auf einen mit Milliliter-Reaktoren (F) bestückten Bioreaktorblock aufgesetzten Mikrodosiereinheit. Diese besteht aus der Fluidikeinheit mit in ein Kanalsystem integrierten Mikro-Membranpumpen (C) und der Steuereinheit mit elektromagnetischen Spulen (B). Mit Teflonhülsen versehene Öffnungen (A) in beiden Einheiten ermöglichen weiterhin eine automatisierte Probenahme. An der Unterseite der Fluidikeinheit befinden sich die mit Achsen versehene Gasverteiler (D). Daneben sind die Injektoren (G) angebracht. Am Ende der Achsen befinden sich die gasinduzierenden Rührer (I). Diese werden mit Hilfe von im unteren der beiden Wärmetauscher (E und H) integrierten elektromagnetischen (modifiziert nach Gebhardt et al. 2011)

Der geschichtete Aufbau setzt sich im Inneren der Mikrodosiereinheit fort, wie Abbildung 4.4 anhand der einzelnen übereinanderliegenden Komponenten von Steuereinheit und Fluidikeinheit zeigt.

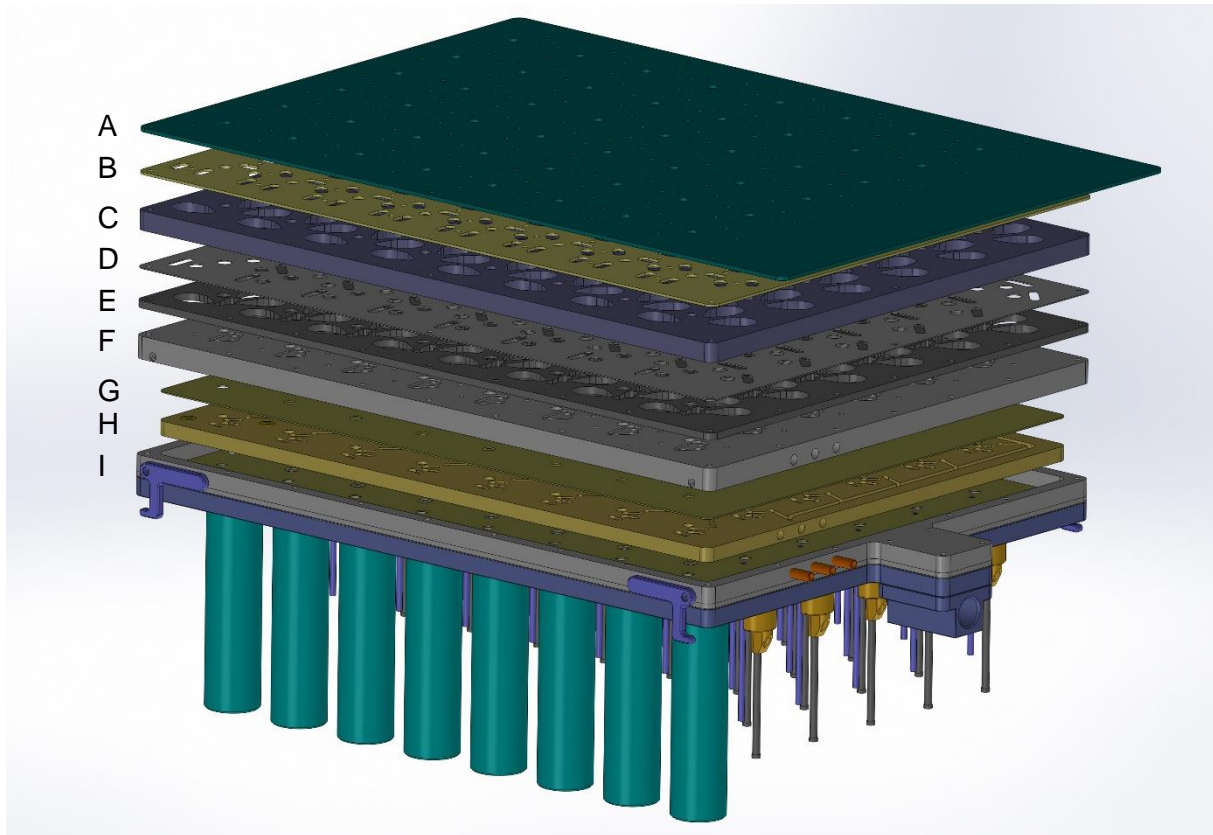


Abbildung 4.4 Die Platine (A) der Steuereinheit liegt über einer Isolation (B) auf einer verzinkten Eisenplatte (C) mit den Fassungen zur Aufnahme der elektromagnetischen Spulen (nicht abgebildet). Darunter beginnt der ebenfalls geschichtete Aufbau der autoklavierbaren Fluidikeinheit beginnend mit dem Deckblech (D). Dieses wird auf der Flussplatte (E) mit den Fassungen zur Aufnahme der Aktoren (nicht abgebildet) auf die Führungsplatte (F) aufgeschraubt. Zwischen der Führungsplatte und der Unterplatte (I) werden die Silikonmembran (G) und die mit einem Kanalsystem versehene Kanalplatte (H) gefasst (untere Silikonmembran nicht gekennzeichnet). Darunter befindet sich das Kammer­system der Begasungshaube mit den in den Kopfraum der Reaktoren hineinragenden Gasverteilern.

Durch eine kompakte Anordnung der Aktoren konnten 144 Mikro-Membranpumpen in die Fluidikeinheit integriert werden. Das Kanalsystem der Kanalplatte unterteilt sich in drei voneinander getrennte Kanäle mit je 48 Pumpen. Jede der Pumpen ist einzeln mit bis zu 2 Hz ansteuerbar, um jeden der 48 Reaktoren individuell mit bis zu drei Medien oder Titrationsmitteln zu versorgen. Hierfür ist je eine Pumpe von jedem der drei Kanäle an einen der 48 Injektoren angeschlossen. Über den in die Flüssigphase eintauchenden Injektor werden Medien und Titrationsmittel unmittelbar über dem Rührer abgegeben. Dies soll für eine sofortige und optimale Dispersion sorgen.

4.2.2 Modifikationen

Abweichend von dem ursprünglichen Labormuster wurden die Bauteile der Mikrodosiereinheit im Rahmen dieser Arbeit mehrfach modifiziert, da bei der Inbetriebnahme neben den bereits bekannten Dosierfehlern im Betrieb mit niedrigen Förderraten weitere schwere Mängel der Dichtung und der Aktorik festgestellt wurden.

Modifikationen der Kanalplatte der Mikrodosiereinheit

Die ursprüngliche Kanalplatte aus PEEK wies eine konkave Wölbung über 4 mm auf einer Länge von 29 cm auf. Hierdurch war ein Zusammenbau mit gleichmäßiger Anpressung der Silikondichtung nicht möglich. Aus diesem Grund wurde eine neue Kanalplatte aus PEEK gefertigt. Hierbei durchlief das Halbzeug aus PEEK zunächst einen Temperprozess und wurde anschließend mit Hilfe eines modifizierten Fräsprotokolls mit verringertem Vorschub bearbeitet. Durch diese Maßnahmen konnte die Wölbung auf unter 2 mm auf einer Länge von 29 cm verringert, jedoch nicht vollständig beseitigt werden. Zudem wurde die Kanalplatte am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik manuell entgrated und Fertigungsfehler wie in Anhang Abbildung 8.1 korrigiert. Durch die versenkte Position der Kanalplatte in der Führungsplatte war diese bei der Demontage nur schwer zu entnehmen. Aufgrund der Wölbung der Kanalplatte und dem resultierenden Verkanten an den hineinragenden Zylindern für die Verschraubung der Führungsplatte wurde dabei das Risiko einer Beschädigung der Dichtflächen erhöht. Daher wurde der überarbeitete Typ der Kanalplatte mit Gewinden versehen, in welche Griffe zur einfachen Entnahme eingeschraubt werden können.

Modifikation der Silikonmembran der Mikrodosiereinheit

Die ursprüngliche Silikonmembran besaß eine Härte von 60° Shore A (GM GmbH, München) und gestanzte Bohrungen für die Verschraubung und die Öffnungen zur Probenahme. Die Bohrungen waren jedoch zu klein und die Abstände zwischen den Bohrungen zu gering. Zusammen mit der Härte des Materials erschwerte dies den korrekten Einbau der Membranen um das Kanalsystem der gewölbten Kanalplatte ausreichend abzudichten.

Daher wurde, wie in Anhang 8.2 beschrieben, ein Verfahren zur Eigenherstellung von geeigneten Silikonmembranen ausgearbeitet. Durch Verwendung des temperaturvernetzenden Silikons SILPURAN® 2445 (Wacker Chemie AG, München) konnten Silikonmembranen mit einer Härte von 40° Shore A in 0,5-0,7 mm Dicke produziert werden. Das von der *Food and Drug Administration* (FDA), der Lebensmittelüberwachungs- und Arzneizulassungsbehörde der Vereinigten Staaten, zugelassene Material wies zudem die geforderte chemische und thermische Beständigkeit auf.

Um Fehlpassungen durch Einspannen und Stanzen der Membranen zu vermeiden, wurden die selbst hergestellten Silikonmembranen kontaktlos mit einem CO₂-Laser zugeschnitten.

Einbau einer Profildichtung in die Mikrodosiereinheit

Da trotz modifizierter Kanalplatte aus PEEK und veränderten Silikonmembranen zunächst kein ausreichender Dichtschluss erzielt werden konnte, wurden zusätzlich Stegbleche gefertigt, welche auf den Silikonmembranen platziert wurden und somit den Anpressdruck über den Fluidkanälen des PEEK-Körpers konzentrierten. Hierdurch konnte die ursprüngliche Flächendichtung in eine Profildichtung geändert werden ohne die Komplexität der übrigen Bauteile zu erhöhen. Um die Stegbleche als zusätzliche Bauteile in den schichtartigen Aufbau der Mikrodosiereinheit aufnehmen zu können, wurde eine neue Führungsplatte erstellt. Diese weist ein um 0,4 mm gesenktes Profil auf, da sonst die Stahlkugeln von den Aktoren nicht mehr tief genug in die Pumpmembran eingedrückt würden.

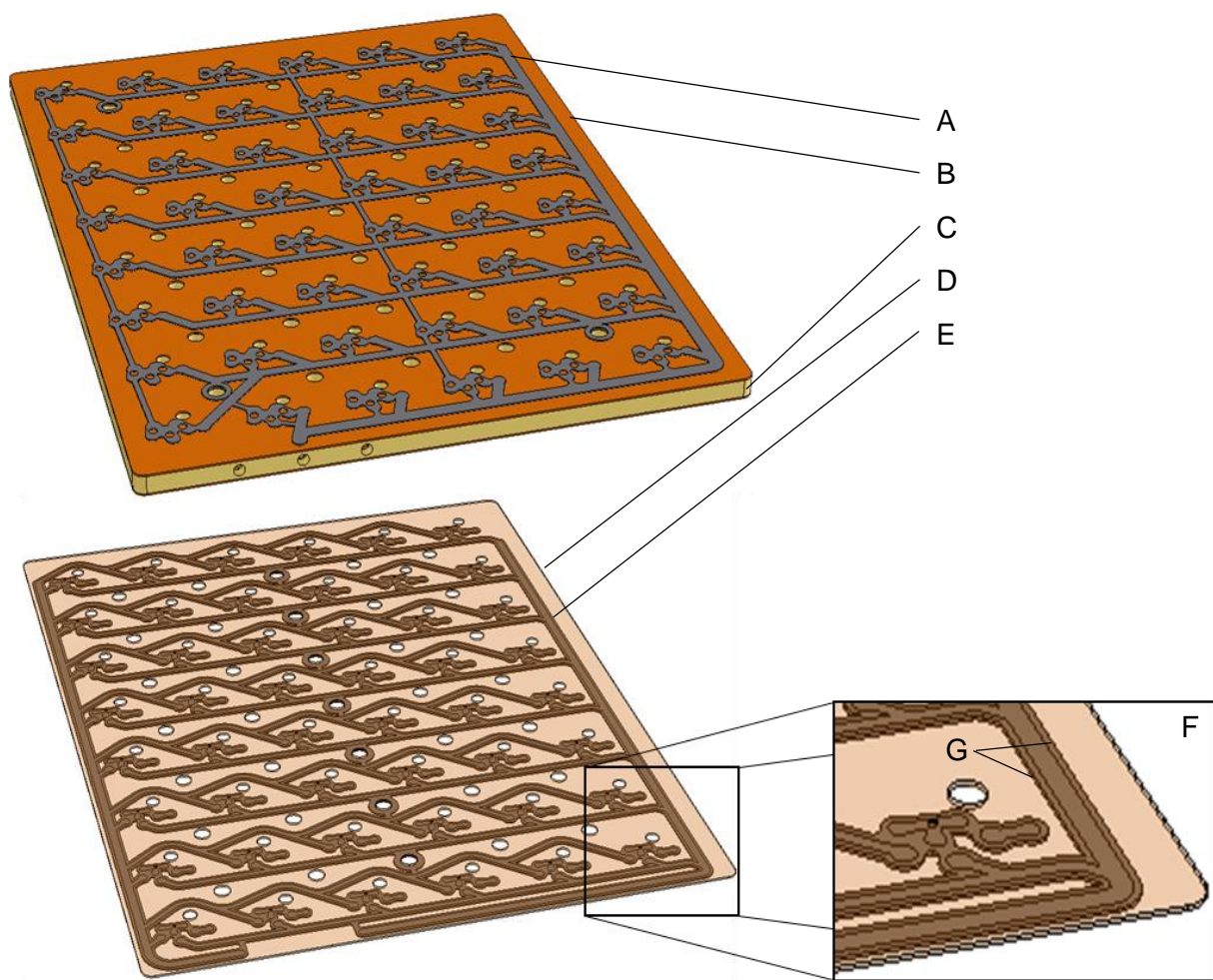


Abbildung 4.5: Die Kanalplatte aus PEEK (C) wird auf Ober- und Unterseite von einer Silikonmembran abgedichtet. Dabei wird das obere Stegblech (A) oberhalb der oberen Silikonmembran (B) eingesetzt und das untere Stegblech (E) unterhalb der unteren Silikonmembran (D). Zur Verdeutlichung ist die untere Silikonmembran (D) zusätzlich transparent dargestellt, um das untere Stegblech (E) zu zeigen. In der Detailansicht (F) sind die vom Überstand des unteren Stegblechs (E) an die Kanalplatte aus PEEK (C) angepressten Bereiche entlang der Kanäle (G) zu sehen.

Es wurden 0,5 bis 0,7 mm dicke Stegbleche aus Edelstahl mit 1 und 2 mm Überstand zu den Kanälen gefertigt. Abbildung 4.5 zeigt die Stegbleche auf beziehungsweise unter den beiden Silikonmembranen. Hier konnten bei der Verwendung der Stegbleche 0,7 mm Dicke und 2 mm

Überstand keine Leckagen der Mikrodosiereinheit mehr beobachtet werden. Wie in Abbildung 4.6 erkennbar, wurde mit den Stegblechen gleichzeitig ein Anschlagpunkt für die ebenfalls angepassten Injektoren geschaffen. Damit ist ein Verschluss der Fluidkanäle durch zu tief in die Kanäle der Dosiertechnik eingesetzte Injektoren nicht mehr möglich.

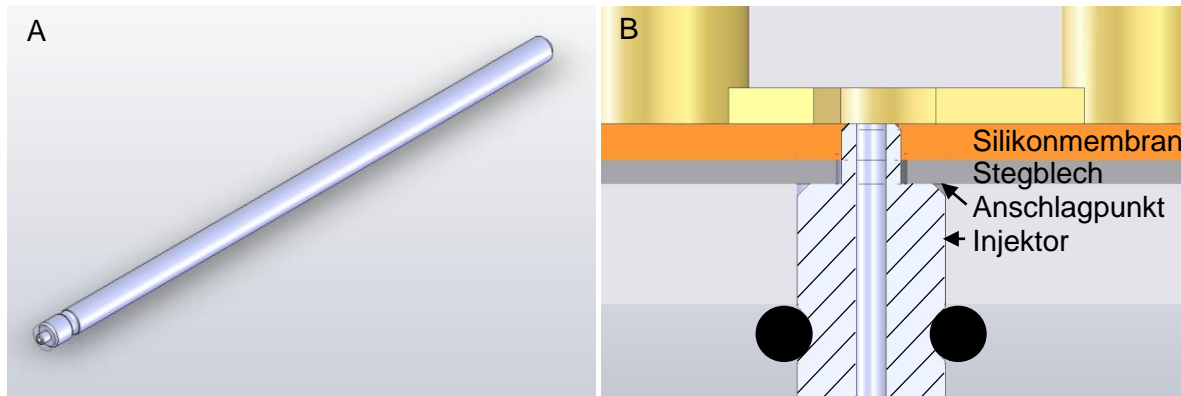


Abbildung 4.6: Neu angepasster Injektor (A) mit Anschlagpunkt an der Unterseite des unteren Stegblechs, wie im Querschnitt (B) zu sehen.

Modifikation der Anschlüsse und Zuleitungen der Mikrodosiereinheit

Für den Anschluss der Vorlagebehälter an die Mikrodosiereinheit wurden ursprünglich Silikonschläuche und Polypropylen Schnellkupplungen (Fa. CPC) benutzt. Aufgrund der hohen Gasdurchlässigkeit von Silikon konnte in den Schläuchen die Bildung von Gasblasen beobachtet werden. Wie in Kapitel 3.3.3 erläutert, kann bereits eine Gasblase von wenigen μL Volumen zum Ausfall der Mikromembranpumpen führen. Daher wurde zunächst ein Durchlaufentgaser (Knauer GmbH, Berlin) zwischengeschaltet. Mit einer Vakuumpumpe im Entgaser wird die Flüssigkeiten vor dem Eintritt in die Mikrodosiereinheit durch Gaspermeation über eine amorphe Fluorpolymer Membran entgast. Aufgrund der geringen Volumenströme kam es dennoch wiederholt zur Bildung von Gasblasen in den Silikonschläuchen zwischen Entgaser und Mikrodosiereinheit. Die gestiegene Anzahl von zwischengeschalteten Geräten wie Entgaser und Schlauchpumpe bedingte zudem zahlreiche Kopplungsvorgänge mit den Schnellkupplungen bei denen wiederholt, wie in Anhang 8.3 beschrieben, ein Gasblaseneintrag beobachtet wurde.

Daher wurde der Abstand der drei Anschlüsse für das Kanalsystem in der Kanalplatte der Mikrodosiereinheit vergrößert, um Edelstahl Schnellkupplungen mit EPDM Dichtungen (Stäubli AG, Freienbach, Schweiz) aufzunehmen, welche keinen Gasblaseneintrag beim Kopplungsvorgang zeigten und zudem uneingeschränkt oft autoklavierbar sind. Zudem konnten mit diesen Kupplungen Perfluoralkoxy-Schläuche mit stark verringerter Gasdurchlässigkeit verwendet werden, wodurch die Verwendung eines Entgasers unnötig wurde.

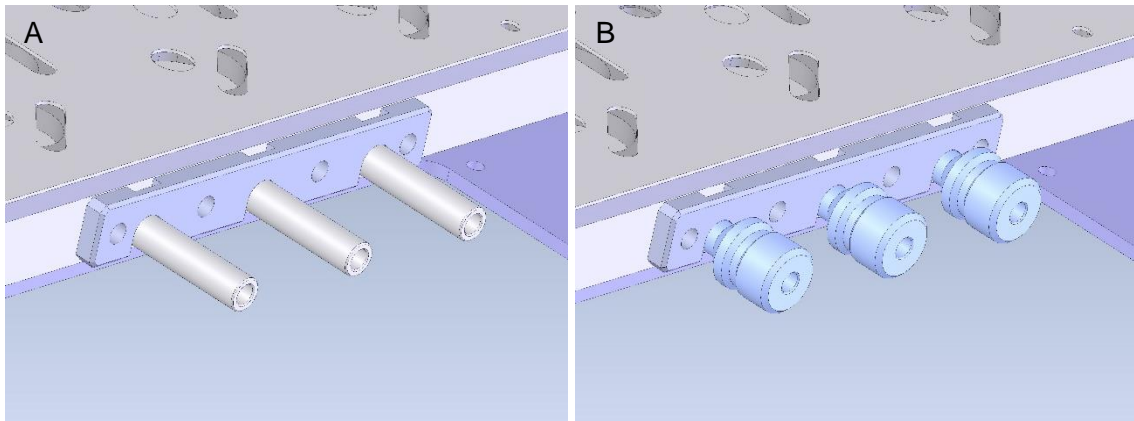


Abbildung 4.7: Modifizierte Anschlüsse der drei Fluidkanäle X, Y und Z der Mikrodosiereinheit mit vergrößertem Abstand für die Verwendung mit Schlauchklemmen (A) und Schnellkupplungen aus Edelstahl mit G1/8" Gewinde (B) (2mag).

Modifikation des Aktors der Mikrodosiereinheit

Da die in Abbildung 4.8 gezeigten ursprünglichen Aktoren beim Betrieb in der Fassung und an dem Führungsstift arretierten, was zu einem Ausfall der Pumpe führte, wurden diese modifiziert.

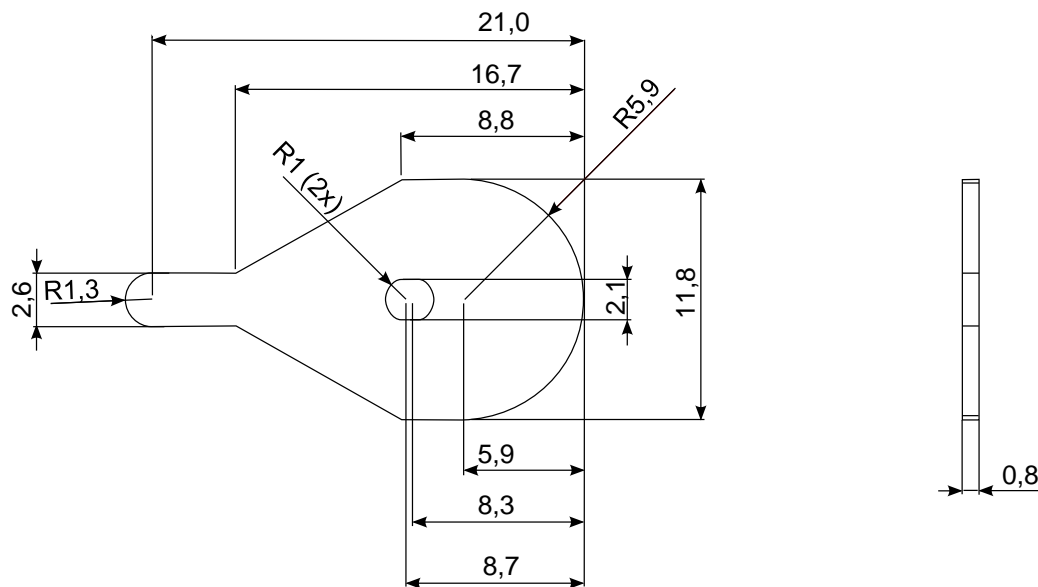


Abbildung 4.8: Technische Zeichnung des ursprünglichen Aktors

Hierfür wurde der Aktor gekürzt und Material an der Verjüngung zwischen dem schmalen und breiten Ende entfernt, wie in Abbildung 4.9 verdeutlicht wird. Der entsprechend modifizierte Aktor ist in Abbildung 4.10 zu sehen.

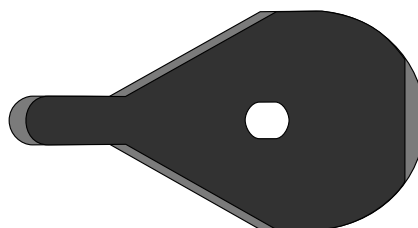


Abbildung 4.9: Deckung alter Aktor (hellgrau) und modifizierter Aktor (dunkelgrau)

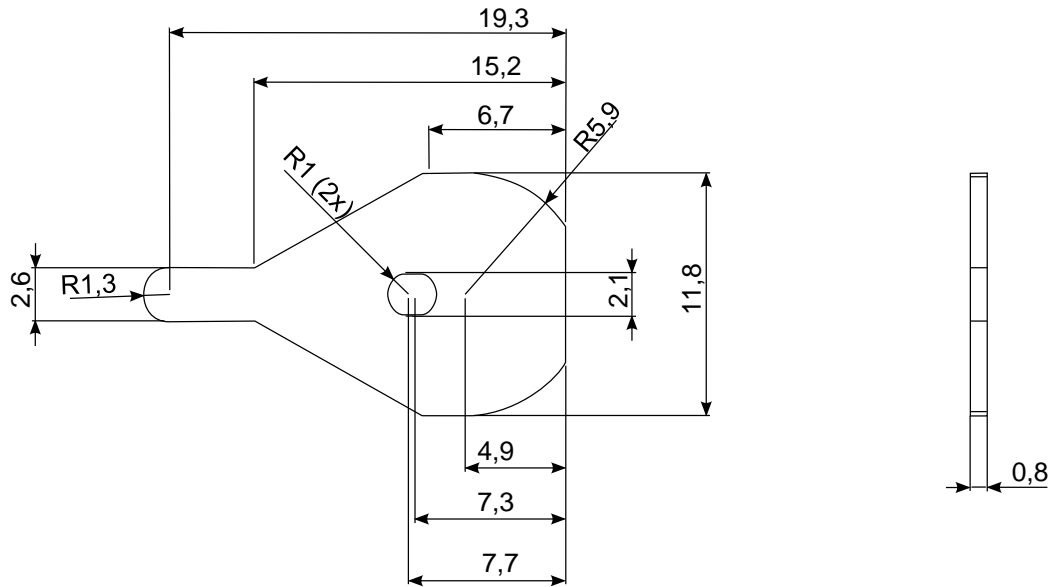


Abbildung 4.10: Technische Zeichnung des modifizierten Aktors

Die Ränder der Aktoren wiesen an den Laserschnittkanten scharfe Grate auf, welche an den Start- und Endpunkten des Schnittprozesses für die Außenkontur, sowie im Langloch besonders ausgeprägt waren. Diese schränkten insbesondere an den Innenkanten des Langlochs die Bewegungsfreiheit des Aktors ein bis hin zu einem unbeabsichtigten Arretieren in Kombination mit rauen Führungsstiften.

Um die Grate der Laserschnittkanten zu entfernen, wurden die modifizierten Aktoren trowalisiert. Dies war jedoch nur bei den Graten an den Außenseiten erfolgreich, da die Körnung der Schleifkörper zu grob war, um die Grate an den Innenseiten der Langlöcher zu beseitigen. Daher wurden die Laserschnittkanten der Langlöcher manuell entgratet. Eine zusätzlich am breiten Ende des Hebels in das Langloch manuell eingefeilte Fase soll ein Verkeilen der Kante am Führungsstift verhindern.

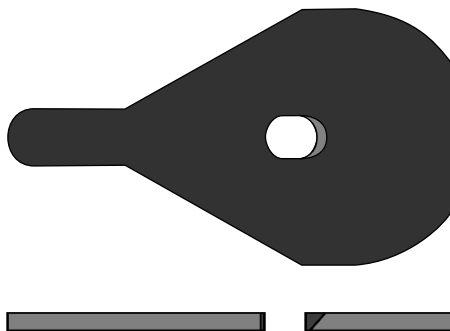


Abbildung 4.11: Skizze des modifizierten Aktors mit Phasen an den Außenseiten der Langlöcher

Modifikation des Deckblechs und der Führungsstifte

Ferner waren die Führungsstifte so kurz bemessen, dass die maximal angehobenen Hebel auf diesen aufliegen konnten und nicht mehr in die Ruheposition zurückfielen.

Um das Verkeilen oder Aufliegen an den Kanten am Kopf der Führungsstifte auszuschließen, wurden diese in einer weiteren Entwicklungsstufe verlängert, um wie in Abbildung 4.12 bis in das Deckblech hinein zu ragen. Hierbei zeigte sich auch, dass nur hochglanzpolierte Stifte aus unmagnetischem, rostfreiem Edelstahl verwendet werden dürfen.

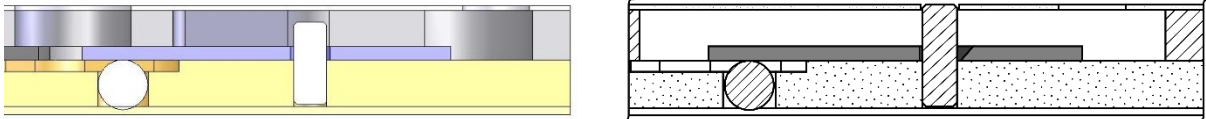


Abbildung 4.12: Querschnittsskizze des ursprünglichen Aktors mit Fassung (links) und vereinfachte Querschnittsskizze des modifizierten Aktors mit längeren Führungsstiften und modifiziertem Deckblech mit zusätzlichen Bohrungen für die längeren Führungsstifte (rechts).

In Abbildung 4.13 ist das entsprechend mit zusätzlichen Öffnungen für die hineinragenden Führungsstifte versehene Stegblech zu sehen.

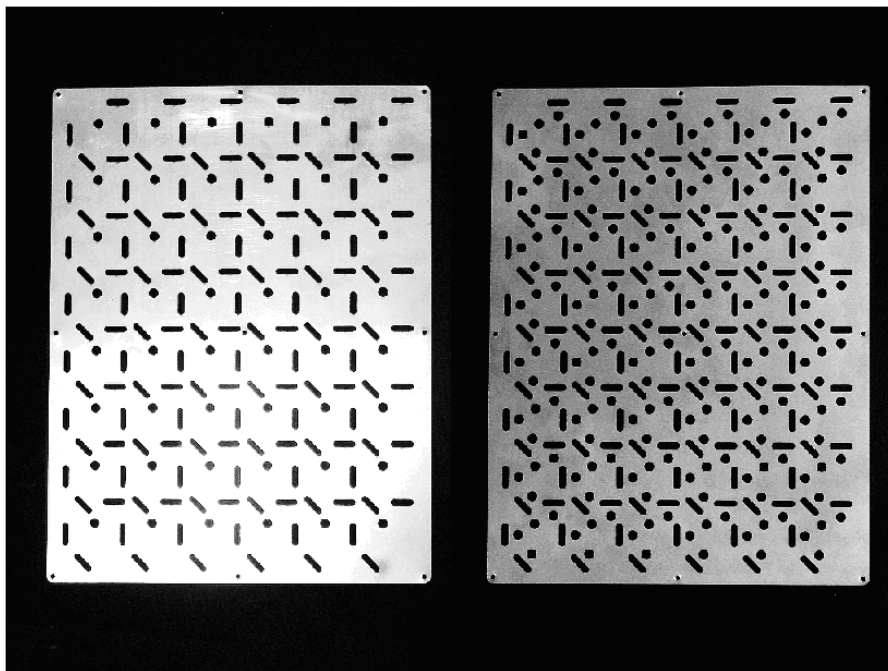


Abbildung 4.13: Deckblech des ursprünglichen Prototyps (links); modifiziertes Deckblech mit zusätzlichen Aussparungen für die verlängerten Führungsstifte (rechts).

Modifikationen der magnetischen Bauteile

Um Ausfällen der Aktoren durch eine induzierte dauerhafte Magnetisierung von Bauteilen und damit dem dauerhaften Arretieren vorzubeugen, wurde die ursprüngliche magnetisierbare Flussplatte gegen eine neue Flussplatte aus unmagnetischen Edelstahl ausgetauscht.

Einzelne Spulen der ursprünglichen Steuereinheit ragten soweit aus ihren Fassungen heraus, dass die Einheit nicht bündig auf die Fluidikeinheit aufgesetzt werden konnte. Hierdurch wurde der Abstand zwischen korrekt in den Fassungen sitzenden Spulen und den zugehörigen

Aktoren erhöht, wodurch die auf die Aktoren wirkende magnetische Kraft verringert wird. Zudem konnte in den mit Teflonhülsen versehenen Öffnungen für die automatisierte Probenahme Flüssigkeit durch den entstandenen Spalt zwischen den Hülsen von Steuer- und Fluidikeinheit austreten und mit den Spulen oder Aktoren in Kontakt kommen. Daher wurde eine neue Steuereinheit mit komplett in den Fassungen versenkten Spulen gefertigt.

4.2.3 Modifizierte Version des Labormusters

Abbildung 4.14 zeigt die Version des Labormusters mit den beschriebenen Modifikationen. Aufgrund der kontaktfreien Kraftübertragung durch den magnetisch-induktiven Antrieb der Pumpen ist die Steuereinheit einfach von der vollständig autoklavierbaren Fluidikeinheit abnehmbar. Eine zweifarbige Licht-emittierende Diode (LED) an der Platine informiert mit Lichtsignalen in grün über die Spannungsversorgung und in orange über den Datenaustausch.



Abbildung 4.14 Zweiteiliger Aufbau der Mikrodosiereinheit mit abnehmbarer Steuereinheit (A) und autoklavierbarer Fluidikeinheit (B). Kopfseitig befinden sich die Anschlüsse für die Datenschnittstelle und Spannungsversorgung mit LED (C), die drei Fluidkanäle (D) und die Gasversorgung (E).

Ohne eine Vergrößerung der Grundfläche erhöht sich die Begasungshaube mit integrierter Fluidikeinheit inklusive aufgelegter Steuereinheit nur um etwa 2,0 cm. Dabei wird die kompakte Konstruktion des Parallelbioreaktorsystems beibehalten und erlaubt weiterhin die Integration in kommerziell erhältliche Laborrobotersysteme für eine automatisierte Probenahme, wie Abbildung 4.15 zeigt.

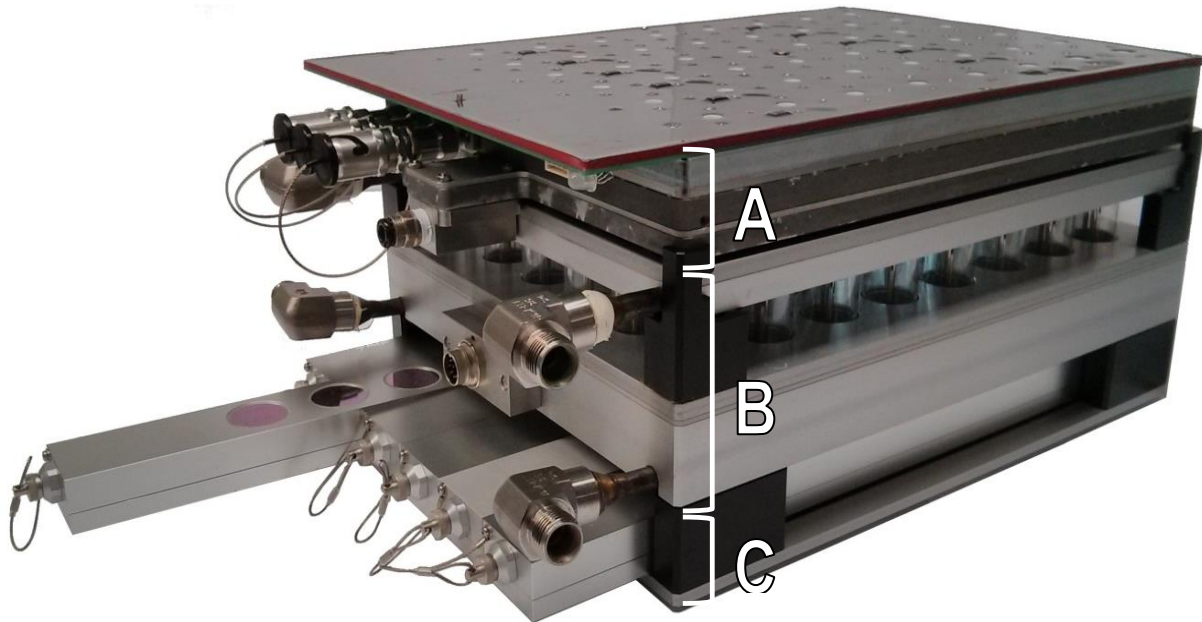


Abbildung 4.15: Labormuster der Mikrodosiereinheit (A) mit 48-fach Parallelbioreaktorsystem (B) mit 6 Ausleseeinheiten (C) für die individuelle pH- und Gelöstsauerstoffkonzentrationsmessung.

Die Oberseite der Platine wurde mit einem Kunstharz vergossen, um eine leicht zu reinigende und lösungsmittelbeständige Oberfläche zu erhalten.

Für einen monoseptischen Betrieb ist die Fluidikeinheit der Mikrodosiereinheit komplett autoklavierbar. Diese wird hierfür in einen in Abbildung 4.16 dargestellten Autoklavierbehälter gegeben, welcher steril verschlossen werden kann, wobei der Druckausgleich über einen integrierten Sterilfilter gewährleistet wird. Nach dem Autoklavieren der Fluidikeinheit in einem handelsüblichen Standautoklaven kann diese in dem Behälter zum Einsatzort transportiert werden.

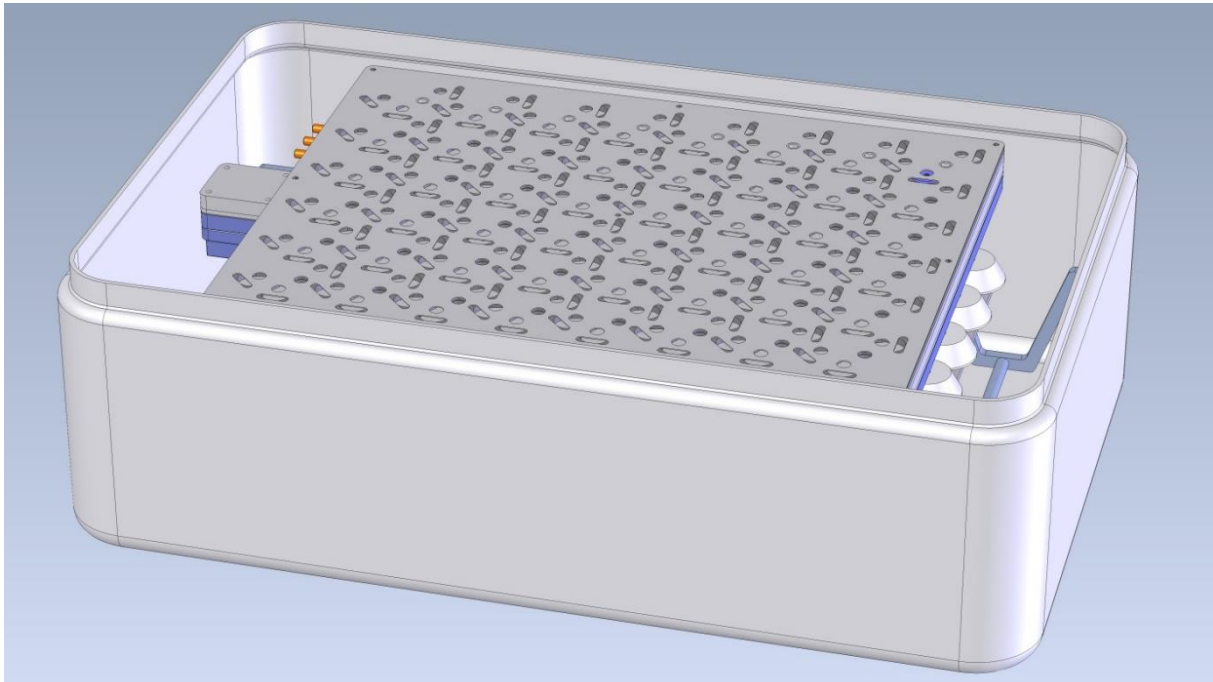


Abbildung 4.16: Autoklavierbehälter ohne Deckel mit eingesetzter Fluidikeinheit der Mikrodosiereinheit.

4.3 Fluorimetrische pH-Sensoren

4.3.1 Ausleseeinheiten

Die fluorimetrischen Sensoren am Boden der Einwegreaktoren werden mit Hilfe von Ausleseeinheiten nach dem DLR-Prinzip ausgelesen. Jede Einheit kann bis zu acht Reaktoren mit bis zu zwei Sensoren auslesen. Hierfür wird von einem LED in der Ausleseeinheit ein Lichtblitz mit der jeweils zur Anregung des jeweiligen Sensors geeigneten Wellenlänge abgestrahlt. Über mit optischen Filtern versehene Photodioden wird anschließend das vom Sensor emittierte Licht in der Wellenlänge des jeweiligen Sensorsignals ausgelesen. Die Ausleseeinheiten sind an einen Rechner angeschlossen auf dem mit Hilfe verschiedener Programme anhand der ausgelesenen Phasenwinkelverschiebung der pH berechnet wird. Je nach verwendetem Sensorfarbstoff werden LED und Filter mit kompatiblen Wellenlängenbereichen benötigt.

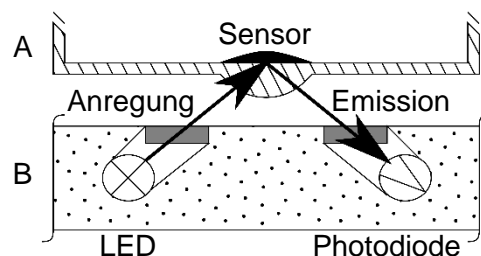


Abbildung 4.17 Skizze des fluorimetrischen Sensors am Boden eines Einwegreaktors (A) mit Ausleseeinheit (B). Mit Hilfe einer LED wird der Sensor über einen optischen Filter (grau) mit Licht der zum Anregen der Farbstoffe geeigneten Wellenlänge angestrahlt. Das vom Sensor emittierte Licht wird von einer Photodiode aufgezeichnet, wobei ein zweiter optischer Filter nur die Wellenlänge zum Auslesen der Sensorsignale passieren lässt.

4.3.2 Sensoren, Abschirmung und Blenden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Chargen von optischen pH Sensoren eingesetzt. Die Sensoren wurden bei der PreSens GmbH in Regensburg bezogen und können grundlegend in drei Kategorien unterteilt werden:

Neutral pH Sensor N470

Dieser Sensor besitzt ein sauerstoffimpermieables hydrophobes Polymer mit einem immobilisierten langabklingendem Referenzfarbstoff dessen Anregungsmaximum bei 470 nm liegt. Der Indikatorfarbstoff besitzt einen pK um 6,5 mit einem Anregungsmaximum bei 470 nm. Dieser ist kovalent in einem hydrophilen, stark quervernetzten und hoch ionenpermeablen Polymer gebunden.

Niedrig pH Sensor S470

Dieser Sensor besitzt ebenfalls ein sauerstoffimpermieables hydrophobes Polymer mit einem immobilisierten langabklingendem Referenzfarbstoff dessen Anregungsmaximum bei 470 nm liegt. Der Indikatorfarbstoff besitzt jedoch einen pK um 4,0 mit einem Anregungsmaximum bei 500 nm. Dieser ist kovalent in einem hydrophilen, stark quervernetzten Polymer mit weiter erhöhter Ionenpermeabilität gebunden.

Niedrig pH Sensor S505

Dieser Sensor besitzt ein sauerstoffimpermieables hydrophobes Polymer mit einem immobilisierten langabklingendem Referenzfarbstoff dessen Anregungsmaximum bei 505 nm liegt. Der Indikatorfarbstoff besitzt ebenfalls einen pK um 4,0 mit einem Anregungsmaximum bei 500 nm. Dieser ist kovalent in einem hydrophilen, stark quervernetzten Polymer mit weiter erhöhter Ionenpermeabilität gebunden.

Verwendete Sensormischungen

Tabelle 4-1 Sensorchargen und Betriebsparameter bei der Funktionsprüfung

Sensor	$\lambda_{\text{Anregung, nm}}$	$\lambda_{\text{Auslesen, nm}}$	pH-Bereich	optische Isolierung	Chargennummer
S505-A	505	600	sauer	nein	1032-01
N470-A	470	550	neutral	nein	1041-01
S470-A	470	550	sauer	nein	1044-02
S470-B	470	550	sauer	nein	1111-01
N470-B	470	550	neutral	nein	1148-01
iN470-B	470	550	neutral	ja	1150-01
S470-C	470	550	sauer	nein	1039-01
S505-B	505	600	sauer	nein	1150-02
iS505-B	505	600	sauer	ja	1150-03

Optische Isolierung und Blenden

Um eine Störung der pH-Messung durch Hintergrundfluoreszenz zu verhindern, wurden zwei Sensorchargen mit einer optischen Isolierung überschichtet. So ist Sensor iN470-B die mit einer optischen Isolierung versehene Version von Sensor N470-B und Sensor iS505-B eine mit optischer Isolierung versehene Version von Sensor S505-B.

Des weiteren wurden, wie in Abbildung 4.18 dargestellt, an den Unterseiten der Reaktorböden lichtundurchlässige Blenden befestigt. Mit diesen sollte verhindert werden, dass das Medium im Bioreaktor durch die transparenten Reaktorböden aus Polystyrol von den LEDs der Ausleseeinheiten angestrahlt und die entstehende Hintergrundfluoreszenz mit ausgelesen wird.

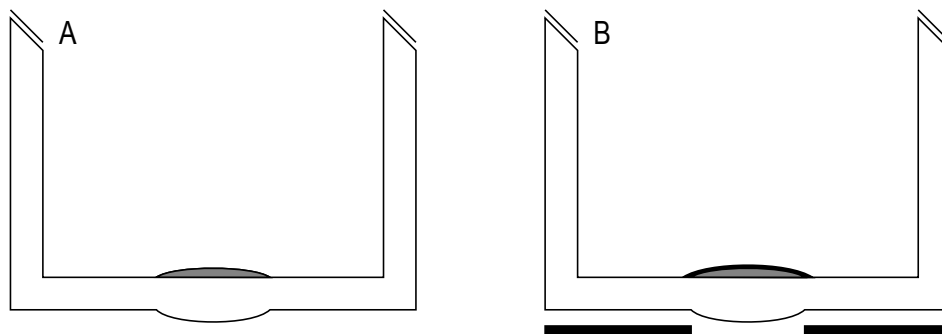


Abbildung 4.18 A: Ursprünglicher Sensor ohne optische Isolierung auf transparentem Reaktorboden aus Polystyrol. B: Mit optischer Isolierung (schwarz) versehener Sensor auf mit Blende (schwarz) versehenem Reaktorboden.

4.4 Akustische Messung der Aktorfunktion

Die Analyse der Aktorfunktion erfolgte mittels akustischer Überwachung der seriell nacheinander bewegten Aktoren der einzelnen Membranpumpen. Der Anschlag der Aktoren am Deckblech am höchsten Punkt der Aufwärtsbewegung, sowie der Aufschlag beim Rückfall auf die Führungsplatte sind akustisch wahrnehmbar. Mit Hilfe eines Mikrofons, welches an der Steuereinheit oder der Führungsplatte der Fluidikeinheit befestigt wird, wurden diese akustischen Signale aufgezeichnet. Anschließend wurde der Frequenzbereich mit einem Bandpass auf 8000-11025 Hz reduziert, um Störgeräusche zu entfernen. Nicht bewegte Aktoren sind als fehlende oder schwache Ausschläge der gefilterten Audiosignale wie in Abbildung 4.19 sichtbar.

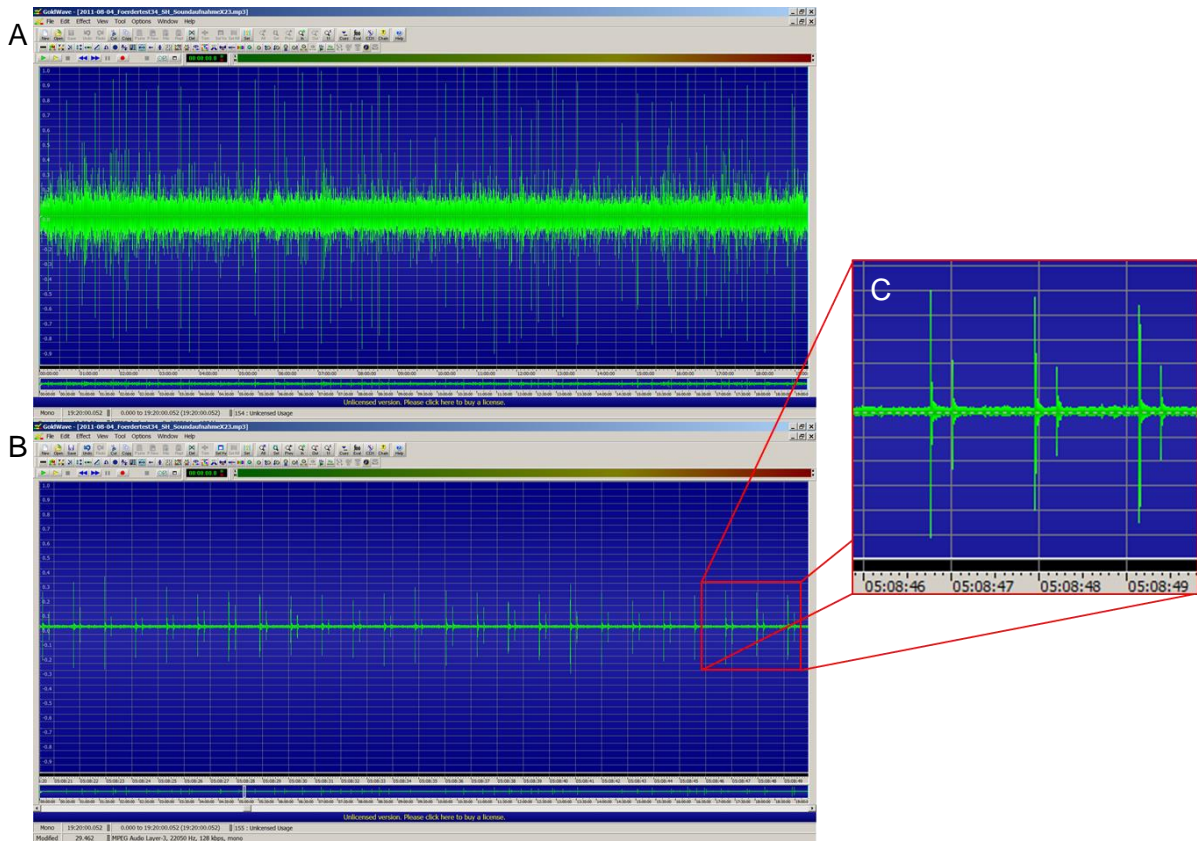


Abbildung 4.19: Ausschnitt der Aufzeichnung der akustischen Signale zur Überwachung der Aktorfunktion vor (A) und nach (B) der Anwendung des Bandpassfilters. In der Detailansicht (C) sind die Anschläge der ausgelenkten Aktoren am Deckblech als große Ausschläge sichtbar, gefolgt von kleinen Ausschlägen der auf die Führungsplatte aufschlagenden zurückfallenden Aktoren.

Bei der akustischen Messung wurde mit Hilfe eines entsprechenden Dosierprofils jeder Aktor der Mikrodosiereinheit einzeln für 18 Minuten bei 1 Hz betätigt, gefolgt von 6 Minuten Pause nach welcher der nächste Aktor betätigt wurde.

4.5 Reinigung der Mikrodosiereinheit

Da Verunreinigungen z.B. von auskristallisierten Medien, Metallspänen oder Dichtungsringen Störungen im Betrieb der Mikrodosiertechnik auslösen können, schließt sich an jeden Einsatz eine Reinigung an.

Dafür wird zunächst die Platine entfernt und anschließend die Dosiereinheit demontiert. Mit Ausnahme der Steuereinheit werden alle Bauteile bei 60°C für 10-15 min im Ultraschallbad unter Zusatz eines Ultraschallreinigungsmittels gereinigt. Anschließend wird eine Sichtkontrolle mit eventueller Nachreinigung durchgeführt. Die Bauteile werden im Trockenschrank bei 80°C über Nacht getrocknet und anschließend wieder montiert.

4.6 Befüllen der Mikrodosiereinheit

4.6.1 Befüllen mit hydrostatischem Druck

Zum Befüllen der Mikrodosiereinheit wurde der Vorlagebehälter auf 0,7 m über das Ventalniveau gehoben, um einen hydrostatischen Druck von etwa 70 mbar für den angeschlossenen Kanal zu gewährleisten. Zudem wurden die zu charakterisierenden Mikro-Membranpumpen mit einer Sollförderate von $3000 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ angesteuert. Nach Kontrolle der Förderfähigkeit jeder einzelnen Position (Injektor fördert das Fluid unter Tropfenbildung am Injektorausgang), wurde die Mikrodosiertechnik weitere 20 Minuten betrieben. Damit sollten etwaige noch im Kanalsystem befindliche Gasblasen ausgespült werden.

4.6.2 Befüllen mit Schlauchpumpe

Zum Befüllen wurde eine Schlauchpumpe zwischen Vorlagebehälter und Mikrodosiereinheit angeschlossen und mit einer Förderate von $0,5 \text{ L h}^{-1}$ betrieben. Nach Kontrolle der Förderfähigkeit jeder einzelnen Position (Injektor fördert das Fluid unter Tropfenbildung am Injektorausgang), wurde die Pumpe ausgekoppelt und ein gegebenenfalls mit angeschlossenem Druckregler versehener Vorlagebehälter an die Mikrodosiereinheit angeschlossen.

4.7 Bestimmung der Förderraten und Leckageraten

4.7.1 Einstellen des hydrostatischen Vordrucks

Der bei den Messungen anliegende Vordruck wurde durch Variation der Höhendifferenz zwischen dem Füllstandes des Vorlagengefäßes und der Mikrodosiereinheit eingestellt wie Abbildung 4.20 zeigt. Dabei wurde der hydrostatische Vordruck der zuvor befüllten Mikrodosiereinheit bei nicht angesteuerten Membranpumpen erhöht bis am Ausgang von mindestens einem Injektor eine Tropfenbildung erkennbar war. Danach wurde die Höhendifferenz reduziert bis über einen Zeitraum von 30 Minuten keine Ablösung oder Vergrößerung der Tropfen beobachtet werden konnte.

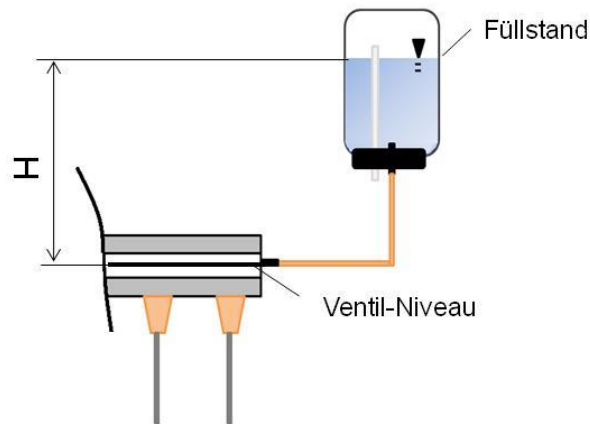


Abbildung 4.20: Bestimmung des optimalen Vordrucks der Mikrodosiereinheit durch Einstellen der Höhe H des Füllstandes im Vorlagegefäß (Poschenrieder, 2012).

4.7.2 Einstellen des Vordrucks mit Druckregler

Um den bei den Messungen anliegenden Vordruck präziser einzustellen, wurde ein Druckregler (Bronkhorst High-Tech, Niederlande) zwischen Vorlagegefäß und Mikrodosiereinheit gekoppelt. Über diesen konnten Drücke von 2,5 mbar bis 50 mbar für die Messung der Förderraten und Leckageraten eingestellt werden. Da der Druckregler selbst bei einem Vordruck von 100 mbar betrieben werden muss, wurde der Vorlagebehälter 1 m oberhalb des Messstands platziert.

4.7.3 Parallele und serielle Bestimmung der Förderraten an einem Kanal

In einem am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik gefertigtem Messplatz wurde die Förderleistung der Pumpen über gravimetrische Bestimmung der Fördervolumen kontrolliert. Wie Abbildung 4.21 A zeigt, wird die Mikrodosiereinheit für die Bestimmung der Förderraten parallel an einem Kanal betriebener Pumpen auf einem Gestell mit 48 Reagenzgläsern platziert.

Für die Bestimmung der Förderraten seriell nacheinander an einem Kanal fördernder Pumpen wurde die Mikrodosiereinheit wie in Abbildung 4.21 B über einem Auffangbehälter mit 48 Vertiefungen platziert, welches über eine Feinwaage in Echtzeit ausgelesen werden kann. Abbildung 4.22 zeigt den gesamten Arbeitsplatz bei Verwendung des Druckreglers zum Einstellen des Vordrucks.

Die Reagenzgläser und Auffangbehälter wurden mit Flüssigkeit gefüllt bis die Injektoren der Dosiereinheit eintauchen. Um der Verdunstung entgegenzuwirken werden die Auffanggefäße danach mit einem Film aus Paraffinöl bedeckt. Das Vorlagegefäß ist dabei an jeweils einen der Kanäle X, Y oder Z der Mikrodosiereinheit angeschlossen.

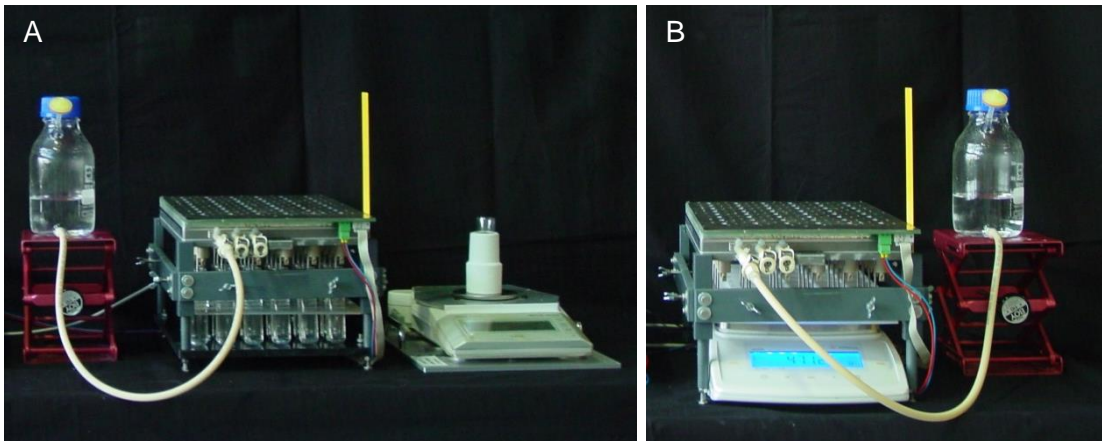


Abbildung 4.21: Messstand für parallele (A) und serielle (B) gravimetrische Volumenbestimmung.

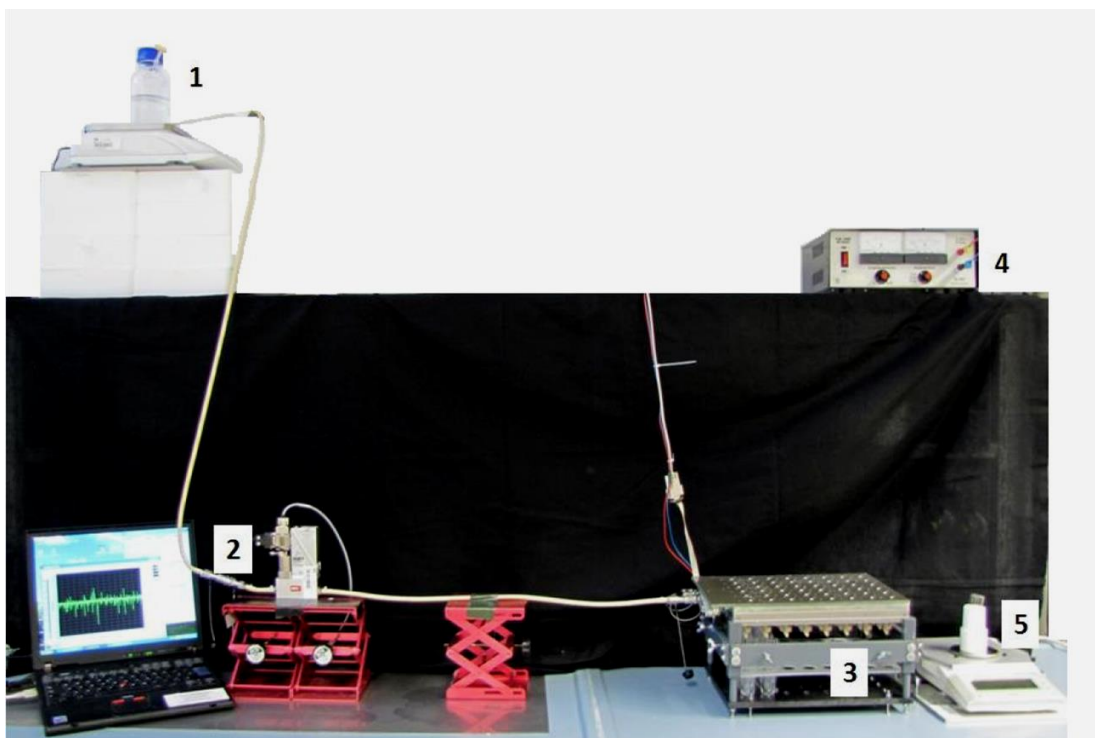


Abbildung 4.22: Modifizierter Messstand mit Vorlagebehälter (1), Druckregler (2) der über einen Kanal mit der Mikrodosiertechnik (3) samt Netzteil (4) verbunden ist. Die Wiegung erfolgt mit einer Präzisionswaage (5).

Für alle Messungen wurden jeweils die 12 Positionen A1 bis B6 betrachtet, während die restlichen Positionen mit Silikonmasse verschlossen wurden (siehe Abbildung 4.23).

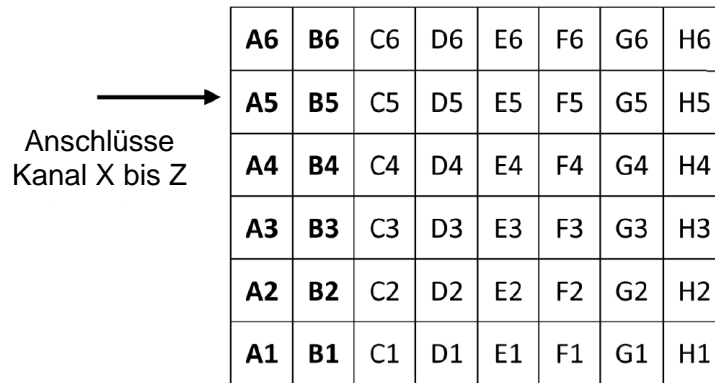


Abbildung 4.23: Schematische Darstellung der Positionen A1 bis B6 zur Bestimmung der Förderraten

Sofern nicht anders erwähnt, wird für die Bestimmung der Förderraten mit bi-distilliertem Wasser mit einer Dichte von $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gearbeitet. Sämtliche verwendeten Medien wurden vor dem Einsatz mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße $0,22 \text{ }\mu\text{m}$) filtriert, um Verunreinigungen oder Verstopfungen im System zu vermeiden.

Bei den Messungen parallel fördernder Pumpen wurde zu Beginn das Ausgangsgewicht der gefüllten Reagenzgläser ermittelt. Nach Ende der Förderung wurde das Endgewicht ermittelt. Jede Messung bzw. jeder Messzyklus wurde jeweils 3-10 Mal durchgeführt, um die mittlere Massendifferenz Δm zu erhalten und die Förderrate mit Hilfe von Gleichung 4-1 zu bestimmen.

$$\dot{V} = \frac{\Delta m}{\Delta t \cdot \rho} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

\dot{V}	Förderrate	mL h^{-1}
Δm	Massendifferenz	g
Δt	Messdauer	h
ρ	Dichte	$\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Bei den Messungen seriell nacheinander fördernder Pumpen wurde die Änderung der Masse mit Hilfe der Feinwaage während der Förderung gemessen und in einer Datei gespeichert. Anschließend erfolgte die Auswertung mit Microsoft Excel.

4.7.4 Parallele Bestimmung der Förderraten an zwei Kanälen

Zur Charakterisierung des Förderverhaltens bei 2-Kanal-Betrieb wurde die Fluoreszenz einer grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Lösung genutzt. Hierfür wurde an Kanal X ein mit phosphatgepufferter Saline (PBS) und an Kanal Z ein mit einer GFP-Lösung gefüllter Vorlagebehälter angeschlossen. Kanal Y wurde nicht angesteuert, vor Beginn der Messungen aber mit PBS befüllt. Anschließend an die Fördertests wurde aus je fünf Messungen eine quantitative GFP-Bestimmung durchgeführt.

Die Fluoreszenzmessung für die GFP-Quantifizierung erfolgte bei 485 nm im 96-well Multimode-Reader Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) mit schwarzen Mikrotiterplatten bei *gain* 85. Hierfür wurde je Messung eine neue GFP-Standardgerade in 1xPBS angesetzt. Dazu wurde die GFP-Lösung mit einer relativen Verdünnung von 0 %, 10 %, 25 %, 50 % und 100 % angesetzt. Die eigentliche Probe wurde zusammen mit dem Standard zu je 200 µL in die Mikrotiterplatten pipettiert und dreifach bestimmt. Mit Hilfe der Werte der GFP-Standardgerade und den Messwerten der eigentlichen Proben konnte deren GFP-Konzentration mit folgender Gleichung bestimmt werden:

$$c_C [\%] = \frac{\bar{F} - t_x}{m_x} \quad \text{Gleichung 4-2}$$

c_C	GFP-Konzentration Probe	%
\bar{F}	Mittelwert Fluoreszenz	-
t_x	Achsenabschnitt	-
m_x	Steigung	-

Für diese Messungen wäre das Vorhandensein von, vor Verdunstungseffekten schützendem, Paraffinöl störend. Aus diesem Grund wurde das geförderte Fluid in einem leeren Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. In dessen Deckel wurde eine Öffnung eingebracht, sodass der Injektor mit einer Passung von ~0,1 mm hineinragen konnte. Die auftretenden Verluste durch Verdunstung wurden somit reduziert. Zudem wurde messungsverfälschendem Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung mit Wahl einer relativ hohen Sollförderrate von 3000 µL·h⁻¹ in beiden Kanälen bei einer gleichzeitig verhältnismäßig kurzen Messdauer von 0,3 h bestmöglich entgegengewirkt.

4.8 Kalibrierung der Mikrodosiereinheit

Um Unterschiede der Förderraten aufgrund von Produktionstoleranzen auszugleichen, muss für jede Mikromembranpumpe ein Kalibrierfaktor für die Pumpfrequenz ermittelt werden. Dieser Prozess wird nachfolgend als Kalibrierung bezeichnet und muss nach jeder Montage der Mikrodosiereinheit erneut erfolgen.

Dafür werden mehrere Kalibrierzyklen hintereinander durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus 3-10 Förderläufen mit anschließender Bestimmung des Kalibrierfaktors KF_{neu} anhand der Gleichung 4-3 besteht:

$$KF_{neu} = \frac{KF_{Ist} \cdot \dot{V}}{\dot{V}_{Soll}} \quad \text{Gleichung 4-3}$$

KF_{neu}	neuer Kalibrierfaktor	%
KF_{Ist}	aktueller Kalibrierfaktor	%
\dot{V}_{Soll}	Sollförderrate	L h ⁻¹
\dot{V}_{Ist}	tatsächliche Förderrate	L h ⁻¹

Die tatsächliche Förderrate \dot{V}_{Ist} wird mit Hilfe der Mittelwerte aus mehreren Messungen bestimmt. Im Ersten Kalibrierzyklus werden die Kalibrierfaktoren der Pumpen auf einen Wert von 100 % gesetzt. Zur Ermittlung eines neuen Kalibrierfaktors wird aus den vier Messungen eines Zyklus der Mittelwert der errechneten Kalibrierfaktoren gebildet, der dann wiederum die Grundlage für den nächsten Zyklus ist. Dieser Prozess wird solange wiederholt, bis keine Reduzierung der Abweichung der Förderraten vom Sollwert mehr beobachtet werden kann.

4.9 Desinfektion der Mikrodosiereinheit

Zur Desinfektion wurden die Kanäle der Mikrodosiereinheit mit 70% (v/v) Ethanol befüllt. Anschließend wurde die Mikrodosiereinheit auf das Parallelbioreaktorsystem, dessen Einwegreaktoren komplett mit 70% (v/v) Ethanol befüllt waren aufgesetzt, so dass Injektoren, Rührwerke und Gasverteiler eintauchten. Die so präparierte Mikrodosiereinheit wurde über Nacht in einer Sterilwerkbank platziert. Vor dem Bioprozesseinsatz wurden die Injektoren, Rührwerke und Gasverteiler mit autoklaviertem bi-destilliertem Wasser abgespült.

4.10 Kalibrierung der fluorimetrischen pH-Sensoren

Zur Kalibrierung der pH-Sensoren der Milliliter-Bioreaktoren wurden die Phasenwinkel in verschiedenen Medien, Puffern und Lösungen gemessen. Diese wurden auf pH-Werte von 2,0 bis 9,0 eingestellt. Die Versuche wurden in Drei- oder Vierfachansätzen mit Volumen von 5-14 mL pro Reaktor durchgeführt, die Temperierung betrug 37°C bei einer Drehzahl von 400 min⁻¹. Die befüllten Reaktoren wurden 30 bis 60 min lang gerührt bis der sogenannte Aufquellvorgang der Sensoren abgeschlossen war. Hierbei nimmt das Sensormaterial Flüssigkeit auf und die Phasenwinkel schwingen sich auf konstante Werte ein. Diese wurden mit Hilfe der Software *Fedbatch XP* alle 30 s aufgezeichnet. Sobald die Software konstante Phasenwinkel anzeigte wurden diese zusammen mit den zugehörigen pH, die parallel mit Hilfe einer Glaselektrode gemessen wurden, notiert.

Da einige der Sensoren nur in geringer Stückzahl zur Verfügung standen, wurden bei diesen die einzelnen pH-Stufen nacheinander in 3 bis 4 Reaktoren gegeben. Zu Beginn der

Kalibrierung wurden 14 mL des Mediums, Puffers oder Lösung mit pH 5,5 in die Reaktoren überführt und 30 bis 60 min lang bei einer Drehzahl von 400 min^{-1} gerührt bis der Aufquellvorgang abgeschlossen war. Sobald die Software konstante Phasenwinkel anzeigte wurden diese zusammen mit den zugehörigen pH, die parallel mit Hilfe einer Glaselektrode gemessen wurden, notiert. Anschließend wurden die Reaktoren entleert und mit der nächsten pH-Stufe gefüllt. Dabei wurden zunächst nacheinander die Medien mit absteigendem pH bis 2,0 eingefüllt. Im Anschluss wurden die pH-Stufen 6,0 bis 9,0 in die Reaktoren gegeben.

Bei der Kalibrierung der Sensoren in riboflavinhaltigem Kulturmedium musste die Rührerdrehzahl aufgrund der Viskosität erhöht werden. So erfolgte die Kalibrierung der S505-A Sensoren bei 2800 min^{-1} und die der S470-A sowie S470-B Sensoren bei 1200 min^{-1} .

4.11 Messung der Signalstabilität der fluorimetrischen pH-Sensoren

Zur Bewertung des Driftverhaltens der Sensoren wurden Phasenwinkelmessungen über 72 h mit Medium durchgeführt. Dabei wurden die pH 4,0/ 5,5/ 6,5/ 7,5 und 9,0 eingestellt und je sechs Reaktoren mit 12 mL Medium befüllt. Je pH-Stufe wurden drei Reaktoren mit einer Rührerdrehzahl von 2800 min^{-1} und drei ungerührte Reaktoren verwendet. Um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurden dem sterilen Medium die Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol zugegeben. Jedem Reaktor wurde ein Tropfen 1 zu 4 verdünntem Antischaummittel Struktol J 633 (Schill + Seilacher "Struktol" GmbH, Hamburg) hinzugefügt. Nach dem Ende der Messung wurde der pH in jedem Reaktor mit einer Glaselektrode kontrolliert.

4.12 Langzeitkalibrierung der fluorimetrischen pH-Sensoren

Um zusätzlich auch die Signalstabilität eines Sensors bei der Kalibrierung zu ermitteln, wurde deren Dauer auf 72 h erhöht. Hierfür wurden die Einwegreaktoren unter der Sterilwerkbank in das Parallelbioreaktorsystem eingesetzt und mit je 16 ml Medium der einzelnen pH-Stufen gemäß Tabelle 4-2 befüllt. Anschließend wurde das Parallelbioreaktorsystem mit der autoklavierten Begasungshaube geschlossen und auf die Ausleseeinheiten am Arbeitstisch des Pipettierroboters gesetzt.

Tabelle 4-2: Übersicht der Befüllung der Mikrodosiertechnik mit Medien unterschiedlicher pH zur Langzeitkalibrierung

	1	2	3	4	5	6
A	pH 2					
B	pH 3					
C	pH 4					
D	pH 5					
E	pH 6					
F	pH 7					
G	pH 8					
H	pH 9					

Dort wurden unmittelbar die Sterilgaszufuhr und die Wärmetauscher angeschlossen und eingeschaltet. Anschließend wurde das Parallelbioreaktorsystem an die Steuereinheit angeschlossen und die Software gestartet. Die Prozessbedingungen sind in Tabelle 4-3 aufgeführt.

Tabelle 4-3: Parameter der Langzeitkalibrierung der pH-Sensoren

Parameter	Sollwert
Druckluftzufuhr [L min^{-1}]	4,8
Rührerdrehzahl [min^{-1}]	2800
Temperatur Wärmetauscher Kopfraum [$^{\circ}\text{C}$]	8
Temperatur Wärmetauscher Reaktoren [$^{\circ}\text{C}$]	37
Dauer der Messung [h]	72

Unmittelbar nach dem Start der Langzeitkalibrierung wurden von dem Pipettierarm des Laborroboters je 500 μl Probe pro Rührkesselreaktor entnommen. 400 μL der Probe wurden für die manuelle pH-Messung mit Hilfe einer Glaselektrode verwendet. 100 μL wurden zur Messung der Fluoreszenz in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Tecan Infinite M200) verwendet. Hierbei wurden die Proben mit 470 nm und 505 nm angeregt und entsprechend die Emission bei 550 nm und 600 nm gemessen. Die Probenahme sowie Messungen wurden alle 12 h bis zum Abbruch der Langzeitkalibrierung nach 72 h wiederholt.

Parallel wurden die fluorimetrischen pH-Sensoren alle 30 s mit Hilfe der Software *Fedbatch XP* ausgelesen. Die Messungen wurden im zwei- oder dreifach Ansatz durchgeführt, d.h. in zwei oder drei Zeilen des Reaktorblocks wurde jeweils eine Charge der Sensoren verwendet und geprüft. Die Anregung der Lumineszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 470 nm mit einer respektiven Emission bei 550 nm, sowie bei einer Wellenlänge von 505 nm mit einer dazugehörigen Emissionsmessung bei 600 nm. Die Messungen wurden sowohl mit Mineral- als auch Medium durchgeführt

4.13 Auswertung der Kalibrierung

Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, kann die Phasenverschiebung ϕ der fluorimetrischen Sensoren mittels DLR über Gleichung 4-4 einem pH zugeordnet werden.

$$\phi = \frac{Ph_{MIN} - Ph_{MAX}}{1 + e^{\frac{pH - pH_0}{dpH}}} + Ph_{MAX} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

ϕ	Phasenverschiebung	°
Ph_{MIN}	Phasenverschiebung bei minimalem pH-Wert	°
Ph_{MAX}	Phasenverschiebung bei maximalem pH-Wert	°
pH_0	Lage des Wendepunkts	-
dpH	Steigung im Wendepunkt	-

Aufgrund der Temperatur- und Medienabhängigkeit dieser Parameter, müssen die Sensoren entsprechend unter den beim Bioprozesseinsatz herrschenden Bedingungen kalibriert werden. Die hierbei für jede pH-Stufe gewonnenen Mittelwerte der Phasenwinkel werden über dem pH aufgetragen. Mittels der Methode zur Minimierung der Fehlerquadrate wird eine Kalibrierkurve berechnet wird, die sich mit Hilfe einer nicht-linearen Regression nach dem Newton-Verfahren basierend auf den gemessenen Wertepaaren, den Messpunkten bestmöglich annähert (Kusterer, 2007). Eine typische Kalibrierkurve ist in Abbildung 4.24 zu sehen. Die Höhe der Sigmoiden ist abhängig von pH_{min} und pH_{max} , während die Lage des Wendepunktes durch pH_0 und die Steigung im Wendepunkt durch dpH definiert wird (Kusterer, 2007). Anhand der genäherten Funktion ergeben sich die Kalibrierparameter pH_{min} , pH_{max} , pH_0 und dpH , welche in die Software *FedBatch XP* übertragen werden, um den pH in Echtzeit ausgeben und dokumentieren zu können.

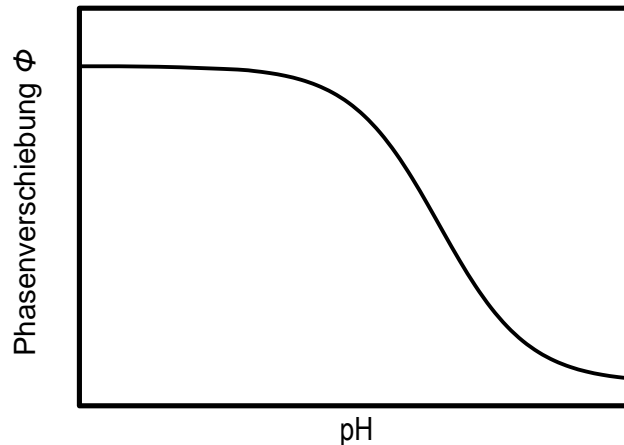


Abbildung 4.24: Typischer Verlauf einer Kalibrierkurve fluorimetrischer pH-Sensoren (Kusterer, 2007).

Bei der Kalibrierung wird der sigmoidale Kurvenverlauf der über den pH aufgetragenen Phasenverschiebung deutlich. Am Wendepunkt der Funktion sind die Steigung und damit auch die Auflösung des Sensors am höchsten. Selbst kleinste Änderungen des pH verursachen eine deutliche Änderung der gemessenen Phasenverschiebung. Anders verhält es sich in den Bereichen wo die Kurve abflacht, wo selbst größere Unterschiede des pH nur geringe Veränderungen der Phasenverschiebung verursachen. Der Kurvenbereich um den Wendepunkt, wo die Steigung ausreicht, um den pH zuverlässig zu bestimmen, wird auch dynamischer Bereich genannt. Je länger die Kurve um den Wendepunkt ihre Steigung beibehält, umso größer ist der dynamische Bereich des Sensors und damit auch der Anwendungsbereich in dem dieser eingesetzt werden kann. Je größer dabei die Steigung der Sigmoiden ist, umso genauer kann der pH mit dem Sensor aufgelöst werden.

Für die Anwendungsbereiche der Kalibrierungen wurde anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen der Mehrfachansätzen der pH-Bereich berechnet in welchem der pH mit einem Fehler von $\pm 0,5$ gemessen werden kann.

Für die Anwendungsbereiche der Langzeitkalibrierungen wurde anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen der Mehrfachansätzen der 12 Stunden Messung der pH-Bereich berechnet in welchem der pH mit einem Fehler von $\pm 0,2$ gemessen werden kann.

Bei einigen Kalibrierungen wurden mit sinkendem pH abfallende oder mit steigendem pH ansteigende Phasenverschiebungen gemessen. Da hierdurch keine eindeutige Zuordnung von pH und Phasenverschiebung mehr möglich ist wurden die betroffenen Wertepaare nicht für die Berechnung der Sigmoiden berücksichtigt. Entsprechend wurden die Anwendungsbereiche auch nur innerhalb der berücksichtigten Wertepaare ermittelt.

Zudem kam es bei der Berechnung der Sigmoiden für die Standardabweichung bei einigen Kalibrierungen zu Überschneidungen mit der Sigmoiden für die Mittelwerte. Hier wurde für pH_{\min} und pH_{\max} eine Standardabweichung der Phasenverschiebung von $\pm 0,2^\circ$ (persönliche Kommunikation PreSens) verwendet um eine Überschneidungen bei der berechneten Standardabweichung zu verhindern.

4.14 Messung der Emissionsspektren von Medien und Zellen

Messung des Emissionsspektrums von Zellen

Der Stamm *Escherichia coli* BL21(DE3) wurde wie in Kapitel 4.16 für im Parallelbioreaktorsystem mit Mineralsalz Medium kultiviert. Die pH Regelung und Substratversorgung erfolgte mittels Laborroboter, welcher zusätzlich im ~1,5 h Rhythmus Proben entnahm. Anschließend wurde im Photometer die Emission für $\lambda=470$ nm und $\lambda=505$ nm Anregungswellenlänge gemessen.

Messung des Emissionsspektrums von Medien

Für die Analyse der Hintergrundfluoreszenz des Mediums wurden die komplexen Bestandteile des Mediums variiert. Durch Zugabe von HCl- und NaOH-Lösungen wurden definierte pH-Werte eingestellt wie Tabelle 4-4 für die zugehörige Komponentenmodifikation angibt. Die Messung erfolgte bei 470 nm Anregungswellenlänge im Mikrotiterplattenphotometer.

Tabelle 4-4: Reaktormedien mit variierenden komplexen Bestandteilen und zugehörigen pH-Werten für die Emissionsmessung

Medium	pH									
Medium	3,5	5,0	5,5	6,0	6,4	7,0	7,4	7,8	8,2	9,9
Medium ohne Pepton	3,6	5,1	5,5	6,0	6,5	7,0	7,4	7,7	8,1	9,8
Medium ohne Hefeextrakt	3,5	5,0	5,5	6,0	6,5	6,9	7,3	7,8	8,2	9,6
Medium ohne Hefeextrakt & Pepton	3,6	4,9	5,5	5,9	6,5	7,0	7,5	7,8	8,1	9,9

4.15 Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum*

Die Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 wurde nach Schmidt durchgeführt (für weitere Informationen siehe Schmidt, 2013).

Vor der Kultivierung wurde eine Vorkultur angesetzt, um eine Zelldichte zu erreichen, die einen Übergang in die exponentielle Wachstumsphase ermöglicht. Dafür wurden zunächst 5 mL *Clostridial Growth Medium* (CGM) in einem Hungate Röhrchen mit 250 μ L Glucoselösung supplementiert und mit 100 ml *C. acetobutylicum* Sporen inokuliert. Zur Aktivierung wurden die Röhrchen für 10 min in ein 80°C heißes Wasserbad gestellt und anschließend bei 37°C in einem Brutschrank für 16 h inkubiert.

Von dieser Sporensuspension wurden 5 mL in 45 mL MES-Puffer inokuliert und erneut unter gleichen Bedingungen inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden erneut 5 mL in 45 mL MES-Puffer inokuliert und 16 h bei 37°C inkubiert.

Das Animpfen der Vorkultur erfolgte in der Anaerobwerkbank in 500 mL MES-Puffer mit einer optischen Dichte (OD) von 0,21. Zudem wurde 1 mL Antischaum pro 100 mL Medium zugegeben und der pH-Wert mittels 3 M KOH auf 5,5 eingestellt.

Der Reaktorblock wurde auf 37°C vortemperierte bevor je 12 mL Medium in 24 der 48 Bioreaktoren eingefüllt wurde. Die mL-Bioreaktoren waren zuvor über Nacht unter der Anaerobwerkbank gelagert, um in den Kunststoff eingelagerten Sauerstoff zu entfernen. Die restlichen 24 Bioreaktoren wurden mit VE-Wasser gefüllt. Nach dem kompletten Zusammenbau des Reaktorblocks wurde dieser an eine Stickstoffbegasung angeschlossen und eine Stunde bei 48 L h⁻¹ begast, um einen stabilen Stickstofffluss zu gewährleisten. Danach wurde die Begasungsrate stündlich halbiert und ab einem Volumenfluss von 6 L h⁻¹ konstant gehalten.

Die Kopfraumkühlung wurde auf +2°C, die Temperierung auf 37°C geregelt und es wurde eine Rührerdrehzahl von 400 min⁻¹ eingestellt.

Die erste Probennahme erfolgte etwa 2 h nach Prozessbeginn. Im Anschluss wurde alle 3 h eine Probe genommen. Dabei wurde jeweils drei Reaktoren 12 mL Flüssigkeit entnommen und der pH mit Hilfe einer Glaselektrode gemessen. Anschließend wurden Teile der Probe zur Messung der optischen Dichte abgefüllt und für die Bestimmung der Substratkonzentrationen durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) filtriert. Um ein Trockenlaufen der Rührer zu vermeiden, wurden die geleerten Reaktoren mit Wasser gefüllt. Die Fermentation wurde nach etwa 46 h beendet.

4.16 Kultivierung von *Escherichia coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zwei Stämme *E. coli* HMS174(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) für die Kultivierung im Zulaufbetrieb eingesetzt. Beide Stämme tragen einen pET Plasmid mit Kanamycin Resistenz.

In allen Kultivierungen wurde ein Mineralsalz Medium eingesetzt. Für den Zulauf wurde Glucoselösung mit 500 g L⁻¹ bei *E. coli* HMS174(DE) und mit 250 g L⁻¹ bei *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Dabei wurden die Zulaufraten der Glucosekonzentration entsprechend angepasst. Jeder Rührkesselreaktor des Parallelbioreaktorsystems wurde mit 1 mL Vorkultur auf 9 mL Mineralsalz Medium inokuliert. Für die Vorkultur wurden 200 mL lysogeny broth (LB) Medium (5 g L⁻¹ Hefeextrakt, 10 g L⁻¹ Pepton aus Casein, 5 g L⁻¹ NaCl) mit tiefgefrorenen Stammkulturen inokuliert und für 11-18 h bei 37°C und 250 min⁻¹ in 1 L Schüttelkolben inkubiert.

Begleitend wurde die Mikrodosiereinheit durch Spülen der Kanäle mit Glucoselösung von den Ethanolrückständen der Desinfektion gereinigt, bevor sie auf das Parallelbioreaktorsystem aufgesetzt wurde.

Die Kultivierung im Parallelbioreaktorsystem erfolgte bei 30°C für *E. coli* HMS174(DE3) und bei 37°C für *E. coli* BL21(DE3). Der pH wurde mit Hilfe des Pipettierroboters durch Zugabe 12,5% (w/w) NH₃ auf pH 6,5 oder 6,7 geregelt.

Der Kopfraum jedes Milliliterreaktors wurde mit 0,1 L min⁻¹ Luft begast. Die Rührerdrehzahl wurde manuell auf 2800-3100 min⁻¹ eingestellt. Bei der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE) wurde 100 µL h⁻¹ Wasser zugegeben, um Verdunstungseffekte zu kompensieren.

4.17 Medien

4.17.1 Mineralsalz Medium

Es wurde ein modifiziertes Mineralsalz Medium nach Riesenberg et al., 1991 verwendet. Im Gegensatz zum ursprünglichen Medium wurde kein Thiaminhydrochlorid zugesetzt und sowohl eine andere Glukosekonzentration als auch ein anderes Antischaummittel (Antifoam 204, Sigma Aldrich) gewählt. Zunächst wurden KH₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄ und Citronensäure in vollentsalztem (VE-) Wasser gelöst und über die Titriermittel Phosphorsäure und Natronlauge der pH eingestellt. Anschließend folgte eine Autoklavierung der Salzlösungen sowie der separaten Glukoselösung bei 121°C für 20 min. Danach wurde sowohl das Magnesiumsulfat als auch die Spurenelemente getrennt voneinander in VE-Wasser gelöst, steril filtriert und den Salzlösungen zugegeben. Für die Kalibrierung der Sensoren wurde Antibiotikum-Antimykotikum (100X) (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, United States) und bei den Zulaufkultivierungen wurde Kanamycin (50 µg mL⁻¹) hinzugefügt. Abschließend erfolgte die Zugabe der Glukoselösungen.

Tabelle 4-5: Zusammensetzung des Mineralsalz Mediums für die Langzeitkalibrierung der pH-Sensoren nach Riesenberg et al., 1991.

Komponente	Konzentration [g·L ⁻¹]
Glucose	25,0
KH ₂ PO ₄	13,3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0
Citronensäure	1,7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5·10 ⁻³
MnCl ₂ ·4H ₂ O	15,0·10 ⁻³
CuCl ₂ ·4H ₂ O	1,5·10 ⁻³
H ₃ BO ₃	3,0·10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,5·10 ⁻³
Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	13,0·10 ⁻³
Fe(III)citrat	100,0·10 ⁻³

4.17.2 Komplexmedium

Für die Kalibrierungen der Sensoren wurde ein Komplexmedium nach Kusterer *et al.*, 2008 verwendet. Dessen Zusammensetzung kann Tabelle 4-6 entnommen werden. Alle Komponenten bis auf Glucose und $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wurden in VE-Wasser gelöst und mittels Titriermitteln die acht pH-Stufen von pH 2 bis pH 9 in 1,0-Schritten eingestellt und ebenso wie die Glucose-Lösung bei 121°C für 20 min autoklaviert. Parallel dazu erfolgt die Sterilfiltration der $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung, welche anschließend zusammen mit der Glucoselösung den Ansätzen mit den unterschiedlichen pH-Werten zugegeben werden. Zuletzt erfolgt eine Zugabe von Antibiotikum-Antimykotikum (100X) (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, United States) und Struktol J633 Entschäumer (1:4 verdünnt 600 $\mu\text{L L}^{-1}$) (Struktol GmbH, Hamburg, Deutschland).

Tabelle 4-6: Zusammensetzung des komplexen Mediums für die Langzeitkalibrierung der pH-Sensoren nach Kusterer *et al.*, 2008.

Komponenten	Konzentration [g L^{-1}]
Glucose	30,0
Pepton	20,0
Hefeextrakt	20,0
KH_2PO_4	13,0
K_2HPO_4	10,0
$\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
NaCl	5,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
NH_4Cl	0,2

4.17.3 Morpholinethansulfonsäure gepuffertes Mineralsalzmedium

Des Weiteren wird ein Mineralsalz Medium mit Morpholinethansulfonsäure-Puffer (MS-MES) verwendet. Für die modifizierte Herstellung nach Monot *et al.* 1982 werden die in Tabelle 4-7 genannten Komponenten in VE-Wasser gelöst und autoklaviert. Die Einstellung des pH erfolgt für die Kalibrierungen mit 5 % HCl und 3 M NaOH.

Beim Einsatz für die Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* werden zunächst alle Komponenten bis auf *p*-Aminobenzoesäure (PABA), Biotin und MES gelöst und mit KOH auf einen pH-Wert von 6,6 eingestellt. Anschließend folgen die Zugabe der restlichen Bestandteile und die Einstellung auf pH 5,5. Das Medium wird 20 min gekocht und unter Stickstoffbegasung in einer Schottflasche auf Eis gekühlt, um den gelösten Sauerstoff zu verdrängen. Anschließend wird die Flasche mit einem Septum verschlossen und für 20 min bei 121°C autoklaviert.

Tabelle 4-7: Zusammensetzung des MS-MES Mediums, modifiziert nach Monot et al., 1982

Komponente	Konzentration
Glucose	60 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,55 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,55 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,98 g L ⁻¹
Eisessig	2,3 mL
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,011 g L ⁻¹
PABA	0,008 g L ⁻¹
Biotin	80 µL einer 1mg L ⁻¹ Lösung für 1L
MES	21,3 g L ⁻¹

4.17.4 Clostridial Growth Medium

Tabelle 4-8: Zusammensetzung des Clostridial Growth Medium (CGM)

Komponenten	Konzentration [g·L ⁻¹]
K ₂ HPO ₄	0,75
KH ₂ PO ₄	0,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
NaCl	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Hefeextrakt	5
Asparagin	2
Glukose	50

4.17.5 Lösungen und Puffer

Riboflavinhaltige Fermentationslösung

Die riboflavinhaltige Fermentationslösung wurde am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München von Dr. C. Bendig zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein Referenzmedium (Vester, 2009) in dem das Riboflavin produzierende Bakterium *Bacillus subtilis* kultiviert wurde. Der gewünschte pH wurde mittels 5% HCl- und 3M NaOH-Lösung eingestellt.

Natriumphosphatpuffer

Zur Herstellung einer 0,1 M Natriumphosphatpufferlösung werden 14,16 g L⁻¹ Dinatriumhydrogenphosphat in VE-Wasser gelöst und mit 3 M NaOH und 10 %iger Salzsäure auf der gewünschten pH eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wird der Puffer bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Benutzung wird die Lösung auf eventuellen Mikroorganismenbefall geprüft und der pH-Wert kontrolliert und bei Bedarf nachkalibriert.

Riboflavinlösung

Für die Riboflavinlösung werden 8 g/L Riboflavin in 0,1 M Natriumphosphatpuffer gelöst. Der pH wird nach Bedarf mit 5 % HCl und NaOH eingestellt.

GFP-Lösung

Bei den 2-Kanal-Fördertests kam Lösung mit *grün fluoreszierendem Protein* (GFP) zum Einsatz. Das in 1xPBS (Phosphat Buffered Saline) gelöste Protein, mit einem Proteingehalt von $\sim 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, welches von Dipl. Chem. M. von Roman (Fachgebiet für Selektive Trenntechnik) zur Verfügung gestellt wurde, wurde im Volumenverhältnis 1:40 mit 1xPBS verdünnt. Die Zusammensetzung des PBS-Puffers kann der Tabelle 4-9 entnommen werden.

Tabelle 4-9: Zusammensetzung einer 1xPBS-Lösung.

Komponente	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,42
KH ₂ PO ₄	0,27

4.18 Software

Prozesssteuerung mittels FedBatch XP, Gemini und ProEd

Die Software *FedBatch XP* (DASGIP AG, Jülich, Deutschland) dient als Prozessleitsystem für den Einzelbetrieb der Mikrodosierttechnik sowie für den parallelen Einsatz von Laborroboter und Mikrodosierttechnik.

Sie besteht aus zwei Teilen: Der eigentlichen Prozesssoftware *FedBatch XP*, sowie dem *FBX Server*, welcher als Schnittstelle zur Software *Gemini* (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, IDeutschland) dient, die ihrerseits für die Ansteuerung des Laborroboters zuständig ist. Zur Steuerung der Mikrodosierttechnik kann in *FedBatch XP* jeder der 144 Mikromembranpumpen ein individueller Kalibrierfaktor zugewiesen werden, welcher in eine Frequenz umgerechnet wird, um konstruktive Ungenauigkeiten auszugleichen und den gewünschten Volumenstrom sicherzustellen. Weiterhin können mit Hilfe der eigens entwickelten Software *ProEd 1.0* (Spreng, 2010) für jede der 48 Reaktorpositionen individuelle konstante, sigmoidale oder exponentielle Dosierprofile eingegeben werden. Im Kombinationsbetrieb von Mikrodosierttechnik und Laborroboter dient *FedBatch XP* zudem zur Überwachung der Parameter des Bioprozesses, wie zum Beispiel pH, pO₂ und Titrationsmittelzugabe.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Dichtung der Mikrodosiereinheit

5.1.1 Ursprüngliches Labormuster

Bis auf eine in Abhängigkeit von der Montage zufällige Leckage und durch ein verstopftes Kanalsystem oder ausfallende Aktoren nicht fördernde Pumpen war eine Charakterisierung nicht möglich.

Beim Befüllen konnte wiederholt ein Flüssigkeitsaustritt an den Rändern des ersten Prototyps beobachtet werden. Die Flüssigkeit trat dabei aus dem Spalt zwischen Führungsplatte und Unterplatte aus. Sowohl an der mit den Anschlüssen für die Fluidkanäle versehenen Seite, als auch an den langen Seiten wurde austretende Flüssigkeit beobachtet. Zudem wurde nach Entfernung der Teflonhülsen in mehreren Pipettieröffnungen ebenfalls austretende Flüssigkeit beobachtet. Auch konnte nicht an allen Injektoren austretende Flüssigkeit beobachtet werden.

5.1.2 Modifiziertes Labormuster

Bei der Entwicklung des überarbeiteten Dichtungskonzepts wurde zunächst kontrolliert, ob beim Befüllen weiterhin Flüssigkeit zwischen Führungsplatte und Unterplatte austrat. Ebenso wurden weiterhin keine Teflonhülsen in die 48 Pipettieröffnungen eingesetzt, um auch hier interne Leckagen feststellen zu können.

Mit Einsatz der weicheren am Lehrstuhl hergestellten Silikonmembranen war zusätzlich eine Kontrolle des Abdrucks der Kanalmuster in den Membranen möglich. Diese entstanden durch die Verpressung der Membranen mit der Kanalplatte und dem Stegblech und konnten nach der Demontage der Mikrodosiereinheit nach einer Messung oder Messreihe kontrolliert werden.

Zusätzlich wurde über den Vergleich von ein- und ausgehendem Fördervolumen die interne Dichtigkeit der Mikrodosiereinheit geprüft, wie Abbildung 5.1 beispielhaft für 12 an einem Kanal angeschlossene Pumpen zeigt.

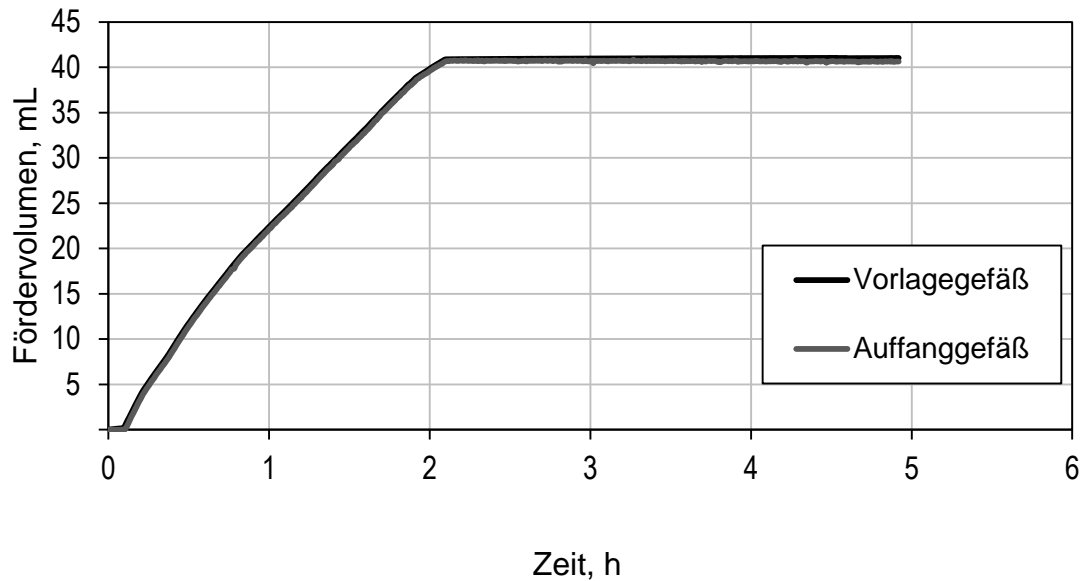


Abbildung 5.1: Vergleich der geförderten Flüssigkeit mit Hilfe von gravimetrisch bestimmten Fördervolumen von Vorlagegefäß und Auffanggefäß beim Betrieb von 12 Pumpen an Kanal Z der Mikrodosiereinheit für rund 2 Stunden gefolgt von rund 3 Stunden Ruhezeit.

5.1.3 Diskussion

Durch die Modifikation des Labormusters der Mikrodosiereinheit konnten die offensichtlichen Undichtigkeiten des Systems beseitigt werden. Zusätzlich konnte durch gravimetrische Kontrolle der Fördervolumen auch kein Flüssigkeitsverlust im Inneren der Dosiereinheit beobachtet werden.

5.2 Kontrolle der Aktorfunktion

5.2.1 Ursprüngliche Aktoren

Bei den ursprünglich in der Mikrodosiereinheit verbauten Aktoren handelte es sich um lasergeschnittene ferromagnetische Hebel aus hartmagnetischen Stahl. Diese Laserschnittkanten wiesen scharfe Grate auf, welche zu einem Verkannten des Aktors am Führungsstift führen konnten.

Zusätzlich waren die ursprünglichen Führungsstifte so kurz, dass die Aktoren beim Auslenken mit dem Rand des zur Führung in den Hebel eingebrachten Langlochs auf diesen aufsetzen konnten. Des Weiteren waren die ursprünglichen Aktoren zu lang, so dass deren Enden beim Anheben nicht gegen die hierfür in das Deckblech geschnittenen Öffnungen anschlugen, sondern gegen die darüber befindlichen Spulen. Damit war kein definierter Anschlagpunkt und kein definiertes Dosiervolumen pro Aktorauslenkung mehr gegeben. Zudem erhöhte sich durch den Kontakt mit den Spulenkernen das Risiko, die ferromagnetischen Aktoren im Betrieb dauerhaft zu magnetisieren.

Die Verjüngung zwischen dem breiten und dem schmalen Ende der Aktoren orientierte sich an der Geometrie der Fassung. In Ruhestellung war somit ein einheitlicher Abstand zwischen

Aktor und Fassung gegeben. Jedoch verursachte diese Geometrie bei angehobenem Aktor einen verringerten Abstand zu der Fassung und ermöglichte damit ein Verkanten der Aktoren in der Fassung.

In ersten akustischen Messungen liefen an dem Kanal mit der geringsten Ausfallrate nur 32 % der für 18 Minuten bei 1 Hz betriebenen Positionen über die gesamte Dauer der Messung, wogegen 68 % der Positionen nach einer durchschnittlichen Laufzeit von 5,7 Minuten ausfielen, wie Abbildung 5.2 zeigt.

	1			2			3			4			5			6		
Kanal	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z	X	Y	Z
A	T	1	1	T	1	1	T	1	T	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	T	1	1	T	T	1	T	1	1	T	1	T	T	1	1	1	1	1
C	T	1	1	1	1	1	1	1	1	T	1	0	T	1	1	T	1	1
D	T	1	1	T	1	1	T	1	1	T	1	T	T	1	1	T	1	1
E	1	1	T	T	T	1	T	1	1	T	0	T	T	1	1	T	1	T
F	T	1	T	1	T	T	1	T	T	T	1	T	T	1	T	1	1	T
G	0	1	T	1	T	T	1	1	T	1	1	1	1	1	T	1	T	0
H	1	1	T	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Abbildung 5.2: Auswertung der akustischen Messung bei der 18 Minuten bei 1 Hz funktionierende Aktoren mit „1“, nach Anschlag gegen das Trennblech aussetzende Aktoren mit „T“ und kein Audiosignal gebende Aktoren mit „0“ gekennzeichnet sind. Die Ausfälle an Position 1G Kanal X, Position 4E Kanal Y und Position 6G Kanal Z sind auf beschädigte Spulen der Steuereinheit zurückzuführen.

5.2.2 Modifizierte Aktoren

Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 5.3 das Ergebnis der akustischen Messung mit wie in Kapitel 4.2.2 modifizierten Aktoren, Führungsstiften und Deckblech nur eine einzige ausgefallene Position.

	1			2			3			4			5			6		
Kanal	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1	1	1	T	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
G	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Abbildung 5.3: Auswertung der akustischen Messung mit modifizierten Aktoren bei der 18 Minuten bei 1 Hz funktionierende Aktoren mit „1“, nach Anschlag gegen das Trennblech aussetzende Aktoren mit „T“ und kein Audiosignal gebende Aktoren mit „0“ gekennzeichnet sind. Die Ausfälle an Position 1G Kanal X, Position 4E Kanal Y und Position 6G Kanal Z sind auf beschädigte Spulen der Steuereinheit zurückzuführen.

5.2.3 Austausch der Flussplatte

Der Prozessablauf sieht vor, dass Spulenkerne, Flussplatte und Aktor temporär magnetisiert werden; jedoch wurde beobachtet, dass es mit fortschreitender Betriebsdauer zu einer dauerhaften Magnetisierung dieser Bauteile kam. Dies führte auf Grund der entstandenen magnetischen Anziehungskraft zu einem Blockieren der Hebel in der Fassung.

Daher wurde eine Flussplatte aus unmagnetischem Edelstahl gefertigt. Damit war die namensgebende Funktion der Flussplatte nicht mehr gegeben, welche das von den Magnetspulen generierte Feld stabilisierte. Erneut wurde mit Hilfe der akustischen Messung in mehreren aufeinander folgenden Messungen geprüft, ob durch das neue Plattenmaterial noch ein Auslenken der Hebel möglich war und ob es weiterhin mit zunehmender Betriebszeit aufgrund magnetischer Remanenz zu ausfallenden Hebeln kam.

Tabelle 5-1: Aufeinanderfolgende Messungen der Aktorfunktion an Kanal X und Z mit unmagnetischer Flussplatte. Jede Pumpe wurde für 18 Minuten bei 1 Hz betrieben wobei die Anzahl der Hübe der Aktoren akustisch gemessen und prozentual angegeben wurde.

Kanal	X	X	X	X	X	X	X	Z	Z	Z	Z
Messung	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4
Pumpe	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %	Hübe, %
A1	100	100	25	100	99	100	100	100	100	100	100
A2	100	100	83	100	100	100	100	100	100	100	100
A3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
A4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
A5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
A6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B6	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	100

Wie Tabelle 5-1 zeigt können die Hebel der Aktorik auch mit der unmagnetischen Flussplatte erfolgreich ausgelenkt werden. Zudem konnten auch nach über 50 Stunden Betriebszeit, was über 54.000 Pumpenhüben entspricht, keine Totalausfälle aufgrund von magnetischer Remanenz beobachtet werden. Die an den Positionen A1, A2 und B6 von Kanal X aufgetretenen Aussetzer konnten mit fehlerhaft sitzenden Stiften und Fertigungsfehlern der ersten unmagnetischen Flussplatte erklärt werden. Durch Richten der Führungsstifte und Einsatz einer neuen korrekt gefertigten unmagnetischen Flussplatte wurde auch diese Fehlerursache abgestellt. Nach der Umsetzung sämtlicher zuvor genannter Modifikationen wurde kein Verkanten der Hebel mehr beobachtet.

5.2.4 Diskussion

Die Aktoren des ursprünglichen Labormusters zeigten aufgrund von Fertigungsfehlern und einer schlechten Passung mit der Fassung und den Führungsstiften hohe Ausfallraten, was dem Ausfall einer entsprechenden Anzahl an Pumpen gleichkommt. Durch die Beseitigung der Fertigungsfehler und Modifikation der Aktoren, Führungsstifte und des Deckblechs konnten die mechanisch bedingten Ausfälle beseitigt werden. Des Weiteren zeigten sich mit

steigender Betriebsdauer magnetisch bedingte Aussetzer und Ausfälle der Aktoren. Als Ursache konnte eine dauerhafte Magnetisierung der Aktoren, Spulenkern und Flussplatte identifiziert werden. Durch Einsatz einer aus unmagnetischem Stahl gefertigten Flussplatte konnten alle Aktoren zuverlässig betrieben werden. Dies zeigt, dass die von den Spulen generierte magnetische Kraft auch ohne die verstärkende Funktion der Flussplatte für den Betrieb der Pumpen ausreicht. Zudem zeigte sich der Einfluss kleinster Fertigungsfehler auf die Aktorfunktion. Die Auswahl von Material und Fertigungstechnik muss passgenaue Bauteile mit Oberflächen geringer Rauheit gewährleisten.

5.3 Einfluss der Betriebsspannung auf die Förderleistung

5.3.1 Messung der Förderraten bei unterschiedlicher Betriebsspannung

Um den Einfluss der Betriebsspannung auf die Förderraten zu untersuchen, wurde die mit modifizierter Dichtung und Aktoren, aber noch ursprünglicher Flussplatte bestückte Mikrodosiereinheit zur Förderung von bi-distilliertem Wasser eingesetzt. Dabei wurden die Förderraten bei 10 V und 15 V Betriebsspannung ermittelt.

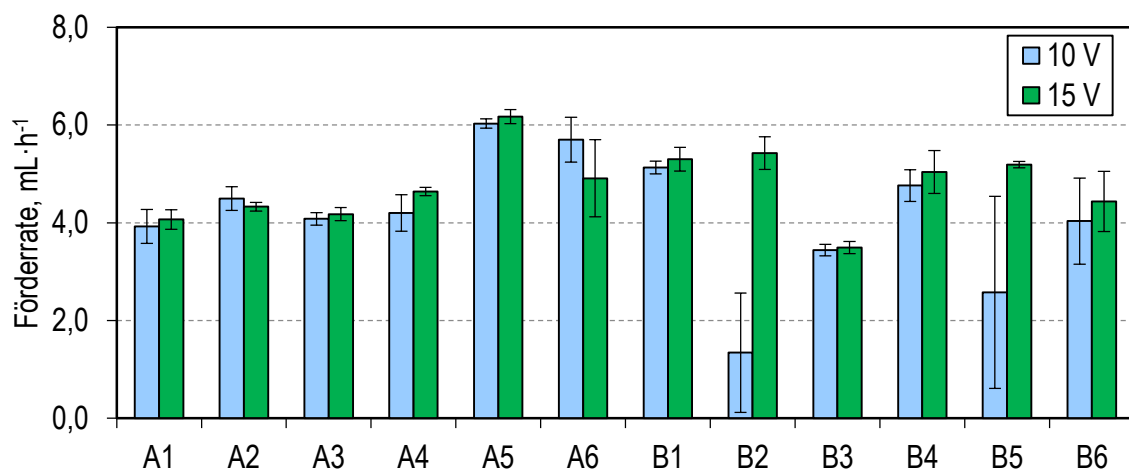


Abbildung 5.4: Messung der Förderraten nicht kalibrierter Pumpen bei unterschiedlicher Betriebsspannung bei 1 Hz.

Wie in Abbildung 5.4 ersichtlich, führte eine Erhöhung der Spannung von 10 V auf 15 V bei zwei von 12 Positionen zu einer gesteigerten Förderleistung und verringerten Standardabweichungen.

5.3.2 Diskussion

Aufgrund der gesteigerten Förderraten wurde in folgenden Versuchen eine Betriebsspannung von 15 V beibehalten. Ob dies die zuvor beschriebene Magnetisierung der Aktoren, Hebel und Flussplatte beschleunigte wurde nicht geklärt. Da bei einer Betriebsspannung von 15 V auch mit unmagnetischer Flussplatte ein zuverlässiges Anheben der Aktoren beobachtet werden

konnte, wurde die Kombination von nicht magnetisierbarem Bauteil und erhöhter Spannung der Kombination von magnetisierbarem Bauteil und niedriger Spannung vorgezogen.

5.4 Einfluss des Vordrucks auf die Förderraten

Das mit 144 Mikromembranpumpen ausgestattete Labormuster der Mikrodosiereinheit konnte nicht selbstansaugend befüllt werden. Umgekehrt konnte ein Flüssigkeitsaustritt an mehreren Positionen der nicht fördernden Mikrodosiereinheit beobachtet werden, wenn der Füllstand des Vorlagebehälters etwa 70 cm über das Niveau der Mikrodosiereinheit angehoben wurde. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Messungen durchgeführt, ob die Höhenpositionierung des Vorlagebehälters und die resultierenden unterschiedlichen hydrostatischen Vordrücke einen Einfluss auf die Förderraten der Mikropumpen hat.

5.4.1 Messung der Förderraten bei variierendem Vordruck

Hierfür wurde beispielhaft an 12 Positionen die Förderrate von unkalibrierten Pumpen gemessen, wobei die Höhendifferenz zwischen Füllstand des Vorlagebehälters und Mikrodosiereinheit variiert wurde. Die Ebene der Ventile in der Fluidikeinheit wurde als Nullpunkt (Höhe 0 cm) gewählt. Die zuvor befüllte Mikrodosiereinheit wurde anschließend bei Höhendifferenz von 10 cm, 0 cm und -10 cm zwischen Füllstand und Mikrodosiereinheit betrieben, was einem hydrostatischen Druck von etwa 10 mbar, 0 mbar und -10 mbar entspricht. Wie in Abbildung 5.5 zu sehen, konnte an allen Positionen eine mit dem Pegelstand zunehmende mittlere Förderrate gemessen werden. Zudem zeigte sich, mit Ausnahme von zwei Positionen, eine geringere Standardabweichung der Förderraten auf Pegelnulldruck.

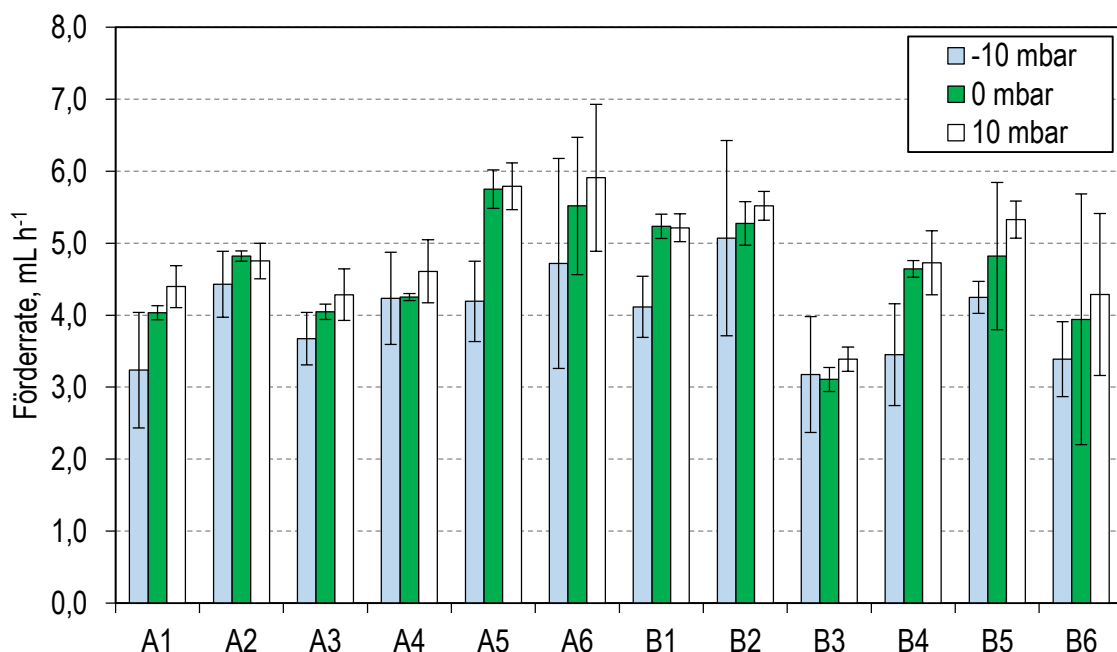


Abbildung 5.5: Förderraten der Pumpen an Position A1 bis B6 an Kanal Z mit hydrostatischen Vordruck von -10 mbar, 0 mbar und 10 mbar bei Betrieb von nicht kalibrierten Pumpen bei 1 Hz was einer Sollförderrate von 3,6 mL·h⁻¹ bei 1 µL Hubvolumen entspricht. Durchgeführt wurden je zehn Messungen à 0,3 h mit VE-H₂O als Medium.

5.4.2 Diskussion

Diese Ergebnisse zeigen wie empfindlich die Förderraten der Pumpen auf Variationen des Vordrucks reagieren. Daher wurden die Pumpen bei der Charakterisierung mit einem leichten Überdruck betrieben, ohne dass dabei an einer Position die Ventile auch ohne Auslösen der Aktorik öffneten. Der dafür notwendige Höhenunterschied zwischen Füllstand im Vorlagebehälter und Mikrodosiereinheit musste für jede neue Montage der Mikrodosiereinheit mit großem manuellem Aufwand für jeden Kanal neu bestimmt werden. Daher wurde begleitend zur Charakterisierung der Mikrodosiereinheit mit der Suche nach der Ursache und einer möglichen Beseitigung der Vordruckempfindlichkeit der Mikropumpen begonnen.

5.5 Kalibrierung der Mikro-Membranpumpen

5.5.1 Ermittlung der Förderraten der unkalibrierten Pumpen

Aufgrund von Fertigungstoleranzen unterscheiden sich die Hubvolumen der Mikromembranpumpen. Um trotzdem an jeder Position einheitliche Förderraten zu erhalten, werden die unterschiedlichen Hubvolumen durch individuelle Modulation der Taktfrequenz der Spulen ausgeglichen. Abbildung 5.6 zeigt beispielhaft die Förderraten von 12 unkalibrierten Pumpen bei 1 Hz, was bei optimaler Passung der Bauteile $3,6 \text{ mL h}^{-1}$ entsprechen sollte. Anhand der mittleren Förderraten der unkalibrierten Pumpen wird ein Kalibrierfaktor für die individuelle Anpassung der Taktfrequenz der Pumpen berechnet und in die Steuerungssoftware eingegeben.

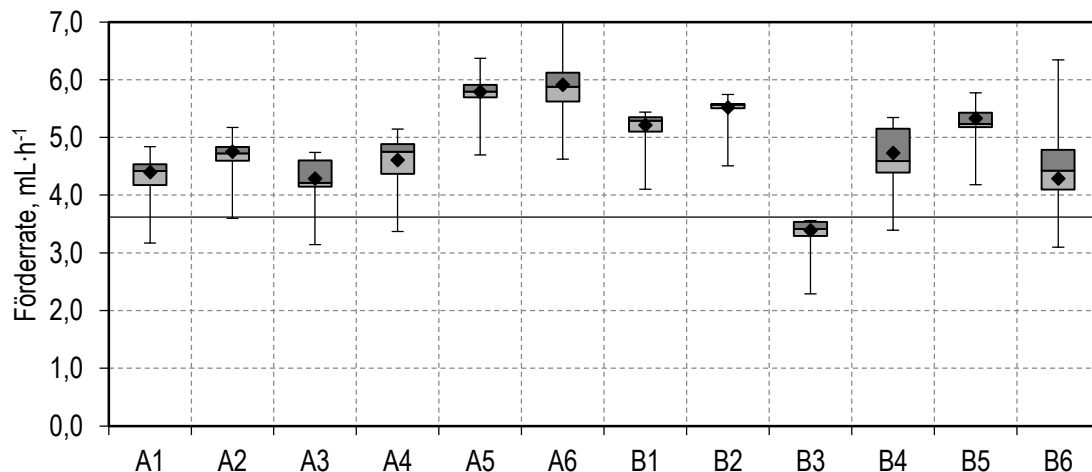


Abbildung 5.6: Förderraten von 12 unkalibrierter Pumpen nach 10 Messungen (Position A1 bis B6).

5.5.2 Kontrolle der Förderraten der kalibrierten Pumpen

Abbildung 5.7 zeigt die entsprechend angepassten Förderraten der mit Kalibrierfaktor angesteuerten Pumpen.

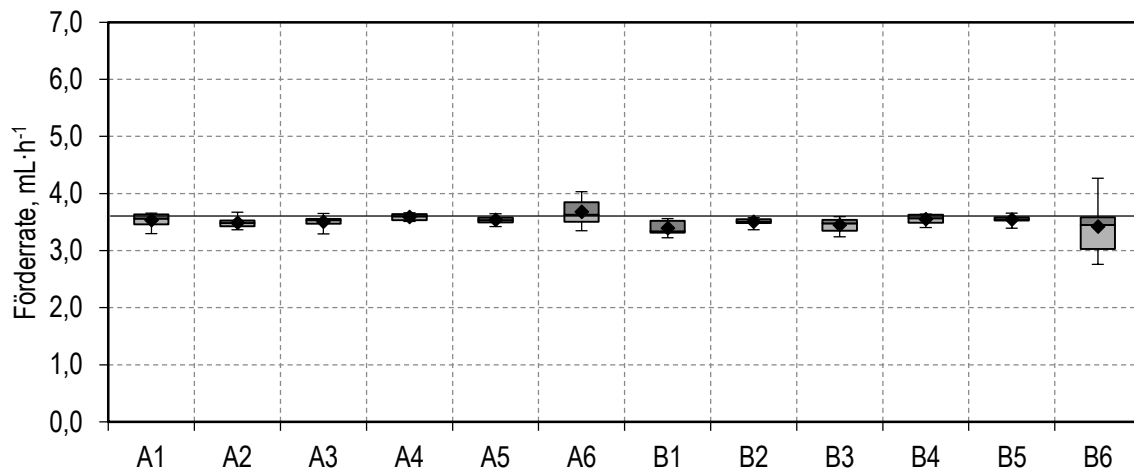


Abbildung 5.7: Förderraten von 12 kalibrierten Pumpen nach 10 Messungen (Position A1 bis B6).

5.5.3 Diskussion

Die Kalibrierung von 12 beispielhaft an einem Kanal parallel betriebenen Pumpen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Bei allen Positionen konnte ein um weniger als 10% vom Sollwert ($3,6 \text{ mL h}^{-1}$) abweichender Mittelwert erreicht werden.

5.6 Ermittlung des linearen Förderbereichs

5.6.1 Messung der Förderraten bei variierenden Sollwerten

Nach erfolgter Kalibrierung wurde das lineare Förderverhalten der zwölf Membranpumpen untersucht. Hierfür wurden die Median-Werte der Förderraten aus jeweils zehn Messungen mit den zugehörigen Fehlern über der Frequenz aufgetragen. Wie Abbildung 5.8 zeigt, können die kalibrierten Pumpen im Bereich von $0,1$ bis $3,6 \text{ mL h}^{-1}$ angesteuert werden. Über die Auftragung der Förderraten über die Frequenz in Abbildung 5.9 wird deren, für jede Pumpe individueller, linearer Zusammenhang deutlich.

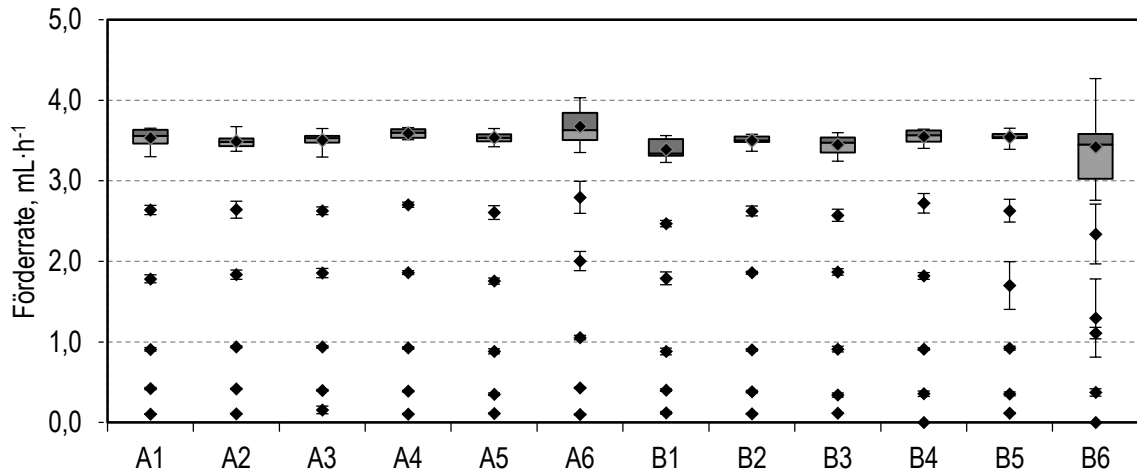


Abbildung 5.8: Mittlere Förderraten 12 kalibrierter Pumpen bei verschiedenen Sollwerten (Position A1 bis B6)

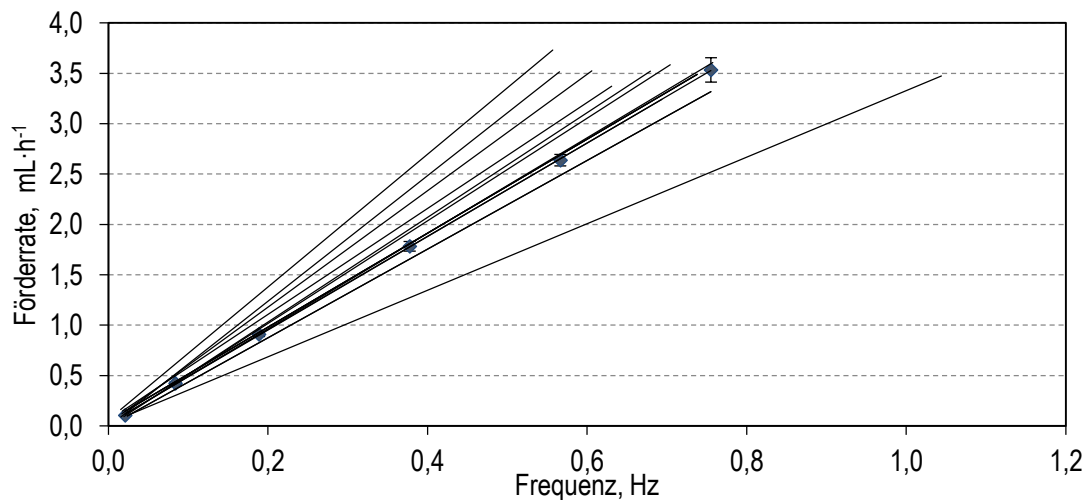


Abbildung 5.9: Linearer Zusammenhang von Förderrate und Frequenz

5.6.2 Diskussion

Den individuellen Hubvolumen entsprechend arbeiten die Pumpen mit unterschiedlichen Frequenzen, um die in der Software eingegebenen Förderraten von 0,1 bis 3,6 mL h^{-1} zu erzielen. Durch die Kalibrierung konnten die Pumpfrequenzen also erfolgreich angepasst werden. Auch kann der Verlauf der Datenpunkte an elf von zwölf Positionen mit einem Bestimmtheitsmaß $> 99\%$ linear angenähert werden. Nur bei Position B6 betrug das Bestimmtheitsmaß 93,8 %. Abbildung 5.9 zeigt den individuellen linearen Zusammenhang von Förderrate und Förderfrequenz der 12 vermessenen Positionen.

5.7 Förderung von exponentiellen Dosierprofilen

5.7.1 Anpassung des exponentiellen Dosierprofils

Nachdem der lineare Förderbereich der Mikrodosiereinheit bestimmt worden war, wurde diese zur Förderung entsprechender exponentieller Dosierprofile eingesetzt.

Bei den ersten gravimetrischen Messungen an Position A1 wurde das Dosierprofil zunächst mit $500 \mu\text{L h}^{-1}$ Förderrate gestartet. Jedoch wurden an anderen beispielhaft ausgewählten Positionen mehrfach ein Ausbleiben der Massezunahme bei niedrigen Förderraten beobachtet, wie Abbildung 5.10 links zeigt. Daher wurde das Dosierprofil, wie in Abbildung 5.11 A zu sehen, bei allen folgenden Messungen mit $1000 \mu\text{L h}^{-1}$ Förderrate gestartet, wobei auch hier ein Ausbleiben der Massezunahme bei niedrigen Förderraten beobachtet wurde. Wie Abbildung 5.10 B zeigt, war dieses jedoch weniger stark ausgeprägt.

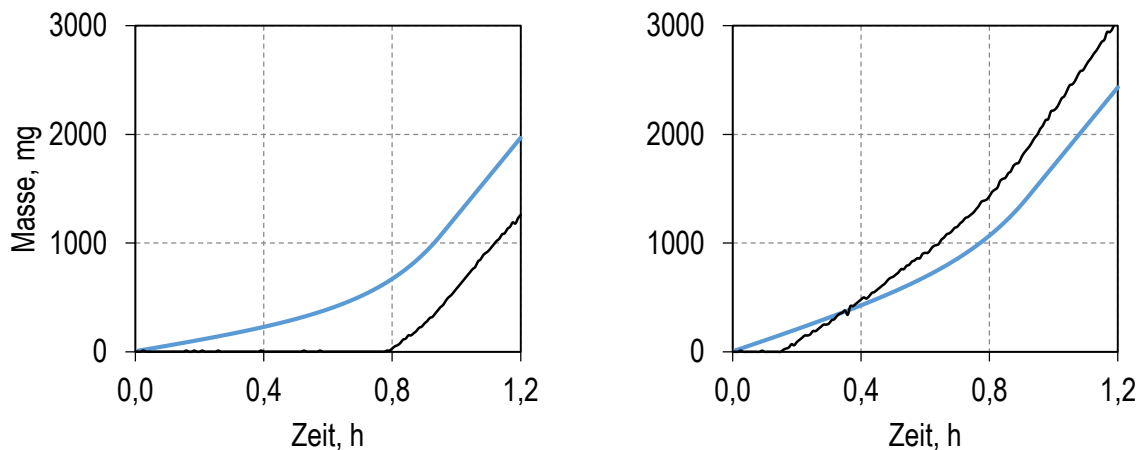


Abbildung 5.10: A: Messung der geförderten Masse an Position A6 mit Förderraten von 500 bis $3600 \mu\text{L h}^{-1}$. B: Messung der geförderten Masse an Position B1 mit Förderraten von 1000 bis $3600 \mu\text{L h}^{-1}$. Neben den experimentell ermittelten Werten (–), ist in jedem Diagramm noch der theoretisch berechnete optimale Kurvenverlauf (—) abgebildet.

5.7.2 Vergleich experimenteller Ergebnisse mit den Sollwerten

Die Ergebnisse für vier beispielhaft dargestellte Positionen sind in Abbildung 5.11 C bis F zu sehen. An den Positionen A1 und A4 stimmen die Ergebnisse der Messungen sehr gut mit den vorgegebenen Kurvenverläufen überein. Bei Position B1 (Abbildung 5.11 E) zeigte sich gerade bei den niedrigen Förderraten zu Beginn der Messung eine zu geringe Förderleistung, wogegen mit steigender Förderrate zu viel Flüssigkeit gefördert wurde. Die Ergebnisse der Messungen an Position B3 (Abbildung 5.11 F) zeigen anfänglich eine gute Übereinstimmung mit dem vorgegebenen Kurvenverlauf. Jedoch fällt die Förderleistung ab rund 0,4 h unter die vorgegebenen Werte.

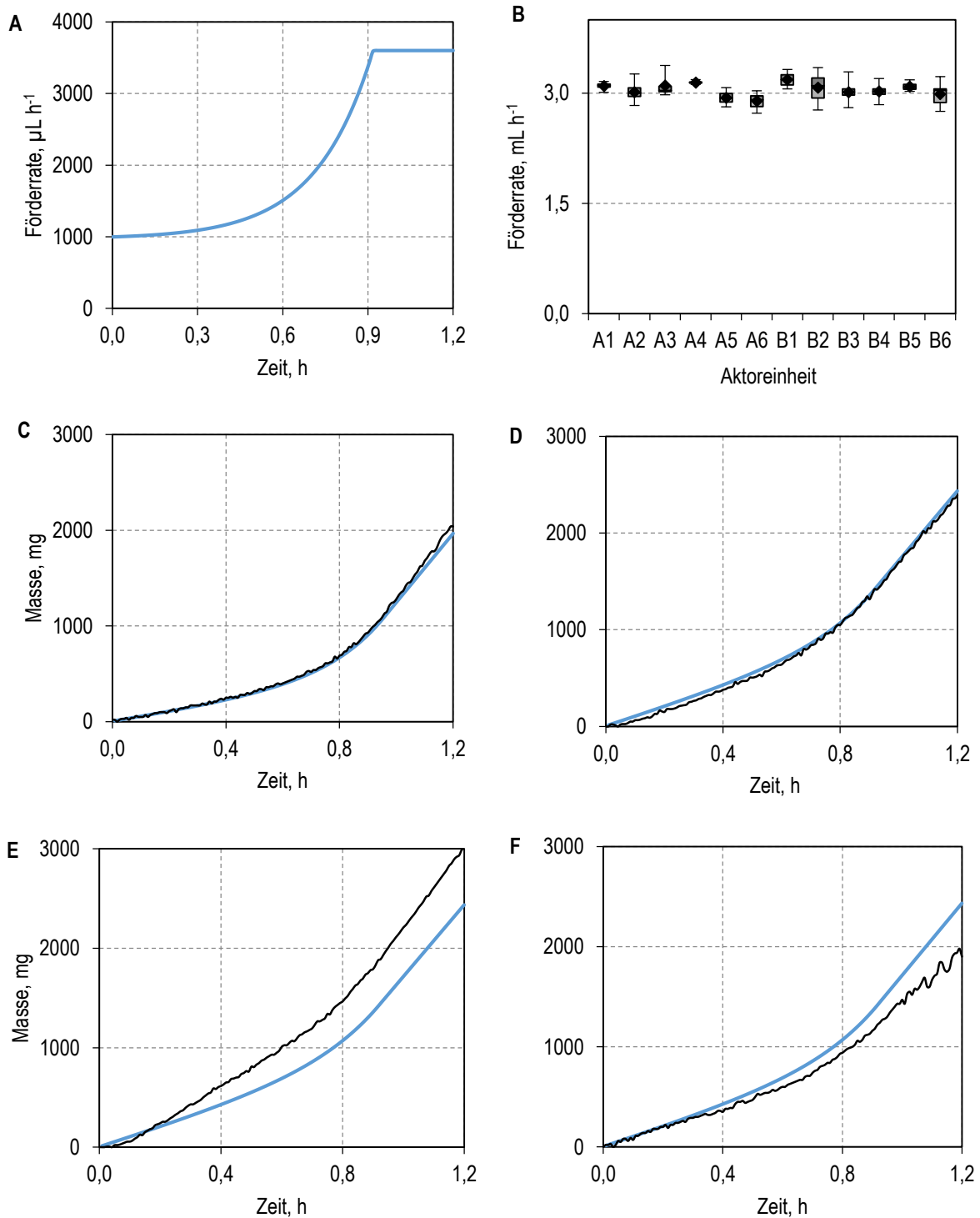


Abbildung 5.11: A: Verlauf eines exponentiellen Dosierprofils bis zu einer maximalen Förderleistung, von $3600 \mu\text{L h}^{-1}$. B: Boxplot Darstellung der Förderleistungen der kalibrierten Pumpen für die Förderung von exponentiellen Dosierprofilen. C: Median der 5-fachen Messung an Position A1 mit Förderleistungen von 500 bis $3600 \mu\text{L h}^{-1}$. D: Median der 10-fachen Messung an Position A4 mit Förderleistungen von 1000 bis $3600 \mu\text{L h}^{-1}$. E: Median der 10-fachen Messung an Position B1 mit Förderleistungen von 1000 bis $3600 \mu\text{L h}^{-1}$. F: Median der 9-fachen Messung an Position B3 mit Förderleistungen von 1000 bis $3600 \mu\text{L h}^{-1}$. Neben den experimentell ermittelten Werten (—), ist in jedem Diagramm noch der theoretisch berechnete optimale Kurvenverlauf (—) abgebildet.

5.7.3 Diskussion

Bei Förderraten unterhalb von $1000 \mu\text{L h}^{-1}$ konnte oftmals keine Massezunahme beobachtet werden. Dies könnte mit einem Füllen etwaiger leerer Dosierstrecken und Injektoren bei Start der Dosierung erklärt werden, dem widerspricht jedoch, dass die Mikrodosiereinheit vor jeder Förderung befüllt wurde bis an jeder Position Flüssigkeit aus dem Injektor austrat.

Bei höheren Förderraten zeigte sich, dass die Kalibrierung einiger Positionen nicht genau genug war und die Messwerte reproduzierbar von den Sollwerten abwichen. So zeigt Position B1 in Abbildung 5.11 B nach der Kalibrierung immer noch eine im Vergleich zum Sollwert von $3,0 \text{ mL h}^{-1}$ leicht erhöhte Förderrate, welche jedoch mit Ausnahme der höheren Standardabweichung mit der von Position A1 und A4 vergleichbar ist. Warum dieser vergleichsweise geringe Unterschied in der Kalibrierung nur an dieser Position so deutliche Auswirkungen bei der Förderung des exponentiellen Dosierprofils hat, ist daher unklar.

Anhand dieser Messungen wurde deutlich, dass die Mikropumpen für die Förderung von exponentiellen Dosierprofilen nicht zuverlässig genug arbeiten. Insbesondere die häufigen Ausfälle unterhalb $1000 \mu\text{L h}^{-1}$ sind für den Prozesseinsatz, bei dem Förderraten zwischen 50 und $500 \mu\text{L h}^{-1}$ benötigt werden, nicht tragbar.

5.8 Messung der Förderraten im Mehrkanalbetrieb

5.8.1 Förderraten einzeln betriebener Kanäle

Um eine Beeinflussung der Förderleistung beim parallelen Betrieb von zwei Pumpen an einer Position der Mikrodosiereinheit zu messen, wurden die Pumpen an Kanal X und Z kalibriert. Im Anschluss wurde die Förderrate der Pumpen bei einer vorgegebenen Förderrate von 3 mL h^{-1} bei nacheinander getrennt angesteuerten Kanälen gemessen, wie in Abbildung 5.12 zu sehen.

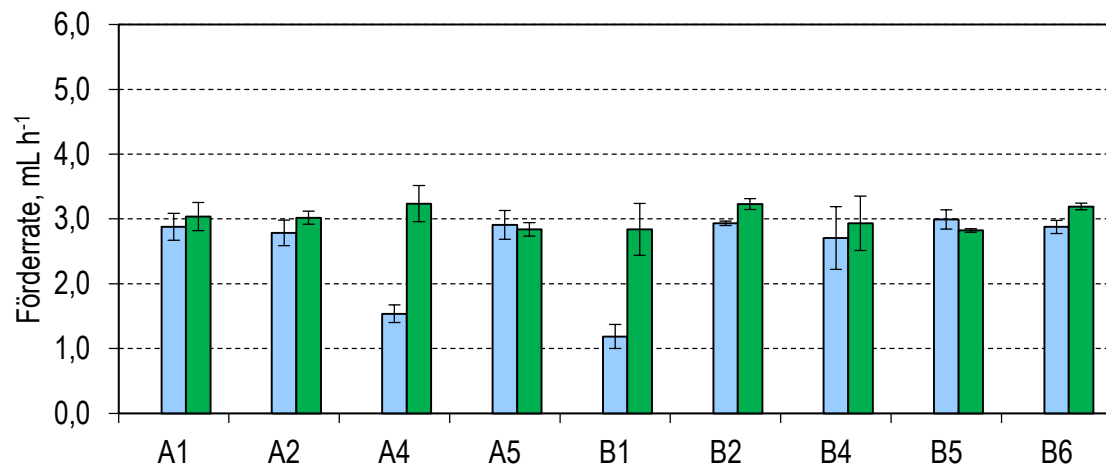


Abbildung 5.12: Letzter Schritt der getrennt voneinander durchgeführten Kalibrierung der Pumpen A1 bis B6 an Kanal X (■) und Z (■). Ergebnisse für A3, A6 und B3 sind nicht dargestellt. Kalibrierung nach Methode mit einer Messdauer von 0,7 h. Mittelwert und Fehlerbalken aus drei Messungen mit endgültigem Kalibrierfaktor.

Hier zeigte sich, dass an den Positionen A4 und B1 an Kanal X aufgrund eines bei der Montage zu gering ausgefallenen Hubvolumens im Rahmen des für die Kalibrierung zu Verfügung stehenden Frequenzbereichs bis 2 Hz nicht die geforderte Förderleistung erreicht werden konnte. Da die unmagnetische Flussplatte bei der Messung noch nicht zur Verfügung stand fielen an den Positionen A3 und B3 jeweils eine der Pumpen durch magnetisch arretierende Aktoren aus. Position A6 fiel durch Leckage der Pumpe von Kanal Z aus, da der betroffene Injektor abgedichtet werden musste, um ein Überlaufen des Auffangbehälters zu verhindern.

5.8.2 Förderraten parallel betriebener Kanäle

Anschließend wurde die Messung der Förderraten bei mit 3 mL h^{-1} betriebenen Pumpen bei gleichzeitig angesteuerten Kanälen wiederholt, wie in Abbildung 5.13 zu sehen. Hier zeigten sich deutlich Abweichungen zu den mit einzeln angesteuerten Kanälen ermittelten Förderraten. Besonders auffällig sind die Abfälle der Förderraten der Positionen A1 und A2 an Kanal X. Zudem zeigen die zuvor durch Frequenzerhöhung nicht kalibrierbaren Positionen A4 und B1 deutlich erhöhte Förderraten. Auch an Kanal Z zeigen sich deutliche Abweichungen der Förderraten, so fördert Position A1 mit mehr als der anderthalbfachen Förderleistung, wogegen Position B6 komplett ausfiel.

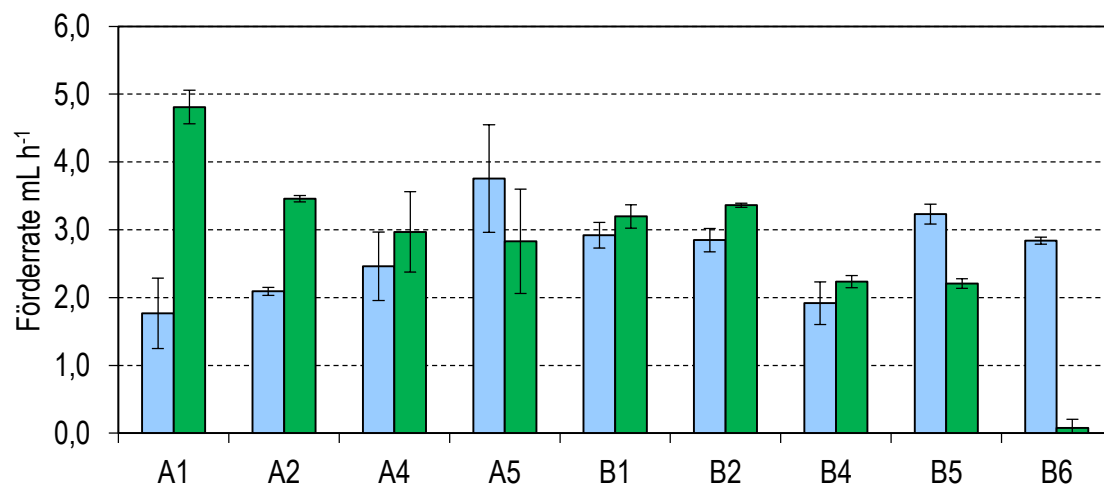


Abbildung 5.13: Förderraten im 2-Kanal-Betrieb an 9 von 12 beispielhaft ausgewählten Positionen an Kanal X (■) und Z (■). Eingestellte Sollförderrate an beiden Kanälen von $3,0 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$. Durchgeführt wurden je fünf Messungen à $0,3 \text{ h}$. Gefördertes Medium: 1xPBS in Kanal A, GFP-Lösung in Kanal C.

5.8.3 Diskussion

Noch ausgeprägter als bei der Aufzeichnung der Exponentialprofile zeigten sich beim gleichzeitigen parallelen Betrieb von zwei Kanälen die Nachteile der Vordruckempfindlichkeit des Systems. So wurden von Leckage, über deutlich schwankende Förderraten bis hin zu nicht fördernden Positionen, Ergebnisse verzeichnet, die den Anforderungen für den Bioprozesseinsatz nicht gerecht werden.

5.9 Charakterisierung der Vordruckempfindlichkeit der Lippenrückschlagventile

5.9.1 Ergebnisse

In vorangegangenen Messungen (Kapitel 5.4) hatte sich eine Beeinflussung der Förderraten durch den hydrostatischen Vordruck aufgrund des Höhenunterschieds zwischen dem Flüssigkeitsstand im Vorlagegefäß und der Mikrodosiereinheit gezeigt. Daher wurde diese mit einem leichten hydrostatischen Überdruck betrieben. Hierbei zeigte die Messung der Förderraten schon bei geringen Druckunterschieden im Bereich von 0 bis 10 mbar unterschiedliche Ergebnisse sowie unkontrolliert austretende Flüssigkeit aus Injektoren mit nicht fördernden Pumpen.

Um einen definierten Vordruck einstellen zu können wurde daher ein Druckregler für den Bereich von 2,5 bis 50 mbar zwischen Vorlagebehälter und Mikrodosiereinheit angeschlossen. Um die Drucktoleranz der Mikrodosiereinheit zu erhöhen, wurden neue Lippenrückschlagventile aus Silikon mit einer Härte von 70 ° Shore A und oder aus EPDM mit einer Härte von 50 ° Shore A und erhöhtem Elastizitätsmodul gemeinsam mit den bisher verwendeten Ventilen aus Silikon mit einer Härte von 50 ° Shore A genauer charakterisiert.

Um zu bestimmen bis zu welchem Vordruck die mit Shore Härte 70 Silikonventilen bestückte Mikrodosiereinheit dicht ist, wurde mit Hilfe des Druckreglers für jeweils 5 Stunden ein Vordruck von 5 mbar, 15 mbar und 25 mbar an jeweils 12 Positionen von Kanal X und Z angelegt. Wie Abbildung 5.14 zeigt, konnte dabei an beiden Kanälen anhand der Gewichtsabnahme des Vorlagebehälters eine Leckage der nicht angesteuerten Ventile beobachtet werden. Da diese aus dem härtesten verfügbaren Material gefertigten Ventile bereits bei der ersten Druckstufe von 5 mbar eine Leckage an beiden Kanälen zeigten, wurde für die weitere Charakterisierung der mit dem Regler minimal einstellbare Vordruck von 2,5 mbar gewählt.

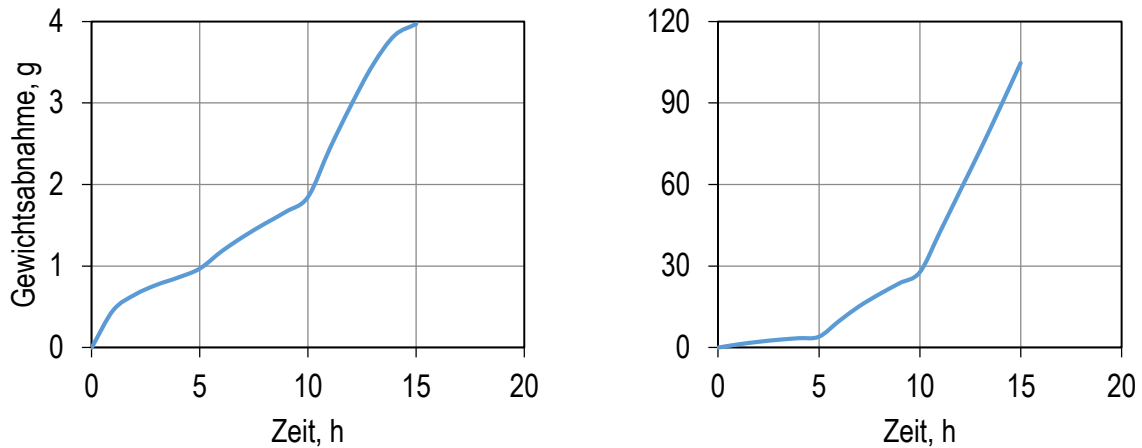


Abbildung 5.14: Darstellung der bei den Druckstufen gemessenen Gewichtsabnahme im Vorlagebehälter für Kanal X nach 20 Betriebsstunden und Kanal Z nach 45 Betriebsstunden mit je 12 angeschlossenen Positionen. Mit Hilfe des Druckreglers wurde je fünf Stunden ein Vordruck von 5 mbar, 15 mbar und 25 mbar eingestellt. Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf der Gewichtsabnahme des Vorlagebehälters.

Abbildung 5.15 bis Abbildung 5.17 zeigen, dass alle untersuchten Ventile bereits bei 2,5 mbar Vordruck unkontrolliert auslaufen. Die Leckagen treten stochastisch verteilt an einer oder mehreren der 12 beispielhaft untersuchten Positionen auf. Auch innerhalb der Messungen an einer Position variieren die Leckageraten, wobei kein Zusammenhang mit der Anzahl der Betriebsstunden oder Befüllvorgänge beobachtet werden kann.

Die beiden Lippenrückschlagventile aus Silikon und EPDM mit 50° Shore A Härte 50 zeigten die höchsten Leckageraten. Die unkalibrierten bei einer Förderrate von $500 \mu\text{L h}^{-1}$ betriebenen Pumpen mit Lippenrückschlagventilen aus Silikon mit 50° Shore A Härte zeigten den Erfahrungen vorheriger Messungen entsprechende Schwankungen.

Die mit Lippenrückschlagventilen aus EPDM mit 50° Shore A Härte und erhöhtem Elastizitätsmodul bei einer Förderrate von $500 \mu\text{L h}^{-1}$ betriebenen unkalibrierten Pumpen zeigten dagegen deutlich mehr ausfallende Positionen bei den Messungen. Sechs der Neun fördernden Positionen zeigten zudem auf über 180% erhöhte Förderraten.

Die Lippenrückschlagventile aus Silikon mit 70° Shore A Härte zeigten insgesamt die geringsten Leckageraten. Dies spiegelte sich auch in den mit unkalibrierten Pumpen ermittelten Förderraten wider. So zeigte keine der 36 untersuchten Positionen, die auf eine Leckage hindeutenden, stark überhöhten Förderraten, wie bei der Verwendung der weicheren Ventile.

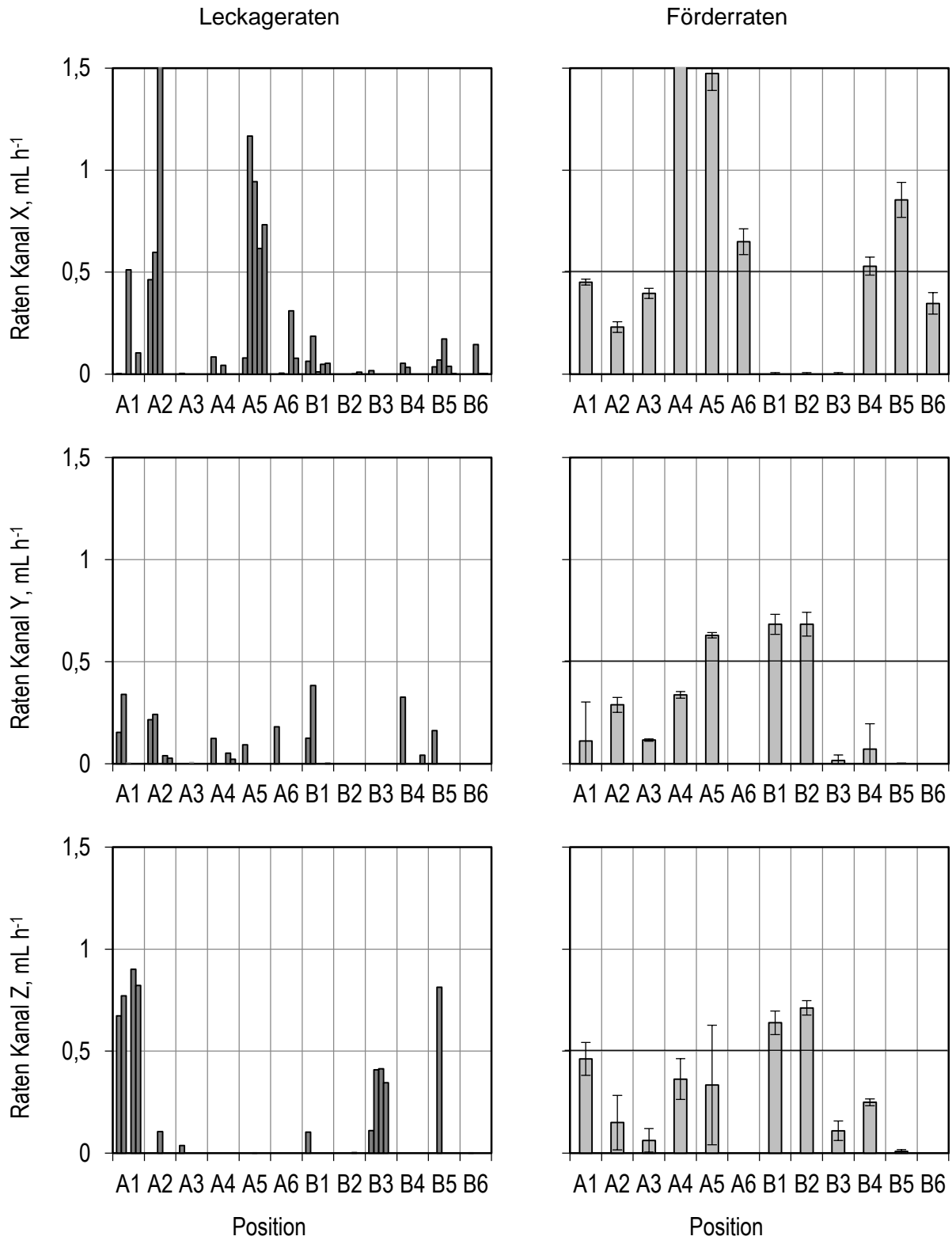


Abbildung 5.15: Links: Darstellung der fünf jeweils für jede Position über einen Zeitraum von einer Stunde nach dem Befüllen der Mikrodosiereinheit ermittelten Leckageraten. Rechts: Die in dreifach Messungen zwischen den Befüllvorgängen bestimmten Förderraten der unkalibrierten Pumpen jeweils mit Silikonventilen mit 50° Shore Härte A für Kanal X, Y und Z bei 2,5 mbar Vordruck.

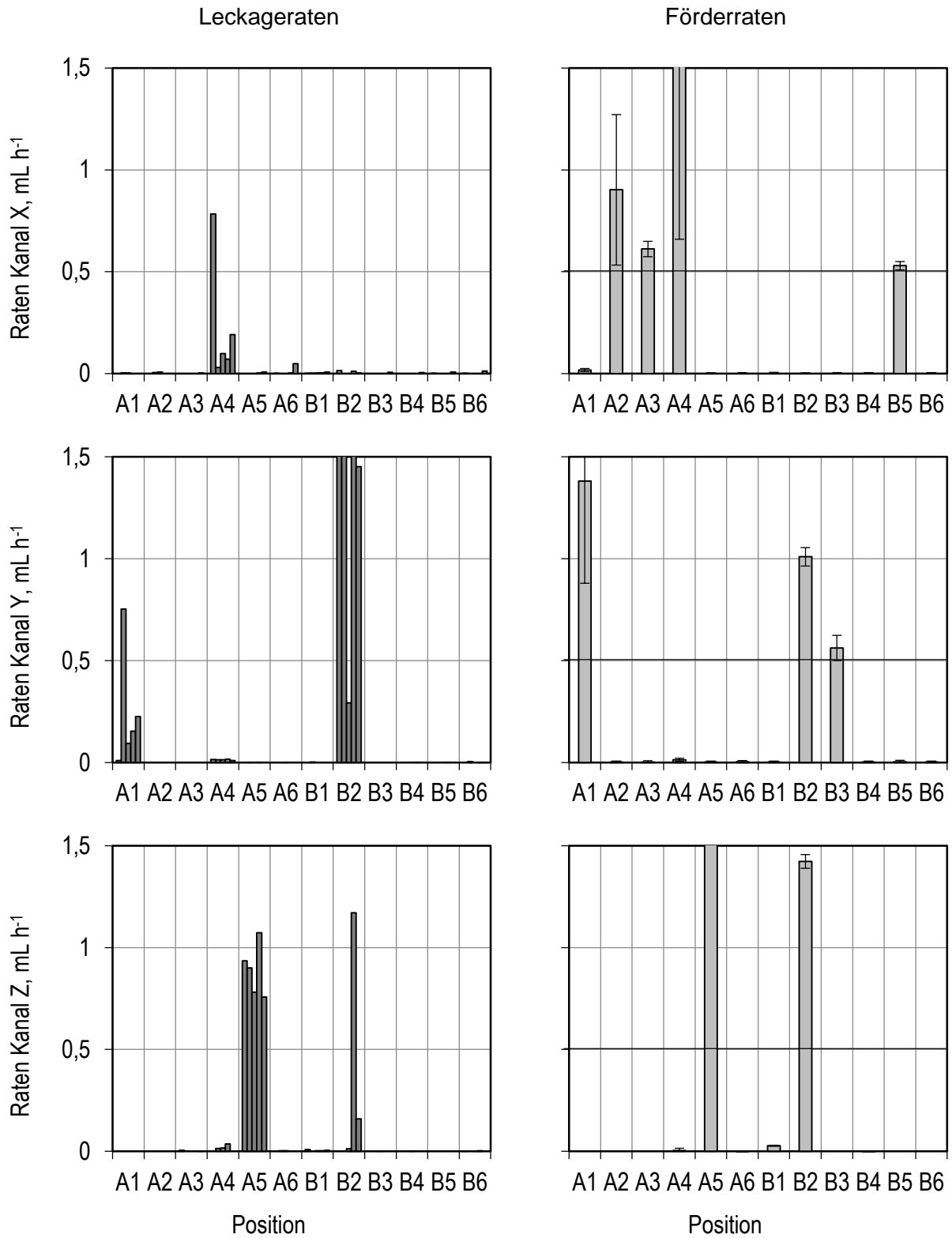


Abbildung 5.16: Links: Darstellung der fünf jeweils für jede Position über einen Zeitraum von einer Stunde nach dem Befüllen der Mikrodosiereinheit ermittelten Leckageraten. Rechts: Die in dreifach Messungen zwischen den Befüllvorgängen bestimmten Förderraten der unkalibrierten Pumpen jeweils mit EPDM-Ventilen mit 50° Shore Härte A für Kanal X, Y und Z bei 2,5 mbar Vordruck.

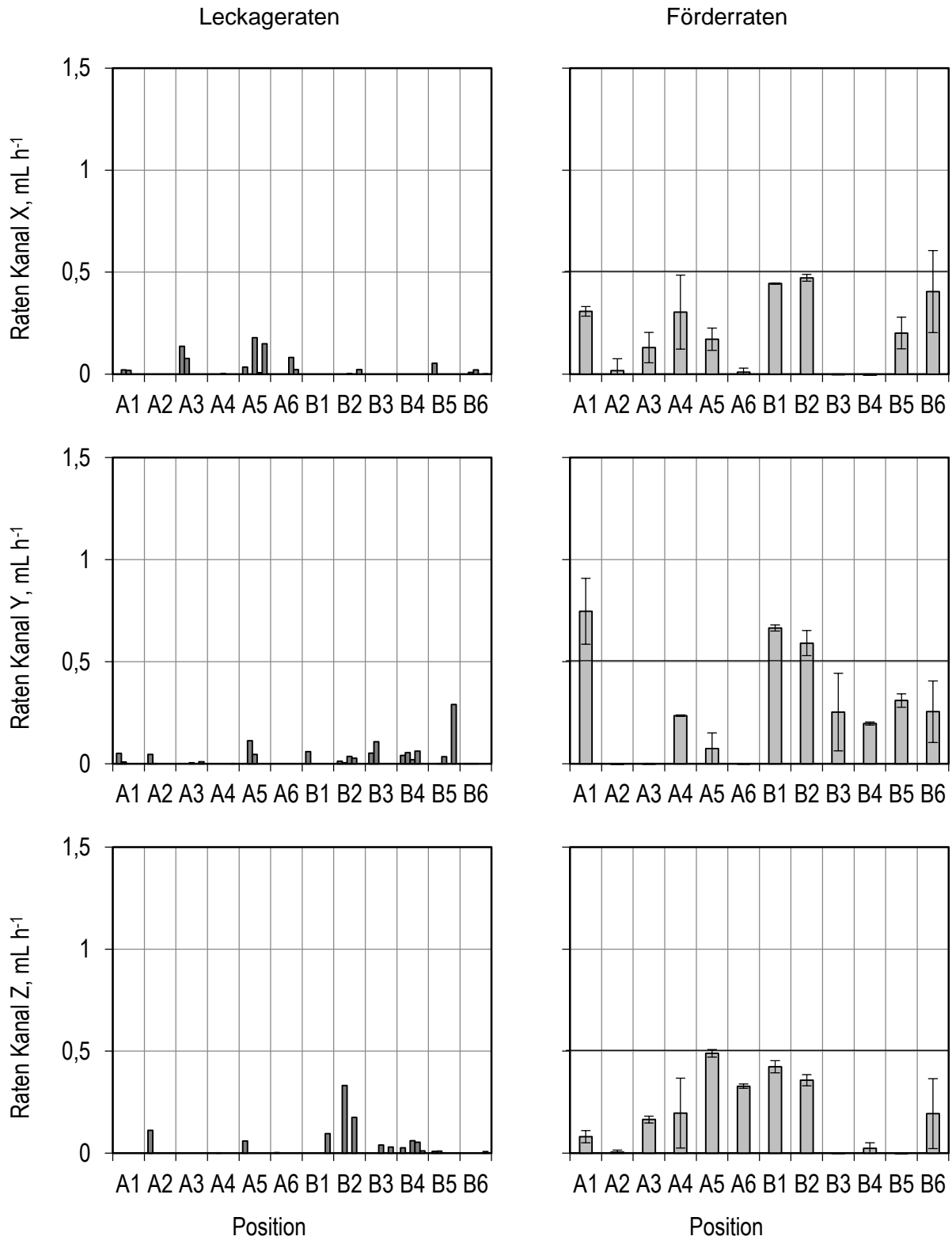


Abbildung 5.17: Links: Darstellung der fünf jeweils für jede Position über einen Zeitraum von einer Stunde nach dem Befüllen der Mikrodosiereinheit ermittelten Leckgeraten bei 2,5 mbar Vordruck. Rechts: Die in dreifach Messungen zwischen den Befüllvorgängen bestimmten Förderraten bei 5,0 mbar Vordruck der unkalibrierten Pumpen jeweils mit Silikonventilen mit 70° Shore Härte A für Kanal X, Y und Z.

5.9.2 Diskussion

In vorangegangenen Arbeiten (Gebhardt *et al.*, 2011) wurde die Funktionsfähigkeit des ursprünglichen Prototyps der Mikrodosiereinheit anhand des Hubvolumens der Pumpen, also dem beim einmaligen Eindrücken der Pumpenmembran geförderten Volumens, charakterisiert. Dabei wurde der Frequenzbereich von 0,5 bis 2,0 Hz untersucht. Hier wurde bereits bei Frequenzen unterhalb 1,25 Hz ein Anstieg des Dosierfehlers beobachtet. Daher wurde der Betriebsbereich der Pumpen auf 1,25 bis 2,0 Hz festgelegt, was bei dem angegebenen durchschnittlichen Hubvolumen von 1,6 μL einer Förderrate von 7,2 mL h^{-1} bis 11,5 mL h^{-1} entspricht. Das Auftreten oder eine Messung von Leckageraten ist nicht dokumentiert.

Diese Ergebnisse stellen dennoch keinen Widerspruch mit den neu gewonnen Erkenntnissen bei der Charakterisierung der Vordruckempfindlichkeit der Lippenrückschlagventile dar. So geht aus der Funktionsweise der Lippenrückschlagventile wie in Abbildung 5.18 hervor, dass diese nur einen Volumenstrom in eine Richtung zulassen. Bei einem negativen Vordruck schließen und bei einem positiven Vordruck öffnen die Ventile nach Überschreiten der Druckschwelle selbstständig. Wie in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, herrscht bei Betrieb der Membranpumpen in der Pumpkammer ein ständiger Wechsel zwischen Über- und Unterdruck. Entsprechend schließen Einlassventil und Auslassventil ebenfalls in ständigem Wechsel, wobei die Ventillippen durch die Druckdifferenz aufeinandergepresst werden.

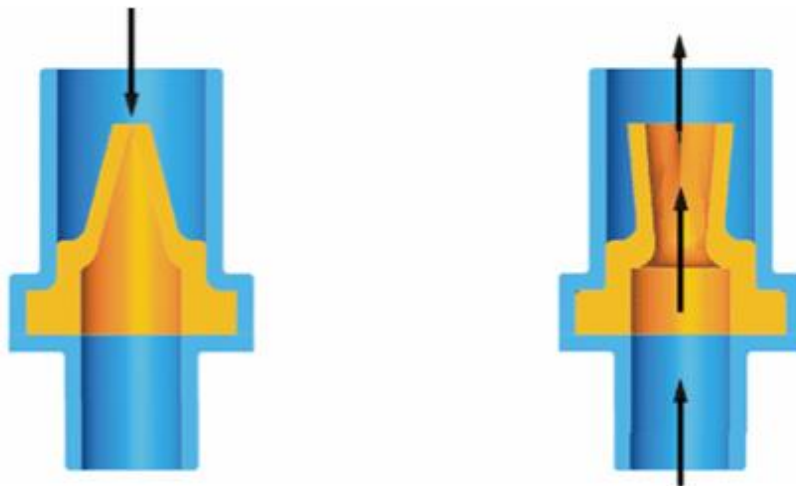


Abbildung 5.18: Funktionsprinzip des Lippenrückschlagventils der Firma miniValve bei dem der Durchfluss von Fluiden nur in eine Richtung möglich ist (miniValve, 2010)

Da die verwendeten Lippenrückschlagventile aufgrund der bei der Herstellung verwendeten Gussform einen minimalen permanent geöffneten Spalt zwischen den Ventillippen besitzen, (persönliche Kommunikation der Firma miniValve) kann durch dieses Aufeinanderpressen der Ventillippen der Dichtschluss der Ventile verbessert werden. Wie Abbildung 5.19 für ein mit Gas durchströmtes Lippenrückschlagventil der Firma miniValve zeigt, kommt es bei geringen Unterdrücken bis etwa -10 mbar, entgegen des theoretischen Funktionsprinzips, zu einem

negativen Volumenstrom, also einem Rückfluss durch das Ventil. Erst mit weiter abfallendem Druck und damit steigender Druckdifferenz, welche die Ventillippen aufeinanderpresst, wird das Ventil weiter geschlossen und der Rückfluss nimmt ab.

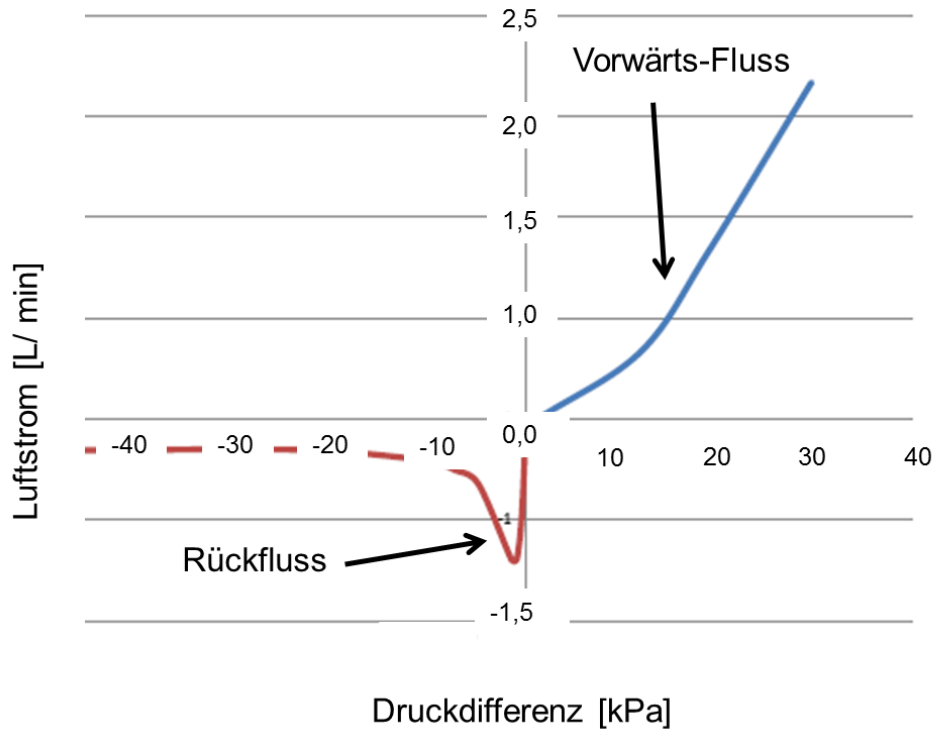


Abbildung 5.19: Strömungsverhalten von Luft durch ein Lippenrückschlagventil der Firma miniValve bei Über- und Unterdruck (miniValve, mod. Poschenrieder, 2012).

Folglich dichten die Lippenrückschlagventile der Mikro-Membranpumpen bei höheren Förderraten und der damit steigenden Frequenz der Pumpzyklen besser. Im Ruhezustand der Pumpen kommt es jedoch in der Pumpkammer zu einem Druckausgleich und die Ventillippen werden nicht mehr zusammengepresst. Nun ist aufgrund des fertigungsbedingten Spalts zwischen den Ventillippen selbst bei einem Vordruck von 2,5 mbar die gemessene Leckage der Pumpen messbar.

Dies erklärt, wieso die Mikro-Membranpumpen in den vorangegangenen Arbeiten (Gebhardt *et al.*, 2011) bei hohen Förderraten mit Frequenzen von 1,25 Hz und 2,0 Hz geringe Standardabweichungen und ähnliche berechnete Hubvolumen zeigten. Die zunehmenden Schwankungen der berechneten Hubvolumen bei Frequenzen unterhalb 1,0 Hz könnten mit den länger im Ruhezustand befindlichen Pumpen und den damit schlechter abdichtenden Ventilen erklärt werden. Damit kann es je nach anliegendem Vordruck zu einem unkontrollierten erhöhten Flüssigkeitsaustritt oder durch einen Rückfluss in der Pumpe bedingten verminderten Flüssigkeitsaustritt kommen. Über die Berechnung des Hubvolumens aus der geförderten Flüssigkeitsmenge und der Frequenz könnte es zu der Interpretation gekommen sein, dass dieses bei niedrigen Frequenzen schwankt.

Für den Bioprozesseinsatz der Mikrodosiereinheit sind jedoch gerade die niedrigen Frequenzen unterhalb 0,5 Hz für Förderraten von $50 \mu\text{L h}^{-1}$ bis $500 \mu\text{L h}^{-1}$ von Interesse. Hier stören die selbst bei 2,5 mbar Vordruck und Silikonventilen mit 70° Shore A Härte auftretenden Leckageraten eine sichere Dosierung. Um auch bei diesen niedrigen Förderraten zuverlässig arbeiten zu können, ist daher der Dichtschluss der nicht fördernden Pumpen von höchster Priorität. So darf zum Beispiel während der anfänglichen Satzphase eines Bioprozesses keine Glukoselösung aus den Injektoren austreten. Aufgrund des geringen Maßstabs im 10 mL System besitzen hier bereits kleinste Volumenströme relativ großen Einfluss auf den Prozessverlauf.

5.10 Autoklavierbarkeit

5.10.1 Einfluss auf die Förderraten der Pumpen

Die mit 70° Shore A harten Silikonventilen bestückte Mikrodosiereinheit wurde für die Untersuchung der Autoklavierbarkeit benutzt. Hierfür wurden 12 Positionen an Kanal Z der Dosiereinheit zunächst mit einer Sollförderrate von $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ bei 2,5 mbar Vordruck kalibriert. Vor und nach dem Autoklavieren wurden die Förderraten bei $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ in 4 Messungen, sowie die Leckageraten bei nicht fördernden Pumpen in 3 Messungen von je einer Stunde bestimmt. Abbildung 5.20 und Abbildung 5.21 zeigen die Mittelwerte und Standardabweichung der Messungen. Wie in Abbildung 5.21 zu sehen, waren nach dem ersten Autoklavierzyklus die Förderraten aber auch die Leckageraten an allen Positionen gesunken.

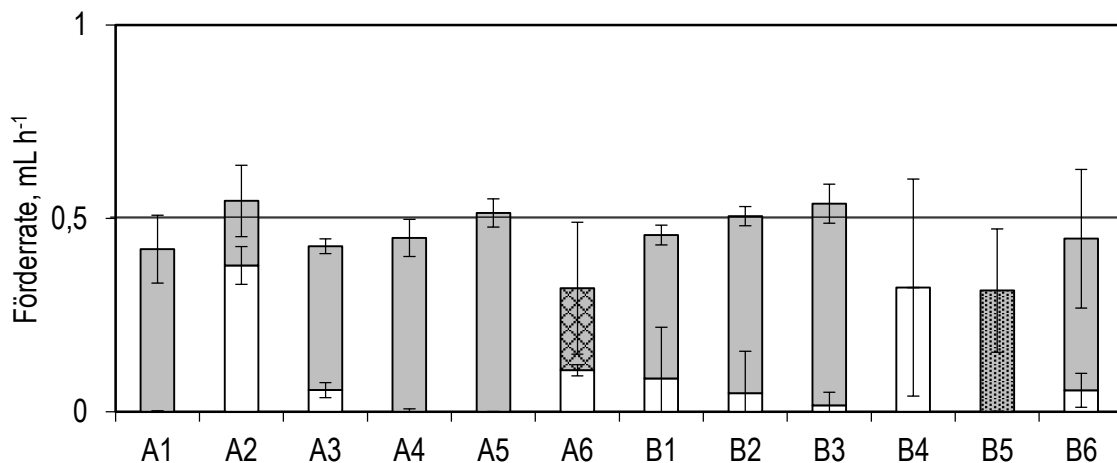


Abbildung 5.20: Förderraten bei $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ Sollwert und Leckageraten an 12 kalibrierten Positionen von Kanal Z der Mikrodosiereinheit vor dem ersten Autoklavieren. Hierbei gibt der nicht gefüllte Bereich der Balken die Leckageraten bei ruhenden Pumpen und die Schraffur des Balkens die Zuverlässigkeit der Pumpen an. Grau steht für 100%, Streifen für 75%, Rauten für 50% und Punkte für 25% Zuverlässigkeit.

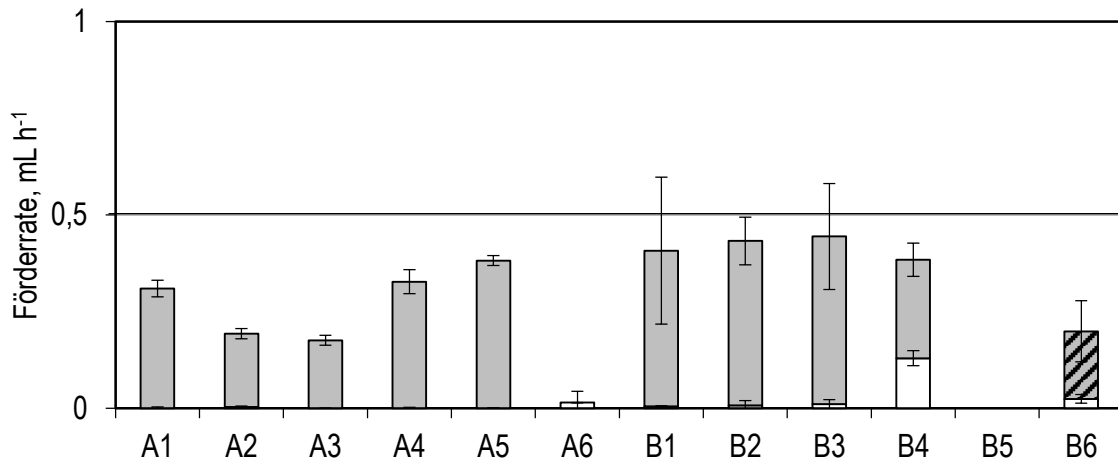


Abbildung 5.21: Förderraten bei $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ Sollwert und Leckageraten an 12 kalibrierten Positionen von Kanal Z der Mikrodosiereinheit nach dem ersten Autoklavieren. Hierbei gibt der nicht gefüllte Bereich der Balken die Leckageraten bei ruhenden Pumpen und die Schraffur des Balkens die Zuverlässigkeit der Pumpen an. Grau steht für 100%, Streifen für 75%, Rauten für 50% und Punkte für 25% Zuverlässigkeit.

Daher wurde die Mikrodosiereinheit basierend auf den nach dem ersten Autoklavieren ermittelten Förderraten einmal nachkalibriert und erneut autoklaviert. Abbildung 5.22 und Abbildung 5.23 zeigen die gemessenen Förderraten der nachkalibrierten Dosiereinheit vor und nach dem zweiten Autoklavieren.

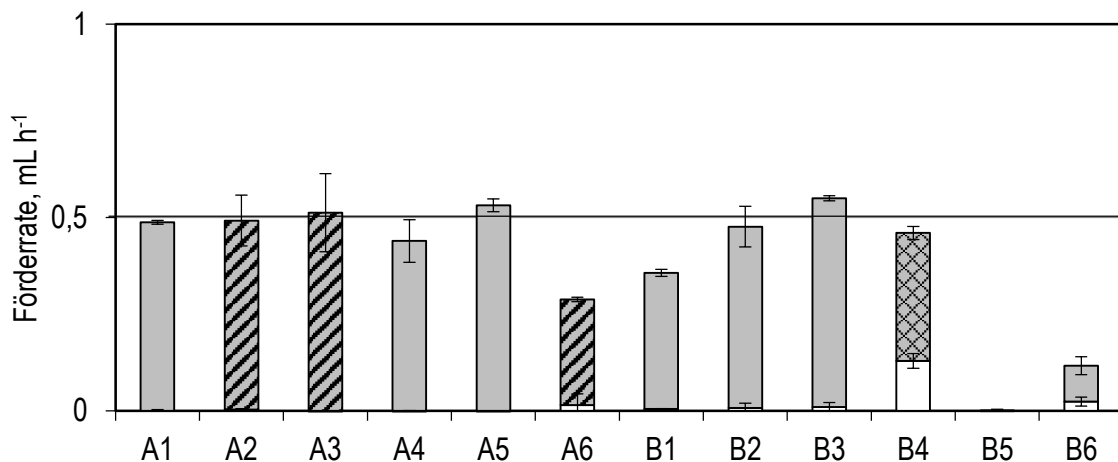


Abbildung 5.22: Förderraten bei $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ Sollwert und Leckageraten an 12 kalibrierten Positionen von Kanal Z der Mikrodosiereinheit vor dem zweiten Autoklavieren. Hierbei gibt der nicht gefüllte Bereich der Balken die Leckageraten bei ruhenden Pumpen und die Schraffur des Balkens die Zuverlässigkeit der Pumpen an. Grau steht für 100%, Streifen für 75%, Rauten für 50% und Punkte für 25% Zuverlässigkeit.

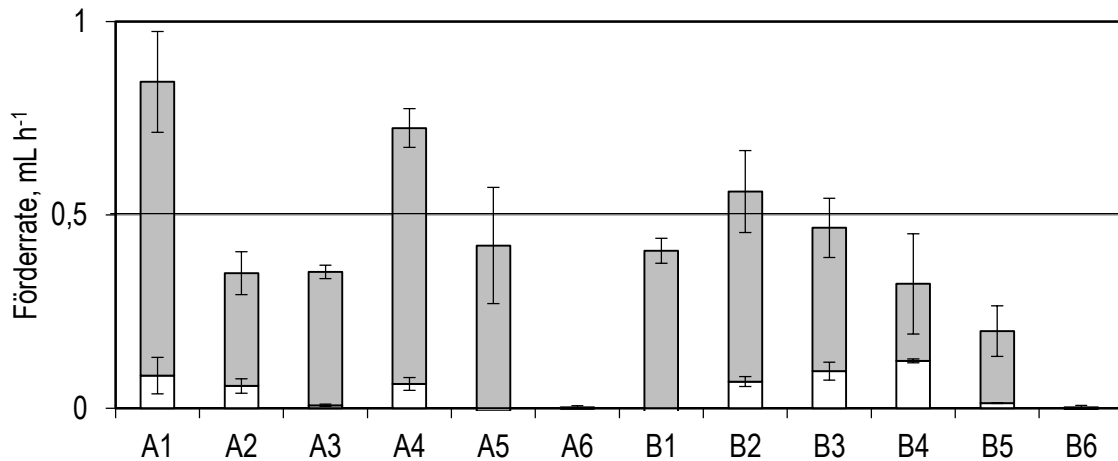


Abbildung 5.23: Förderraten bei $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ Sollwert und Leckageraten an 12 kalibrierten Positionen von Kanal Z der Mikrodosiereinheit nach dem zweiten Autoklavieren. Hierbei gibt der nicht gefüllte Bereich der Balken die Leckageraten bei ruhenden Pumpen und die Schraffur des Balkens die Zuverlässigkeit der Pumpen an. Grau steht für 100%, Streifen für 75%, Rauten für 50% und Punkte für 25% Zuverlässigkeit.

Nach dem zweiten Autoklavierzyklus fielen die Förderraten und Leckageraten entgegen der Beobachtungen beim ersten Autoklavierzyklus nur an einigen Positionen ab. An anderen Positionen stiegen die gemessenen Förderraten, so dass nach dem Autoklavieren alle Positionen teilweise deutlich mehr als 10 % von der eingestellten abwichen. Unabhängig davon nahmen auch die Leckageraten an einigen Positionen zu und fielen an anderen ab. Diese Messungen wurden mehrfach wiederholt und die Mikrodosiereinheit im Laufe der Messungen 15 mal autoklaviert.

Wie Abbildung 5.24 dargestellt kommt es auch nach insgesamt 15 Autoklavierzyklen immer noch zu stochastischen Schwankungen der Förderraten und Leckageraten. Eine Verringerung der Abweichungen, welche auf einen Spannungsabbau durch das Setzen der Bauteile hinweisen würden, konnte nicht beobachtet werden. Mit Ausnahme des ersten Autoklaviervorgangs, der zu reduzierten Leckageraten und damit auch einer besseren Kalibrierung geführt hat, konnte während der ganzen Messreihe keine Stabilisierung des Systems beobachtet werden.

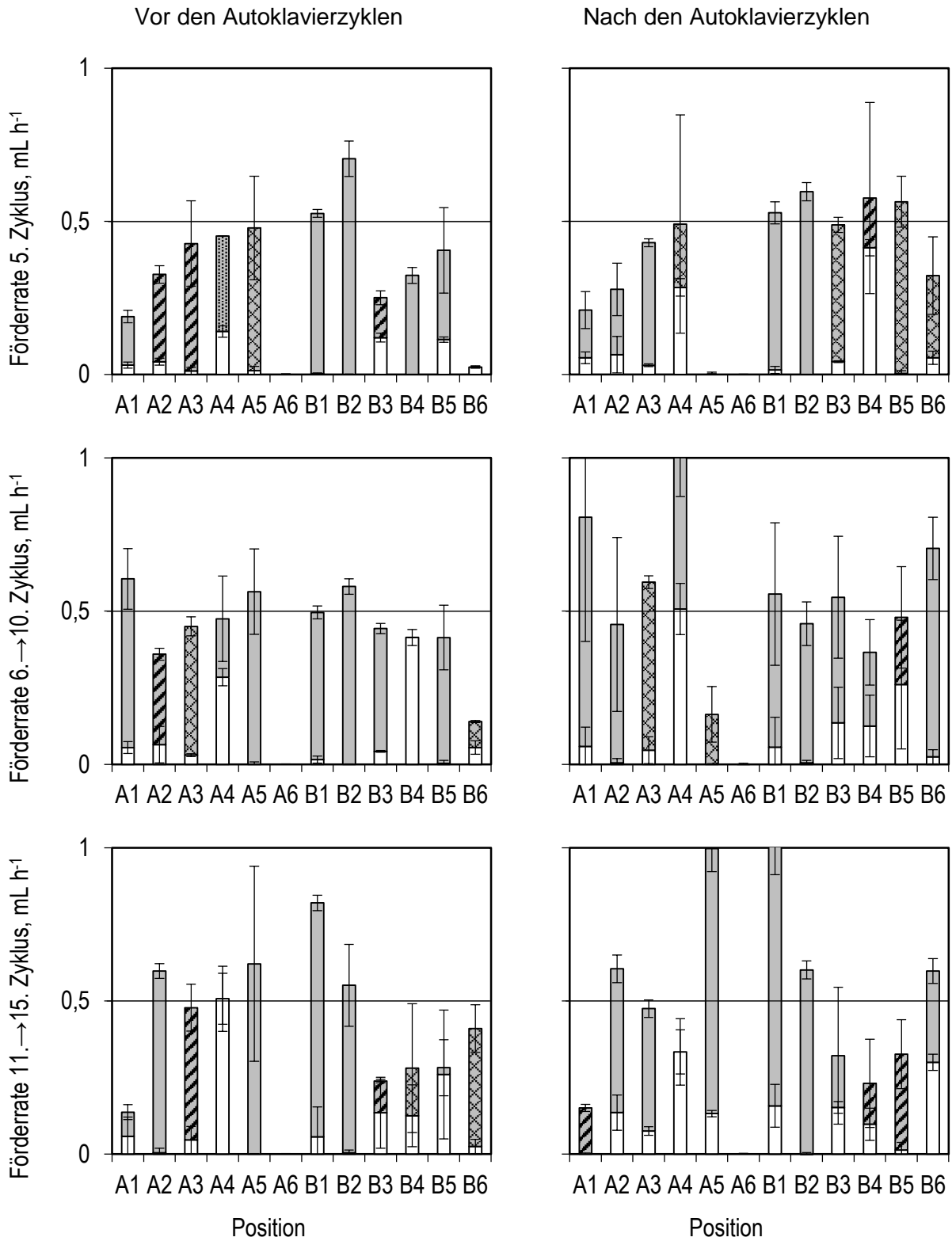


Abbildung 5.24 Förderraten bei $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ Sollwert und Leckageraten vor und nach dem 5. Autoklavierzyklus, vor dem 6. und nach dem 10. Autoklavierzyklus, sowie vor dem 11. und nach dem 15. Autoklavierzyklus. Hierbei gibt der nicht gefüllte Bereich der Balken die Leckageraten bei ruhenden Pumpen und die Schraffur des Balkens die Zuverlässigkeit der Pumpen an. Grau steht für 100%, Streifen für 75%, Rauten für 50% und Punkte für 25% Zuverlässigkeit.

5.10.2 Einfluss auf die Komponenten

Nach jedem Autoklavierzyklus wurde die montierte Mikrodosiereinheit auf Beschädigungen oder Lockerung von Bauteilen überprüft. Auch der Sitz aller Schrauben wurde kontrolliert, wobei ebenfalls keine Lockerung der Verschraubung festgestellt werden konnte. Wie schon von den Begasungshauben des Parallelbioreaktorsystems bekannt ist, konnte an vereinzelt Stellen der Führungs- und Unterplatte, wo die Eloxierung des Aluminiums beschädigt war, Korrosion beobachtet werden, welche jedoch die Funktion nicht beeinträchtigte.

Nach den 15 Autoklavierzyklen wurde die Mikrodosiereinheit für eine genaue Betrachtung aller Bauteile demontiert. Hierbei zeigten die in Führungs- und Unterplatte sitzenden Schrauben weiße Ablagerungen. Auch zeigten die Anschlussstücke für die Kanäle Korrosion, welche auf mangelhaften Stahl oder dessen mangelhafte Bearbeitung schließen lässt. Abbildung 5.25 zeigt die betroffenen Bauteile.

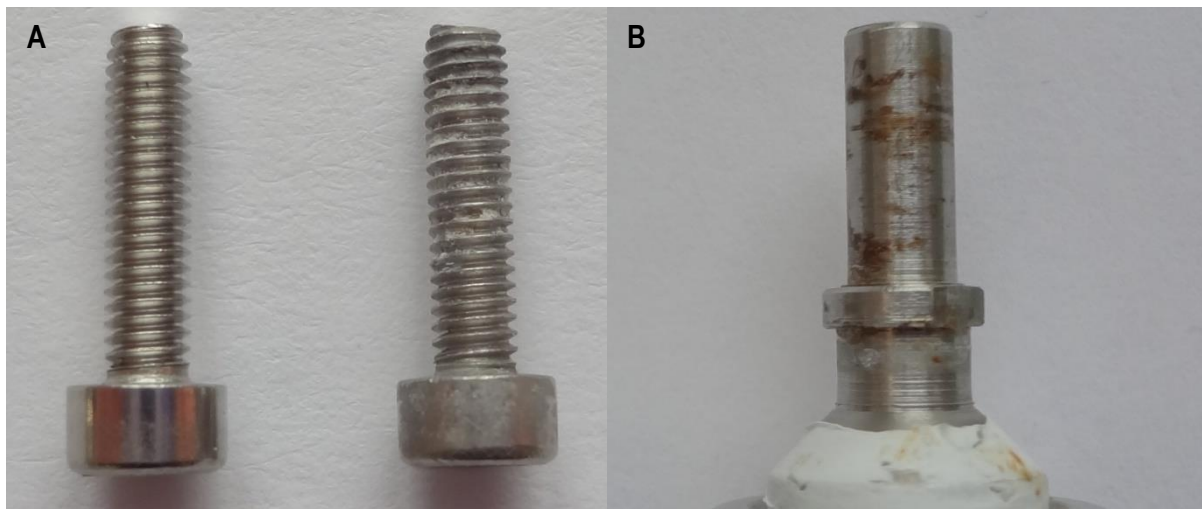


Abbildung 5.25: A: Edelstahlsschrauben ohne und mit weißen Ablagerungen, B: Anschlussstück mit Korrosion

Zudem wurde bei der erneuten Montage beobachtet, dass das Einstecken der Injektoren einen größeren Kraftaufwand erfordert. Dies könnte auf eine Veränderung der lateralen Ausdehnung des unteren Stegbleches hinweisen. Eine Beeinträchtigung der Funktion konnte jedoch nicht beobachtet werden.

5.10.3 Diskussion

Die Messung der Förderraten vor und nach den Autoklavierzyklen zeigte starke Schwankungen. Die vor dem Autoklavieren für die Pumpen bestimmten Kalibrierfaktoren konnte nach dem Autoklavieren nicht mehr verwendet werden. Daher ist die Mikrodosiereinheit für einen Bioprozesseinsatz nicht autoklavierbar.

Eine eindeutige mechanische Ursache für den negativen Einfluss der Autoklavierzyklen konnte nicht gefunden werden. Jedoch ist einzig der exakte Sitz des Hebels in seiner Ruheposition auf der Führungsplatte bis hin in seine ausgelenkte Position am Anschlagpunkt des Deckblechs für ein gleichbleibendes Hubvolumen verantwortlich. Hier ist das derzeitige

Deckblech mangelhaft, da es aus dünnem gerollt gelagertem Edelstahl gefertigt ist. Dies sorgt für eine Wölbung, welche auch durch ein mehrfaches Ausglühen nicht beseitigt werden konnte. Da das Deckblech nur mit neun Schrauben auf der Flussplatte befestigt ist, kommt es zwischen den Verschraubungen zu einer Wölbung. Diese kann aufgrund der thermischen Materialausdehnung beim Autoklavieren variieren. Daher sollte in Zukunft ein passgenaues und formhaltiges Deckblech verwendet werden. Bei diesem sollten zudem die Löcher für die hineinragenden Führungsstifte entfallen und durch Vertiefungen an der Unterseite des Blechs ersetzt werden, ebenso wie für die als Anschlagpunkte der Aktoren dienenden Langlöcher.

Nach dem Autoklavieren der Mikrodosiereinheit im wassergefüllten Autoklavierbehälter könnte Kondenswasser vom Behälterdeckel durch die Löcher im Deckblech tropfen. Gelangte dabei zu viel Wasser unter die auf der Führungsplatte aufliegenden Hebel, könnten diese aufgrund der Adhäsionskräfte nicht mehr ausgelenkt werden.

Bei den weißen Ablagerungen handelt es sich vermutlich um korrodiertes Aluminium. Wird beim Einschrauben die Eloxierung des Gewindes beschädigt, kommt es durch den Kontakt verschieden edler Metalle und den Wasserdampf zur Korrosion. Diese beeinträchtigt die Funktion nicht, kann aber auf lange Sicht die Stabilität der Bauteile gefährden. So wurde die Oberseite einer alten Begasungshaube des Parallelbioreaktorsystems aus eloxiertem Aluminium bei der Demontage zerstört, da mehrere der zylindrischen mit Innengewinden versehenen Fortsätze aufgrund fortgeschrittener Korrosion abbrachen. Durch eine dickere Eloxal-Schicht an den Gewinden könnte das Risiko einer Beschädigung beim Eindrehen der Schrauben verringert werden.

5.11 Parallele Zulaufverfahren mit *Escherichia coli*

Zusammen mit dem bisher für die Substratversorgung eingesetzten Pipettierroboter wurde die Mikrodosiereinheit für vergleichende Zulaufverfahren bei der parallelen Kultivierung von *Escherichia coli* im 10 mL-Maßstab eingesetzt. Probenahme und pH-Regelung erfolgten an allen Reaktoren über den Pipettierroboter. Die Mikrodosiereinheit wurde wie zunächst in Kapitel 4.8 und 4.9 beschrieben, kalibriert und desinfiziert. Anschließend wurde die Kultivierung wie in Kapitel 4.16 durchgeführt.

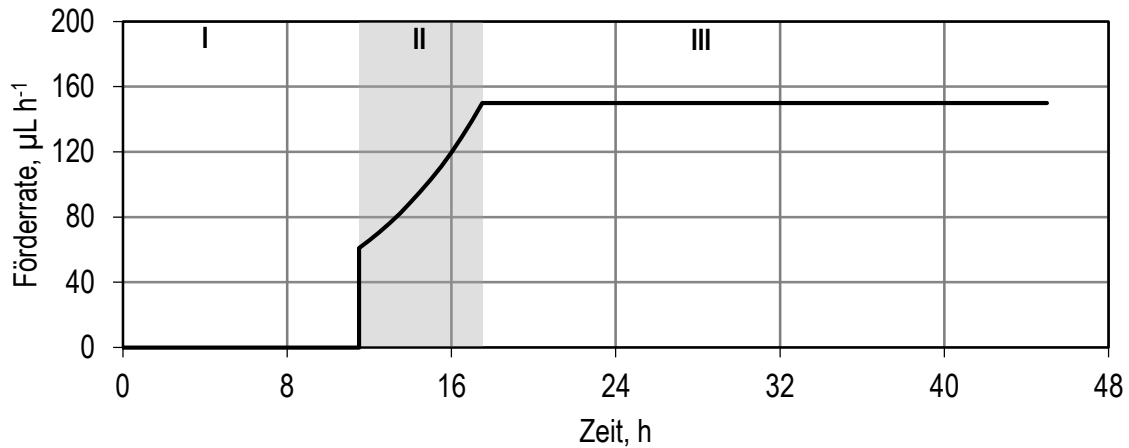


Abbildung 5.26: Dosiervprofil mit Satzphase (I), exponentiellem (II) und konstantem Zulauf (III) für die Zugabe der 500 g L^{-1} Glucoselösung mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter.

Entsprechend der Abbildung 5.26 wurde nach einer Satzphase von 11,5 h beginnend bei $61 \mu\text{L h}^{-1}$ ein exponentielles Dosiervprofil mit 500 g L^{-1} Glucoselösung gestartet, welches nach 6 Stunden in eine konstante Zulaufdosiervung von $150 \mu\text{L h}^{-1}$ überging.

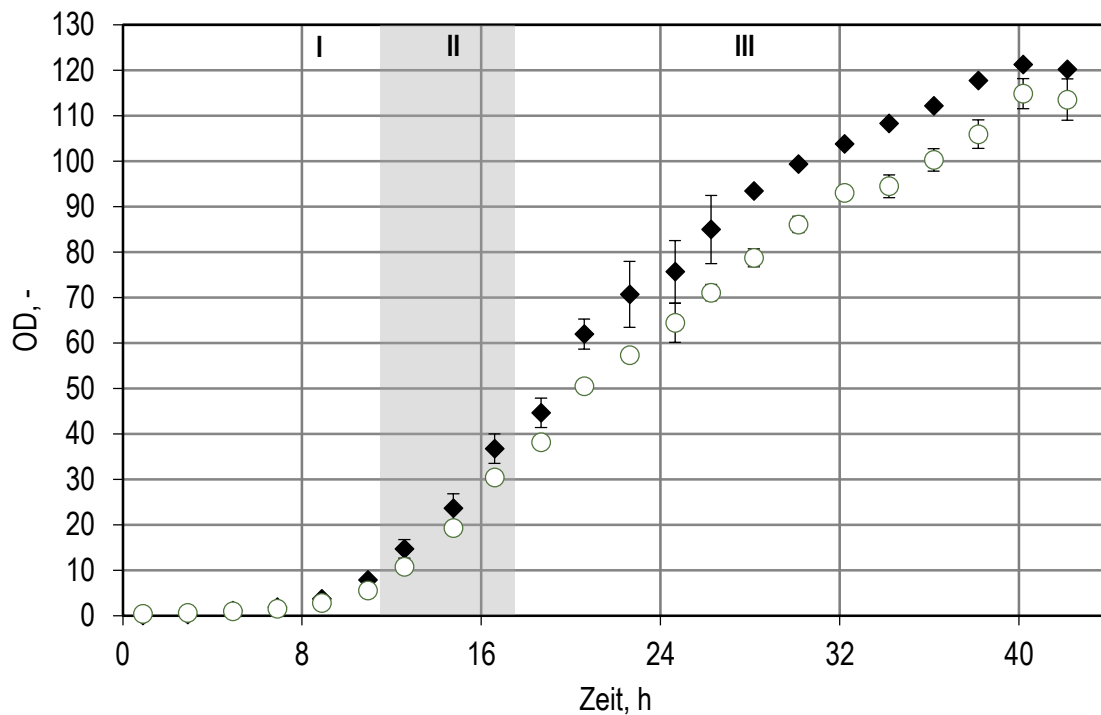


Abbildung 5.27: Vergleichende Darstellung der bei 600 nm ermittelten optischen Dichte bei der Kultivierung von *Escherichia coli* HMS174(DE3) im Parallelbioreaktorsystem mit intermittierender Substratzugabe durch den Pipettierroboter (○) und die Mikrodosiereinheit (◆). Die Zellen wachsen dabei in einer Satzphase (I) an, welche von einer exponentiellen Zulaufphase (II) gefolgt wird, die in eine konstante Zulaufphase (III) übergeht. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der vierfach Messungen an, wobei aufgrund technischer Störungen nach 26 h nur noch zwei mit der Mikrodosiereinheit versorgte Reaktoren zur Verfügung standen.

Abbildung 5.27 zeigt die erfolgreiche Kultivierung von *Escherichia coli* HMS174(DE3) in Hochzelldichteverfahren mit optischen Dichten OD_{600} von 114-121 in parallelen Rührkesselreaktoren im 10 mL-Maßstab. Dabei zeigten die von der Mikrodosiereinheit mit

Substrat versorgten Reaktoren höhere optische Dichten als die vom Pipettierroboter versorgten Reaktoren. Jedoch konnte nur an vier der zwölf angesteuerten Pumpen ein dem exponentiellen Dosierprofil entsprechendes Zellwachstum beobachtet werden, von denen zwei nach 26 h ebenfalls aufgrund technischer Störungen ausfielen.

In einer weiteren Kultivierung von *Escherichia coli* BL21(DE3) wurde das modifizierte Labormuster der Mikrodosiereinheit mit einem auf 2,5 mbar Vordruck eingestellten Druckregler eingesetzt. Vor dem Bioprozesseinsatz wurden wie in Abbildung 5.28 dargestellt, die Förderraten und Leckageraten der mit 250 g L^{-1} Glucoselösung wie in Kapitel 4.8 kalibrierten Mikrodosiereinheit bestimmt. Anschließend wurde die Mikrodosiereinheit wie in Kapitel 4.9 beschrieben mit 70% (v/v) Ethanol desinfiziert.

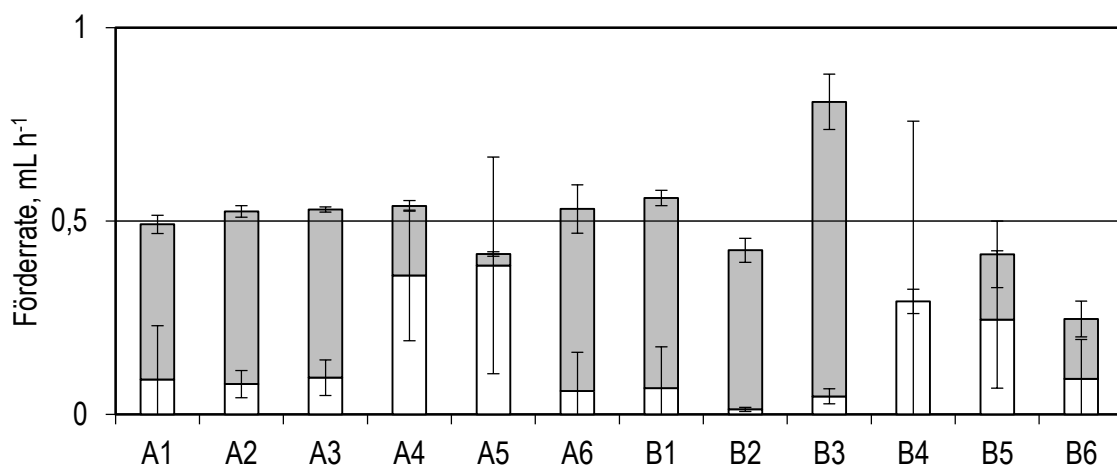


Abbildung 5.28: Förderraten und Leckageraten der 12 mit 250 g L^{-1} Glucoselösung auf $0,5 \text{ mL h}^{-1}$ Sollwert kalibrierten Pumpen mit 70° Shore A harten Silikonventilen bei 2,5 mbar Vordruck an Kanal C der Mikrodosiereinheit. Die weißen Balken stellen die ebenfalls bestimmten Leckageraten an den jeweiligen Positionen dar.

Die Kultivierung wurde mit einem 11,5 h dauernden Satzbetrieb gestartet. Anschließend wurde an 12 Positionen das in Abbildung 5.29 dargestellte angepasste Dosierprofil mit 250 g L^{-1} Glucoselösung gefördert. Vergleichend wurde dasselbe Zulaufprofil an 12 weiteren Positionen vom Pipettierroboter zudosiert. Probenahme und pH-Regelung erfolgten an allen 24 Positionen über den Pipettierroboter.

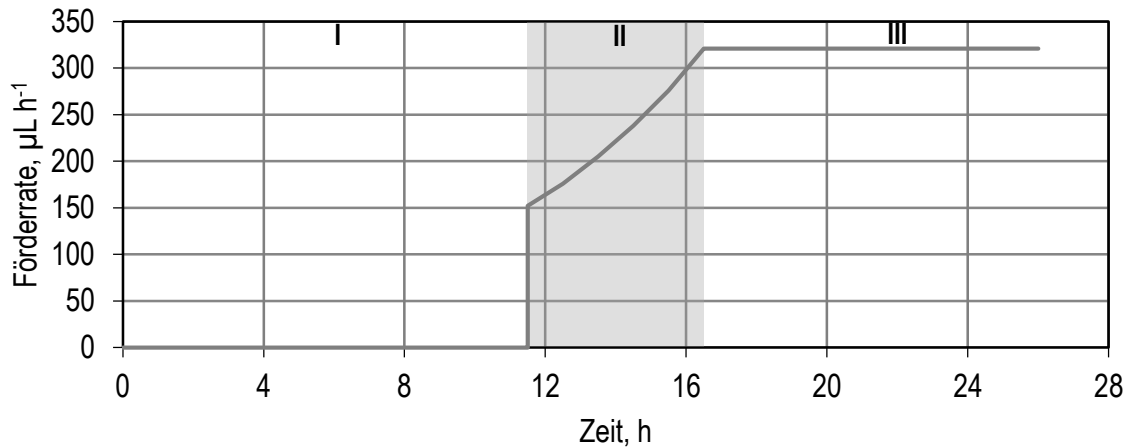


Abbildung 5.29: Dosiervprofil mit Satzphase (I), exponentiellem (II) und konstantem Zulauf (III) für die Zugabe der 250 g L^{-1} Glucoselösung mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter.

In Abbildung 5.30 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der bei 600 nm ermittelten optischen Dichte dargestellt. Vor dem Hintergrund der gemessenen Förder- und Leckageraten der kalibrierten Pumpen sind deren geringe Standardabweichung, welche mit denen der mit Pipettierroboter versorgten Reaktoren vergleichbar ist und die wiederholt höhere optische Dichte der mit der Mikrodosiereinheit versorgten Reaktoren bemerkenswert.

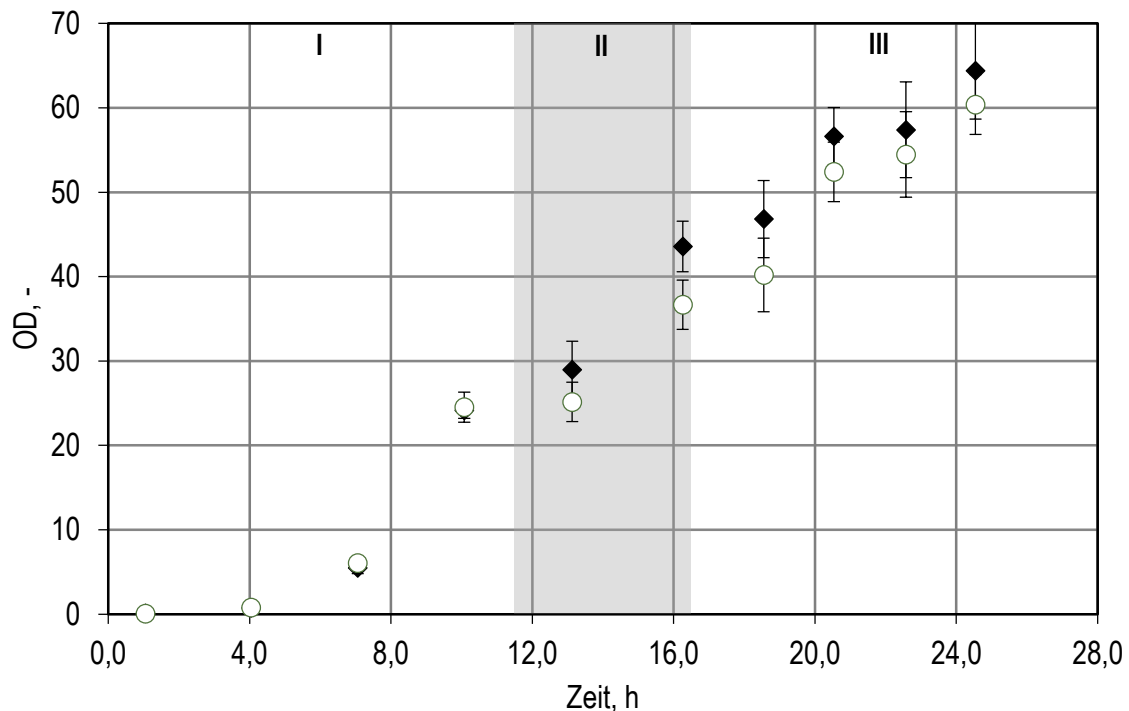


Abbildung 5.30: Vergleichende Darstellung der bei 600 nm ermittelten optischen Dichte bei der Kultivierung von *Escherichia coli* BL21(DE3) im Parallelbioreaktorsystem mit intermittierender Substratzugabe durch den Pipettierroboter (○) und der Mikrodosiereinheit (◆). Die Zellen wachsen dabei in einer Satzphase (I) an, welche von einer exponentiellen Zulaufphase (II) gefolgt wird, die in eine konstante Zulaufphase (III) übergeht. Die Fehlerbalken geben Standardabweichung der 12 mit Pipettierroboter und der 11 mit Mikrodosiereinheit versorgten Reaktoren an.

Bei der Betrachtung der Gelöstsauerstoffkonzentration zeigt sich in der Satzphase zunächst ein einheitliches Bild in allen Reaktoren, wo eine abfallende Gelöstsauerstoffkonzentration beobachtet werden kann. Nach etwa neun Stunden kann ein abrupter Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration beobachtet werden, welcher auf das Ende der Satzphase hindeutet, wie in Abbildung 5.31 oben an zwei beispielhaft ausgewählten Reaktoren ersichtlich ist. Im Anschluss an die Satzphase wird nach 11,5 Stunden das exponentielle Dosierprofil gestartet, welches nach 16,5 Stunden seine maximale Förderrate von $321 \mu\text{L h}^{-1}$ erreicht und in ein konstantes Dosierprofil übergeht. Hier zeigen sich Unterschiede in der Fluktuation der Gelöstsauerstoffkonzentration zwischen den mit Mikrodosiereinheit und Pipettierrobotern versorgten Reaktoren. Die Frequenz der intermittierenden Substratzugabe durch den Pipettierroboter betrug dabei bis zu 20 h^{-1} bei einem minimalen Dosiervolumen von $15 \mu\text{L}$. Bei genauerer Betrachtung der Gelöstsauerstoffkonzentration, wie in Abbildung 5.31 unten rechts zu sehen, kann bei den mit Pipettierroboter versorgten Reaktoren ein regelmäßiges Zackenmuster beobachtet werden, bei dem die Gelöstsauerstoffkonzentration zwischen den Substratzugaben des Pipettierroboters ansteigt, was auf eine vollständige Substratumsetzung hindeutet. Besonders ausgeprägt ist dies zu beobachten, wenn der Pipettierroboter aufgrund einer Probenahme, wie in Abbildung 5.31 gezeigt, die Substratzugabe zeitweise aussetzen muss. So betrug die durchschnittliche Frequenz der intermittierenden Substratzugabe $13,6 \text{ h}^{-1}$ bei einem durchschnittlichen Volumen von $22 \mu\text{L}$.

Im Gegensatz dazu betrug das durchschnittliche Dosiervolumen je Pumpenhub bei der Mikrodosiereinheit etwa $1,3 \mu\text{L}$. Obwohl die durchschnittliche Substratzugabe der Mikrodosiereinheit damit 17 mal geringer war als die des Pipettierroboters, konnten dennoch Fluktuationen der Gelöstsauerstoffkonzentration beobachtet werden. Jedoch zeigen die mit Mikrodosiereinheit versorgten Reaktoren ein stochastisches Rauschen mit geringeren Fluktuationen wie in Abbildung 5.31 unten links dargestellt. Bei einer Förderrate von $321 \mu\text{L h}^{-1}$ würde eine durchschnittliche Mikropumpe etwa 4,1 Pumpzyklen pro Minute durchlaufen. Da die fluorimetrischen Gelöstsauerstoffsensoren nur zweimal pro Minute ausgelesen werden, kann der tatsächliche pH-Verlauf in den mit der Mikrodosiereinheit versorgten Reaktoren nicht aufgelöst werden.

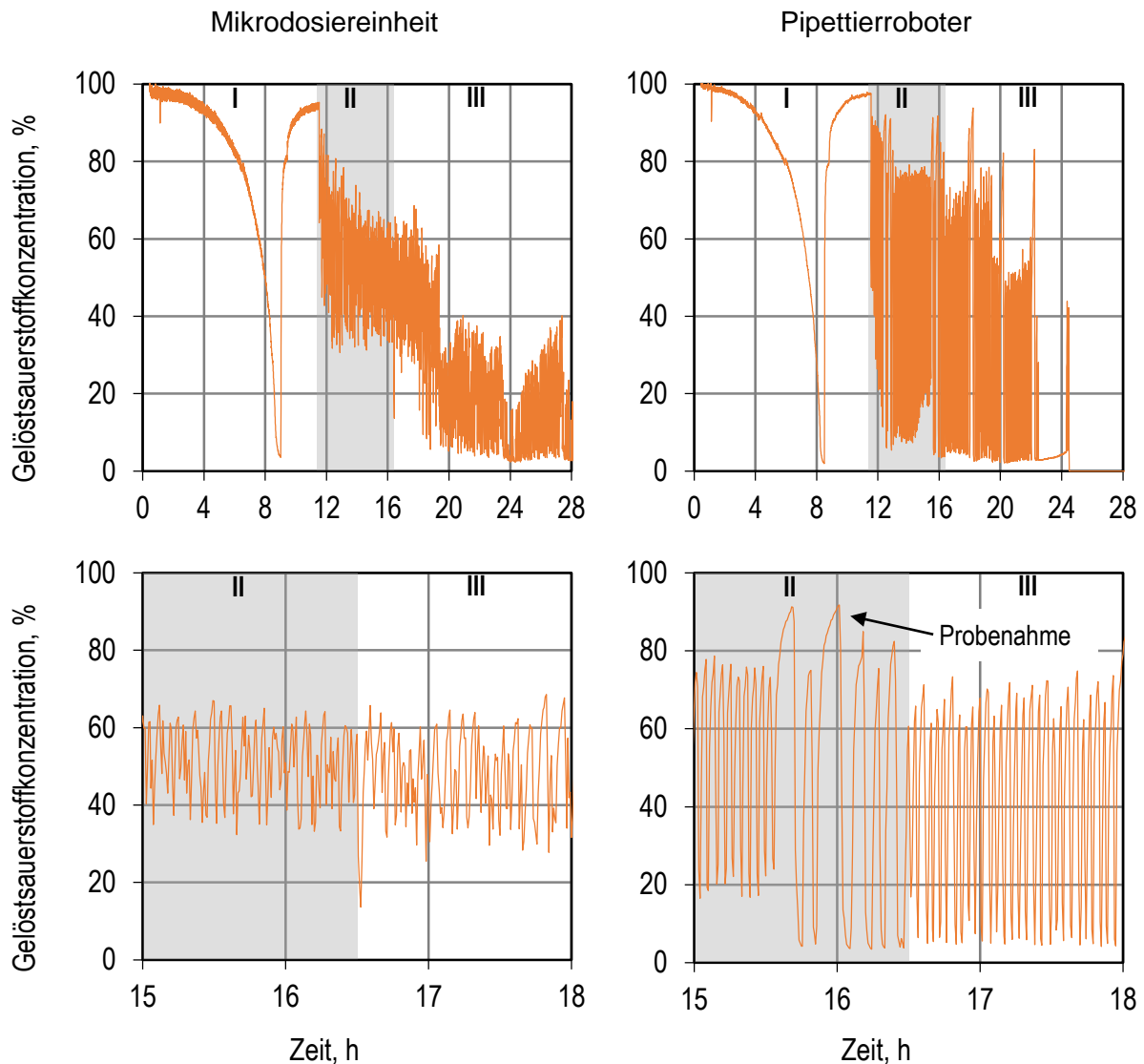


Abbildung 5.31: Vergleichende Darstellung der Gelöstaerstoffkonzentrationen in je einem beispielhaft ausgewählten Reaktor bei der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) im Zulaufverfahren mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter über den gesamten mit einer Satzphase (I) beginnenden Prozessverlauf (oben) und in 3 Stunden Detailansicht am Ende der exponentiellen Zulaufphase (II) beim Übergang in eine konstante Zulaufphase (III) mit $321 \mu\text{L h}^{-1}$ (unten).

5.11.1 Diskussion

Bei der vergleichenden Zulaufkultivierung von *Escherichia coli* HMS174(DE3) mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter konnte erfolgreich ein Hochzelldichteverfahren mit optischen Dichten über $\text{OD} = 120$ im 10 mL-Maßstab realisiert werden. Die zunächst noch mit magnetisierbarer Flussplatte und ohne Druckregler betriebene Mikrodosiereinheit zeigte dabei eine große Unzuverlässigkeit der Pumpen. So zeigten nur vier von zwölf Pumpen eine den als Referenz mit Pipettierroboter versorgten Reaktoren ähnliche Zunahme der optischen Dichte. Von diesen fielen jedoch während der Kultivierung zwei Pumpen aus. Eine der Ursachen für das Aussetzen der Pumpen waren aufgrund der Dauermagnetisierung der Flussplatte magnetisch arretierende Aktoren. Auch könnte ein zu geringer Vordruck zum Ausfall der Pumpen geführt haben. Dieser wurde bei der ersten Kultivierung noch manuell über den Höhenunterschied zwischen Füllstand im Vorlagebehälter und Mikrodosiereinheit eingestellt.

Dabei wurde der resultierende hydrostatische Druck soweit reduziert bis keine Tropfenbildung an den Injektoren mehr beobachtet werden konnte. Hierdurch wurde der Vordruck der Pumpe mit der geringsten Vordrucktoleranz angepasst, welcher für eine zuverlässige Förderung an anderen Pumpen möglicherweise zu gering war.

Bei der zweiten vergleichenden Zulaufkultivierung von *E. coli* BL21(DE3) mit dem weiter optimierten Labormuster der Mikrodosiereinheit konnte eine deutlich erhöhte Zuverlässigkeit der Pumpen beobachtet werden. Die mit unmagnetischer Flussplatte, Lippenrückschlagventilen aus härterem Silikon (70° Shore A) und auf 2,5 mbar geregelter Vordruck betriebene Mikrodosiereinheit zeigte in 11 von 12 versorgten Reaktoren die erwartete Zunahme der optischen Dichte.

Dabei konnte in den mit der Mikrodosiereinheit versorgten Reaktoren wiederholt eine im Vergleich zu den mit Pipettierroboter versorgten Reaktoren höhere optische Dichte gemessen werden.

Auch zeigten die Verläufe der in den Reaktoren gemessenen Gelöstsauerstoffkonzentration deutliche Unterschiede. So sank diese nach Zugabe von 15-25 μL Glucoselösung (250-500 g L^{-1}) durch den Roboter auf 20 % und weniger ab. Bei einem Arbeitsvolumen von 10 mL ergibt diese Zugabe eine Glucosekonzentration von 375-1250 mg L^{-1} in den Reaktoren. Diese Konzentration liegt mindesten 46 mal höher als die für Glucose zwischen 0,058 mg L^{-1} und 8 mg L^{-1} berichteten Sättigungskonstanten K_S für *E. coli* (Lendenmann *et al.*, 2000). Damit kann nach der Zugabe von einem maximalen Wachstum ausgegangen werden. Umgekehrt wurden auch minimale Glucosekonzentrationen angegeben bei denen *E. coli* wachsen kann (Ferenci, 2006). Der anschließende abrupte Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration auf 80 % und höher deutet auf eine vollständige Umsetzung der Glucose und damit Hungerphase der Zellen hin.

Im Gegensatz dazu zeigen die Verläufe der Gelöstsauerstoffkonzentration der mit der Mikrodosiereinheit versorgten Reaktoren ein rauschendes Signal mit deutlich geringeren Fluktuationen. Aufgrund der geringen Abtastrate der Gelöstsauerstoffsensoren kann der tatsächliche Konzentrationsverlauf nicht aufgelöst werden. Für die Kontrolle der Gelöstsauerstoffkonzentration der vom Pipettierroboter alle 4 bis 12 Minuten mit Glucoselösung versorgten Reaktoren war ein 30 Sekunden Intervall ausreichend. Für die Überwachung der etwa alle 4 bis 12 Sekunden dosierenden Mikromembranpumpen ist die Abtastfrequenz der Sensoren jedoch zu gering. Aus den so gemessenen Werten kann der tatsächliche Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration in den Reaktoren nicht rekonstruiert werden. Es können nur die Maximal- und Minimalwerte für eine Beurteilung des Systems herangezogen werden. In Zukunft könnte mit den optimierten Sensorriegeln eine Messung mit auf 0,14 Hz erhöhter Abtastfrequenz durchgeführt werden.

Die mit der derzeitigen Abtastezeit beobachteten Schwankungen umfassen einen Bereich von 20 % bis 30 %. Diese beginnen mit der exponentiellen Phase des Dosierprofils zwischen 70 % und 50 % und sinken im weiteren Verlauf der Kultivierung ab bis das Signal nach etwa 20 h zwischen 40 % und 10 % schwankt. Obwohl ein Pumpenhub von 1,3 μL nur 0,013 % des Arbeitsvolumens entspricht kann daher nur von einer quasi-kontinuierlichen Dosierung gesprochen werden kann. Ähnlich rauschende Gelöstsauerstoffschwankungen wurden auch bei dem mit Peristaltikpumpen versehenen Microfluidic Biolector[®] beobachtet wo je Pumpenhub 300 nL zu 500 μL Arbeitsvolumen dosiert werden was einem Verhältnis von 0,060 % entspricht (Funke *et al.*, 2010).

Dennoch scheint die Verkürzung der Substratüberschuss- und Hungerphasen sich positiv auf die Vitalität der Zellen auszuwirken, wie anhand der gesteigerten optischen Dichte der mit der Mikrodosiereinheit versorgten Reaktoren ersichtlich ist.

Die verbesserte Präzision und Zuverlässigkeit der optimierten Mikrodosiereinheit zeigt sich auch beim Vergleich mit den Ergebnissen des Labormusters. So wurde in vorangegangenen Arbeiten (Gebhardt *et al.*, 2011) aufgrund zunehmender Dosierfehler von einem Betrieb der Pumpen mit Frequenzen unterhalb 1,2 Hz, was etwa 4,0 mL h^{-1} entspricht, abgeraten. Auch wurden bei dem 16 h dauernden Prozesseinsatz nur 3-8 von 48 Reaktoren ausgewertet.

Im Gegensatz dazu konnte die modifizierte Mikrodosiereinheit bei der Kultivierung von *Escherichia coli* im Zulaufbetrieb an 11 von 12 Positionen über 24 h eine Substratzugabe mit Förderraten von 150 bis 321 $\mu\text{L h}^{-1}$ gewährleisten.

Trotz der Limitierung durch die nicht richtig schließenden Lippenrückschlagventile unterstreichen diese Ergebnisse die Leistungsfähigkeit der Mikrodosiereinheit und die zukünftig möglichen Einsatzfelder, sollten geeignete Ventile gefunden werden.

5.12 Charakterisierung von fluorimetrischen Niedrig-pH-Sensoren

5.12.1 Untersuchung der Querempfindlichkeit durch vergleichende Kalibrierungen

Da sowohl definierte Mineralsalz Medien, als auch Komplexmedien im Parallelbioreaktorsystem verwendet werden, wurden die Sensoren jeweils in diesen kalibriert.

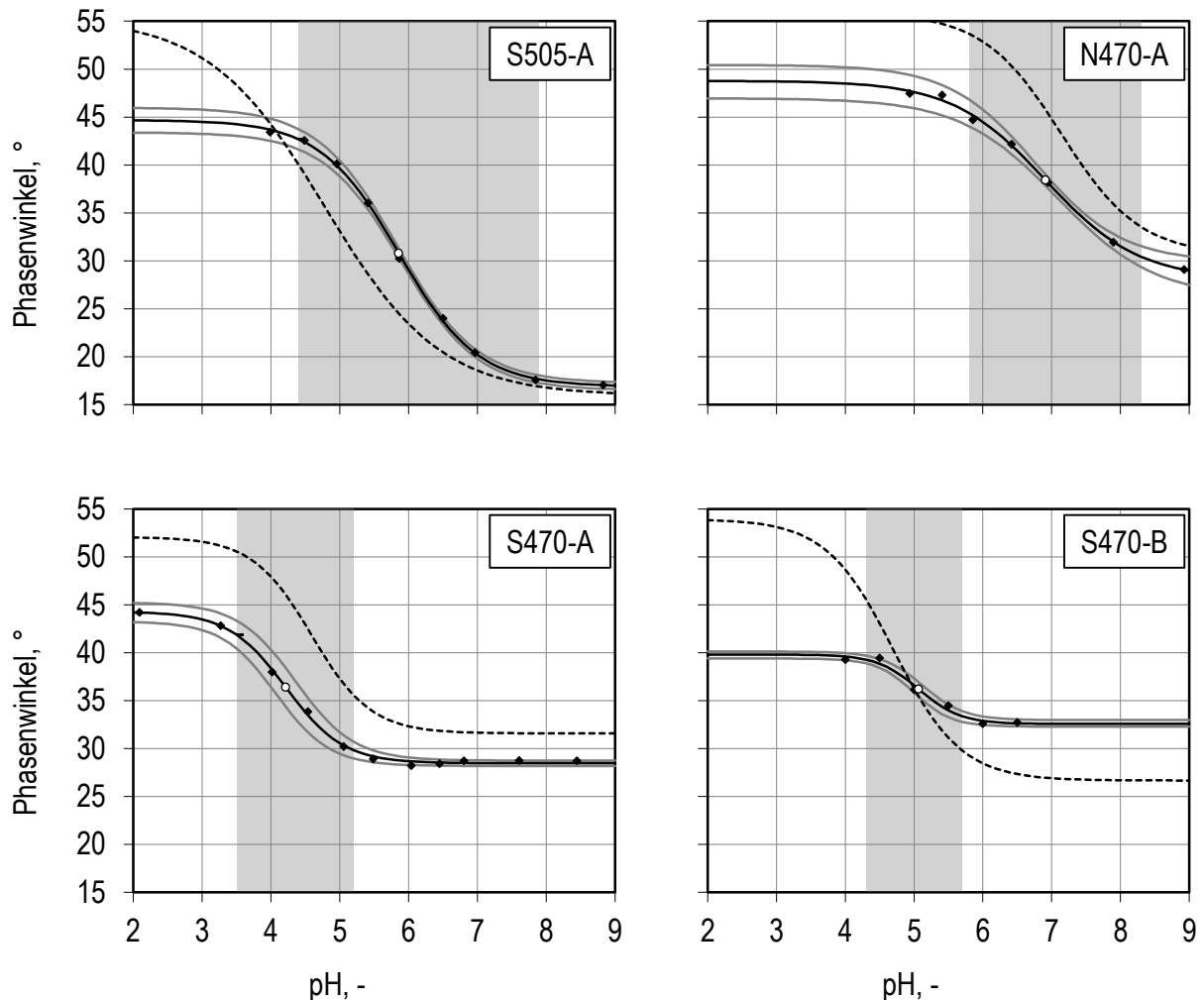


Abbildung 5.32: Kalibrierkurven der drei Niedrig-pH-Sensoren S505-A, S470-A, S470-B und des Neutral-pH-Sensors N470-A in Komplexmedium. Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (◆) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoide Kalibrierkurve (-), samt Standardabweichung (-) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,5 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (···).

Wie in Abbildung 5.32 zu sehen ist, zeigen die drei Niedrig-pH-Sensoren S505-A, S470-A und S470-B im Vergleich zu dem Neutral-pH-Sensor N470-A deutlich in den sauren pH-Bereich verschobene Anwendungsbereiche. Insbesondere Sensor S470-A zeichnet sich mit einem bei pH 3,5 beginnenden Anwendungsbereich aus. Hierbei sind die Anwendungsbereiche der beiden Niedrig-pH-Sensoren S470-A und S470-B deutlich schmäler als der des Neutral-pH-Sensors N470-A. Im Gegensatz dazu zeigt Sensor S505-A einen deutlich breiteren Anwendungsbereich. In Tabelle 5-2 sind die zugehörigen Werte aufgeführt.

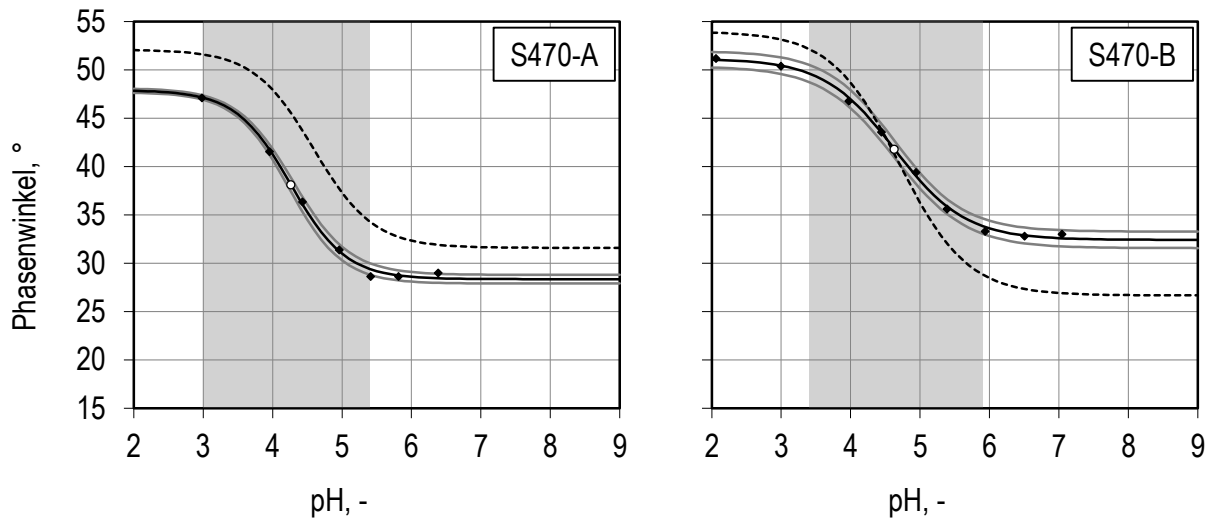


Abbildung 5.33: Kalibrierkurven der zwei Niedrig-pH-Sensoren S470-A und S470-B in definiertem MS-MES Medium. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (\blacklozenge) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoide Kalibrierkurve ($-$), samt Standardabweichung ($-$) und Wendepunkt (\circ) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,5 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve

Wie schon bei der Kalibrierung in Komplexmedium zeigt Sensor S470-A auch in definiertem Mineralsalz Medium mit Morpholinethansulfonsäure-Puffer (MS-MES Medium) einen breiteren Anwendungsbereich als Sensor S470-B. Weiter fällt beim Vergleich der in Abbildung 5.33 für das komplexfreie Medium dargestellten Anwendungsbereiche auf, dass diese bei beiden Sensoren deutlich breiter sind, als in dem komplexhaltigen Medium in Abbildung 5.32. Die vergleichende Auflistung der zugehörigen Werte in Tabelle 5-2 verdeutlicht die Beeinträchtigung der Sensoren.

Da in vorangegangenen Arbeiten (Vester, 2009) mit bei 470 nm Wellenlänge angeregten Neutral-pH-Sensoren Messstörungen durch Untergrundflorezenz von Riboflavinmolekülen beobachtet wurden, erfolgten Messungen mit den neuen Niedrig-pH-Sensoren in Riboflavinlösung und riboflavinhaltiger Fermentationslösung.

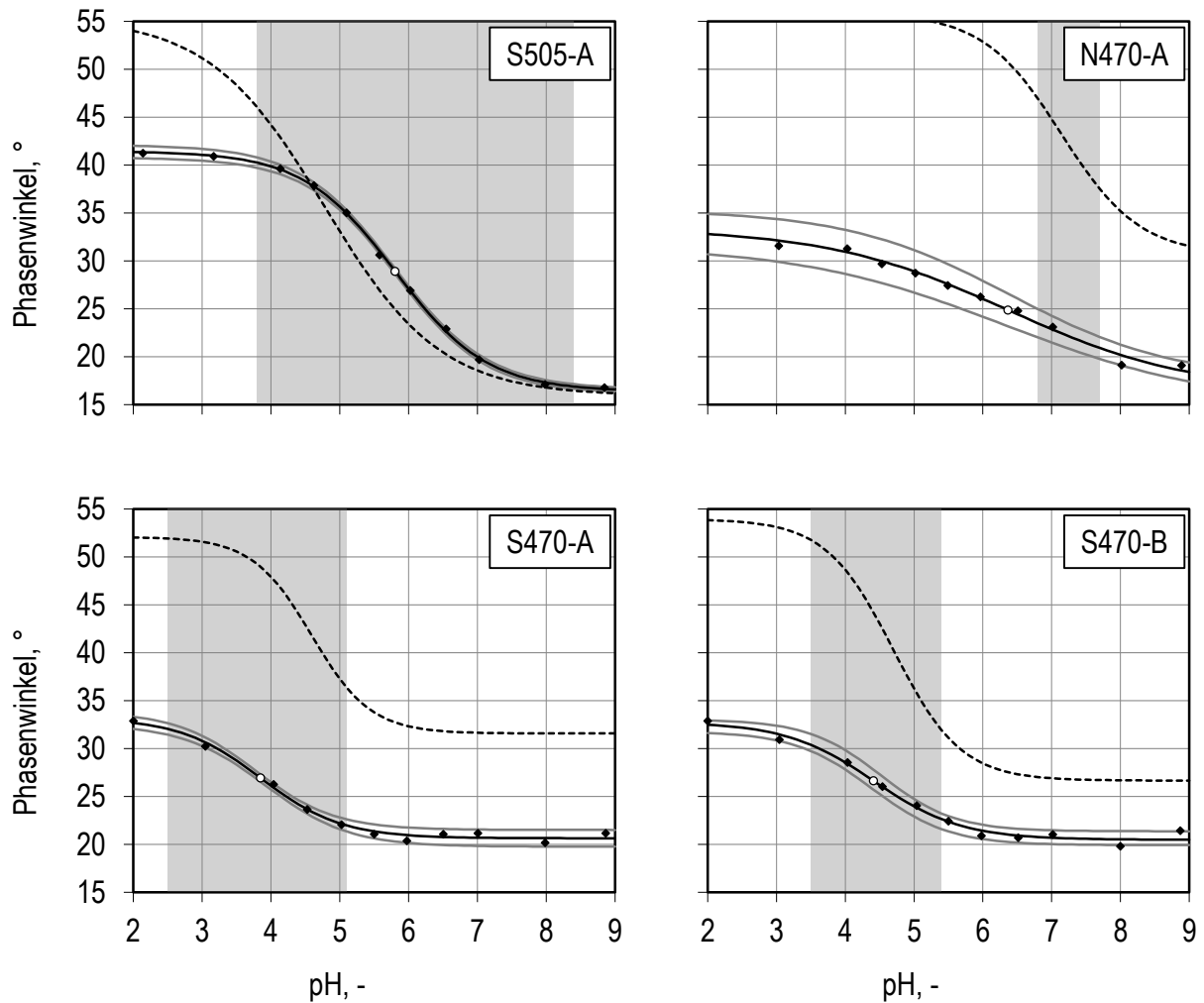


Abbildung 5.34: Kalibrierkurven der drei Niedrig-pH-Sensoren S505-A, S470-A, S470-B und des Neutral-pH-Sensors N470-A in Riboflavinlösung (8 g L^{-1}). Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (◆) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoide Kalibrierkurve (—), samt Standardabweichung (—) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,5 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (···).

Wie in Abbildung 5.34 zu sehen ist, reduziert sich bei der Kalibrierung des Neutral-pH-Sensors N470-A in mit 8 g L^{-1} Riboflavin versetztem $0,1 \text{ M}$ Natriumphosphatpuffer der Anwendungsbereich um etwa zwei Drittel. Dagegen zeigen die Kalibrierkurven aller Niedrig-pH-Sensoren im Vergleich zu denen bei komplexhaltigem Medium breitere Anwendungsbereiche. Hier erweitert sich bei den mit 470 nm Wellenlänge angeregten Sensoren der Anwendungsbereich um etwa eine pH-Stufe in den sauren Bereich. Wogegen Sensor S505-A einen in beide Richtungen um etwa eine halbe pH-Stufe verbreiterten Anwendungsbereich aufweist.

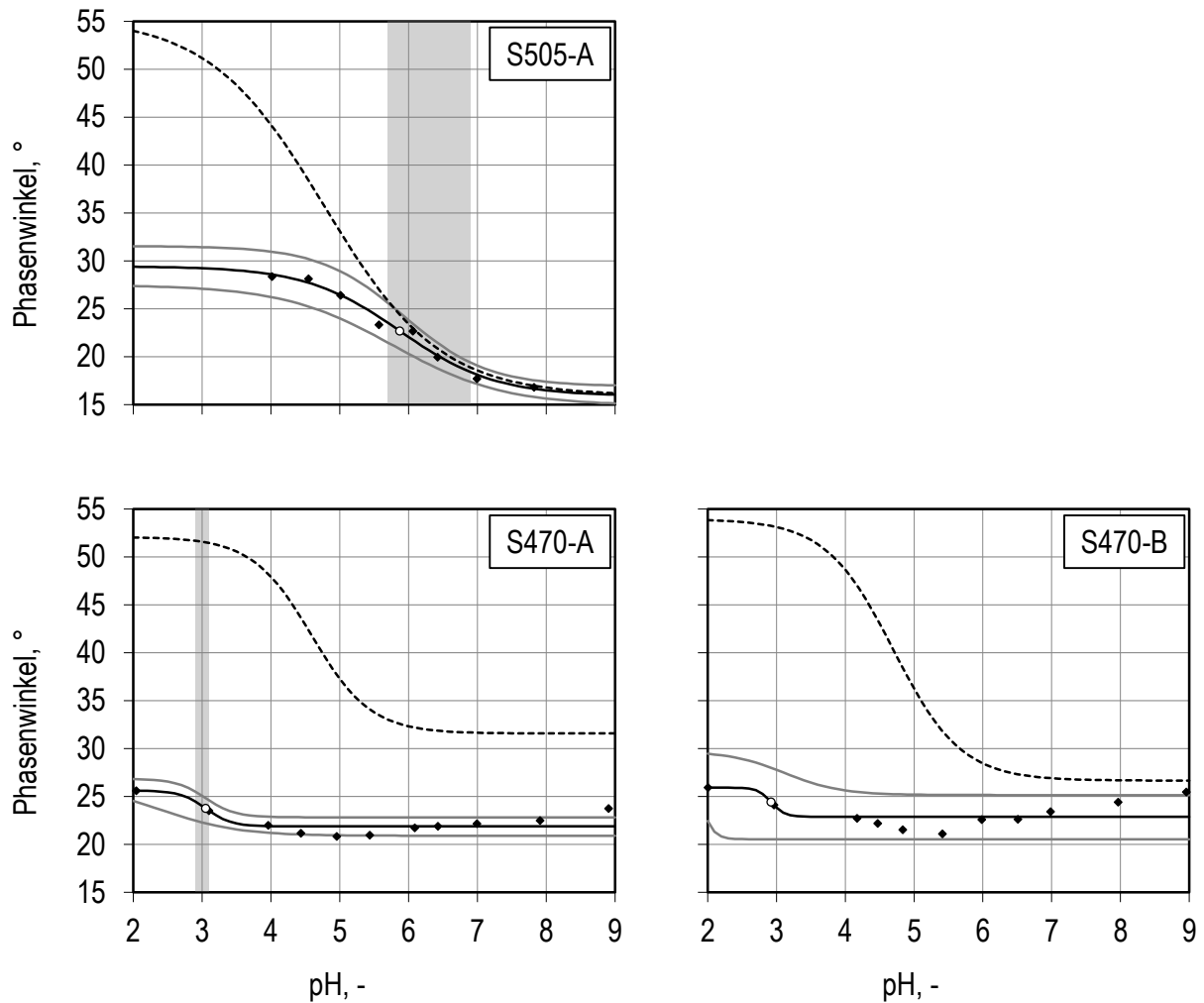


Abbildung 5.35: Kalibrierkurven der drei Niedrig-pH-Sensoren S505-A, S470-A und S470-B in riboflavinhaltiger Fermentationslösung ($\sim 4 \text{ g L}^{-1}$). Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (\blacklozenge) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve ($-$), samt Standardabweichung ($-$) und Wendepunkt (\circ) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,5 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (\cdots).

Bei der Kalibrierung der Sensoren in riboflavinhaltiger Fermentationslösung kam es wie in Abbildung 5.35 zu sehen, zu einer starken Beeinträchtigung des dynamischen Bereiches der Sensoren. Die gemessenen Phasenwinkel der mit 470 nm angeregten Sensoren zeigen stark reduzierte Werte. Die Berechnung eines Anwendungsbereiches ist kaum oder nicht mehr möglich. Auch die Messwerte des bei 505 nm angeregten Sensors zeigen deutlich reduzierte Phasenwinkel mit erhöhten Standardabweichungen. Entsprechend klein ist auch der von pH 5,7 bis 6,9 ermittelte Anwendungsbereich, welcher zum Vergleich gemeinsam mit den Ergebnissen aller Messungen in Tabelle 5-2 eingetragen ist.

Tabelle 5-2: Berechnete Anwendungsbereiche und Wendepunkte der fluorimetrischen pH-Sensoren

Medium	Sensor	Anwendungsbereich, pH			Wende- punkt	Steigung Wendepunkt
		von	bis	Breite		
Komplexmedium	N470-A	5,8	8,3	2,5	6,9	0,7
	S470-A	3,5	5,2	1,7	4,2	0,4
	S470-B	4,3	5,7	1,4	5,1	0,3
	S505-A	4,4	7,9	3,5	5,9	0,6
Riboflavin- Lösung	N470-A	6,8	7,7	0,9	6,4	1,3
	S470-A	2,5	5,1	2,6	3,9	0,6
	S470-B	3,5	5,4	1,9	4,4	0,6
	S505-A	3,8	8,4	4,6	5,8	0,7
Riboflavinhaltige Fermentations- lösung	S470-A	2,9	3,1	0,2	3,1	0,2
	S470-B	-	-	-	2,9	0,1
	S505-A	5,7	6,9	1,2	5,9	0,7
MS-MES Medium	S470-A	3,0	5,4	2,4	4,3	0,4
	S470-B	3,4	5,9	2,5	4,6	0,5

5.12.2 Signalstabilität

In Langzeitmessungen wurde die Signalstabilität der Sensoren kontrolliert. Hierbei wurden die Phasenwinkel der in Komplexmedium mit unterschiedlichen pH betriebenen Sensoren 72 h lang aufgezeichnet. Mit einer Glaselektrode wurde dabei am Ende der Messung der auf verschiedene Werte eingestellte pH aller Ansätze kontrolliert.

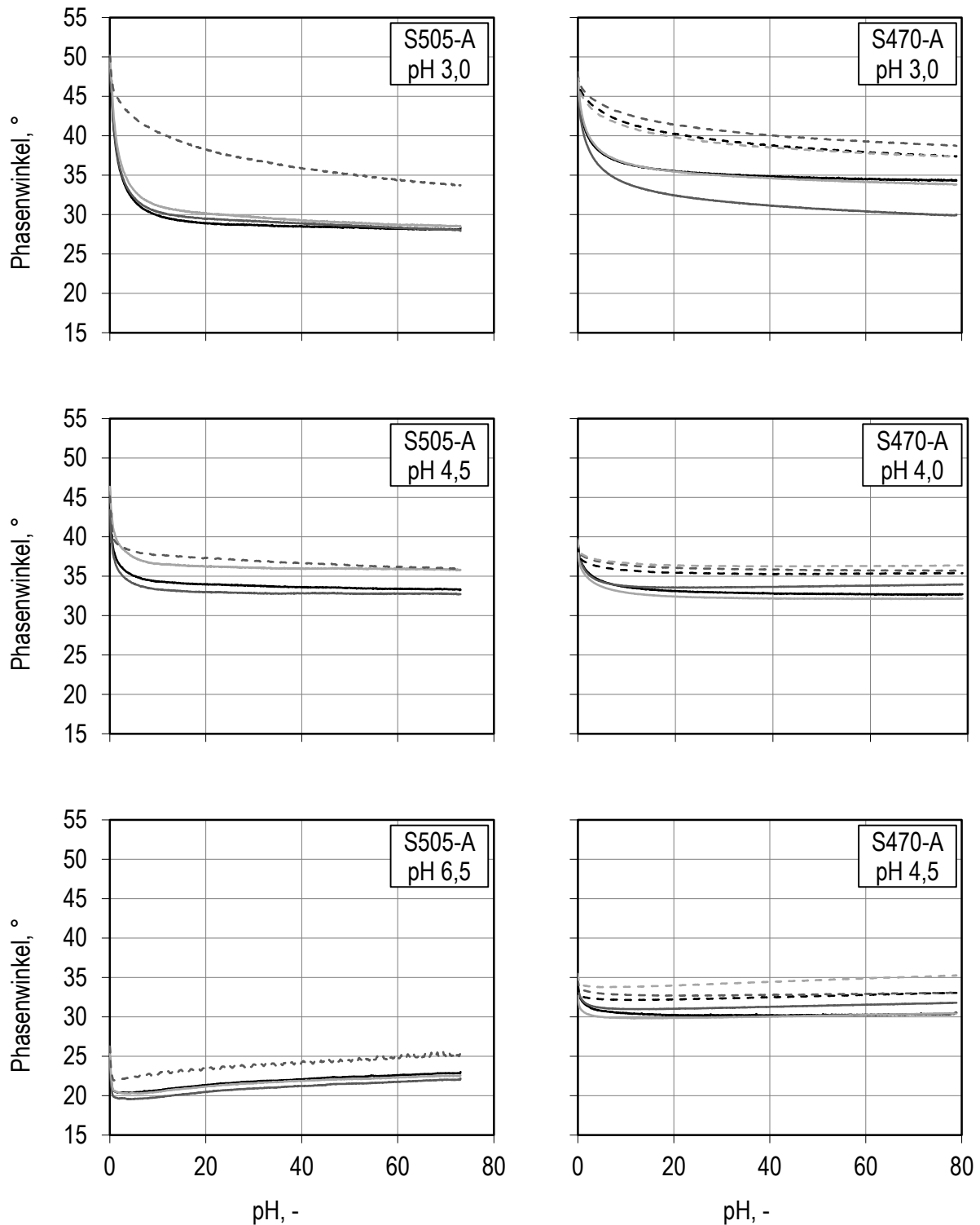


Abbildung 5.36: Langzeitmessung des Niedrig-pH-Sensors S505-A bei pH 3,0, 4,5 und 6,5 in Komplexmedium mit je 3 gerührten (durchgehende Linie) und einem ungerührten (gepunktete Linie) Reaktor und Langzeitmessung des Niedrig-pH-Sensors S470-A bei pH 3,0, 4,0 und 4,5 in Komplexmedium mit je 3 gerührten (durchgehende Linie) und ungerührten (gepunktete Linie) Reaktoren. Die mit einer Glaselektrode am Ende der Langzeitmessung durchgeführte Kontrolle der Ansätze von Sensor S505-A ergab einen im Durchschnitt um 0,06 gesunkenen pH. Bei den Ansätzen von Sensor S470-A war der pH im Durchschnitt um 0,22 gesunken.

Hier konnte anhand der aufgezeichneten Phasenwinkel eine pH- und drehzahlabhängige Drift der Sensorsignale beobachtet werden. So lagen die gemessenen Phasenwinkel der mit 2800 min^{-1} gerührten Ansätze immer über denen der ungerührten Ansätze. Zudem zeigte sich

bei den gerührten Ansätzen bei pH 3,0 ein schnelleres Einschwingen der Phasenwinkel, welches sich jedoch nicht stabilisierte und nach 20 Stunden bis zum Versuchsabbruch eine negative Drift zeigte. Im Gegensatz dazu konnte bei den für Sensor S505-A bei pH 6,5 und für Sensor S470-A bei pH 4,5 aufgezeichneten Werten nach einem ähnlichen Einschwingverhalten eine positive Drift beobachtet werden. Die gemessenen Phasenwinkel zwischen den pH Bereichen mit negativer und positiver Drift zeigten stabilere Signale, jedoch wurde auch hier in den ersten 20 Stunden ein ausgeprägtes Einschwingen beobachtet.

5.12.3 Diskussion

Bei der Kalibrierung der Niedrig-pH-Sensoren wurde bei allen Sensoren ein im Vergleich zum Neutral-pH-Sensor deutlich im sauren Milieu liegender dynamischer Bereich der sigmoidalen Kalibrierkurve ermittelt. Allerdings zeigten die bei 470 nm Wellenlänge angeregten Sensoren im Vergleich zu dem bei 505 nm angeregten Sensor deutlich schmalere Anwendungsbereiche in Komplexmedium. Diese nicht einmal zwei pH Stufen abdeckenden Anwendungsbereiche schränkten die Verwendbarkeit der 470 nm Sensoren ein, auch wenn diese wie bei Sensor S470-A bereits bei pH 3,5 begannen. Unter Berücksichtigung der Annahme, dass zur Bestimmung der Anwendungsbereiche ein maximaler pH Fehler von 0,5 akzeptierbar ist, wurde Sensor S505-A als tauglichster pH Sensor eingestuft, da er nicht nur von pH 4,4 bis 7,9 den größten Anwendungsbereich besitzt, sondern sich zusätzlich auch durch eine geringe Standardabweichung auszeichnet. Diese war bei Sensor S470-A sogar um den Wendepunkt herum deutlich ausgeprägt, was gemeinsam mit dem schmalen Anwendungsbereich gegen den Sensor spricht, selbst wenn dieser beginnend bei pH 3,5 am deutlichsten ins Saure verschoben ist.

Für die Kalibrierung in definiertem MS-MES Medium standen nur die Sensoren S470-A und S470-B zur Verfügung, wiesen aber im Vergleich zum komplexhaltigen Medium eine Erweiterung des Anwendungsbereiches um etwa 1,0 pH ins saure und 0,5 pH ins basische Milieu auf. Damit wären beide Sensoren für den Einsatz in diesem Medium geeignet, wobei sich Sensor S470-A durch eine geringe Standardabweichung auszeichnet, Sensor S470-B mit pH 3,4 bis 5,9 jedoch den für einen Bioprozesseinsatz geeigneteren Anwendungsbereich zeigt.

Die Kalibrierung der Sensoren in mit 8 g L^{-1} Riboflavin versetzter Riboflavinlösung zur Untersuchung der Querempfindlichkeit zeigte wie in vorangegangenen Arbeiten (Vester, 2009) eine deutliche Beeinträchtigung des Neutral-pH-Sensors N470-A. Aufgrund der verringerten Steigung im Wendepunkt und der Zunahme der Standardabweichung ist der Anwendungsbereich zu schmal, um den Sensor einzusetzen. Im Gegensatz dazu zeigten die bei gleicher Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensoren S470-A und S470-B eine geringere Beeinträchtigung. Im Vergleich zum Komplexmedium wiesen beide Sensoren sogar einen breiteren Anwendungsbereich auf und Sensor S470-A zeigte sogar eine geringere

Standardabweichung. Dieser Effekt war bei dem mit 505 nm Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensor S505-A noch deutlicher ausgeprägt. So zeigte dieser Sensor in Riboflavinlösung von pH 3,8 bis 8,4 den größten Anwendungsbereich aller vorgenommenen Kalibrierungen.

Bei den in riboflavinhaltiger Fermentationslösung ermittelten Kalibrierungen zeigten die Sensoren S470-A und S470-B keine oder für einen Bioprozesseinsatz unzureichende Anwendungsbereiche. Sensor S505-A wies ebenfalls einen auf 1,2 pH breite reduzierten Anwendungsbereich auf und ist daher für den Bioprozesseinsatz ungeeignet.

Zusammen zeigen die Kalibrierungen, dass die neu entwickelten Niedrig-pH-Sensoren im Gegensatz zu den Standard-pH-Sensoren keine Querempfindlich auf Riboflavin besitzen. Jedoch weisen die Ergebnisse darauf hin, dass dagegen eine Querempfindlichkeit der Sensoren auf die Bestandteile komplexhaltiger Medien und Fermentationslösungen vorliegt. Von allen Sensoren zeigte S505-A gleichzeitig den größten dynamischen Bereich, die beste Auflösung, sowie keine Querempfindlichkeit auf Riboflavin und die geringste Beeinträchtigung in komplexhaltigen Medien. Da dieser Sensor im Gegensatz zu den anderen Sensoren mit Licht von 505 nm Wellenlänge angeregt wird, sollten weitere Sensoren mit geänderter Anregungswellenlänge und die Ursache für deren überdurchschnittliche Eigenschaften untersucht werden.

Die Messungen der Signalstabilität bei denen eine pH und drehzahlabhängige Drift der Sensoren gemessen wurde macht zusätzlich die Notwendigkeit deutlich, bei der Charakterisierung der Sensoren die zeitliche Änderung der Sensorsignale zu berücksichtigen. Da sowohl in vorherigen Arbeiten (Vester, 2009) als auch vom Hersteller (persönliche Kommunikation PreSens) diffusive Einlagerungen von Medienbestandteilen beschrieben wurden, kann nur so die Auswahl von Sensoren mit stabilen Signalen für die üblicherweise 12-72 h andauernden Kultivierungen im Bioprozesseinsatz gewährleistet werden. Zudem wurde in einigen Ansätzen ebenfalls eine Änderung des eingestellten pH beobachtet. Nach der Messung wurde eine Kontamination der vorsorglich mit Antibiotika versehenen Ansätze mit Hilfe einer mikroskopischen Untersuchung ausgeschlossen. Da dieser pH Abfall mit steigendem pH der Ansätze stärker ausgeprägt war, ist auch der Eintrag von CO₂ durch die gasinduzierenden Rührer und die Bildung von Kohlensäure eine mögliche Erklärung.

Bei den Messungen zur Untersuchung der Querempfindlichkeit wurde deutlich, dass nicht nur Riboflavin aufgrund seiner Fluoreszenz für die Störung der Sensoren verantwortlich ist. Auch die Komposition der anderen Medienbestandteile kann eine deutliche Störung der Sensoren verursachen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen der Messungen in definiertem Medium und Medium mit komplexen Bestandteilen, was die Notwendigkeit einer Untersuchung der Medienlumineszenz verdeutlicht.

5.13 Messung der Photolumineszenz von Medien und Zellen

5.13.1 Fluoreszenzmessung von Medium mit komplexen Bestandteilen

Um die Unterschiede in den Kalibrierkurven der Sensoren in verschiedenen Kulturmedien oder Puffern zu verstehen, wurde die Zusammensetzung des Komplexmediums variiert. Abbildung 5.37 zeigt wie durch die komplexen Bestandteile Hefeextrakt und Pepton eine Hintergrundfluoreszenz des Mediums verursacht wird. Die Intensitäten der Fluoreszenz von Pepton ist bei gleicher Konzentration von 20 g L^{-1} etwa um den Faktor Zehn geringer, jedoch addieren sich die von beiden Komponenten verursachten Intensitäten. Die von den komplexen Medienbestandteilen verursachte Fluoreszenz übersteigt die der übrigen Medienbestandteile deutlich. Zudem ist eine Abhängigkeit der Intensität von pH und gemessener Wellenlänge deutlich. Die maximale Intensität liegt etwa bei pH 6 und 550 nm, was ebenfalls die Wellenlänge zum Auslesen der bei 470 nm angeregten pH-Sensoren ist.

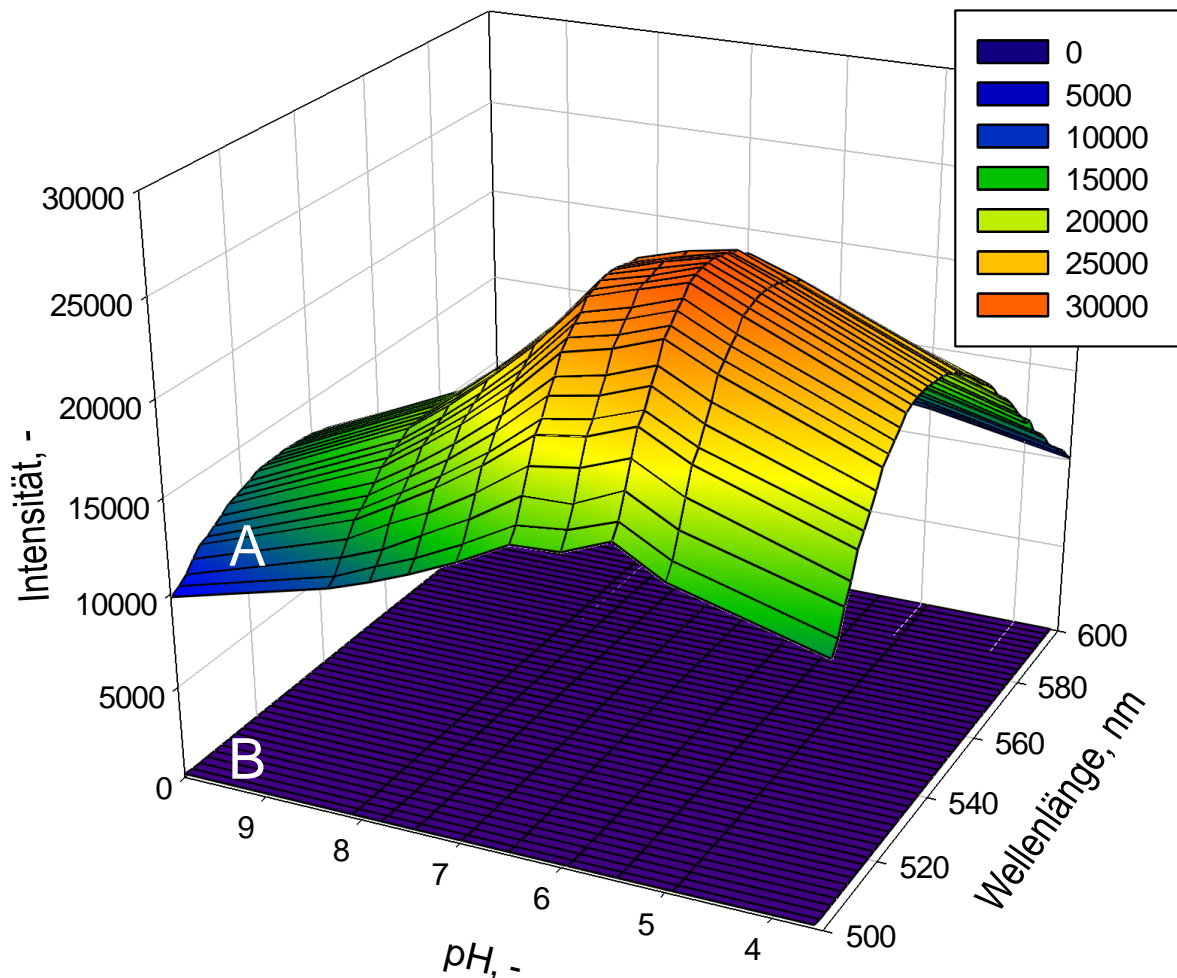


Abbildung 5.37: Vergleich der Fluoreszenzspektrums von komplexem Medium bei 470 nm Anregungswellenlänge mit (A) und ohne (B) die komplexen Medienbestandteile Hefeextrakt und Pepton (je 20 g L^{-1}).

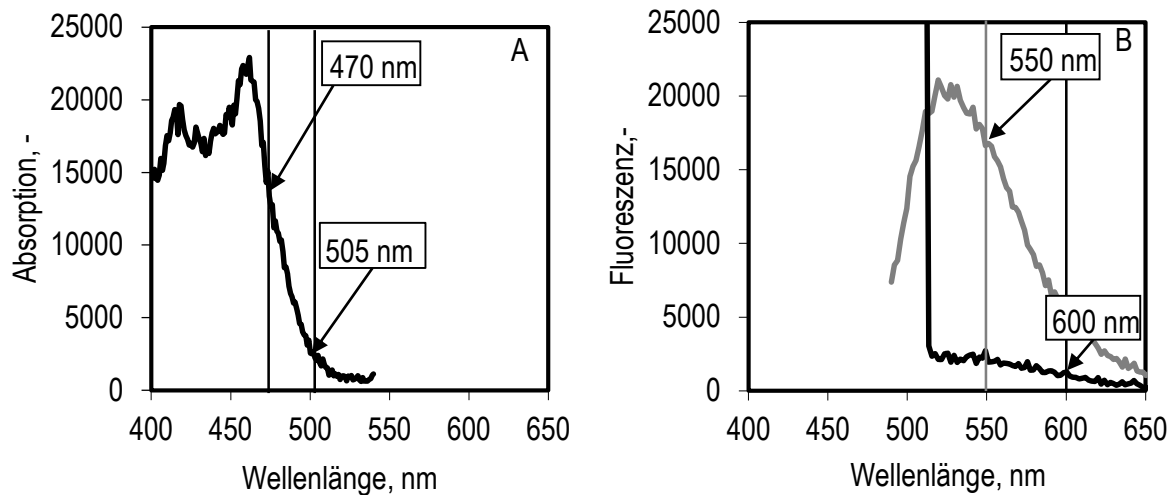


Abbildung 5.38 A: Absorptionsspektrum von Komplexmedium. Die beiden Wellenlängen zur Anregung der Sensoren bei 470 nm und 505 nm sind hervorgehoben. B: Emissionsspektrum von Komplexmedium nach Anregung mit 470 nm (grau) und 505 nm (schwarz) Wellenlänge. Die beiden zugehörigen Wellenlängen zum Auslesen der Sensoren bei 550 nm und 600 nm sind hervorgehoben.

Um die Ursache für die geringe Querempfindlichkeit des bei 505 nm angeregten und 600 nm ausgelesenen Sensors S505-A zu verstehen, wurden Absorption und Fluoreszenz des Komplexmediums, wie in Abbildung 5.38 gezeigt wird, gemessen. Hier zeigte sich eine deutlich größere Interaktion bei der Kombination aus 470 nm Anregungswellenlänge und 550 nm Auslesewellenlänge. Bei der Kombination aus 505 nm Anregungswellenlänge und 600 nm Auslesewellenlänge, wie es bei Sensor S505-A der Fall ist, wird deutlich weniger Strahlung absorbiert, wodurch weniger Energie für die Abstrahlung von Fluoreszenz zur Verfügung steht. Folglich besitzt das emittierte Spektrum eine niedrigere Intensität und wird gleichzeitig bei 600 nm in einem niedrigeren Bereich des emittierten Spektrums ausgelesen. Im Gegensatz dazu wird das bei 470 nm Anregungswellenlänge emittierte Spektrum bei 550 nm nahe der maximalen Intensität ausgelesen.

5.13.2 Fluoreszenzmessung bei der Kultivierung von *E. coli*

Da es sich bei Hefeextrakt und Pepton um aufgeschlossene Zellen und Oligopeptide handelt, wurde die Frage aufgeworfen, ob auch intakte Zellen mit den für den Betrieb der fluorimetrischen Sensoren verwendeten Wellenlängen interagieren. Daher wurde wie in Abbildung 5.39 zu sehen die Medienfluoreszenz während einer Zulaufkultivierung in definiertem Mineralsalz Medium (Riesenberg *et al.*, 1991) gemessen. Auch hier zeigte sich in Abhängigkeit mit der zunehmenden Zellzahl ein Anstieg der gemessenen Fluoreszenz.

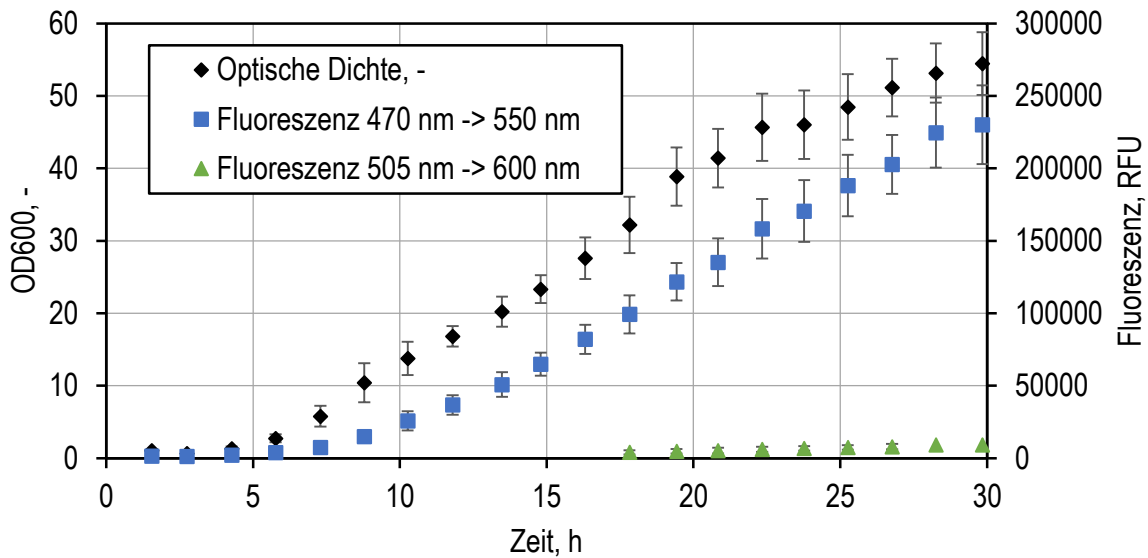


Abbildung 5.39: Optische Dichte und Fluoreszenz bei den zwei unterschiedlichen Wellenlängen zum Auslesen der optischen Sensoren während einer Zulaufkultivierung von *E. coli* in definiertem Mineralsalz Medium (Riesenberg *et al.*, 1991) im Parallelbioreaktorsystem mit Mikrodosiereinheit. Mit der Zunahme der Biomassekonzentration wird eine ansteigende Medienfluoreszenz deutlich. Auch hier ist die bei 505 nm angeregte und bei 600 nm ausgelesene Fluoreszenz deutlich geringer.

5.13.3 Diskussion

Durch die oben genannten Messungen konnte die Fluoreszenz von Biomolekülen, wie Oligopeptiden, Zelltrümmern und lebendigen Zellen mit den zum Auslesen der fluorimetrischen Sensoren genutzten Wellenlängen nachgewiesen werden. Da die nach dem Prinzip des 'dual lifetime referencing' betriebenen Sensoren durch Messung der Phosphoreszenz und Fluoreszenz ausgelesen werden, kann die auftretende Hintergrundfluoreszenz die Funktion der Sensoren in bestimmten pH-Bereichen und Medienzusammensetzungen beeinträchtigen. Obwohl durch das Prinzip des 'dual lifetime referencing' die meisten Störquellen herausgerechnet werden können, stellt die beobachtete Hintergrundfluoreszenz des Mediums eine Ausnahme dar, da diese nicht von der Fluoreszenz des Indikators unterschieden werden kann (Klimant *et al.*, 2001). Daher kann mit der auftretenden Hintergrundfluoreszenz die Stauchung der Kalibrierkurve von Sensor S470-A in Komplexmedium erklärt werden (Abbildung 5.32).

Es zeigte sich, dass die Wellenlängenpaarung von 505 und 600 nm zum Anregen und Auslesen der Sensoren deutlich weniger durch die Hintergrundfluoreszenz gestört wird als die Wellenlängenpaarung von 470 und 550 nm. Hiermit kann die geringere Querempfindlichkeit des bei 505 und 600 nm betriebenen Sensors S505-A gegenüber Hintergrundfluoreszenz erklärt werden.

Zudem konnte in Komplexmedium eine pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität festgestellt werden, welche zu niedrigen pH hin ansteigt und zwischen pH 5,5 und 6,0 ein Maximum annimmt. Dies würde sich mit der Zunahme der Standardabweichung der Kalibrierkurve von

Standard-pH-Sensor N470-A decken. Dieser Trend kann bei den beiden Kalibrierkurven für die beiden Niedrig-pH-Sensoren S505-A und S470-A nur bedingt beobachtet werden.

5.14 Langzeitkalibrierungen von fluorimetrischen Niedrig-pH-Sensoren

Um für die Charakterisierung der Niedrig-pH-Sensoren aussagekräftige Informationen zu erhalten, wurden die Protokolle für die Kalibrierung der Sensoren den zuvor gewonnenen Erkenntnissen entsprechend angepasst. Durch die resultierende Langzeitkalibrierung der Sensoren über 72 Stunden können Anwendungsbereich und Signalstabilität der Sensoren ermittelt werden. Durch die Verwendung von definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium kann die Querempfindlichkeit der Sensoren auf von Biomolekülen verursachte Hintergrundfluoreszenz ermittelt werden. Da es unzählige verschiedene Medienzusammensetzungen gibt und diese je nach eingesetzten Mikroorganismen auch unterschiedliche Substratkonzentrationen entwickeln, ist die Aussagekraft nur eingeschränkt. Jedoch erlaubt der Vergleich von Kalibrierdaten in definiertem Medium und Medium mit komplexen Bestandteilen eine erste Aussage, wie sich eine steigende Biomassekonzentration in definiertem Medium auf die Sensorfunktion auswirkt. Je ähnlicher sich die beiden Kalibrierdaten sind, desto wahrscheinlicher ist ein erfolgreicher Bioprozesseinsatz, da das definierte Mineralmedium im Laufe der Kultivierung, aufgrund der Biomassebildung einem Medium mit komplexen Bestandteilen immer ähnlicher wird.

Um die Störung der Hintergrundfluoreszenz beim Auslesen der Sensoren zu reduzieren, wurden zudem zwei Sensoren mit einer optischen Isolierung überzogen, um die Medienfluoreszenz von den Ausleseeinheiten abzuschirmen.

Zusätzlich wurden von der PreSens – Precision Sensing GmbH optimierte Ausleseeinheiten mit kürzeren Belichtungszeiten und schmalere optischen Filtern zur Verfügung gestellt. In vergleichenden Langzeitkalibrierungen konnte der positive Effekt der optimierten Ausleseeinheiten nachgewiesen werden, weshalb im Folgenden nur die Ergebnisse der Langzeitkalibrierungen mit den optimierten Ausleseeinheiten gezeigt werden, gefolgt von einem beispielhaften Vergleich der mit alten und optimierten Ausleseeinheiten erzielten Ergebnissen. Die mit den alten Ausleseeinheiten ermittelten Datensätze der Langzeitkalibrierungen sind im Anhang 8.5 zu finden.

Abbildung 5.40 und Abbildung 5.41 zeigen die in den Langzeitkalibrierungen mit den neuen Ausleseeinheiten für insgesamt 6 verschiedene Sensoren ermittelten Datensätze.

5.14.1 Signalstabilität

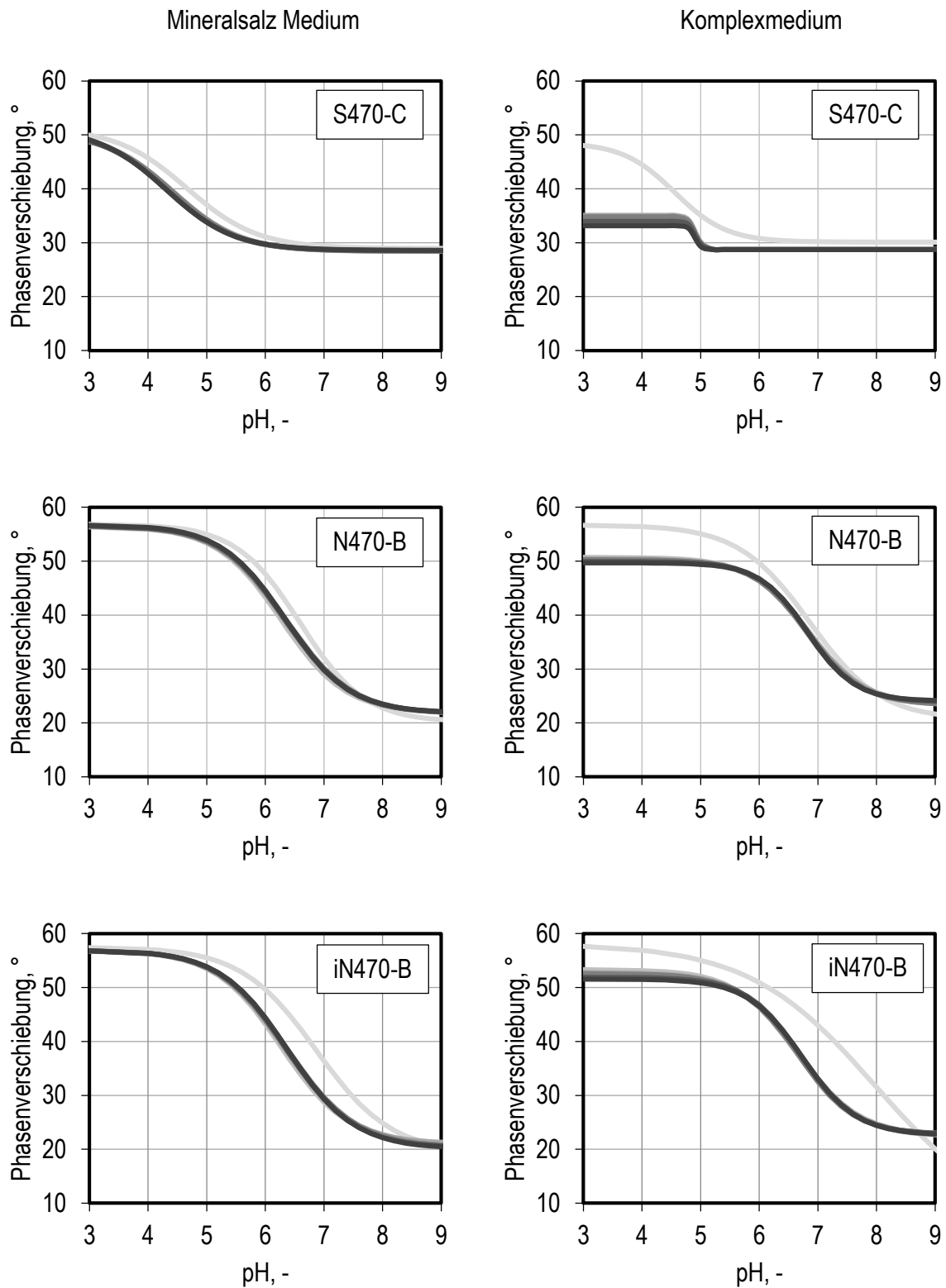


Abbildung 5.40: Kalibrierkurven der Sensoren S470-C, N470-B und iN470-B in definiertem Mineralsalz Medium nach Riesenberg *et al.*, 1991 bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h. Kalibrierkurven der Sensortypen S470-C, N470-B und iN470-B in Komplexmedium nach Kusterer *et al.*, 2008 bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h (unterschiedliche Graustufen von hell nach dunkel).

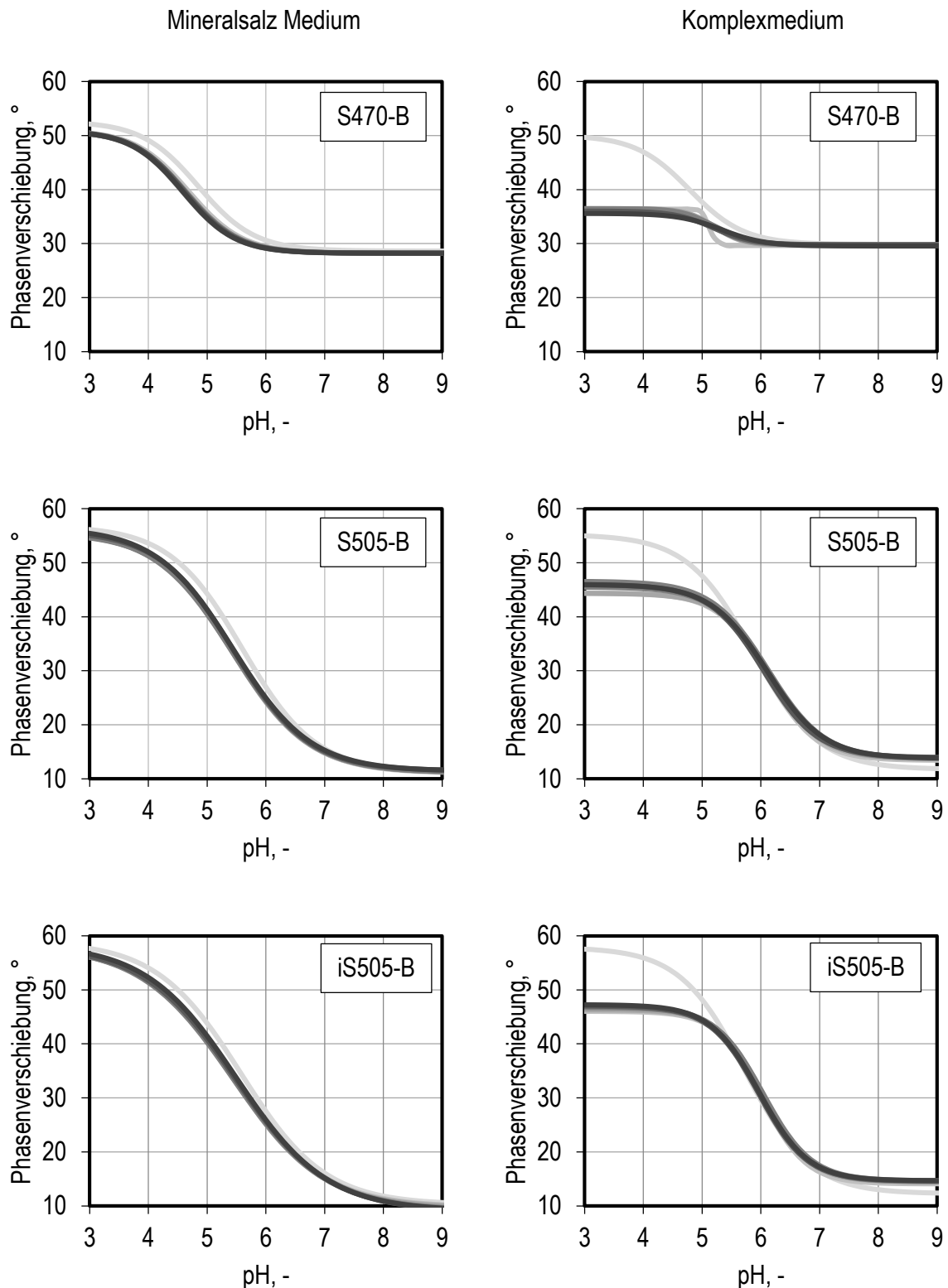


Abbildung 5.41: Kalibrierkurven der Sensoren S470-B, S505-B und iS505-B in definiertem Mineralsalz Medium nach Riesenberg *et al.*, 1991 bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h. Kalibrierkurven der Sensortypen S470-B, S505-B und iS505-B in Komplexmedium nach Kusterer *et al.*, 2008 bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h (unterschiedliche Graustufen von hell nach dunkel).

Wie auch bei den zuvor zu einem einzigen Zeitpunkt durchgeführten Kalibrierungen, zeigen die in den Langzeitkalibrierungen gewonnenen Daten den sigmoidalen Verlauf der Kalibrierkurven der sechs Sensortypen. Zusätzlich ist über die Deckungsgleichheit der im Abstand von je 12 Stunden über 72 Stunden aufgenommenen Sigmoiden die Signalstabilität der Sensoren ersichtlich.

Bei den Ergebnissen der Langzeitkalibrierungen in Abbildung 5.40 und Abbildung 5.41 mit den optimierten Ausleseeinheiten zeigt sich bei den meisten Sensoren, wie an den übereinander liegenden Kurven ersichtlich, eine große Signalstabilität. Einzig die zum Startzeitpunkt der Messung aufgezeichneten Kurven im hellsten Grauton weichen deutlich von den anderen Kurven ab, da das hydrophile ionenpermeable Polymer der Sensoren noch nicht aufgequollen und die Sensorsignale somit noch nicht eingeschwungen waren. In allen Fällen ist eine Stauchung der Kalibrierkurven in Komplexmedium zu erkennen. Bei den beiden Niedrig-pH-Sensoren S470-B und S470-C sind diese besonders ausgeprägt, wodurch wieder die Beeinträchtigung der mit 470 nm Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensoren in Komplexmedium deutlich wird, welche mit der Zeit zunimmt.

5.14.2 Vergleich der alten und optimierten Ausleseeinheiten

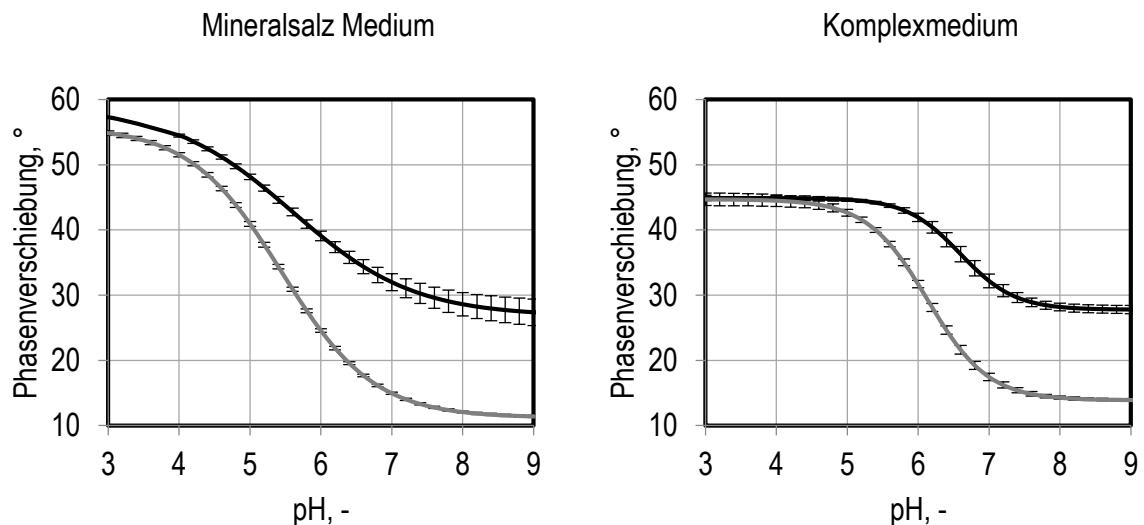


Abbildung 5.42: Kalibrierkurven des Niedrig-pH-Sensoren S505-B in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium. Die Mittelwerte der bei der Langzeitkalibrierung mit alten Ausleseeinheiten (—) und mit optimierten Ausleseeinheiten (---) ermittelten Kalibrierkurven wurden zusammen für beide Medien aufgetragen. Anhand der Fehlerbalken ist Signalstabilität der Kurven über den Zeitraum von 72 h ersichtlich.

Für eine bessere Übersicht wurden die Sigmoiden der Langzeitkalibrierung nach dem Einschwingen zusammengefasst und in Mittelwerten angegeben. Wie Abbildung 5.42 zeigt, weisen die mit optimierten Ausleseeinheiten ermittelten Kalibrierkurven eine höhere Steigung und eine im Verlauf der 72 h dauernden Messung höhere Signalstabilität auf.

5.14.3 Anwendungsbereiche

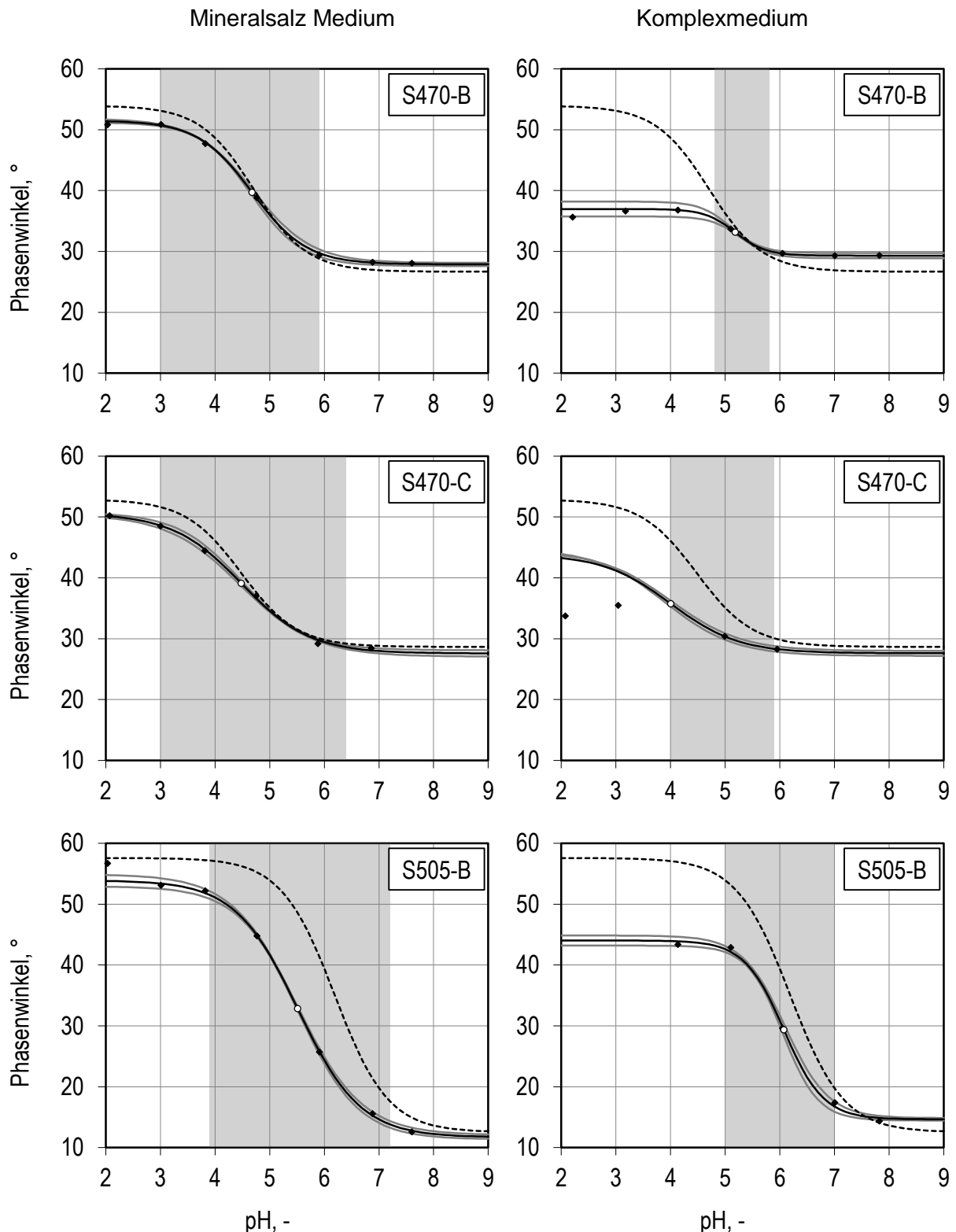


Abbildung 5.43: Kalibrierkurven der drei Niedrig-pH-Sensoren S470-B, S470-C und S505-B in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium aus der 12 h Probe der Langzeitkalibrierung. Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (\blacklozenge) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve ($-$), samt Standardabweichung ($-$) und Wendepunkt (\circ) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,2 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (\cdots).

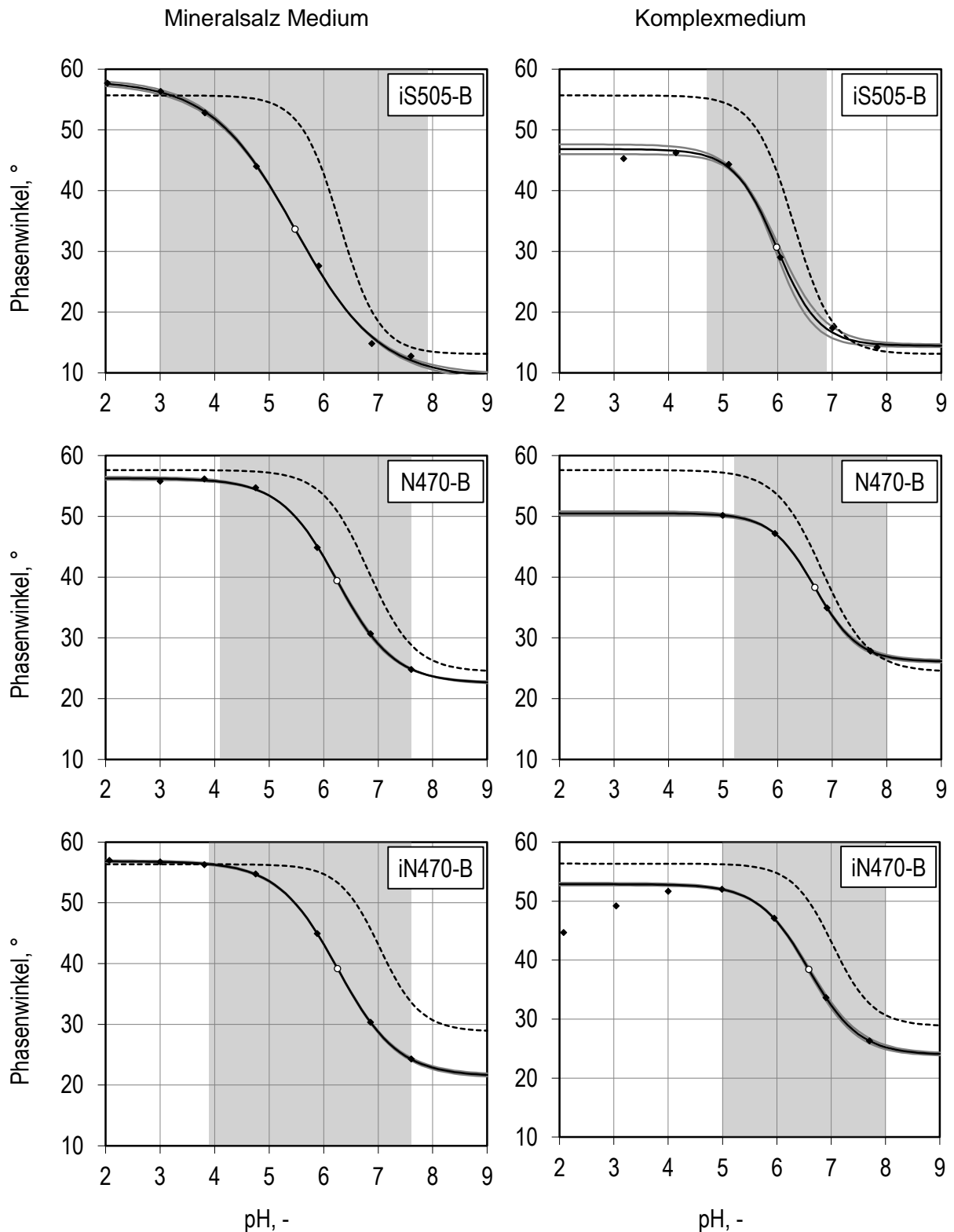


Abbildung 5.44: Kalibrierkurven des mit einer optischen Isolierung versehenen Niedrig-pH-Sensors iS505-B und der Neutral-pH-Sensoren N470-B ohne und iN470-B mit optischer Isolierung in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium aus der 12 h Probe der Langzeitkalibrierung. Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (\blacklozenge) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoide Kalibrierkurve ($-$), samt Standardabweichung ($-$) und Wendepunkt (\circ) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,2 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (\cdots).

Tabelle 5-3 Aus der 12 h Probe der Langzeitkalibrierung berechnete Anwendungsbereiche und Wendepunkte der fluorimetrischen pH-Sensoren

Medium	Sensor	Anwendungsbereich, pH			Wende- punkt	Steigung Wendepunkt
		von	bis	Breite		
Mineralsalz Medium	S470-B	3,0	5,9	2,9	4,68	0,50
	S470-C	3,0	6,4	3,4	4,46	0,60
	S505-B	3,9	7,2	3,3	5,51	0,57
	iS505-B	3,0	7,9	4,9	5,48	0,77
	N470-B	4,1	7,6	3,5	6,25	0,52
	iN470-B	3,9	7,6	3,7	6,26	0,55
Komplexmedium	S470-B	4,8	5,8	1,0	5,19	0,28
	S470-C	4,0	5,9	1,9	4,01	0,62
	S505-B	5,0	7,0	2,0	6,08	0,36
	iS505-B	4,7	6,9	2,2	5,98	0,39
	N470-B	5,2	8,0	2,8	6,68	0,40
	iN470-B	5,0	8,0	3,0	6,59	0,46

Die beiden mit 470 nm angeregten Niedrig-pH-Sensoren S470-B und S470-C zeigen in definiertem Mineralsalz Medium ausreichend große, bereits bei pH 3 beginnende Anwendungsbereiche, auch wenn der dabei abgedeckte Phasenwinkelbereich nur 20° beträgt. Allerdings verringern sich in Komplexmedium beide Bereiche deutlich.

Der mit 505 nm angeregte Niedrig-pH-Sensor S505-B in Mineralsalz Medium zeigte einen, erst bei pH 3,9 beginnenden, aber ähnlich großen Anwendungsbereich. Im Gegensatz zu den beiden S470 Sensoren wird Sensor S505-B in Komplexmedium weniger beeinträchtigt und zeigt einen bei pH 5,0 beginnenden Anwendungsbereich. Die mit optischer Isolierung versehene Variante des Sensors iS505-B, zeigt sowohl in Mineralsalz- als auch Komplexmedium die breitesten Anwendungsbereiche.

Mit dem Sensor N470-B und dessen optisch isolierter Version iN470-B wurden auch zwei Neutral-pH-Sensoren untersucht. Der Effekt der optischen Isolierung ist hier deutlich geringer ausgeprägt und die Sensoren zeigen sowohl in komplexfreien, als auch in Komplexmedium ähnliche Anwendungsbereiche. Jedoch sind die in Mineralsalz Medium bei etwa pH 4 beginnenden Anwendungsbereiche für die Neutral-pH-Sensoren bemerkenswert.

5.14.4 Abschirmung der Medienfluoreszenz

Aufgrund der verbesserten Auflösung der mit einer optischen Isolierung überschichteten Sensoren, wurden wie in Abbildung 4.18 dargestellt, an den Unterseiten der Reaktorböden lichtundurchlässige Blenden befestigt. Mit diesen sollte verhindert werden, dass das Medium im Bioreaktor durch die transparenten Reaktorböden aus Polystyrol von den LEDs der Ausleseeinheiten angestrahlt und die dabei entstehende Hintergrundfluoreszenz mit ausgelesen wird. Aufgrund von Fertigungsfehlern war jedoch zu wenig optische Isolierung über dem Sensorfilm aufgetragen worden, wodurch dieser nicht komplett abgedeckt wurde. Zudem waren die Löcher in den zur Verfügung gestellten Blenden größer als die vom Sensorfilm bedeckte Fläche. Hierdurch konnte der Reaktorinhalt nach wie vor von den Ausleseeinheiten angestrahlt und die entstehende Medienfluoreszenz mit ausgelesen werden. Somit war eine vollständige Abschirmung nicht gewährleistet.

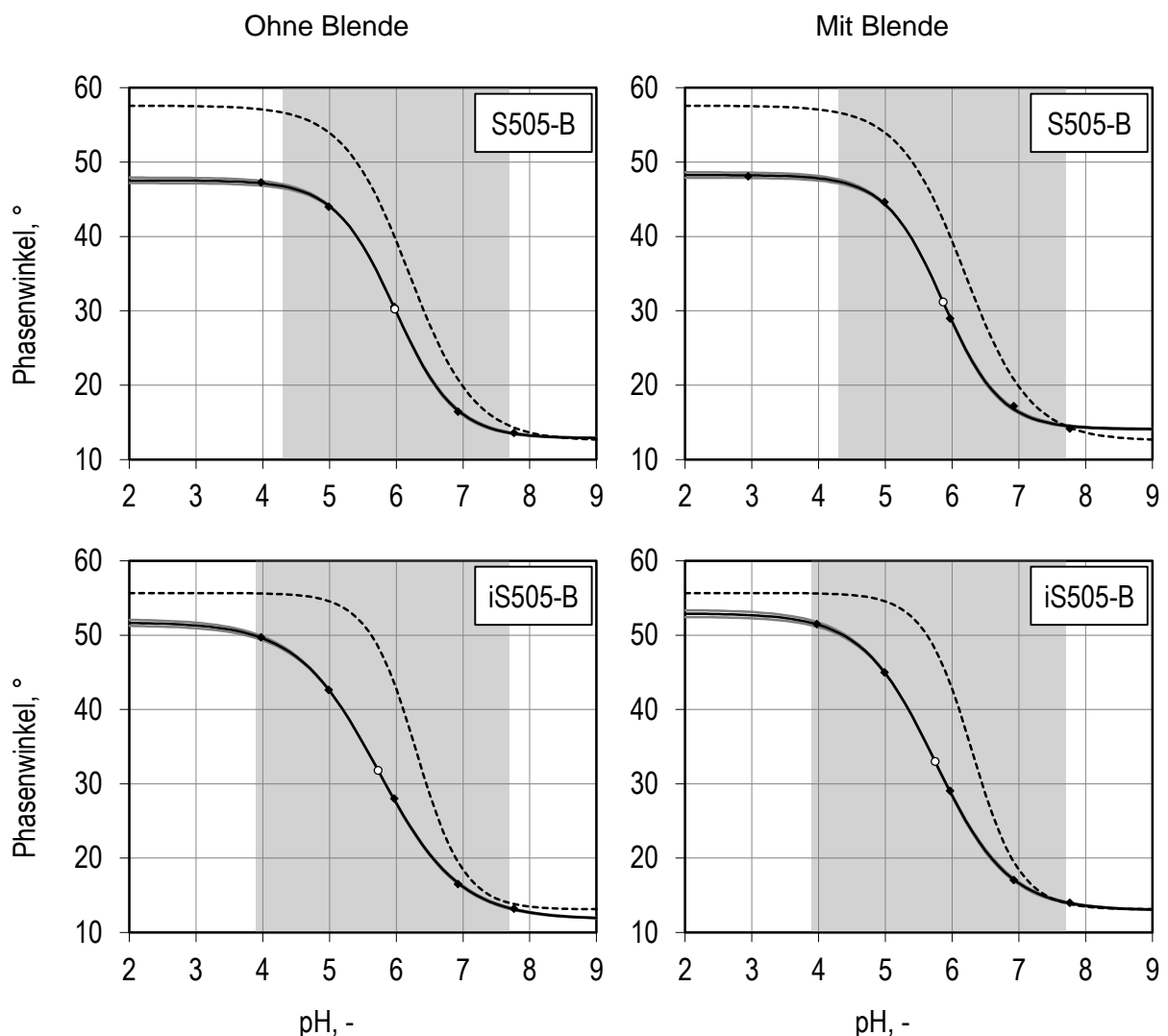


Abbildung 5.45 Kalibrierkurven der Niedrig-pH-Sensoren S505-B ohne optische Isolierung und iS505-B mit optischer Isolierung in Komplexmedium. Die bei der Kalibrierung mit und ohne eine an der Unterseite der Reaktoren befestigten Blende gemessenen Phasenwinkel (◆) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoide Kalibrierkurve (-), samt Standardabweichung (-) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,2 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (···).

Tabelle 5-4: Anwendungsbereiche und Wendepunkte der mit optischen Isolierungen und Blenden versehenen Sensoren

Medium	Sensor	Anwendungsbereich, pH			Wende- punkt	Steigung Wendepunkt
		von	bis	Breite		
Komplexmedium ohne Blende	S505-B	4,3	7,7	3,4	5,98	0,45
	iS505-B	3,9	7,7	3,8	5,73	0,6
Komplexmedium mit Blende	S505-B	4,3	7,7	3,4	5,87	0,43
	iS505-B	3,9	7,7	3,8	5,75	0,54

Wie in Abbildung 5.45 zu sehen, zeigt der Einsatz einer Blende bei den Niedrig-pH-Sensoren S505-B ohne optische Isolierung eine Verschiebung des Wendepunktes um 0,1 pH in Saure, wodurch die Phasenwinkeldifferenz zwischen pH 4,3 bis 6,0 erhöht und damit die Auflösung des Sensors in diesem Bereich verbessert wird.

Bei Einsatz einer Blende mit den optisch isolierten Niedrig-pH-Sensoren iS505-B ist keine Verschiebung des Wendepunktes zu beobachten, jedoch erhöht sich hier der Phasenwinkel an der Grenze des Anwendungsbereiches um 2°, wodurch ebenfalls die Phasenwinkeldifferenz zwischen pH 4,3 bis pH 6,0 erhöht und damit die Auflösung des Sensors in diesem Bereich verbessert wird.

5.14.5 Diskussion

In vergleichenden Langzeitkalibrierungen konnte die Signalstabilität der zur Verfügung stehenden Sensoren erfolgreich ermittelt werden. Besonders die bei 470 nm angeregten Sensoren zeigten hier in komplexhaltigem Medium innerhalb der ersten 12 h stark schwankende Sigmoiden.

Hierbei zeigte sich auch der positive Einfluss der optimierten Ausleseeinheiten mit kürzeren Belichtungszeiten und engeren optischen Filtern, welche eine geringere Drift der Sigmoiden zeigten und größere Phasenwinkelbereiche abdeckten.

Durch den Vergleich der in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium durchgeführten Kalibrierungen konnte zudem die Querempfindlichkeit der Sensoren auf fluoreszierende komplexe Medienbestandteile beurteilt werden. Beim Vergleich der Sigmoiden der bei 470 nm angeregten Sensoren mit denen der bei 505 nm angeregten Sensoren zeigten letztere überlegene Eigenschaften hinsichtlich der Auflösung, des dynamischen Bereichs und der Querempfindlichkeit. So zeigten die bei 470 nm angeregten Niedrig-pH-Sensoren einen für den Bioprozesseinsatz unzureichenden Anwendungsbereich der Sigmoiden in Komplexmedium. Auch die bei 505 nm angeregten Niedrig-pH-Sensoren S505-B und iS505-

B zeigten in Komplexmedium einen reduzierten Anwendungsbereich, welcher jedoch trotz der Hintergrundfluoreszenz des Mediums eine Messung von pH 5,0 bis 7,5 zuließ. Die bei 470 nm angeregten Neutral-pH-Sensoren zeigten ebenfalls eine Beeinträchtigung des Anwendungsbereiches, waren aber weiterhin im pH-Bereich von 5,0 bis 7,5 einsetzbar, wenn auch mit geringerer Phasenwinkeldifferenz und somit Auflösung als die mit 505 nm angeregten Niedrig-pH-Sensoren.

Um die als Störquelle identifizierte Hintergrundfluoreszenz durch komplexe Medienbestandteile zu eliminieren, wurden einige Sensoren mit einer optischen Isolierung über dem Sensorfilm versehen. Zudem wurden einige Reaktorböden mit lichtundurchlässigen Blenden versehen. Der Erfolg beider Maßnahmen konnte anhand einer gesteigerten Auflösung der Sensoren im sauren Milieu beobachtet werden, wobei sich deren Effekt auch noch kombinieren ließ.

Abschließend haben sich sowohl der Wechsel zu einer Anregungswellenlänge von 505 nm zum Anregen der pH-Sensoren als auch deren Abschirmung bewährt, um einen Sensor mit verringerter Querempfindlichkeit zu erhalten, welcher selbst in Medium mit komplexen Bestandteilen noch bis pH 5,0 betrieben werden kann. Anhand der begleitend charakterisierten Neutral-pH-Sensoren N470-B und iN470-B konnte zudem gezeigt werden, dass sich die gewonnenen Erkenntnisse in Form einer optischen Isolierung auch auf die bei 470 nm angeregten Sensoren übertragen lässt.

5.15 Parallele Satzverfahren mit *Clostridium acetobutylicum*

5.15.1 pH Messung im Bioprozesseinsatz

Die im sauren Milieu ablaufende Aceton-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation (Schmidt, 2013) wurde als Anwendungsbeispiel für die neuen niedrig pH Sensoren ausgewählt. Der Niedrig-pH-Sensor S505-B wurde wie in Kapitel 4.7 beschrieben in MS-MES Medium kalibriert und zur pH-Kontrolle des anaeroben Bioprozesses eingesetzt. Dieser kann in vier Phasen unterteilt werden. Nach einer Verzögerungsphase, während der sich die Mikroorganismen an die Wachstumsbedingungen im Medium adaptieren steigt die Zellzahl in der Übergangsphase langsam an. In der anschließenden exponentiellen Wachstumsphase vermehren sich die Zellen maximal. Hierbei unterscheidet man zwischen acidogener Wachstumsphase, mit Säurebildung, und nachfolgender solventogener Phase, in der Säuren wiederaufgenommen und Lösemittel gebildet werden. Dies ist sehr gut an dem pH Verlauf des unregulierten Satzprozesses zu erkennen. Zuletzt führt die Akkumulation von Lösemitteln, wie Butanol, zur Absterbephase. Im Laufe der Kultivierung wurden im 3-fach Ansatz Proben genommen und deren pH mit einer Einstabmesskette kontrolliert. Wie in Abbildung 5.46 und Abbildung 5.48 zu sehen zeigen die mit beiden Methoden ermittelten pH eine sehr gute Übereinstimmung. Mit Ausnahme der 24 h Probe beträgt die Abweichung weniger als 0,1 pH Stufen.

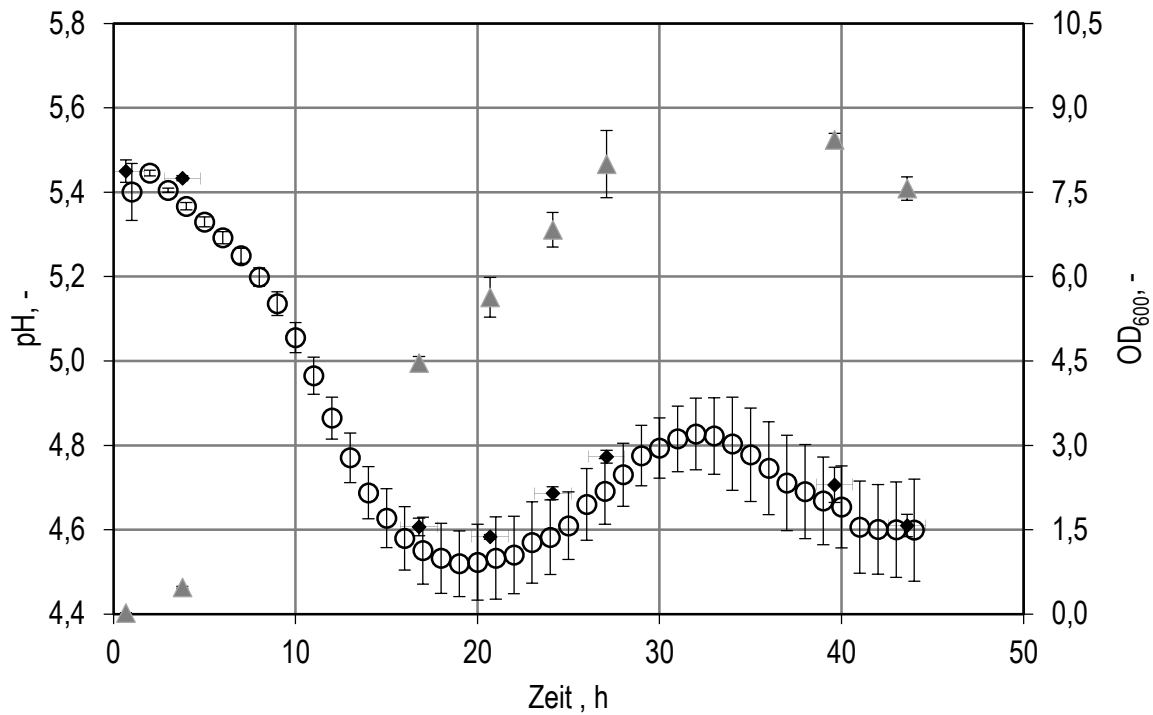


Abbildung 5.46: Vergleichende Darstellung der mit fluorimetrischen Sensoren (○) und Glaselektrode (◆) ermittelten pH bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* mit zugehöriger optischer Dichte (▲) bei 600 nm.

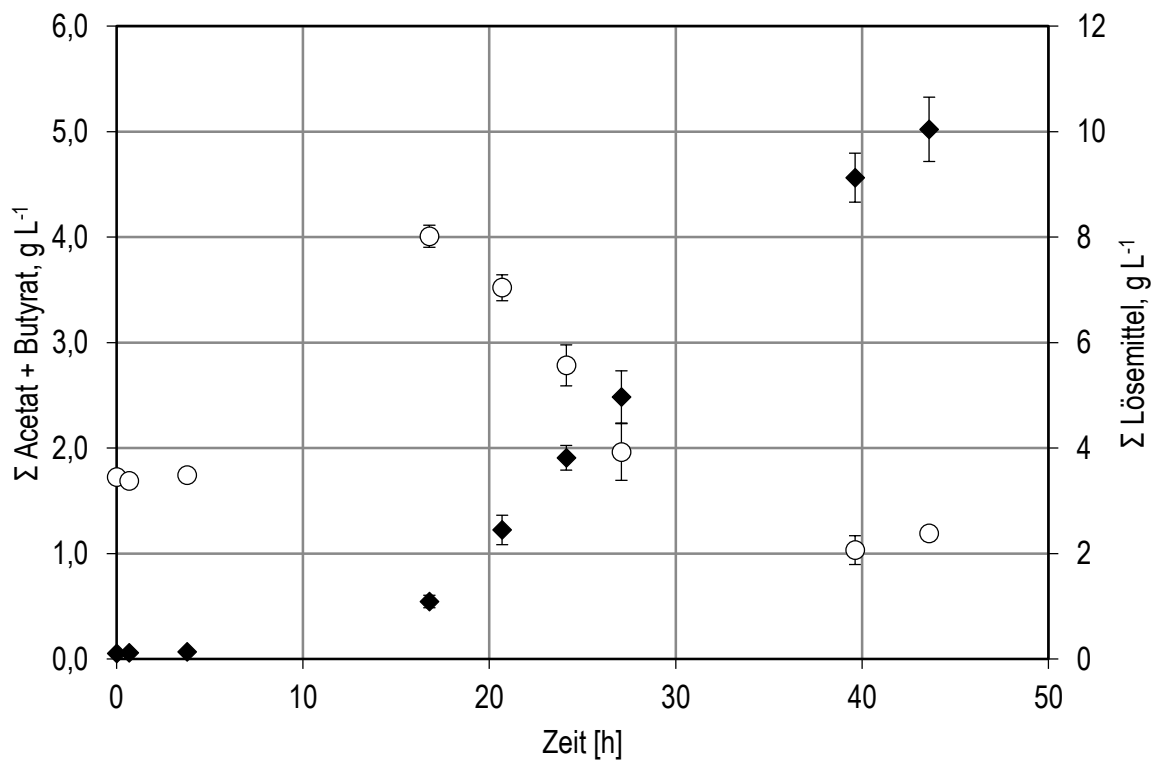


Abbildung 5.47: Konzentrationen von Acetat und Butyrat (○) mit den gebildeten Lösemitteln Aceton, Butanol und Ethanol, (◆) bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* mit den Endkonzentrationen: Acetat 0,6 g L⁻¹, Butyrat 0,6 g L⁻¹, Aceton 3,6 g L⁻¹, Butanol 6,1 g L⁻¹ und Ethanol 0,4 g L⁻¹.

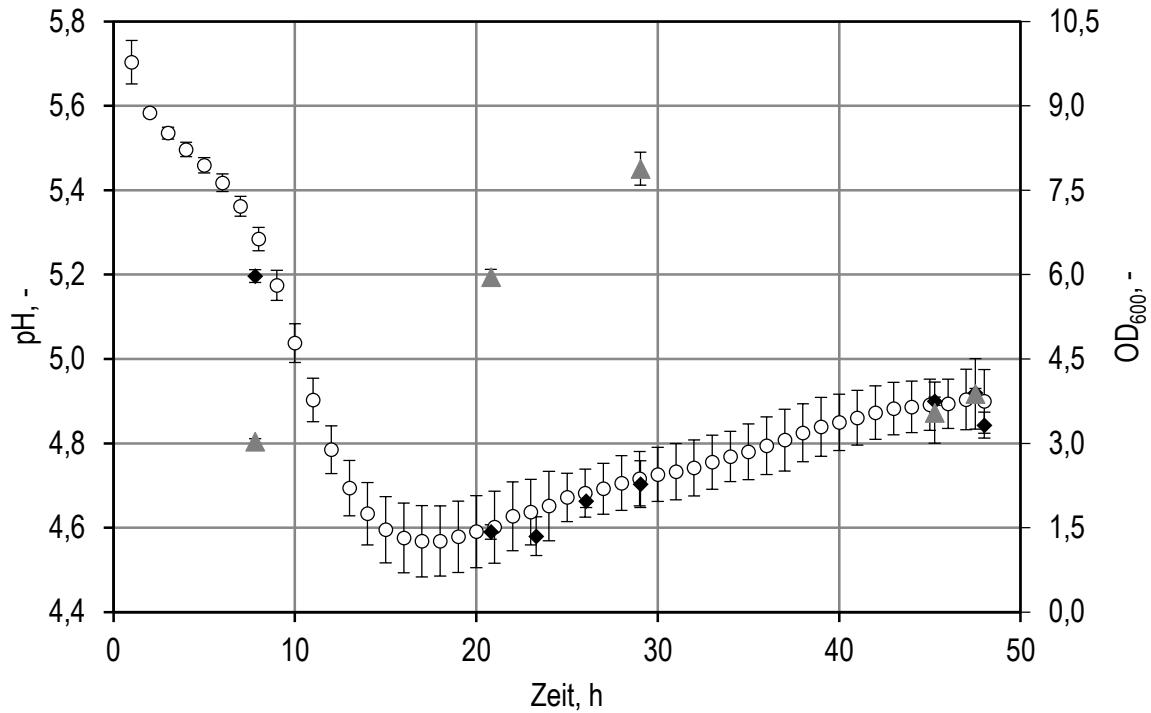


Abbildung 5.48: Vergleichende Darstellung der mit fluorimetrischen Sensoren (○) und Glaselektrode (◆) ermittelten pH bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* ohne Umstellung des Stoffwechsels mit zugehöriger optischer Dichte (▲) bei 600 nm.

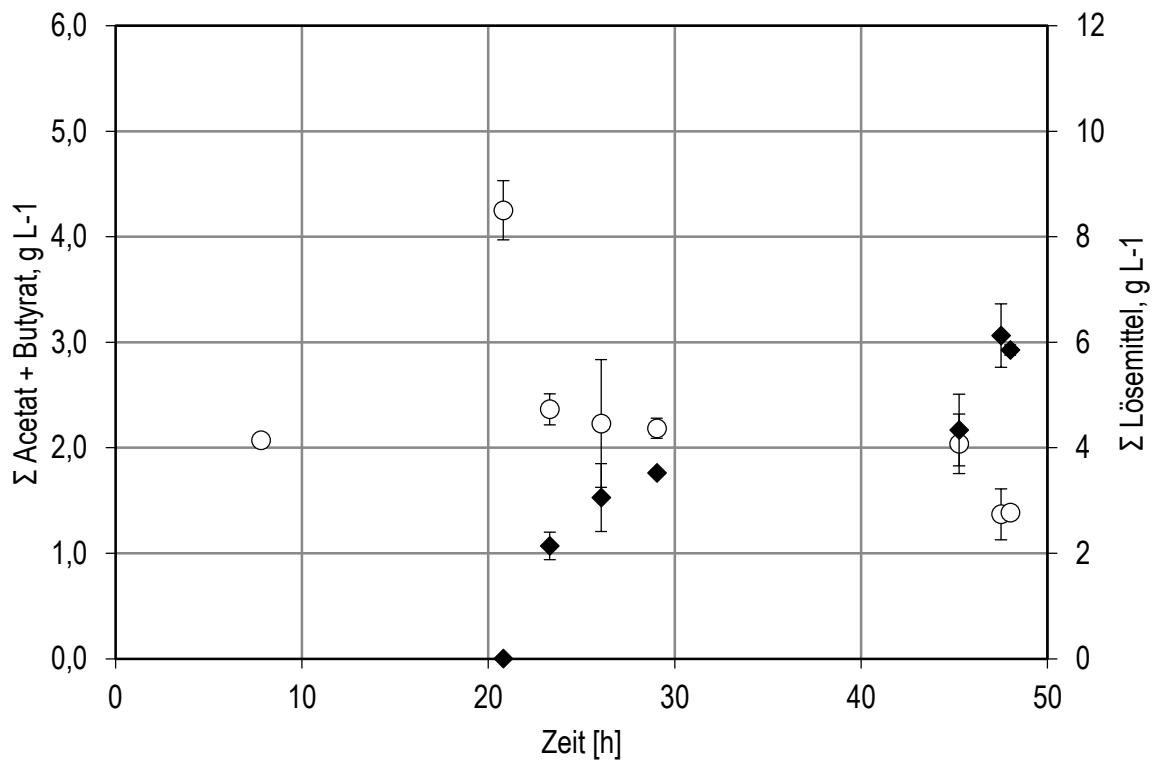


Abbildung 5.49 Konzentrationen von Acetat und Butyrat (○) mit den gebildeten Lösemitteln Aceton, Butanol und Ethanol (◆) bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* mit den Endkonzentrationen: Acetat 1,4 g L⁻¹, Butyrat 1,7 g L⁻¹, Aceton 1,9 g L⁻¹, Butanol 3,9 g L⁻¹ und Ethanol 0,1 g L⁻¹.

5.15.2 Diskussion

Mit Hilfe der fluorimetrischen Sensoren konnte der in vorangegangenen Arbeiten beschriebene charakteristische pH-Verlauf der unregelmäßigen ABE-Fermentation erfolgreich im parallelen 10 mL-Maßstab nachverfolgt werden (Schmidt, 2013). Im Laufe der Fermentation steigt die Standardabweichung für die Werte der fluorimetrischen Sensoren aufgrund der individuellen pH-Varianz in den einzelnen Reaktoren des Mehrfachansatzes an. Während der Messung kann anfänglich ein Absinken des pH von rund 5,5 auf 4,5 bei etwa 19 h Prozesszeit beobachtet werden. Anschließend steigt der pH bis 32 h Prozesszeit an und erreicht ein lokales Maximum von pH 4,8. Der pH-Anstieg kann mit der Umsetzung der zu Beginn gebildeten Säuren Acetat und Butyrat erklärt werden, was mit den HPLC-Messungen der zugehörigen Proben übereinstimmt, wie Abbildung 5.47 zeigt. Von 32 bis 44 h Prozesszeit wird ein zweiter pH-Abfall beobachtet, bis der Prozess beendet wurde.

Wie in Abbildung 5.48 zu sehen konnte bei einer weiteren Kultivierung eine Abweichung vom charakteristischen pH Verlauf mit den fluorimetrischen Sensoren und der Glaselektrode aufgezeichnet werden. Der zuvor nach 20 h beobachtete charakteristische pH Anstieg, der auf eine Stoffwechsellage und die Umsetzung der zuvor gebildeten Säuren hinweist, bleibt aus. Wie in Abbildung 5.49 zu sehen wird dies von den Ergebnissen der HPLC-Messung bestätigt, da im Gegensatz zur ersten Fermentation in diesem Zeitraum auch eine geringere Abnahme der Konzentrationen der Säuren zu sehen ist. Ebenfalls kann auch eine unvollständige Umsetzung der Glucose festgestellt werden, welche am Ende der Fermentation noch mit 18 g L^{-1} vorliegt.

Anhand des Prozessbeispiels der ABE-Fermentation konnte der erfolgreiche Einsatz der neuen Niedrig-pH-Sensoren gezeigt werden. Die Sensoren erschließen dabei den bisher nicht von fluorimetrischen Sensoren abgedeckten Bereich unterhalb pH 6,0 und erlauben die zuverlässige Messung eines zwischen pH 4,5 bis pH 5,5 variierenden Fermentationsprozesses während der gesamten Prozessdauer von 44 Stunden. Anhand der präzisen Messungen konnte mit Hilfe der Sensoren bereits während der Fermentation eine Aussage über deren erfolgreichen Verlauf gemacht werden, wie beispielsweise anhand der mit dem pH-Verlauf korrelierenden Stoffwechsellage gezeigt wurde.

Dies unterstreicht, dass mit den neu entwickelten Sensoren erstmals im pH Bereich unter 6,0 mit fluorimetrischen Sensoren bei der parallelen Kultivierungen im Milliliter-Maßstab kritische Prozessinformationen zu Verfügung gestellt werden konnten.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Die Gewinnung von technisch relevanten Prozessinformationen bei der Entwicklung von neuen Bioprozessen für den industriellen Maßstab stellt einen wesentlichen Engpass dar. Ein Ansatz zur Überwindung dieser Problematik ist die Miniaturisierung und Parallelisierung von Bioreaktoren (Zhang *et al.*, 2007). Am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik wurden daher in vorangegangenen Arbeiten ein Parallelbioreaktorsystem mit 48 Rührkesselreaktoren im Milliliter-Maßstab zur ‚Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung‘ entwickelt (Puskeiler *et al.*, 2005b). Die automatisierte Durchführung von Zulaufverfahren konnte bisher jedoch lediglich intermittierend mit einem Laborroboter erfolgen. Dieser bewerkstelligt zudem die pH-Reglung und regelmäßige Probenahmen. Muss der Roboter mehrere Aufgaben gleichzeitig verrichten, so werden diese anhand festgelegter Prioritäten zeitlich versetzt ausgeführt (Weuster-Botz *et al.*, 2005). Hierdurch kann es zu stochastisch auftretenden Unregelmäßigkeiten bei der Substratzugabe oder pH-Reglung kommen.

Um diese Unregelmäßigkeiten zu beseitigen, die Abtastzeiten stark zu verkürzen und gleichzeitig das Kontaminationsrisiko der durch nicht keimfreien Raum bewegten Pipettenspitzen zu vermeiden, wurde in Vorarbeiten ein Labormuster einer neuartigen Mikrodosiereinheit für die quasi-kontinuierliche Dosierung entwickelt (Gebhardt *et al.*, 2011). Diese zeichnet sich durch 144 magnetisch induktiv betriebene Mikro-Membranpumpen aus, welche vollständig in den Deckel des Parallelbioreaktorsystems integriert wurden. Durch jeweils 3 Pumpen soll jeder der 48 Reaktoren gleichzeitig und individuell mit bis zu drei Substraten oder Titrationsmitteln versorgt werden. Durch die kontaktlose magnetisch-induktive Kraftübertragung der Pumpen kann deren Steuereinheit einfach von der Mikrodosiereinheit getrennt werden. Die komplett autoklavierbare Fluidikeinheit der Mikrodosiereinheit kann anschließend zusammen mit Gasverteiler und Rührorganen vom Parallelbioreaktorsystem abgenommen und autoklaviert werden. Die pH-Kontrolle im Parallelbioreaktorsystem erfolgte bisher mit optischen Sensoren, welche die Kultivierung im 10 mL-Maßstab auf einen Messbereich von pH 6,0 bis pH 8,0 einschränkten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum einen die Mikrodosiereinheit charakterisiert und gegebenenfalls optimiert werden, sowie beispielhaft der Bioprozesseinsatz mit parallelen Zulaufverfahren erfolgen. Zum anderen sollten optische Niedrig-pH-Sensoren für den biotechnologisch relevanten pH-Bereich $< \text{pH } 6,0$ ausgewählt, charakterisiert und beispielhaft im Bioprozesseinsatz verwendet werden.

Die Funktionsprüfung des ursprünglichen Labormusters der Mikrodosiereinheit zeigte zunächst schwerwiegende Mängel bezüglich der Abdichtung der Fluidikeinheit, der Aktoren zum Betrieb der Mikro-Membranpumpen und der magnetischen Komponenten.

Die drei grundlegenden Funktionen der Dichtung sind die Dichtung gegen Flüssigkeitsaustritt aus dem Kanalsystem, Dichtung gegen Gaseintrag in das Kanalsystem und damit die zuverlässige Flüssigkeitsversorgung der Pumpen an allen Positionen. Um diese Funktionen zu gewährleisten wurden sowohl die Kanalplatte als auch die Membranen mehrfach modifiziert oder deren Fertigungstechnik angepasst. Dennoch konnte nach dem ursprünglich realisierten Prinzip der Flächendichtung kein ausreichender Dichtschluss erreicht werden. Erst durch die Integration von Stegblechen, welche die vorherige Flächendichtung in eine Profildichtung mit Linienpressung überführten, konnte in Verbindung mit den reduzierten Fertigungstoleranzen der überarbeiteten Bauteile eine zuverlässige Funktion der Dichtung erzielt werden.

Bei der Entwicklung eines zuverlässigen Aktors zum Betrieb der Mikro-Membranpumpen zeigte sich zunächst die unabdingbare Notwendigkeit einer präzisen Fertigung aller Bauteile. Ebenso wie deren in allen Belangen aufeinander abgestimmte Geometrie muss auch deren Oberflächenbeschaffenheit genauestens angepasst sein. Durch entsprechende Veränderungen der Aktoren und der Aktorkammern konnten die mechanisch bedingten Pumpenausfälle beseitigt werden.

Ebenfalls konnten durch Anhebung der Betriebsspannung Unzulänglichkeiten der Bauteilbeschaffenheit durch eine gesteigerte Magnetkraft kompensiert werden. Mit zunehmender Betriebsdauer wurde bei einigen Bauteilen die Induktion einer magnetischen Remanenz beobachtet. Die resultierenden magnetisch bedingten Ausfälle der Aktoren konnten durch den Einbau einer Flussplatte aus nicht magnetisierbarem Stahl beseitigt werden.

Die Entwicklung einer akustischen Methode zur Aufzeichnung der Anschläge der Aktoren in den Aktorkammern erlaubte eine von den Förderraten der Pumpen unabhängige Kontrolle der Aktorfunktion.

Die Fördereigenschaften der modifizierten Mikrodosiereinheit wurden gravimetrisch bestimmt. Die Messung der Förderraten einzelner Pumpen wurde in Echtzeit durchgeführt. Bei gleichzeitig an einem Fluidkanal parallel betriebenen Pumpen wurden mehrfache Endpunktmessungen genutzt um die Förderraten zu bestimmen. Zur Messung der Förderraten bei gleichzeitig parallel betriebenen Pumpen an mehreren Kanälen wurden mit fluoreszierenden Farbstoffen versehene Lösungen benutzt, um über deren Konzentration die anteiligen Förderraten zu berechnen.

Durch gravimetrische Messungen wurde die Mikrodosiereinheit zunächst für die Förderung an einem Fluidkanal kalibriert. Dabei konnte ein linearer Zusammenhang der individuellen Frequenz der kalibrierten Pumpen und deren Förderraten von 0,1 bis 3,6 mL h⁻¹ nachgewiesen werden.

Gleichzeitig wurde hierbei auch ein Einfluss des angelegten Vordrucks auf die Förderraten der Mikrodosiereinheit nachgewiesen. Bereits bei einem Vordruck von weniger als 10 mbar öffneten sich die Lippenrückschlagventile einiger Pumpen und liefen aus. Bei weiter reduziertem Vordruck konnten die Anzahl und die Leckageraten der auslaufenden Pumpen reduziert werden. Gleichzeitig wurden jedoch, insbesondere bei mit niedrigen Förderraten unterhalb 1 mL h⁻¹ angesteuerten Pumpen, Ausfälle der Förderung beobachtet.

Beim parallelen Betrieb von zwei Fluidkanälen kam es zu Abweichungen der Förderraten der zuvor im Einzelkanalbetrieb kalibrierten Pumpen.

Die Mikrodosiereinheit wurde mehrfach ohne eine Beschädigung autoklaviert, jedoch wurden stark schwankende Förderleistungen der zuvor kalibrierten Mikromembranpumpen gemessen. Durch Anschluss eines Druckreglers und Einsatz härterer Lippenrückschlagventile konnte die Vordruckempfindlichkeit der Pumpen und die damit verbundenen Leckageraten verringert, aber nicht beseitigt werden. So konnten bei Lippenrückschlagventilen aller untersuchten Härtegrade bereits bei einem Vordruck von 2,5 mbar Leckagen beobachtet werden. Ein mit Miniatur-Schirmventilen versehenes Labormuster zeigte ebenfalls bereits bei 2,5 mbar Vordruck keinen Dichtschluss mehr (siehe Anhang 8.4).

Trotz der stochastisch auftretenden Leckagen erhöhte die Regelung des Vordrucks auf 2,5 mbar, zusammen mit dem Einsatz von Lippenrückschlagventilen aus Silikon mit 70 ° Shore A Härte die Präzision und Zuverlässigkeit der modifizierten Mikrodosiereinheit deutlich.

So wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits von einem Anstieg der Dosierfehler bei Förderraten unterhalb 4,0 mL h⁻¹ berichtet (Gebhardt *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu konnte die modifizierte Mikrodosiereinheit erfolgreich bei der Kultivierung von *Escherichia coli* im Zulaufbetrieb mit Förderraten von 150 bis 321 µL h⁻¹ eingesetzt werden. Wie Abbildung 6.1 zeigt, konnten anhand der gemessenen Gelöstsauerstoffkonzentration für die Reaktionsansätze im Betrieb mit der Mikrodosiereinheit reduzierte Fluktuationen der Substratkonzentration im Vergleich zum Betrieb mit einem Laborroboter bestimmt werden. Dies kann mit den geringen Dosiervolumen von etwa 1,3 µL pro Hub der Mikro-Membranpumpen und den kurzen Abtastzeiten von 4 bis 12 Sekunden erklärt werden.

In weiteren vergleichenden Zulaufkultivierungen von *Escherichia coli* wurde dabei mit beiden Systemen erstmals ein Hochzelllichtprozess im parallelen Mililitermaßstab ermöglicht. Die Tatsache, dass dabei mit dem modifizierten Labormuster der Mikrodosiereinheit wiederholt höhere optische Dichten als in den mit einem Laborroboter versorgten Reaktionsansätzen erreicht wurden, unterstreicht deren Potential.

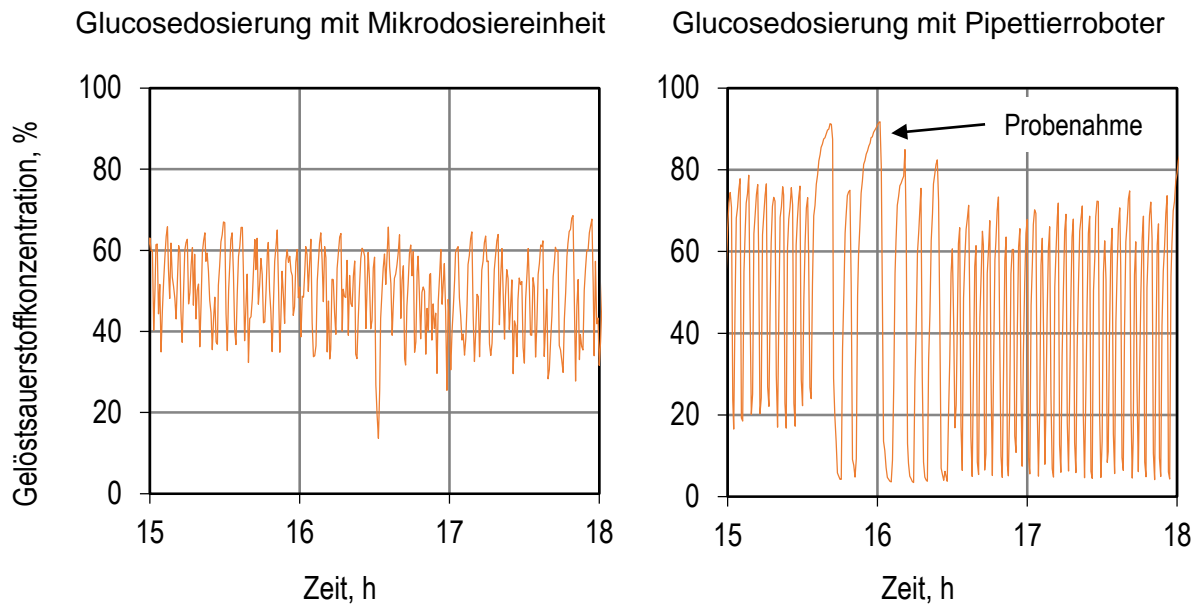


Abbildung 6.1: Vergleichende Darstellung der Gelöstsauerstoffkonzentrationen in je einem beispielhaft ausgewählten Rührkesselreaktor im Millilitermaßstab bei der pH konstanten Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) im Zulaufverfahren mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter (260 bis 321 $\mu\text{L h}^{-1}$ Glucoselösung bei ca. 19 bis 29 g L^{-1} Biotrockenmasse).

Bei der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Charakterisierung der optisch auslesbaren Niedrig-pH-Sensoren wurde eine Störung der Sensoren in Medien mit komplexen Bestandteilen beobachtet. Bereits in vorangegangenen Arbeiten mit optisch auslesbaren Neutral-pH-Sensoren wurde von einer Störung der Sensoren durch Riboflavin berichtet (Vester, 2009). Diese Störung wurde mit der Fluoreszenz des Riboflavins bei den zum Anregen und Auslesen der Sensoren verwendeten Wellenlängen erklärt. Obwohl die zum Auslesen der Sensoren verwendete Methode des *Dual Lifetime Referencing* die meisten Störquellen kompensieren kann, stellt die intrinsische Hintergrundfluoreszenz eine Ausnahme dar, da sie nicht von der Fluoreszenz des Indikatorfarbstoffs des Sensors unterschieden werden kann (Klimant *et al.*, 2001).

Durch Analysen des Fluoreszenzspektrums konnten die komplexen Medienbestandteile Hefeextrakt und Pepton als Hauptstörquellen für die Messung mit Niedrig-pH-Sensoren identifiziert werden. Zudem konnte auch eine von *Escherichia coli* Zellen selbst verursachte Hintergrundfluoreszenz beobachtet werden, welche von der Anregungswellenlänge abhängig war. So wurde bei der Wellenlängenkombination $\lambda_{\text{Anregung}} = 470 \text{ nm} / \lambda_{\text{Auslesen}} = 550 \text{ nm}$ bereits ab einer optischen Dichte (OD) von etwa 6 ein mit dieser korrelierender Anstieg der Hintergrundfluoreszenz gemessen. Bei der Verwendung der Wellenlängenkombination $\lambda_{\text{Anregung}} = 505 \text{ nm} / \lambda_{\text{Auslesen}} = 600 \text{ nm}$ konnte erst ab etwa OD = 30 eine um den Faktor 25 geringere Hintergrundfluoreszenz gemessen werden. In weiteren Spektralanalysen konnte die Wellenlängenabhängigkeit der Hintergrundfluoreszenz auch bei Hefeextrakt und Pepton enthaltendem Medium festgestellt werden. Auch hier war die Fluoreszenz bei der Anregungswellenlänge $\lambda = 470 \text{ nm}$ im Vergleich zu $\lambda = 505 \text{ nm}$ Anregungswellenlänge 16-fach erhöht.

Da bei einigen Sensoren auch eine pH und drehzahlabhängige Drift der Signale gemessen wurde, erfolgte die weitere Charakterisierung der Niedrig-pH-Sensoren durch Langzeitkalibrierungen, welche den Messbereich und die Signalstabilität der Sensoren beschreiben. Um die Querempfindlichkeit der Sensoren auf komplexe Bestandteile zu prüfen, wurden vergleichende Langzeitkalibrierungen in Medien mit und ohne komplexe Bestandteile durchgeführt. Hier zeigten die mit Licht von $\lambda = 505$ nm Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensoren im Vergleich zu den mit Licht von $\lambda = 470$ nm Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensoren größere Anwendungsbereiche, in denen der pH aufgrund eines größeren Phasenwinkelbereichs genauer aufgelöst werden konnte. Bei der Kalibrierung in Medium mit komplexen Bestandteilen zeigten die mit Licht von $\lambda = 505$ nm Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensoren zudem eine geringere Störung als die mit Licht von $\lambda = 470$ nm Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensoren, deren Auflösung für den Bioprozesseinsatz unzureichend war. Dies korreliert mit den zuvor in den Fluoreszenzspektren gewonnenen Ergebnissen.

Um der Störung der Messung durch die Hintergrundfluoreszenz von Medien entgegenzuwirken wurde eine lichtundurchlässige Beschichtung auf den Sensoren aufgebracht und lichtundurchlässige Blenden unter Reaktorböden angebracht. Hierdurch konnte die untere Grenze des Anwendungsbereich der mit Licht von $\lambda = 505$ nm Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensoren in Medium mit komplexen Bestandteilen von pH 4,3 auf pH 3,9 erweitert und die Auflösung des pH verbessert werden. Auch bei den mit Licht von $\lambda = 470$ nm Wellenlänge angeregten Neutral-pH-Sensoren konnte durch die optische Isolierung der Anwendungsbereich von pH 5,1 auf pH 5,0 erweitert und die Auflösung des pH verbessert werden.

Durch neue Ausleseeinheiten mit engeren optischen Filtern, kürzeren Belichtungszeiten zum Anregen der Sensoren und die Erhöhung der Sensorhelligkeit wurde die Auflösung der ausgelesenen Sensoren verbessert und eine durch Bleichen bedingte Drift der bei $\lambda = 505$ nm Wellenlänge angeregten Niedrig-pH-Sensoren im basischen Bereich reduziert.

Wie Abbildung 6.2 zeigt, konnten die neu entwickelten Niedrig-pH-Sensoren mit $\lambda = 505$ nm Anregungswellenlänge bei anaeroben Parallelkultivierungen von *Clostridium acetobutylicum* erfolgreich für die kontaktfreie fluorimetrische pH-Kontrolle zwischen pH 4,5 und pH 6,0 eingesetzt werden, wobei die Analyse des pH in Echtzeit bereits während der Fermentation Rückschlüsse auf eine erfolgreiche Umsetzung der Substrate zuließ.

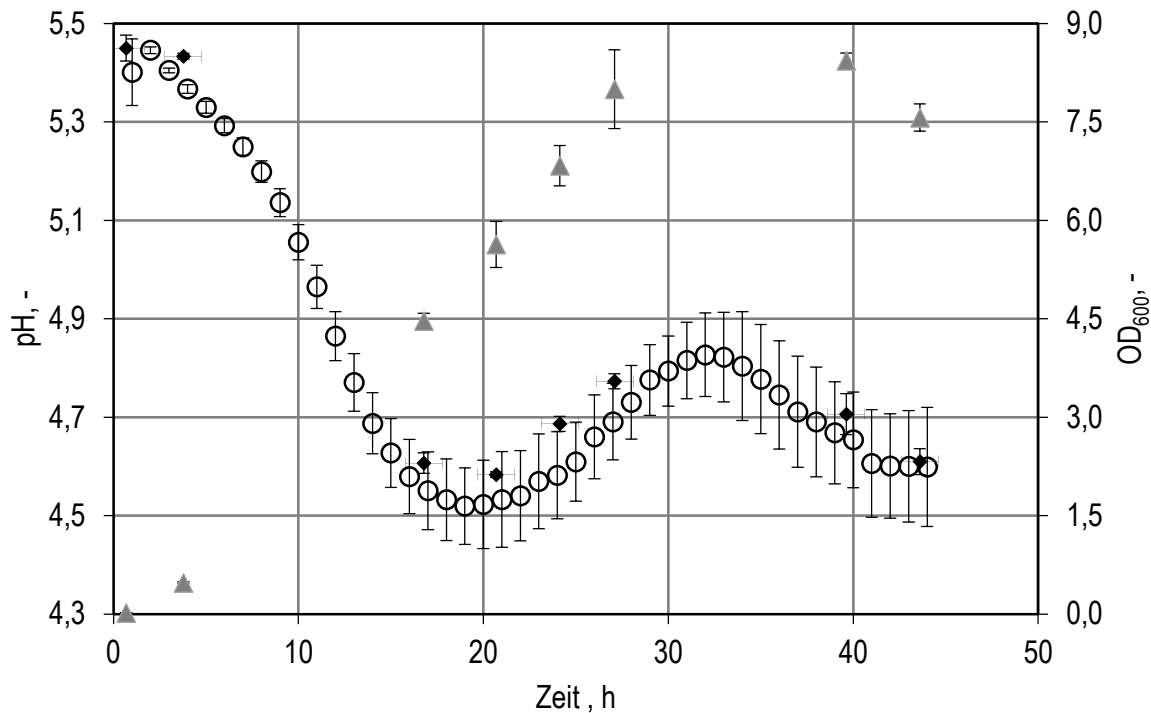


Abbildung 6.2: Vergleichende Darstellung der mit fluorimetrischen Sensoren (○) und Glaselektrode (◆) ermittelten pH bei der Parallelkultivierung von *Clostridium acetobutylicum* in Rührkesselreaktoren im Millilitermaßstab mit zugehöriger optischer Dichte (▲).

6.2 Ausblick

Bei der weiteren Entwicklung der Mikrodosiereinheit sollte besonderes Augenmerk auf den Einsatz von dicht schließenden Miniaturventilen gelegt werden, welche auch bei Vordrücken von über 50 mbar verwendet werden können. Die Nutzung eines modularen Aufbaus von in Serie gefertigten präzisen Pumpkammern, welche in eine mit vereinfachter Geometrie gefertigte Fluidikplatte eingesetzt werden könnten, würde die gestiegenen Forderungen nach Präzision bedienen und gleichzeitig die Komplexität der Bauteile reduzieren. Diese Modifikationen würden eine weitere Charakterisierung der Mikrodosiereinheit bei der parallelen Förderung mit mehreren Kanälen ermöglichen. Ebenso sollte sichergestellt werden, dass die Kalibrierung der mit neuen Miniaturventilen versehenen Pumpen auch nach dem Autoklavieren verwendet werden kann. Hierfür muss ein präzise gefertigtes Deckblech entwickelt werden, welches definierte Anschlagpunkte für die Aktoren liefert und das Eindringen von Flüssigkeit in die Aktorkammern verhindert.

Alternativ wäre auch die Entwicklung einer Mikrodosiereinheit ohne Pumpen möglich, welche beispielsweise mit einem Druckregler oder dem hydrostatischen Druck eines entsprechend hoch positionierten Vorlagebehälters betrieben wird. An Stelle der Pumpen könnten magnetisch-induktiv betriebene Ventile treten, welche aufgrund der kontaktfreien Kraftübertragung weiterhin eine einfache Separation der elektronischen Steuereinheit von der autoklavierbaren Fluidikeinheit ermöglichen.

Obwohl die entwickelten und bereits im Bioprozesseinsatz bewährten Niedrig-pH-Sensoren bereits sehr gute Ergebnisse zeigten, könnte die Herstellung von Sensoren, deren optische Isolierung das Sensormaterial komplett abdeckt, eine weitere Verringerung der Querempfindlichkeiten gegenüber Zellen und komplexen Medienbestandteilen bewirken. Dies trifft generell auch auf die bisher verwendeten Neutral-pH-Sensoren zu.

Alternativ könnten auch Spektralanalysen gängiger Medienbestandteile genutzt werden, um nach einem Wellenlängenbereich mit minimaler Hintergrundfluoreszenz zu suchen und einen im entsprechenden Wellenlängenbereich betriebenen Sensor zu entwickeln, bei dem eventuell auf eine optische Isolierung verzichtet werden kann. Basierend auf den bisher gewonnenen Daten erscheint die Untersuchung von langwelligeren Wellenlängenbereichen vielversprechend.

7 Literaturverzeichnis

- Ashraf MW, Tayyaba S, and Afzulpurkar N (2011): Micro Electromechanical Systems (MEMS) Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications. *International journal of molecular sciences*, 12(6), 3648-704.
- Bahl H (2006): Produktion von Lösungsmitteln. In G. Antranikian (Ed.), *Angewandte Mikrobiologie* (p. 316f). Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Berg HC (2004): *E.Coli in Motion* (pp. 1-5). New York: Springer-Verlag New York Inc.
- Betts J, and Baganz F (2006): Miniature bioreactors: Current practices and future opportunities. *Microbial Cell factories*, 5, 21-35.
- Braha A, and Groza M (2006): *Moderne Abwassertechnik* (p. 170). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KG.
- Chartrain M, Salmon P, Robinson D, and Buckland B (2000): Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. *Current Opinions on Biotechnology*, 11, 209-214.
- Cheng Y, Truckenmüller R, Ahrens R, Rogge T, Karlsruhe F, and Berichte W (2005): Entwicklung und Herstellung einer chemisch inerten Mikropumpe, (August).
- Chmiel H (2011): *Bioprozesstechnik* (p. 197f). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Cox G (2012): *Optical Imaging Techniques in Cell Biology* (2. ed., pp. 36-39). Boca Raton: Taylor & Francis Group LLC.
- DASGIP (2014): Multi Pump Modules 4-fold and 8-fold Parallel Fluid Transfer.
- El-Sadi H, and Esmail N (2006): Simulation of three-dimensional transient performance in micro-pump. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 115(1), 510-518.
- Felleisen M (2001): *Prozessleittechnik für die Verfahrensindustrie* (p. 140ff). München: Oldenbourg Industrieverlag GmbH.
- Ferenci T (2006): Minireview Hungry bacteria ± definition and properties of a nutritional state. *Environmental Microbiology*, 3(2001), 605-611.
- Freyer S, König M, and Künkel A (2004): Validating shaking flasks as representative screening system. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 169-173.
- Funke M (2010): *Microfluidic Bioprocess Control in Baffled Microtiter Plates* Matthias Funke. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- Funke M, Buchenauer A, Mokwa W, Kluge S, Hein L, Müller C, Kensy F, and Büchs J (2010): Bioprocess control in microscale: scalable fermentations in disposable and user-friendly microfluidic systems. *Microbial cell factories*, 9(1), 86.
- Gebhardt G (2010): *Reaktionstechnische Untersuchungen von rekombinanten Saccharomyces cerevisiae zur Bernsteinsäureherstellung*. Technische Universität München.

- Gebhardt G, Hortsch R, Kaufmann K, Arnold M, and Weuster-Botz D (2011): A New Microfluidic Concept for Parallel Operated Milliliter-Scale Stirred Tank Bioreactors. *Biotechnology Progress*, 27(3), 684 - 690.
- Grönke K (2011): *Metabolische 13C-Stoffflussanalyse* (p. 19 f.). Jülich: Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Grote R, and Antranikian G (2006): Einführung in die Diversität, Systematik und Physiologie von Mikroorganismen. In G. Antranikian (Ed.), *Angewandte Mikrobiologie* (p. 15f). Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Hoefel T, Faust G, Reinecke L, Rudinger N, and Weuster-Botz D (2012): Comparative reaction engineering studies for succinic acid production from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* in fed-batch-operated stirred tank bioreactors. *Biotechnology journal*, 7(10), 1277-87.
- Hortsch R (2011): *Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen*.
- Hsu W-T, Aulakh RPS, Traul DL, and Yuk IH (2012): Advanced microscale bioreactor system: a representative scale-down model for bench-top bioreactors. *Cytotechnology*, 64(6), 667-678.
- Huber C, Klimant I, Krause C, and Wolfbeis OS (2001): Dual lifetime referencing as applied to a chloride optical sensor. *Analytical chemistry*, 73(9), 2097-103.
- John GT, Klimant I, Wittmann C, and Heinzle E (2003): Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: A novel tool for microbial cultivation. *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 829-838.
- Kleinhans R, Brischwein M, Wang P, Becker B, Demmel F, Schwarzenberger T, Zottmann M, Wolf P, Niendorf A, and Wolf B (2012): Sensor-based cell and tissue screening for personalized cancer chemotherapy. *Medical & biological engineering & computing*, 50(2), 117-26.
- Klimant I (1999): Method and Device for Referencing Fluorescence Intensity Signals.
- Klimant I, Huber C, Liebsch G, Neurauter G, Stangelmayer A, and Wolfbeis OS (2001): Dual Lifetime Referencing (DLR) - a NEW Scheme for Converting Fluorescence Intensity into Frequency-Domain or Time-Domain Information. In B. Valeur and J.-C. Brochon (Eds.), *New Trends for Fluorescence Spectroscopy* (pp. 257-274). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Klimant I, and Leiner MJP (2002): Optischer Sensor und Sensorfeld. Deutschland.
- Knorr B, Schlieker H, Hohmann H-P, and Weuster-Botz D (2007): Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 33(3), 263-274.
- Kocincova AS, Nagl S, Arain S, Krause C, Borisov SM, Arnold M, and Wolfbeis OS (2008): Multiplex bacterial growth monitoring in 24-well microplates using a dual optical sensor for dissolved oxygen and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 430-438.
- Krahe M (2003): Biochemical Engineering. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KG.

- Kuchling H (1999): *Taschenbuch der Physik* (16th ed., p. 375 f., 555 f.). München Wien: Carl Hanser Verlag.
- Kusterer A (2007): *Reaktionstechnische Optimierung von Parallelreaktoren für kontrollierte Bioprozesse*. Technische Universität München.
- Kusterer A, Krause C, Kaufmann K, Arnold M, and Weuster-Botz D (2008): Fully automated single-use stirred-tank bioreactors for parallel microbial cultivations. *Bioprocess and biosystems engineering*, 31(3), 207-15.
- Lakowicz JR (2006): *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (p. 5). New York: Springer Science + Business Media LLC.
- Lee HLT, Boccazzi P, Ram RJ, and Sinskey AJ (2006): Microbioreactor arrays with integrated mixers and fluid injectors for high-throughput experimentation with pH and dissolved oxygen control. *Lab on a chip*, 6(9), 1229-35.
- Lee SY, Park JH, Jang SH, Nielsen LK, Kim J, and Jung KS (2008): Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and bioengineering*, 101(2), 209-28.
- Lendenmann U, Snozzi M, and Egli T (2000): Growth kinetics of Escherichia coli with galactose and several other sugars in carbon-limited chemostat culture. *Canadian Journal of Microbiology*, (46), 72-80.
- Lienhard J, Knippers J, Cremers J, and Gabler M (2010): *Atlas Kunststoffe + Membranen* (p. 63). Institut für internationale Architektur Dokumentationen GmbH&Co.KG.
- Meister E (2012): *Grundpraktikum Physikalische Chemie* (2. ed., pp. 315-339). Zürich: vdf Hochschulverlag AG.
- Millat T, Janssen H, Bahl H, Fischer RJ, and Wolkenhauer O (2011): The ph-induced metabolic shift from acidogenesis to solventogenesis in Clostridium acetobutylicum - from experiments to models. *Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterization* (pp. 33-56). Rüdeshheim/Rhein: Beilstein- Institut.
- Monot F, Martin J-R, Petitdemange H, and Gay R (1982): Acetone and Butanol Production by Clostridium Acetobutylicum in a Synthetic Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1318-1324.
- Moses S, Manahan M, Ambrogelly A, and Ling WLW (2012): Assessment of AMBR TM as a model for high-throughput cell culture process development strategy, 2012(November), 918-927.
- Nguyen N-T, and Wereley ST (2002): *Fundamentals and applications of microfluidics* (pp. 293-337). Artech house, Inc., Norwood.
- Nielsen J (2007): Fermentation Kinetics. In E. M. T. El-Mansi, C. F. A. Bryce, L. D. Arnold, and A. R. Allman (Eds.), *Fermentation Microbiology and Biotechnology* (2nd ed., p. 73 ff). Boca Raton: Taylor & Francis Group LLC.
- Pörtner R (2006): Grundlagen der Bioverfahrenstechnik. In G. Antranikian (Ed.), *Angewandte Mikrobiologie* (pp. 238-251). Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.

- Poschenrieder S (2012): *Charakterisierung magnetisch angetriebener Mikropumpen für Bioprozesse im Milliliter-Maßstab*. Technische Universität München.
- Puskeiler R (2004): *Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung*. Technische Universität München.
- Puskeiler R, Kaufmann K, and Weuster-Botz D (2005a): Development, parallelization and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD9). *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 512-513.
- Puskeiler R, Kusterer A, and 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(3), 227-235.
- Ratcliffe E, Glen KE, Workman VL, Stacey a. J, and Thomas RJ (2012): A novel automated bioreactor for scalable process optimisation of haematopoietic stem cell culture. *Journal of Biotechnology*, 161(3), 387-390.
- Richter M, Linnemann R, and Woias P (1998): Robust design of gas and liquid micropumps. *Sensors and Actuators A: Physical*, 68(1-3), 480-486.
- Riesenberg D, Schulz V, Knorre W a, Pohl HD, Korz D, Sanders E a, Ross a, and Deckwer WD (1991): High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *Journal of biotechnology*, 20(1), 17-27.
- Scheibel T (2009): Spinnenseide- Was Spiderman wissen sollte. *Biospektrum*, 23, 23ff.
- Scheidle M, Klinger J, and Büchs J (2007): Combination of on-line pH and oxygen transfer rate measurement in shake flasks by fiber optical technique and respiration activity monitoring system (RAMOS). *Sensors*, 7, 3472-3480.
- Schlücker E (2001): Mikrodosiertchnik für Flüssigkeiten. In G. Vetter (Ed.), *Handbuch Dosieren* (pp. 679-691). Essen: Vulkan Verlag.
- Schmidt M (2013): *Reaktionstechnische Untersuchungen von Clostridium acetobutylicum Stämmen zur Butanolgärung in Rührkesselreaktoren*.
- Schönheit P (2006): Grundlagen des Kohlehydratabbaus in Mikroorganismen. In G. Antranikian (Ed.), *Angewandte Mikrobiologie* (p. 69). Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Schragg AH (2009): *Biofuels: Production, Application and Development* (p. 133f). Wallingford: CABI Head Office.
- Schügerl K (1997): *Bioreaktionstechnik: Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen* (pp. 5-12,141 f.). Basel: Birkhäuser Verlag AG.
- Seibold G, Dempf S, Schreiner J, and Eikmanns BJ (2007): Glycogen formation in *Corynebacterium glutamicum* and role of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Microbiology*, 153(Pt 4), 1275-1285.
- Seibold GM, and Eikmanns BJ (2007): The glgX gene product of *Corynebacterium glutamicum* is required for glycogen degradation and for fast adaptation to hyperosmotic stress. *Microbiology*, 153(Pt 7), 2212-2220.

- Shiloach J, and Fass R (2005): Growing E. coli to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnology advances*, 23(5), 345-57.
- Spreng S (2010): *Entwicklung eines XML-Editors für Dosierprofile einer Mikrodosiertechnik*. Technische Universität München, Garching.
- Storhas W (1994): *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen* (pp. 279-297). Braunschweig: Fr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH.
- Storhas W (2003): *Bioverfahrensentwicklung* (1. Auflage., p. 5ff). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Storhas W (2013): *Bioverfahrensentwicklung* (2. ed., pp. 5-21). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Sussmann M (1997): Escherichia Coli and Human Disease. In M. Sussmann (Ed.), *Escherichia Coli: Mechanisms of Virulence* (pp. 1-5). Cambridge: Cambridge University Press.
- Thiemann WJ, and Palladino MA (2007): *Biotechnologie* (pp. 1-30). München: Pearson Education Deutschland GmbH.
- Vester AGS (2009): *Reaktionstechnische Untersuchungen zur mikrobiellen Riboflavin-Herstellung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren*. Technische Universität München.
- Vetter G (1998): *Leckfreie Pumpen, Verdichter und Vakuumpumpen* (pp. 161-178). Essen: Vulkan Verlag.
- Vetter G (2001): *Handbuch Dosieren* (p. 2f). Essen: Vulkan Verlag.
- Vetter G (2003): Dosieren. *Chemie Ingenieur Technik*, 75(10), 1567-1572.
- Weidegans B (2004): *New Fluorescent Optical pH Sensors with Minimal Effects of Ionic Strength*. Universität Regensburg.
- Weiss D, Brischwein M, Grothe H, Wolf B, and Wiest J (2013): Label-free monitoring of whole cell vitality. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference, 2013*, 1607-10.
- Wenk P, Hemmerich J, Müller C, and Kensy F (2012a): Hochparallele Bioprozessentwicklung in geschüttelten Mikrobioreaktoren. *Chemie Ingenieur Technik*, 78(8), 256-260.
- Wenk P, Hemmerich J, Müller C, and Kensy F (2012b): Hochparallele Bioprozessentwicklung in geschüttelten Mikrobioreaktoren. *Chemie Ingenieur Technik*, 84(5), 704-714.
- Weuster-Botz D (2005): Parallel Reactor Systems for Bioprocess Development. In T. Scheper and U. Kragl (Eds.), *Technology Transfer in Biotechnology* (pp. 125-142). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Weuster-Botz D (2006): Mikro-Bioverfahrenstechnik. *Chemie Ingenieur Technik*, 78(3), 256-260.

-
- Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, and Arnold M (2005): Methods and milliliter scale devices fo high-throughput bioprocess design. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 28, 109-119.
- Wijngaart W Van Der (2002): Designing Microfluidic Control Components Designing Microfluidic Control Components.
- Woiias P (2005): Micropumps—past, progress and future prospects. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 105(1), 28-38.
- Wolf P, Brischwein M, Kleinhans R, Demmel F, and Schwarzenberger T (2013): Automated platform for sensor-based monitoring and controlled assays of living cells and tissues. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 111-117.
- Zanzotto A, Szita N, Boccazzi P, Lessard P, Sinskey AJ, and Jensen KF (2004): Membrane-aeared microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnology & Bioengineering*, 87(2), 243-254.
- Zhang Z, Perozziello G, Boccazzi P, Sinskey a, Geschke O, and Jensen K (2007): Microbioreactors for Bioprocess Development. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 12(3), 143-151.

8 Anhang

8.1 Modifikation der Kanalplatte

Bei den Reaktoren an Position B6 und C6 wiesen die Kanäle in der Kanalplatte unmittelbar vor den Ventilen eine Rampe auf, welche den Abstand zwischen Silikonmembran und Kanalboden reduzierte wie Abbildung 8.1 (A) zeigt.

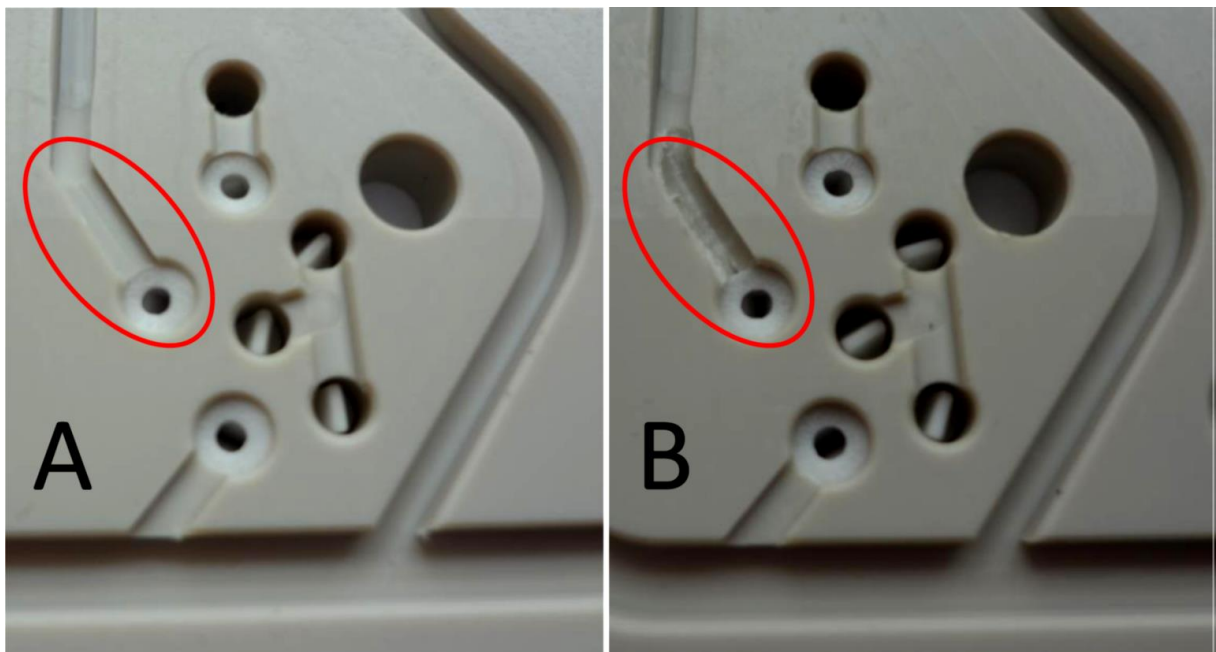


Abbildung 8.1 Rampe im Kanal der PEEK-Platte (A) und im nachbearbeiteten, ausgefrästen Zustand (B); dargestellt am Beispiel der Position B6

Der verringerte Querschnitt erhöhte das Risiko das Kanalstück beim Anpressen der Membran abzudichten. Daher wurden die betroffenen Kanalstücke nachträglich ausgefräst um einen gleichmäßigen Kanaldurchmesser zu gewährleisten, wie in Abbildung 8.1 (B) zu sehen.

8.2 Herstellung von Silikonmembranen

Nach Hirth, S. (2012) Herstellung und Charakterisierung von Pumpen-Membranen für parallele Zulaufverfahren im mL-Maßstab; Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München.

Tabelle 8-1: Geräteliste Herstellung von Silikonmembranen

Gerät	Typ	Hersteller	Artikelnummer
Laborplattenpresse	300 P	Dr. Collin GmbH,	6300-21-02
Membranvakuumpumpe	N 840.3 FT.40.18	KNF Neuberger GmbH,	04608091
Messuhr	Horex 8 Jewels	Hoffmann GmbH, München	-
Handrührgerät	3 Mix 1003	Krups GmbH,	19067
Präzisionswaage	MP1203	Sartorius AG, Göttingen	2802036
Temperofen	NTU 100/150	Vötsch Industrietechnik	-

Tabelle 8-2: Chemikalienliste Herstellung von Silikonmembranen

Chemikalie	Typ	Hersteller	Artikelnummer
Inhibitor	PT 88	Wacker Silicones, Wacker Chemie AG, München	9102169501
Silikonkautschuk	<i>SILPURAN</i> [®] 2445-RTV-2 A	Wacker Silicones, Wacker Chemie AG, München	60082826
Silikonkautschuk	<i>SILPURAN</i> [®] 2445-RTV-2 B	Wacker Silicones, Wacker Chemie AG, München	60082826
Zn(CH ₃ COO) ₂ · 2 H ₂ O	-	Merck KGaA, Darmstadt	1.08802.0250

Vorbereitung

Zunächst wurden die Formplatten und der Formrahmen mit Wasser von Silikonresten sowie Verunreinigungen gesäubert und abgetrocknet. Auf die Innenseiten der Formplatten und des Formrahmens wurde mit einem Tuch eine 1:4-Spülmittel-Wasser-Mischung aufgetragen, um einem Anhaften der Silikonmembran nach der Vulkanisation beim Pressvorgang vorzubeugen.

Ansetzen der Silikonmasse & Pressvorgang

Jeweils 60 g additions- und raumtemperaturvernetzender Silikonkautschuk *SILPURAN*[®] 2445-RTV-2 A und *SILPURAN*[®] 2445-RTV-2 B wurden zusammen eingewogen und mit 300 µL Inhibitor 2 bis 3 Minuten mit einem Handrührgerät vermischt. Das fertige Gemisch wurde wiederholt in einem mit Membranvakuumpumpe versehenen Exsikkator aufgekocht, um Lufteinschlüsse im Silikongemisch zu beseitigen.

Anschließend wurde die Masse gleichmäßig über die Innenfläche einer mit Formrahmen versehenen Formplatte verteilt. Danach wurde die zweite Formplatte aufgesetzt und die Form mit einer thermostabilen Folie umhüllt, um austretendes Silikon beim Pressvorgang aufzufangen.



Abbildung 8.2: Einzelne Schritte während der Präparation zur Herstellung der Silikonmembranen (1) mit Spülmittelfilm beschichtete Formplatte; (2) beschichtete Formplatte mit beschichtetem Formrahmen; (3) aufgetragenes Silikongemisch auf der Innenseite der Formplatte; (4) Packung der Formplatten in hitzestabiler Folie

Die umhüllte Form wurde in eine Thermoplattenpresse gegeben und das in Tabelle 8-3 dargestellte Programm gestartet.

Tabelle 8-3: Spezifikationen und Einstellungen zur Herstellung von Silikonmembranen basierend auf der integrierten Software der Plattenpresse; Einstellung von Temperaturrampen in s·K⁻¹; T - Temperatur; t - Zeit; p - Druck; x - keine Eintragung

Einstellungen	Initialisierung	Aufheizen	Halten	Phase 4	Abkühlen
Phasen	1	2	3	4	5
T, untere Platte (°C)	25	150	150	x	40
T, obere Platte (°C)	25	150	150	x	40
t (min)	1	7	30	x	53
p (bar)	50	50	50	x	50
Rampe/Steigung (s·K ⁻¹) ¹⁾	x	0,7	x	x	0,7

Das Programm dauert etwa 90 Minuten und gliedert sich in eine 1-minütige Initialisierungs-, eine 7-minütige Aufheiz-, eine halbstündige Halte- sowie eine 53-minütige Abkühlphase. Dabei wird ein konstanter Druck von 50 bar gehalten. Im Anschluss wird die Silikonmembran entformt und mit Wasser gereinigt.

Um nicht auspolymerisiertes Material aus den Membranen zu entfernen, werden diese für 4 h bei 200 °C getempert und erneut mit Wasser gereinigt.

Der Zuschnitt der Membranen erfolgte bei der Firma A.L.L. Lasertechnik GmbH (München) per CO₂-Laser.

8.3 Modifikation der Anschlüsse und Zuleitungen der Mikrodosiereinheit

Bei den Kopplungsvorgängen mit den Schnellkupplungen aus Polypropylen wurde wiederholt ein Gaseintrag beobachtet. In Messreihen konnte ein Gaseintrag von bis zu 280 μL beobachtet werden, wie Abbildung 8.3 beispielhaft zeigt.



Abbildung 8.3: Polypropylen Schnellkupplung (Timmer-Pneumatik GmbH, Neuenkirchen) mit Luftblase nach dem Ankuppeln

8.4 Entwicklung von Mikro-Membranpumpen mit Schirmventilen

Da die mit zwei Lippenrückschlagventilen ausgerüsteten Pumpen auch bei einem auf 2,5 mbar geregelten Vordruck bei allen eingesetzten Ventilmaterialien stochastisch auftretende Leckgeräten aufwiesen, wurde nach alternativ verwendbaren Ventilen gesucht.

Hier zeigte sich ein ebenfalls von der Firma MiniValve in Holland produzierter Ventiltyp als mögliche Alternative, da er bereits etablierte Eigenschaften und neue Anforderungen in sich vereint. Die in Abbildung 8.4 dargestellten Schirmventile aus Silikon weisen laut Hersteller die auch schon von den Schirmventilen bekannte Lösungsmittelbeständigkeit und Autoklavierbarkeit auf. Ebenfalls sind die Ventile in einer Größe verfügbar die eine Integration in die Fluidikeinheit ermöglicht. Zusätzlich dichten die über einen Anker im Fluidkanal befestigten Ventile ohne dass ein Rückfluss möglich ist. Über die Tiefe der Verankerung ist laut Herstellerangaben eine Anpassung von 2,5 bis 10,0 mbar Öffnungsdruck möglich, wie Abbildung 8.5 zeigt.

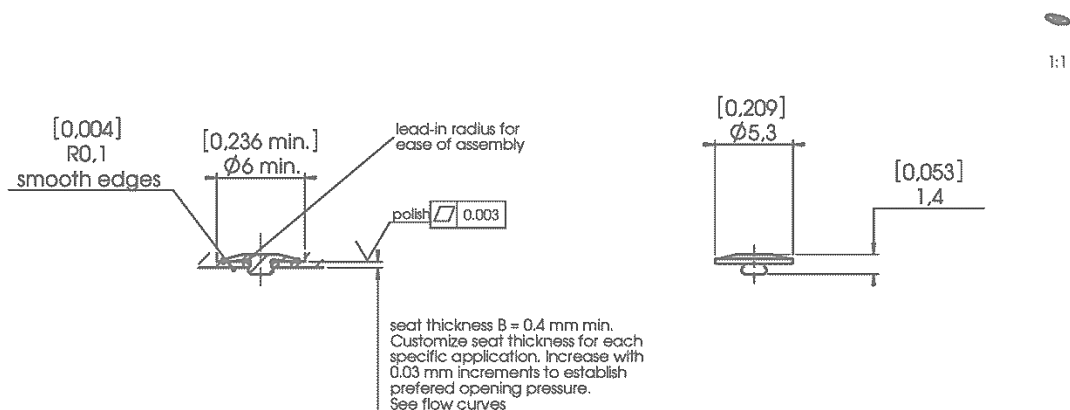


Abbildung 8.4: Querschnitt und Seitenansicht eines Schirmventils der Firma miniValve.

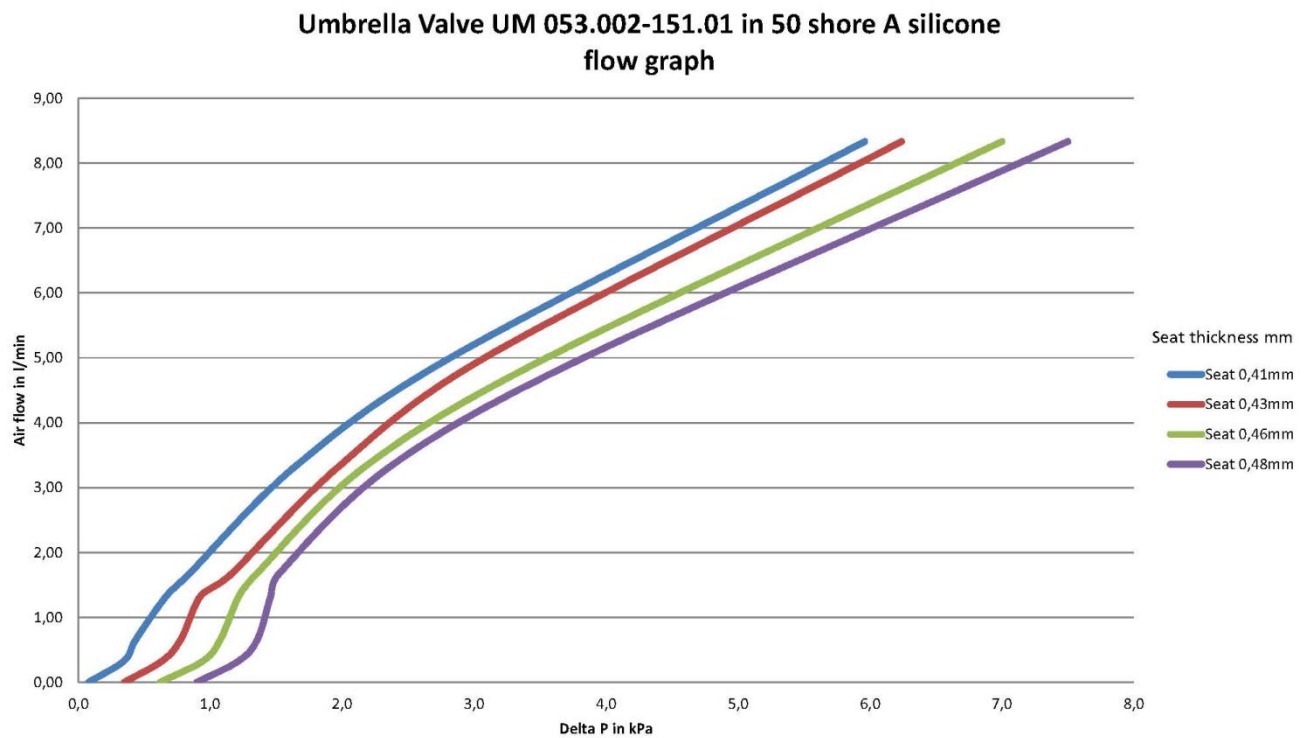


Abbildung 8.5: Öffnungsdrücke der Schirmventile in Abhängigkeit der Verankerungstiefe, MiniValve

Von der 2mag AG wurde ein neues Labormuster mit 3 Mikro-Membranpumpen entwickelt, wobei jede Kammer wie in Abbildung 8.6 mit einem Lippenrückschlagventil am Eingang und einen Schirmventil am Ausgang versehen ist.

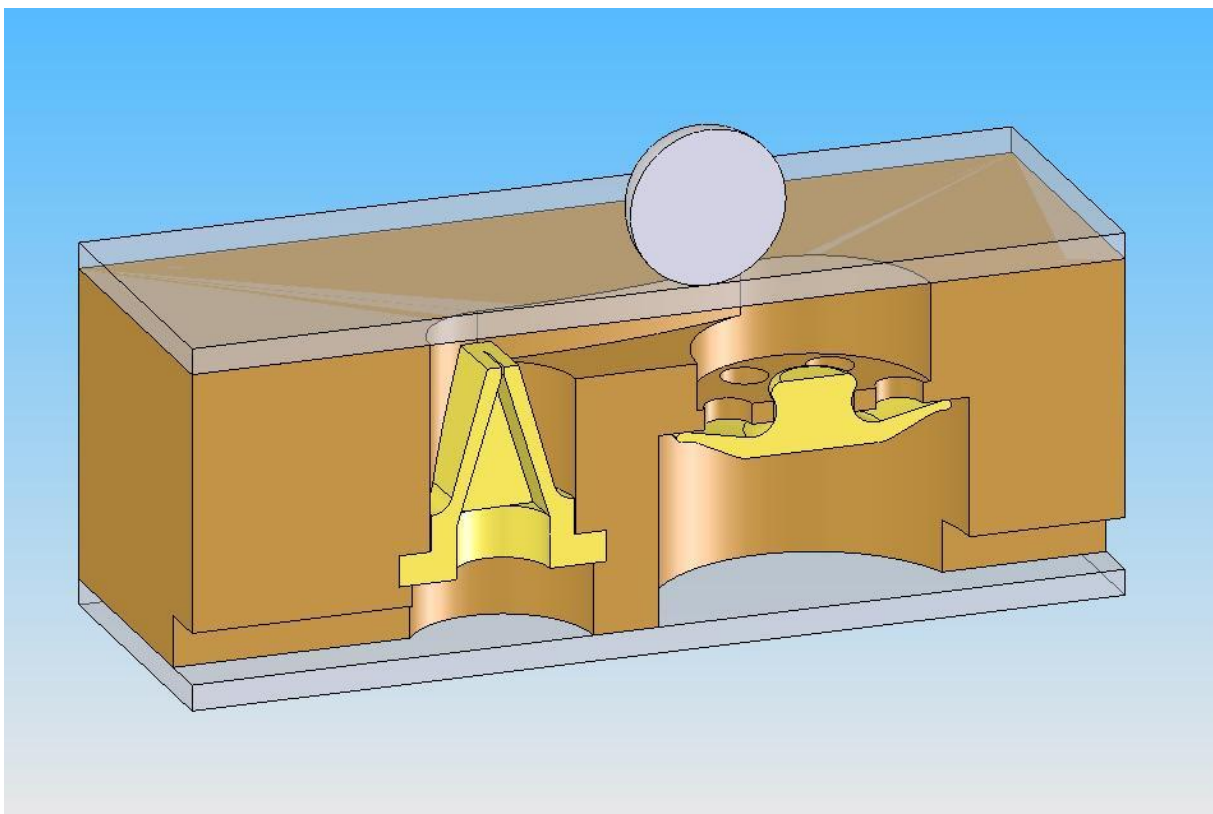


Abbildung 8.6: Querschnitt einer Pumpkammer des neuen Prototyps mit Lippenrückschlagventil und Schirmventil



Abbildung 8.7: Neuer Prototyp mit drei Pumpkammern mit Lippenrückschlag- und Schirmventilen

Begleitend wurde von der DASGIP GmbH eine Platine zur Ansteuerung der Spulen des neuen Labormusters zur Verfügung gestellt. Abbildung 8.7 und Abbildung 8.8 zeigen die Kanalplatte und die Steuereinheit des neuen Prototyps. In ersten Messungen zur Funktionsprüfung der Dichtfunktion der neuen Schirmventile wurde jedoch weiterhin eine Leckage bei 2,5 bis 5,0 mbar Vordruck beobachtet. Auch durch eine Nachbearbeitung der Dichtflächen der aus PEEK gefertigten Kanalplatte konnte kein Dichtschluss bei 2,5 mbar beobachtet werden.

Daher wurden die Dichtflächen aus PEEK entfernt und durch 0,5 mm dicke Ventilscheiben aus 96,0 % und 99,6 % Aluminiumoxid (Al_2O_3) ersetzt. Die in Abbildung 8.9 dargestellten Ventilscheiben aus Aluminiumoxid sind aufgrund ihrer geringen Rauigkeit von $R_z=0,8 - 0,9$ nm als Dichtflächen geeignet und können durch Laserschnitt präzise gefertigt werden. Doch auch bei der Funktionsprüfung des mit Ventilscheiben aus Aluminiumoxid bestückten Prototyps konnten weiterhin Leckageraten bei 2,5 bis 5,0 mbar gemessen werden.

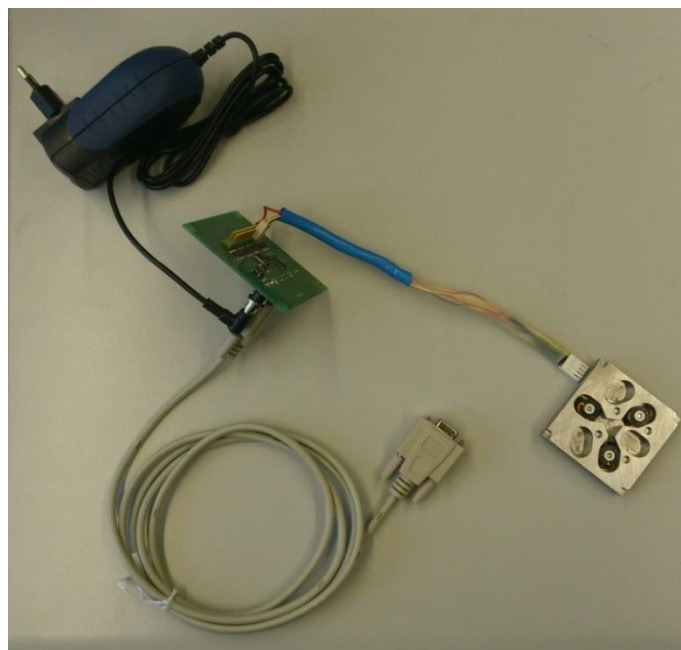


Abbildung 8.8: Spulenplatte mit separater Steuerplatine mit Anschlüssen für Spannungsversorgung und PC

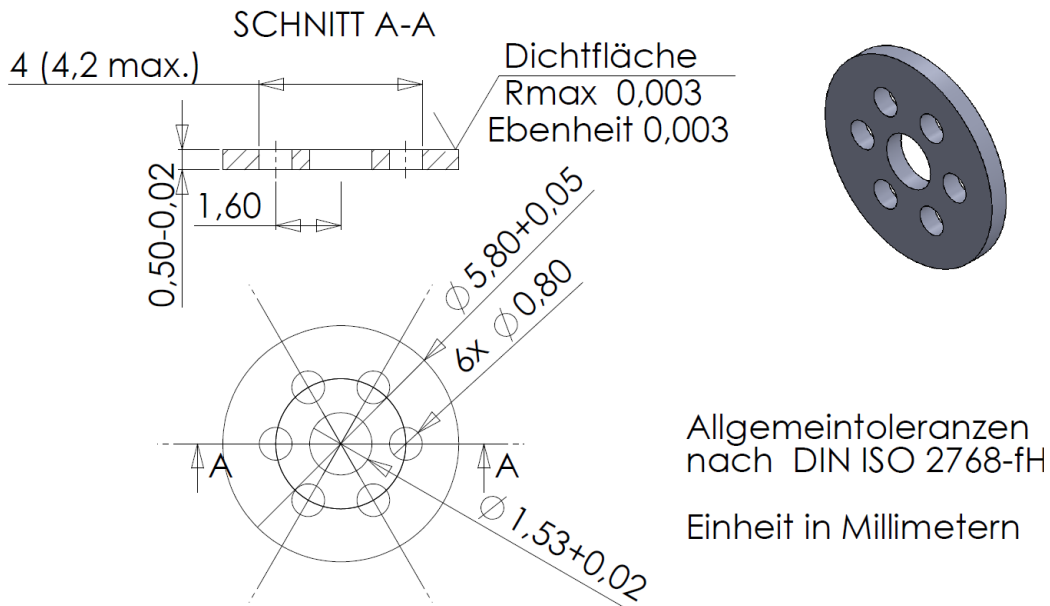


Abbildung 8.9: Technische Zeichnung einer Ventilscheibe zur Aufnahme eines Schirmventils der Firma miniValve.

Jedoch zeigt das grundlegende Konzept der modularisierten Bauweise der Ventilscheiben mehrere Vorteile. Zum einen wird die Komplexität der Fluidikplatte auf ein mit den Grenzen der für PEEK verfügbaren Fertigungsmethoden erreichbares Niveau reduziert, was Kosten und Fertigungszeit spart. Zum anderen können Material und Fertigungsmethoden der modularisierten Komponenten den gesteigerten Anforderungen nach Präzision freier gewählt werden, wobei ebenfalls durch die Möglichkeit der Massenfertigung Kosten und Fertigungszeit gespart werden. Hiermit wäre in Zukunft auch der Einbau von Ventilen mit weiter verbessertem Dichtschluss, wie den in Abbildung 8.10 gezeigten Belleville Ventilen möglich.

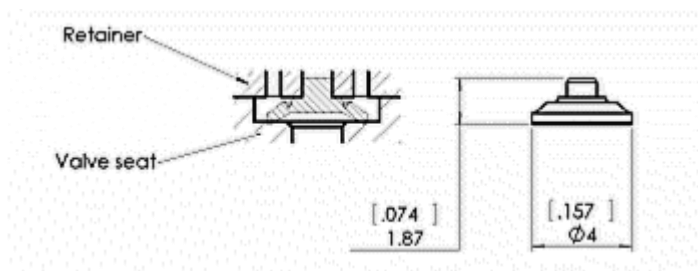


Abbildung 8.10: Querschnitt und Seitenansicht eines Belleville Ventils mit 4 mm Durchmesser der Firma miniValve.

8.5 Signalstabilität und Querempfindlichkeit in Langzeitkalibrierungen

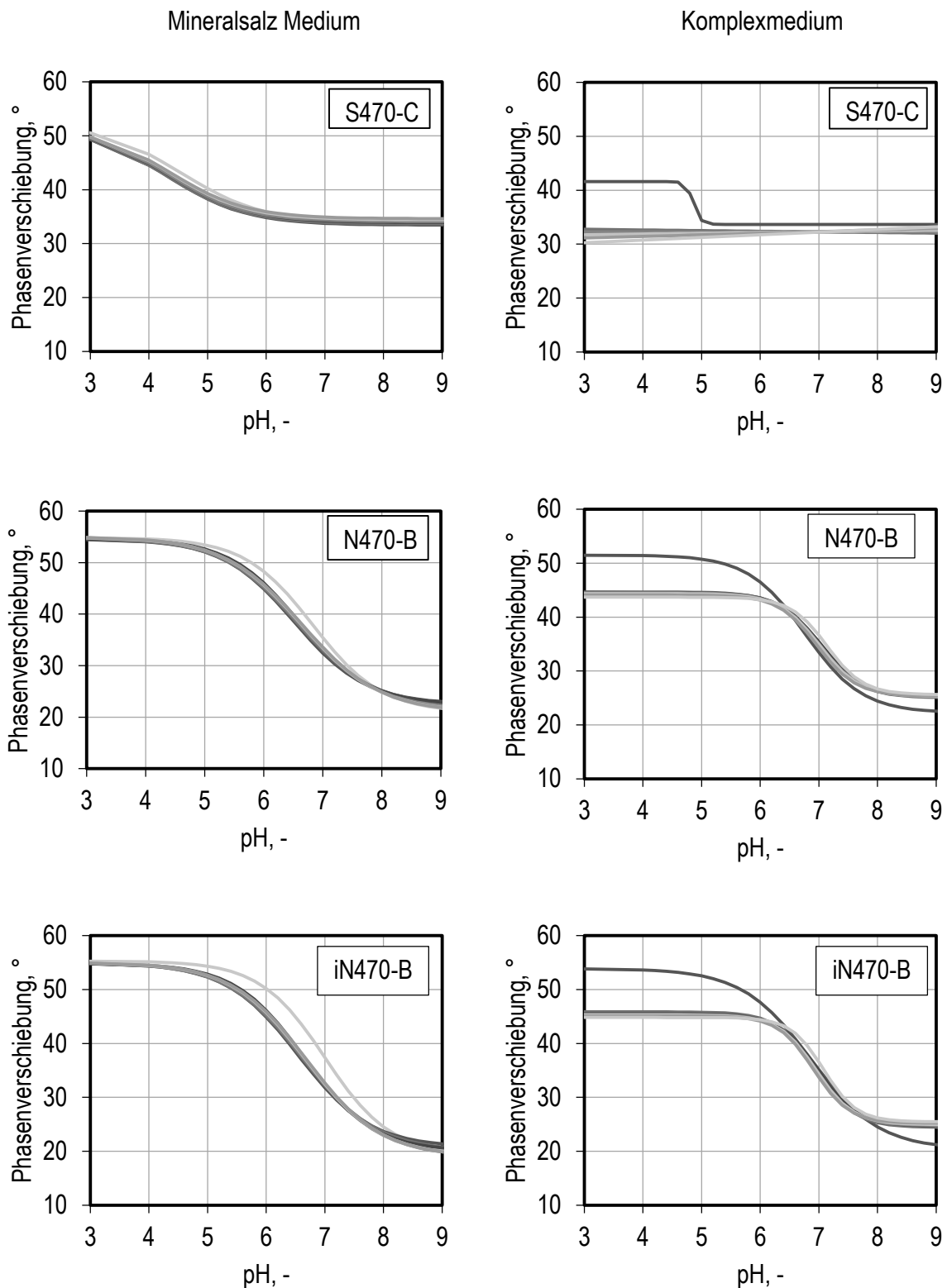


Abbildung 8.11: Mit alten Ausleseeinheiten ermittelte Kalibrierkurven der Sensoren S470-C, N470-B und iN470-B in definiertem Mineralsalz Medium nach (Riesenberg *et al.*, 1991) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h. Kalibrierkurven der Sensortypen S470-C, N470-B und iN470-B in Komplexmedium nach (Kusterer *et al.*, 2008) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h (unterschiedliche Graustufen).

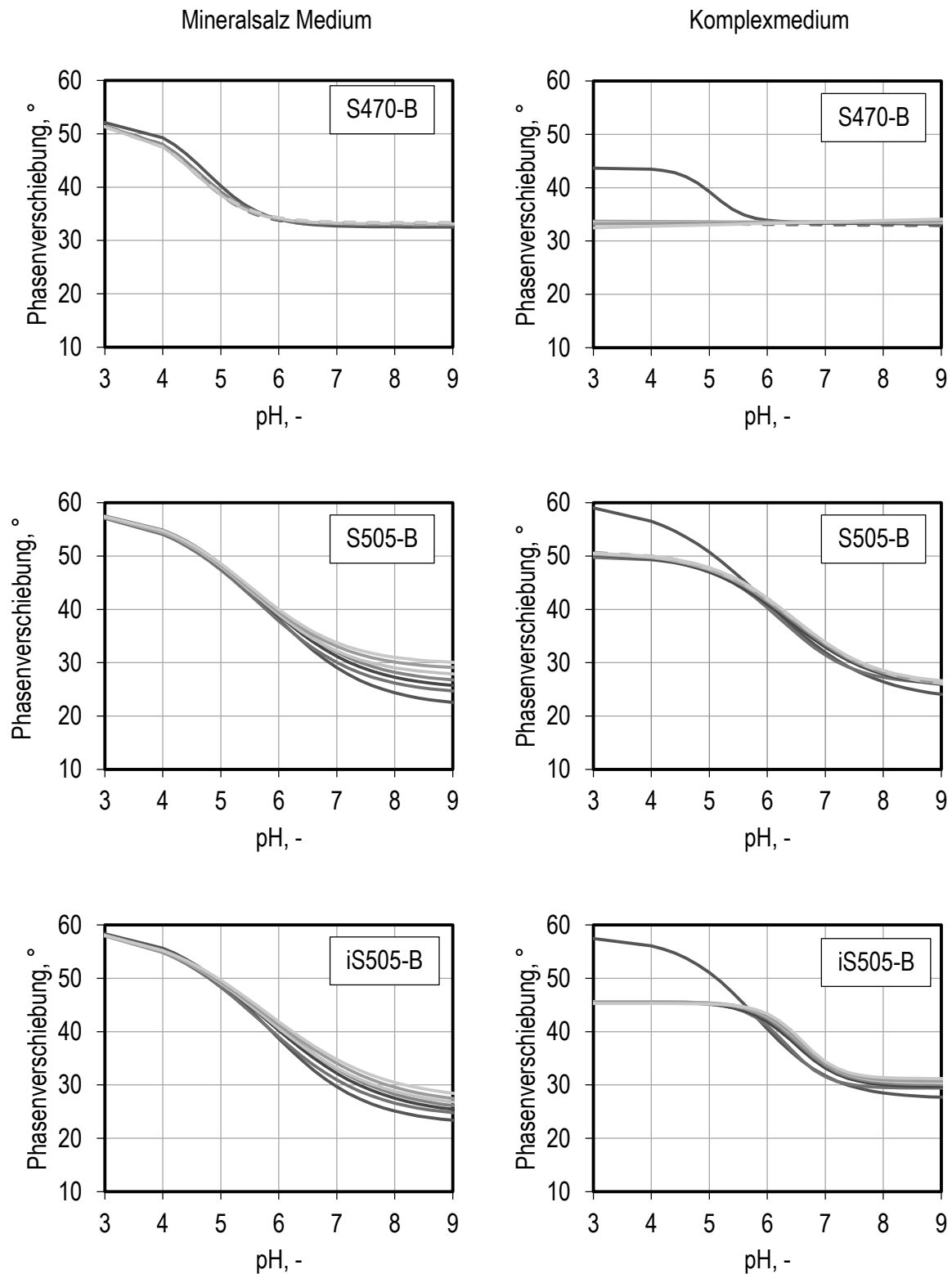


Abbildung 8.12: Mit alten Ausleseeinheiten ermittelte Kalibrierkurven der Sensoren S470-B, S505-B und iS505-B in definiertem Mineralsalz Medium nach (Riesenberg *et al.*, 1991) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h. Kalibrierkurven der Sensortypen S470-B, S505-B und iS505-B in Komplexmedium nach (Kusterer *et al.*, 2008) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h (unterschiedliche Graustufen).

Wie auch bei den zuvor an einem einzigen Zeitpunkt durchgeführten Kalibrierungen, zeigen die in den Langzeitkalibrierungen gewonnenen Daten den dynamischen Bereich und die Auflösung der sechs Sensortypen. Zusätzlich ist über die Deckungsgleichheit der über 72 Stunden aufgenommenen Sigmoiden die Signalstabilität ersichtlich. So zeigt beispielsweise Sensor iN470-B in Abbildung 8.11 eine sehr gute Signalstabilität in definiertem Mineralsalz Medium bei der, bis auf die initiale Sigmoide wo der Sensor noch nicht eingeschwungen war, alle Sigmoiden übereinanderliegen. In Abbildung 8.12 ist dagegen anhand der voneinander abweichenden Sigmoiden von Sensor S505-B und iS505-B in definiertem Mineralsalz Medium eine Drift der Sensoren im neutralen pH-Bereich zu erkennen. Am Beispiel von Sensor S470-C in Abbildung 8.11 wird deutlich, wie sich die Querempfindlichkeit auf die von komplexen Medienbestandteilen verursachte Hintergrundfluoreszenz auswirkt. So ist in definiertem Mineralsalz Medium noch ein dynamischer Bereich des Sensors im sauren Milieu zu erkennen. Daneben zeigt der Sensor in Gegenwart von Komplexmedium nur zu Beginn der Messung einen minimalen dynamischen Bereich, welcher im Laufe der ersten 12 Stunden zusammenbricht bis keine pH-Messung mehr möglich ist.

8.6 Kalibrierung mit alten und modifizierten Ausleseeinheiten

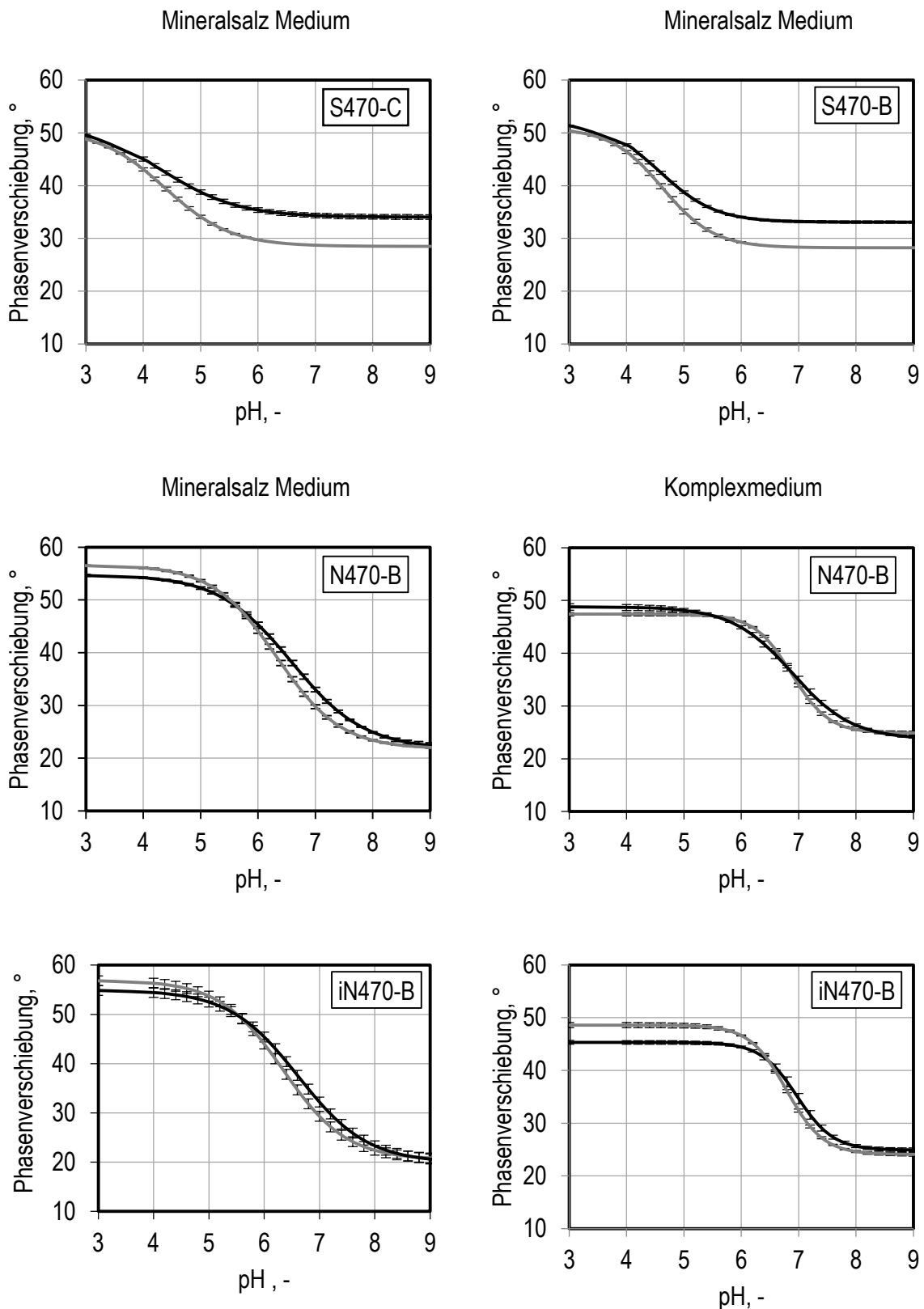


Abbildung 8.13: Vergleich Sensor S470-C, S470-B, N470-B und iN470-B in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium. Die Mittelwerte der bei der Langzeitkalibrierung mit alten Ausleseeinheiten (–) und mit optimierten Ausleseeinheiten (---) ermittelten Kalibrierkurven wurden zusammen für beide Medien aufgetragen. Anhand der Fehlerbalken ist Signalstabilität der Kurven über den Zeitraum von 72 h ersichtlich. (Daten S470-C und S470-B in Komplexmedium nicht abgebildet).

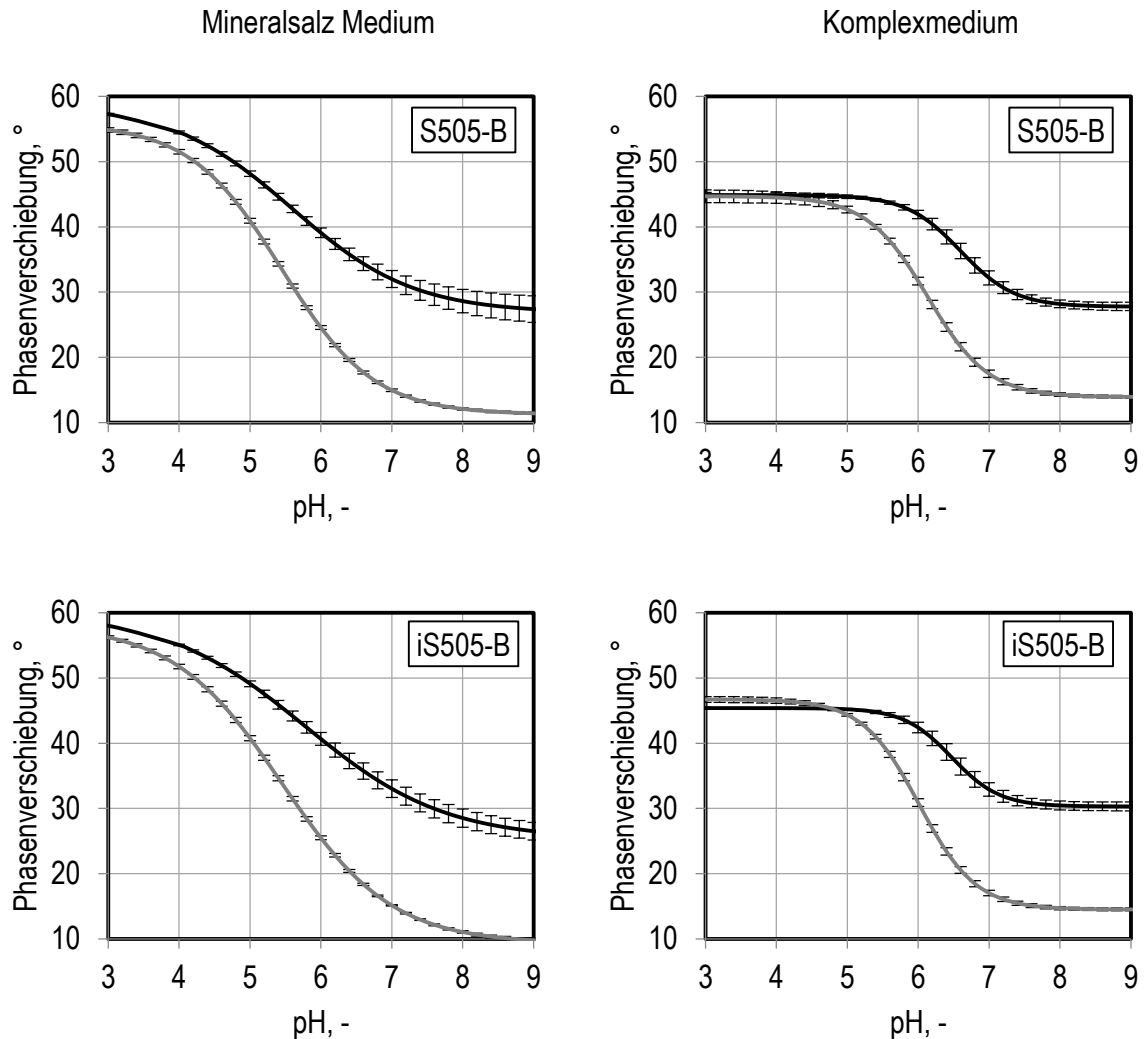


Abbildung 8.14: Vergleich Sensor S505-B und iS505-B in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium. Die Mittelwerte der bei der Langzeitkalibrierung mit alten Auslese-einheiten (---) und mit optimierten Auslese-einheiten (—) ermittelten Kalibrierkurven wurden zusammen für beide Medien aufgetragen. Anhand der Fehlerbalken ist Signalstabilität der Kurven über den Zeitraum von 72 h ersichtlich.

Bei den in Abbildung 8.13 dargestellten Sensoren mit 470 nm Anregungswellenlänge und 550 nm Auslesewellenlänge ist eine leichte Verbesserung der Kalibrierung zu erkennen. So sind bis auf eine Ausnahme bei allen Kurven eine größere Steigung und ein vergrößertes Spektrum der Phasenwinkelverschiebung zu erkennen. Lediglich bei Sensor N470-B in Abbildung 8.13 ist bei einer größeren Steigung der Sigmoiden ein verringerter Bereich der Phasenwinkelverschiebung sichtbar, wodurch der dynamische Bereich des Sensors leicht reduziert wird.

Bei den mit 505 nm angeregten und bei 600 nm ausgelesenen Sensoren ist mit den neuen LEDs und Filtern eine deutliche Leistungssteigerung zu erkennen. Wie in Abbildung 8.14 zu sehen, weisen alle mit den neuen Auslese-einheiten ermittelten Sigmoiden, aufgrund eines besonders im Bereich niedriger Phasenwinkelverschiebung erweiterten Spektrums, eine größere Steigung auf. Dies resultiert in einer deutlich verbesserten Auflösung des pH über den gesamten dynamischen Bereich der Sensoren.

8.7 Material und Gerätelisten

Tabelle 8-4: Einzelkomponenten des Aufbaus des ml-Bioreaktor mit Mikrodosiertechnik

Geräte	Hersteller	Typ
Vorratsbehälter und Abwasserbehälter	Schubert Kunststoff GmbH, München	150 L
Arbeitstisch des Laborroboters	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Genesis Workstation 150
Bioreaktorblock mit Sterilgasabdeckung und Rührer	2mag AG, München	bioREACTOR 48
Kopfraumkühlung	Fryka Kältetechnik GmbH, Esslingen	MULTIstar 400 W
Gasmischstation Heizbad	DASGIP GmbH, Jülich Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	MX 4/4 W15, Thermostat Haake C-10
Kühlaggregat	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd	-10 bis +40 °C
Laborroboter mit Pipettier- und Roboterarm	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Freedom EVO
Massendurchflussregler (thermisch)	Westphal Mess-und Regeltechnik GmbH, Ottobrunn	Brooks 58505
Mikrodosiertechnik Mini-Reaktor	2mag AG, München preSens GmbH, Regensburg	Protoyp HTBD
MTP Photometer	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Infinite M200
MTP Waschstation	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Columbus Pro
Optischer Sensorriegel (MultiChannel Reader for pH and oxygen)	PreSens GmbH, Regensburg	MCR 8pH+8oxygen VI; Sensorriegel R1, Sensorriegel R2
Rührersteuergerät	2mag AG, München	Variomag
Schnellkupplungen Edelstahl	Stäubli Tec-Systems GmbH, Bayreuth	HCB
Schnellkupplungen Polypropylen	Colder Products Company CPC, St. Paul, USA	Polypropylen

Tabelle 8-5: Allgemein verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Produkttyp
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen	ED124 S
Autoklav	Systemec GmbH, Wetzlar	5075 EV
Autoklav	H+P Labortechnik AG, Oberschießheim	Varioklav 500 EV-Z
Druckregler	Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande	EI-Press 609 CV
Feinwaage	Mettler Toledo International Inc., Columbus, USA	AC 88, AG285
Glaselektrode	Schott AG, Mainz	Z 451
Hebebühne	Rudolf Grauer AG, Degersheim, Schweiz	Swiss Boy
Laborplattenpresse	Dr. Collin GmbH, Ebersberg	300 P
Magnet-Rührer	Janke & Kunkel, Staufen	IKA-Combimag
Magnet-Rührer	IKA Labortechnik	RCT basic
Mapren-Schläuche	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen	902.0016.016
Messuhr	Hoffmann GmbH, München	Horex 8 Jewels NOGA
Mixer	Krups GmbH, Offenbach / Main	3 Mix 1003
Fluorteflonschläuche		
Silikonschläuche	Unbekannt	unbekannt
Online-Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen	CPA2202S
Präzisionswaage (Silikonmembran)	Sartorius AG, Göttingen	MP 1203
pH-Meter	Schott AG, Mainz	Lab 870
Rheomat	proRheo GmbH, Althengstett	Contraves Rheomat 115
Schlauchpumpe	Ismatec S.A, Wertheim.	Reglo ISM796
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz	HT Multitron
Schüttler	Scientific Industries Inc., Bohemia	Vortex Gene 2
Temperofen	Vötsch Industrietechnik, Balingen	NTU 100/150
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen	E28
Ultraschall-Bad	Branson, Ultrasonic Cooperation, Danbury	Sonifier II S-450 D
Membran-Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg	KNF LABLaboport N840.3FT.40.18

Tabelle 8-6: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Typ
Ab-/ Zuluftfilter	Sartorius AG, Göttingen	Midisart 2000, 0,2 µm
Einwegspritze	Henke-Sass Wolf GmbH	10 ml
Einwegspritze	Becton Dickinson S.A.	5ml
Kanülen	Servoprax GmbH	0,9 x 70 mm
Laborflaschen	Schott AG, Mainz	100, 250, 500, 1000, 2500 ml
Messkolben, Messzylinder	Schott AG, Mainz	100, 250, 500, 1000 ml
Multitierplatte, schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	96 well
Multitierplatte	Nunc GmbH & Co. KG	96 well
Pipettenspitzen	Brand GmbH & Co.KG	200 µl, 1000 µl, 10 ml
Polystyrol Mini-Reaktoren HTBD mit Sensorsports (pH & DO)	PreSens GmbH, München	
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	1,5 ml; 2,0 ml
Lippenrückschlagventile	miniValve International B.V, Oldenzaal, Niederlande	173, 152, 352
Schüttelkolben	Schott AG, Mainz	500
Spritzenfilter	Sartorius AG, Göttingen	Minisart, 0,2 µm
Spritzenfilter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	PET-Allround Membran, 0,2 µm
Sterilfilter	Milipore GmbH, Schwalbach	Steritop Express Plus 0,22 µm

Tabelle 8-7: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller	Software
Software Laborroboter	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Gemini V4.2.17.304
Software Prozesssteuerung	DASGIP AG, Jülich	FedBatch XP 1.0.213/ FedBatch XP Server 1.0.21
Software für Dosierprofile	(Spreng, 2010)	ProEd 1.0
Software MTP Photometer	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Magellan V6.6
Software MTP- Waschstation	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	WinWash V1.30
Software Audioaufzeichnungen	GoldWave Inc., St. John, Canada	GoldWave 5.67
Software zur mp3 Konvertierung	LAME	Mp3 Encoder 3.58.4
Software Druckregler	Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo, Niederlande	Flowplot
Software zur Echtzeitaufzeichnung der Präzisionswaage	Entwickelt am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik durch D. Hebel	Software Validierung der µD- Technik

Tabelle 8-8: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Formel/ Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Ammoniak 25% reinst	NH ₃	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	5460.2
di- Ammoniumhydrogenphosphat	(NH ₄) ₂ HPO ₄	AppliChem GmbH, Darmstadt	A2301.5000
Antibiotikum-Antimycotikum	Gibco®	Life Technologies Co., Carlsbad, USA	15240-062
Antischaum	Delamex 180	Bussetti & Co., Wien, Österreich	-
	Struktol J633	Schill + Seilacher Struktol GmbH, Hamburg	3022516
Biotin		Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	B4639
Borsäure	H ₃ BO ₃	Merck KGaA, Darmstadt	1.00165.0500
Chloramphenicol		Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	C037
Cobaltdichlorid Hexa-Hydrat	CoCl ₂ ·6H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt	1.02539.0250
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Merck KGaA, Darmstadt	1.59294.0025
Eisensulfat	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	P015.1
Eisen-(III)-Citrat Dihydrat	C ₆ H ₅ FeO ₇ ·7H ₂ O	Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	F6129
Eisessig		Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	3738.1
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	P076.2
Grün fluoreszierendes Protein	GFP	STT, TU München Carl Roth GmbH	-
Glucose-Monohydrat	C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	&Co. KG, Karlsruhe	6780.2
Hefeextrakt	-	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	2363.4

Inhibitor	PT 88	Deutsche Hefewerke GmbH Wacker Silicones, Wacker Chemie AG, München	253-3 9102169501
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	6781.3
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	3904.3
Kanamycin		Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	K0254
Kupferdichlorid Di-Hydrid	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt	1.02733.0250
L-Asparagin		Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	T202.1
Magnesiumsulfat Hepta-Hydrid	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	T888.2
Mangandichlorid Tetra-Hydrid	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	M8054-100G
MES		Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	4256.3
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	3957.2
Natriumdihydrogenphosphat Di-Hydrid	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	T879.2
Natriumhydroxid	NaOH	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	P031.3
Natriummolybdat Di-Hydrid	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt	1.06521.0250
Natronlauge (3M)		Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	P031.2
PABA		Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA	A978
Paraffinöl	Ph. Eur., DAB	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	9190.2

ortho-Phosphorsäure >85% reinst	H_3PO_4	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	9079.2
Pepsin-HCL-Lösung		Schott AG, Mainz Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe,	L510
Pepton aus Casein	-	Karlsruhe, Karlsruhe	8986.2
Ph-Kalibrierpuffer		Schott AG, Mainz Sigma Aldrich Co.	L4790
Riboflavin		LLC, St. Louis, USA	R9504-25G
Salzsäure	HCL	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	4625.2
Silikonkautschuk	Silpuran® 2445- RTV-2 A/ B	Wacker Chemie AG, München Schmidbauer	60082826
Ultraschallbad Reiniger	Elma Clean 10, pH 12-13	GmbH & Co. KG, Singen	CC48.1
Zintronensäure	$C_6H_8O_7$	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe	6490.1
Zinkacetat Dihydrogen	$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt	1.08802.0250

8.8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	Mikrobielles Wachstum ohne Eingriffe von außen; X = Zellkonzentration, (1) lag-Phase, (2) exponentielles Wachstum, (3) limitiertes Zellwachstum, (4) stationäre Phase, (5) Absterbephase, (modifiziert nach Braha & Groza, 2006; Pörtner, 2006)	13
Abbildung 3.2:	Verlauf einer Satz-Kultur, X= Zellkonzentration, S = limitierende Substratkonzentration, P = Produktkonzentration, V = Volumen (modifiziert nach Pörtner, 2006).....	15
Abbildung 3.3:	Verlauf einer Zulauf-Kultur, beginnend als Satz-Verfahren bis zum Start des Zulaufprozesses, X= Zellkonzentration, S = limitierende Substratkonzentration, P = Produktkonzentration, V =Volumen, F = Zulaufkonzentration (Pörtner, 2006)	16
Abbildung 3.4:	In ein Laborrobotersystem integriertes des 48-fach bioREACTOR Parallelbioreaktorsystem (1). Jede der 48 Positionen des Reaktorblocks kann individuell vom Pipettierarm (2) des Roboters angefahren werden, wobei im Regelfall eine Pipette eine Zeile mit 6 Reaktoren anfährt. Weiterhin stehen Vorlagegefäße für Flüssigkeiten (3) zur Verfügung. Der Greifarm (4) kann Mikrotiterplatten zur Waschstation (5) oder zum Photometer (6) befördern (Gebhardt, 2010).	18

- Abbildung 3.5: ambr System mit zwei temperierbaren Kultureinheiten (1) mit je 12 Reaktoren, welche über den integrierten Pipettierroboter (2) angefahren werden können. Hierfür stehen auf der Arbeitsfläche sterile Einwegpipettenspitzen (3) und Vorlagegefäße für Flüssigkeiten (4) zur Verfügung.....19
- Abbildung 3.6: RoboLector mit in einen Laborrobotersystem (Tecan) integrierter BioLector Inkubationseinheit (1). Über eine Öffnung kann ein Pipettierarm (2) die Reaktionskammern des Mikrotiterplatten basierenden Systems (3) mit Flüssigkeiten versorgen. Hierfür stehen auf der Arbeitsfläche des Laborrobotersystems mehrere Vorlagebehälter zur Verfügung (4).20
- Abbildung 3.7: Übersicht des in einen Inkubationsschrank integrierten Mikrotiterplatten basierenden Systems (A) mit eingelegter Sensorplatte (B; Detailansicht F). Der Pipettierarm (C) kann gleichzeitig alle Positionen der Sensorplatte anfahren und mit Flüssigkeiten aus bis zu sieben Vorlagebehältern (D) austauschen. Über eine automatisierte Ausleseeinheit (E) erfolgen mikroskopische Aufnahmen und das Auslesen der optischen Sensoren. Die zweiteilige Sensorplatte (F) besitzt 24 Positionen mit je drei Kammern (G). Die mittig angeordnete Kulturkammer (H) besitzt optischen Sensoren für pH (pH) und Gelöstsauerstoffkonzentration (OS) sowie Impedanzelektroden (IE). Die Kulturkammer wird über einen Einsatz (I) auf ein Mikrovolumen (MV) reduziert. Mit der Kulturkammer verbundene Seitenkammern (SC) erlauben den Flüssigkeitstransfer durch den Pipettierroboter. (Wolf *et al.*, 2013).....21
- Abbildung 3.8: DASbox® System mit vier Rührkesselreaktoren (1) und einem Dosiermodul mit 8 Schlauchpumpen (2), sowie einer Gasmischstation (3).....22
- Abbildung 3.9: Schnittzeichnung des Mikrofluidik BioLectors® mit in der Flowerplate® (3) integrierter mit Druckanschluss versehener Vorlagekammer (1) und mit optischen Sensoren für pH und Gelöstsauerstoffkonzentration (6) versehener Kulturkammer (2). Beide Kammern sind über einen Mikrofluidik Chip (4) verbunden, welcher durch eine Membran (7) abgedichtet ist. Diese liegt auf dem mit einer Silikondichtung (5) und Druckanschlüssen für die Ventilkammern (9 und 11) und die Pumpkammer (10) versehenen Schütteltisch (8) auf.....23
- Abbildung 3.10: In einem Schrankinkubator installiertes 6-fach IMOLA System (1). Jedes Modul versorgt eine der mit zwei elektrischen Impedanzsensoren, zwei pH-Sensoren, einem amperometrischen Sensor und einem Temperatursensor versehenen Kulturkammern der sechs BioChip-D (2)......23
- Abbildung 3.11: Querschnitt des schematischen Aufbaus einer magnetisch-induktiven Mikromembranpumpe. Über die in der Platine (A) der Steuereinheit angeschlossene elektromagnetische Spule (D) mit Stahlkern (B) wird der magnetische Aktor (C) angezogen. Durch die Führung (E) in der Metallfassung wird dabei die Hebelkraft über eine Metallkugel (G) auf die obere Silikondichtung (I) übertragen, welche gleichzeitig als Pumpmembran dient. Durch einen Führungsstift (H) und einen von einem Deckblech (F) definierten Anschlagpunkt wird dabei ein gleichbleibendes Hubvolumen bei der Hebelauslenkung gewährleistet. Über ein zuführendes Lippenrückschlagventil (K) und ein abführendes Lippenrückschlagventil (L) aus Silikon welche in die mit Pumpkammer und

	Kanalsystem versehene Fluidikplatte aus PEEK (J) eingebracht sind wird die Flüssigkeit in den Injektor (N) befördert. Eine zweite Silikondichtung (M) schließt das Kanalsystem an der Unterseite ab (modifiziert nach Gebhardt et al. 2011).25
Abbildung 3.12	Beispielhafte Darstellung einer Membranpumpe modifiziert nach (Woiias, 2005).....26
Abbildung 3.13:	Arbeitszyklus einer Mikro-Membranpumpe bei der Förderung eines kompressiblen Mediums (Cheng <i>et al.</i> , 2005).....27
Abbildung 3.14:	Auswirkung von Gasblasen in Mikro-Membranpumpen modifiziert nach (Wijngaart, 2002).....29
Abbildung 3.15	Jablonski-Diagramm; schematische Darstellung der Fluoreszenz, ausgehend vom Singulett Grundzustand S_0 zum energiereicheren Zustand S_1 (und höher) und der anschließenden Rückkehr in den Ausgangsenergiezustand und Aussendung von Wärme und Licht (modifiziert nach Cox 2012).....30
Abbildung 3.16:	Schematische Darstellung der Unterschiede von Fluoreszenz und Phosphoreszenz (modifiziert nach Lakowicz 2006)31
Abbildung 3.17:	Veränderung der Phasenverschiebung der Gesamtlumineszenz Φ_m , der Referenz Φ_{ref} und der Indikatorfluoreszenz Φ_{ind} (A) ohne Analyt und (B) mit Analyt (Weidegans, 2004).32
Abbildung 4.1:	Mit Einwegreaktoren bestückter Bioreaktorblock mit aufgesetzter Begasungshaube. An der Kopfseite des Bioreaktorblocks befinden sich die Anschlüsse für die zwei Wärmetauscher zur Temperierung der Reaktoren und des Kopfraumes. Am untern Wärmetauscher befindet sich zudem der Anschluss für die Spannungsversorgung und Steuerung des integrierten magnetisch-induktiven Rührerantriebs. Die Begasungshaube besitzt Anschlüsse für die Gasversorgung, sowie den Ablauf von gegebenenfalls auftretendem Kondenswasser. 48 mit Teflonbuchsen versehene Öffnungen in der Begasungshaube erlauben Abgas auszutreten und die Probenahme oder auch Flüssigkeitsdosierung.35
Abbildung 4.2:	Mit Schikanen versehener Einwegreaktor mit fluorimetrisch auslesbaren Sensoren.....36
Abbildung 4.3:	Schematischer Querschnitt der auf einen mit Milliliter-Reaktoren (F) bestückten Bioreaktorblock aufgesetzten Mikrodosiereinheit. Diese besteht aus der Fluidikeinheit mit in ein Kanalsystem integrierten Mikro-Membranpumpen (C) und der Steuereinheit mit elektromagnetischen Spulen (B). Mit Teflonhülsen versehene Öffnungen (A) in beiden Einheiten ermöglichen weiterhin eine automatisierte Probenahme. An der Unterseite der Fluidikeinheit befinden sich die mit Achsen versehene Gasverteiler (D). Daneben sind die Injektoren (G) angebracht. Am Ende der Achsen befinden sich die gasinduzierenden Rührer (I). Diese werden mit Hilfe von im unteren der beiden Wärmetauscher (E und H) integrierten elektromagnetischen (modifiziert nach Gebhardt et al. 2011)36
Abbildung 4.4	Die Platine (A) der Steuereinheit liegt über einer Isolation (B) auf einer verzinkten Eisenplatte (C) mit den Fassungen zur Aufnahme der elektromagnetischen Spulen (nicht abgebildet). Darunter beginnt der ebenfalls geschichtete Aufbau der autoklavierbaren Fluidikeinheit

- beginnend mit dem Deckblech (D). Dieses wird auf der Flussplatte (E) mit den Fassungen zur Aufnahme der Aktoren (nicht abgebildet) auf die Führungsplatte (F) aufgeschraubt. Zwischen der Führungsplatte und der Unterplatte (I) werden die Silikonmembran (G) und die mit einem Kanalsystem versehene Kanalplatte (H) gefasst (untere Silikonmembran nicht gekennzeichnet). Darunter befindet sich das Kammersystem der Begasungshaube mit den in den Kopfraum der Reaktoren hineinragenden Gasverteilern.....37
- Abbildung 4.5: Die Kanalplatte aus PEEK (C) wird auf Ober- und Unterseite von einer Silikonmembran abgedichtet. Dabei wird das obere Stegblech (A) oberhalb der oberen Silikonmembran (B) eingesetzt und das untere Stegblech (E) unterhalb der unteren Silikonmembran (D). Zur Verdeutlichung ist die untere Silikonmembran (D) zusätzlich transparent dargestellt, um das untere Stegblech (E) zu zeigen. In der Detailansicht (F) sind die vom Überstand des unteren Stegblechs (E) an die Kanalplatte aus PEEK (C) angepressten Bereiche entlang der Kanäle (G) zu sehen.....39
- Abbildung 4.6: Neu angepasster Injektor (A) mit Anschlagpunkt an der Unterseite des unteren Stegblechs, wie im Querschnitt (B) zu sehen.....40
- Abbildung 4.7: Modifizierte Anschlüsse der drei Fluidkanäle X, Y und Z der Mikrodosiereinheit mit vergrößertem Abstand für die Verwendung mit Schlauchklemmen (A) und Schnellkupplungen aus Edelstahl mit G1/8“ Gewinde (B) (2mag).....41
- Abbildung 4.8: Technische Zeichnung des ursprünglichen Aktors.....41
- Abbildung 4.9: Deckung alter Aktor (hellgrau) und modifizierter Aktor (dunkelgrau)41
- Abbildung 4.10: Technische Zeichnung des modifizierten Aktors.....42
- Abbildung 4.11: Skizze des modifizierten Aktors mit Phasen an den Außenseiten der Langlöcher42
- Abbildung 4.12: Querschnittsskizze des ursprünglichen Aktors mit Fassung (links) und vereinfachte Querschnittsskizze des modifizierten Aktors mit längeren Führungsstiften und modifiziertem Deckblech mit zusätzlichen Bohrungen für die längeren Führungsstifte (rechts).....43
- Abbildung 4.13: Deckblech des ursprünglichen Prototyps (links); modifiziertes Deckblech mit zusätzlichen Aussparungen für die verlängerten Führungsstifte (rechts)43
- Abbildung 4.14: Zweiteiliger Aufbau der Mikrodosiereinheit mit abnehmbarer Steuereinheit (A) und autoklavierbarer Fluidikeinheit (B). Kopfseitig befinden sich die Anschlüsse für die Datenschnittstelle und Spannungsversorgung mit LED (C), die drei Fluidkanäle (D) und die Gasversorgung (E).44
- Abbildung 4.15: Labormuster der Mikrodosiereinheit (A) mit 48-fach Parallelbioreaktorsystem (B) mit 6 Ausleseeinheiten (C) für die individuelle pH- und Gelöstsauerstoffkonzentrationsmessung.45
- Abbildung 4.16: Autoklavierbehälter ohne Deckel mit eingesetzter Fluidikeinheit der Mikrodosiereinheit46
- Abbildung 4.17: Skizze des fluorimetrischen Sensors am Boden eines Einwegreaktors (A) mit Ausleseeinheit (B). Mit Hilfe einer LED wird der Sensor über einen

- optischen Filter (grau) mit Licht der zum Anregen der Farbstoffe geeigneten Wellenlänge angestrahlt. Das vom Sensor emittierte Licht wird von einer Photodiode aufgezeichnet, wobei ein zweiter optischer Filter nur die Wellenlänge zum Auslesen der Sensorsignale passieren lässt.46
- Abbildung 4.18 links: Ursprünglicher Sensor ohne optische Isolierung auf transparentem Reaktorboden aus Polystyrol. rechts: Mit optischer Isolierung (schwarz) versehener Sensor auf mit Blende (schwarz) versehenem Reaktorboden.....48
- Abbildung 4.19: Ausschnitt der Aufzeichnung der akustischen Signale zur Überwachung der Aktorfunktion vor (A) und nach (B) der Anwendung des Bandpassfilters. In der Detailansicht (C) sind die Anschläge der ausgelenkten Aktoren am Deckblech als große Ausschläge sichtbar, gefolgt von kleinen Ausschlägen der auf die Führungsplatte aufschlagenden zurückfallenden Aktoren.49
- Abbildung 4.20: Bestimmung des optimalen Vordrucks der Mikrodosiereinheit durch Einstellen der Höhe H des Füllstandes im Vorlagegefäß (Poschenrieder, 2012).....51
- Abbildung 4.21: Messstand für parallele (A) und serielle (B) gravimetrische Volumenbestimmung.....52
- Abbildung 4.22: Modifizierter Messstand mit Vorlagebehälter (1), Druckregler (2) der über einen Kanal mit der Mikrodosiertechnik (3) samt Netzteil (4) verbunden ist. Die Wiegung erfolgt mit einer Präzisionswaage (5).52
- Abbildung 4.23: Schematische Darstellung der Positionen A1 bis B6 zur Bestimmung der Förderraten53
- Abbildung 4.24: Typischer Verlauf einer Kalibrierkurve fluorimetrischer pH-Sensoren (Kusterer, 2007).59
- Abbildung 5.1: Vergleich der geförderten Flüssigkeit mit Hilfe von gravimetrisch bestimmten Fördervolumen von Vorlagegefäß und Auffanggefäß beim Betrieb von 12 Pumpen an Kanal Z der Mikrodosiereinheit für rund 2 Stunden gefolgt von rund 3 Stunden Ruhezeit.....67
- Abbildung 5.2: Auswertung der akustischen Messung bei der 18 Minuten bei 1 Hz funktionierende Aktoren mit „1“, nach Anschlag gegen das Trennblech aussetzende Aktoren mit „T“ und kein Audiosignal gebende Aktoren mit „0“ gekennzeichnet sind. Die Ausfälle an Position 1G Kanal X, Position 4E Kanal Y und Position 6G Kanal Z sind auf beschädigte Spulen der Steuereinheit zurückzuführen.68
- Abbildung 5.3: Auswertung der akustischen Messung mit modifizierten Aktoren bei der 18 Minuten bei 1 Hz funktionierende Aktoren mit „1“, nach Anschlag gegen das Trennblech aussetzende Aktoren mit „T“ und kein Audiosignal gebende Aktoren mit „0“ gekennzeichnet sind. Die Ausfälle an Position 1G Kanal X, Position 4E Kanal Y und Position 6G Kanal Z sind auf beschädigte Spulen der Steuereinheit zurückzuführen.68
- Abbildung 5.4: Messung der Förderraten nicht kalibrierter Pumpen bei unterschiedlicher Betriebsspannung bei 1 Hz.70
- Abbildung 5.5: Förderraten der Pumpen an Position A1 bis B6 an Kanal Z mit hydrostatischen Vordruck von -10 mbar, 0 mbar und 10 mbar bei Betrieb von nicht kalibrierten Pumpen bei 1 Hz was einer Sollförderrate von 3,6

	mL·h ⁻¹ bei 1 µL Hubvolumen entspricht. Durchgeführt wurden je zehn Messungen à 0,3 h mit VE-H ₂ O als Medium.....	71
Abbildung 5.6:	Förderraten von 12 unkalibrierter Pumpen nach 10 Messungen (Position A1 bis B6).....	72
Abbildung 5.7:	Förderraten von 12 kalibrierten Pumpen nach 10 Messungen (Position A1 bis B6).....	73
Abbildung 5.8:	Mittlere Förderraten 12 kalibrierter Pumpen bei verschiedenen Sollwerten (Position A1 bis B6).....	74
Abbildung 5.9:	Linearer Zusammenhang von Förderrate und Frequenz.....	74
Abbildung 5.10:	A: Messung der geförderten Masse an Position A6 mit Förderraten von 500 bis 3600 µL h ⁻¹ . B: Messung der geförderten Masse an Position B1 mit Förderraten von 1000 bis 3600 µL h ⁻¹ . Neben den experimentell ermittelten Werten (-), ist in jedem Diagramm noch der theoretisch berechnete optimale Kurvenverlauf (-) abgebildet.	75
Abbildung 5.11:	A: Verlauf eines exponentiellen Dosierprofils bis zu einer maximalen Förderrate, von 3600 µL h ⁻¹ . B: Boxplot Darstellung der Förderraten der kalibrierten Pumpen für die Förderung von exponentiellen Dosierprofilen. C: Median der 5-fach Messung an Position A1 mit Förderraten von 500 bis 3600 µL h ⁻¹ . D: Median der 10-fach Messung an Position A4 mit Förderraten von 1000 bis 3600 µL h ⁻¹ . E: Median der 10-fach Messung an Position B1 mit Förderraten von 1000 bis 3600 µL h ⁻¹ . F: Median der 9-fach Messung an Position B3 mit Förderraten von 1000 bis 3600 µL h ⁻¹ . Neben den experimentell ermittelten Werten (-), ist in jedem Diagramm noch der theoretisch berechnete optimale Kurvenverlauf (-) abgebildet.	76
Abbildung 5.12:	Letzter Schritt der getrennt voneinander durchgeführten Kalibrierung der Pumpen A1 bis B6 an Kanal X (■) und Z (■). Ergebnisse für A3, A6 und B3 sind nicht dargestellt. Kalibrierung nach Methode mit einer Messdauer von 0,7 h. Mittelwert und Fehlerbalken aus drei Messungen mit endgültigem Kalibrierfaktor.	77
Abbildung 5.13:	Förderraten im 2-Kanal-Betrieb an 9 von 12 beispielhaft ausgewählten Positionen an Kanal X (■) und Z (■). Eingestellte sollförderrate an beiden Kanälen von 3,0 mL·h ⁻¹ . Durchgeführt wurden je fünf Messungen à 0,3 h. Gefördertes Medium: 1xPBS in Kanal A, GFP-Lösung in Kanal C.....	78
Abbildung 5.14:	Darstellung der bei den Druckstufen gemessenen Gewichtsabnahme im Vorlagebehälter für Kanal X nach 20 Betriebsstunden und Kanal Z nach 45 Betriebsstunden mit je 12 angeschlossenen Positionen. Mit Hilfe des Druckreglers wurde je fünf Stunden ein Vordruck von 5 mbar, 15 mbar und 25 mbar eingestellt. Aufgetragen ist der zeitliche Verlauf der Gewichtsabnahme des Vorlagebehälters.	80
Abbildung 5.15:	Links: Darstellung der fünf jeweils für jede Position über einen Zeitraum von einer Stunde nach dem Befüllen der Mikrodosiereinheit ermittelten Leckageraten. Rechts: Die in dreifach Messungen zwischen den Befüllvorgängen bestimmten Förderraten der unkalibrierten Pumpen jeweils mit Silikonventilen mit 50° Shore Härte A für Kanal X, Y und Z bei 2,5 mbar Vordruck.	81

- Abbildung 5.16: Links: Darstellung der fünf jeweils für jede Position über einen Zeitraum von einer Stunde nach dem Befüllen der Mikrodosiereinheit ermittelten Leckageraten. Rechts: Die in dreifach Messungen zwischen den Befüllvorgängen bestimmten Förderraten der unkalibrierten Pumpen jeweils mit EPDM-Ventilen mit 50° Shore Härte A für Kanal X, Y und Z bei 2,5 mbar Vordruck.....82
- Abbildung 5.17: Links: Darstellung der fünf jeweils für jede Position über einen Zeitraum von einer Stunde nach dem Befüllen der Mikrodosiereinheit ermittelten Leckageraten bei 2,5 mbar Vordruck. Rechts: Die in dreifach Messungen zwischen den Befüllvorgängen bestimmten Förderraten bei 5,0 mbar Vordruck der unkalibrierten Pumpen jeweils mit Silikonventilen mit 70° Shore Härte A für Kanal X, Y und Z.....83
- Abbildung 5.18: Funktionsprinzip des Lippenrückschlagventils der Firma miniValve bei dem der Durchfluss von Fluiden nur in eine Richtung möglich ist (miniValve, 2010).....84
- Abbildung 5.19: Strömungsverhalten von Luft durch ein Lippenrückschlagventil der Firma miniValve bei Über- und Unterdruck (miniValve, mod. Poschenrieder, 2012).....85
- Abbildung 5.20: Förderraten und Leckageraten an 12 kalibrierten Positionen von Kanal Z der Mikrodosiereinheit vor dem ersten Autoklavieren.86
- Abbildung 5.21: Förderraten und Leckageraten an 12 kalibrierten Positionen von Kanal Z der Mikrodosiereinheit nach dem ersten Autoklavieren.....87
- Abbildung 5.22: Förderraten und Leckageraten an 12 kalibrierten Positionen von Kanal Z der Mikrodosiereinheit vor dem zweiten. Autoklavieren.87
- Abbildung 5.23: Förderraten und Leckageraten an 12 kalibrierten Positionen von Kanal Z der Mikrodosiereinheit nach dem zweiten Autoklavieren88
- Abbildung 5.24: Förderraten und Leckageraten vor und nach dem 5. Autoklavierzyklus, vor dem 6. und nach dem 10. Autoklavierzyklus, sowie vor dem 11. und nach dem 15. Autoklavierzyklus.....89
- Abbildung 5.25: A: Edelstahlschrauben ohne und mit weißen Ablagerungen, B: Anschlussstück mit Korrosion.....90
- Abbildung 5.26: Dosierprofil mit Satzphase (I), exponentiellem (II) und konstantem Zulauf (III) für die Zugabe der 500 g L⁻¹ Glucoselösung mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter.....92
- Abbildung 5.27: Vergleichende Darstellung der bei 600 nm ermittelten optischen Dichte bei der Kultivierung von *Escherichia coli* HMS174(DE3) im Parallelbioreaktorsystem mit intermittierender Substratzugabe durch den Pipettierroboter (○) und die Mikrodosiereinheit (◆). Die Zellen wachsen dabei in einer Satzphase (I) an, welche von einer exponentiellen Zulaufphase (II) gefolgt wird, die in eine konstante Zulaufphase (III) übergeht. Die Fehlerbalken geben Standardabweichung der in vierfach Messungen an, wobei aufgrund technischer Störungen nach 26 h nur noch zwei mit der Mikrodosiereinheit versorgte Reaktoren zur Verfügung standen.92
- Abbildung 5.28: Förderraten und Leckageraten der 12 mit 250 g L⁻¹ Glucoselösung kalibrierten Pumpen mit 70° Shore A harten Silikonventilen bei 2,5 mbar

- Vordruck an Kanal C der Mikrodosiereinheit. Die weißen Balken stellen die ebenfalls bestimmten Leckageraten an den jeweiligen Positionen dar. ...93
- Abbildung 5.29: Dosierprofil mit Satzphase (I), exponentiellem (II) und konstantem Zulauf (III) für die Zugabe der 250 g L⁻¹ Glucoselösung mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter.....94
- Abbildung 5.30: Vergleichende Darstellung der bei 600 nm ermittelten optischen Dichte bei der Kultivierung von *Escherichia coli* BL21(DE3) im Parallelbioreaktorsystem mit intermittierender Substratzugabe durch den Pipettierroboter (○) und der Mikrodosiereinheit (◆). Die Zellen wachsen dabei in einer Satzphase (I) an, welche von einer exponentiellen Zulaufphase (II) gefolgt wird, die in eine konstante Zulaufphase (III) übergeht. Die Fehlerbalken geben Standardabweichung der 12 mit Pipettierroboter und der 11 mit Mikrodosiereinheit versorgten Reaktoren an.....94
- Abbildung 5.31: Vergleichende Darstellung der Gelöstsauerstoffkonzentrationen in je einem beispielhaft ausgewählten Reaktor bei der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) im Zulaufverfahren mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter über den gesamten mit einer Satzphase (I) beginnenden Prozessverlauf (oben) und in 3 Stunden Detailansicht am Ende der exponentiellen Zulaufphase (II) beim Übergang in eine konstante Zulaufphase (III) mit 321 µL h⁻¹ (unten).....96
- Abbildung 5.32: Kalibrierkurven der drei Niedrig-pH-Sensoren S505-A, S470-A, S470-B und des Neutral-pH-Sensors N470-A in Komplexmedium. Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (◆) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve (–), samt Standardabweichung (–) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,5 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (⋯).99
- Abbildung 5.33: Kalibrierkurven der zwei Niedrig-pH-Sensoren S470-A und S470-B in definiertem MS-MES Medium. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (◆) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve (–), samt Standardabweichung (–) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,5 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve..... 100
- Abbildung 5.34: Kalibrierkurven der drei Niedrig-pH-Sensoren S505-A, S470-A, S470-B und des Neutral-pH-Sensors N470-A in Riboflavinlösung (8 g L⁻¹). Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (◆) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve (–), samt Standardabweichung (–) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,5 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient

- die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (···)..... 101
- Abbildung 5.35: Kalibrierkurven der drei Niedrig-pH-Sensoren S505-A, S470-A und S470-B in riboflavinhaltiger Fermentationslösung ($\sim 4 \text{ g L}^{-1}$). Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (\diamond) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve (—), samt Standardabweichung (—) und Wendepunkt (\circ) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,5 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (···). 102
- Abbildung 5.36: Langzeitmessung des Niedrig-pH-Sensors S505-A bei pH 3,0, 4,5 und 6,5 in Komplexmedium mit je 3 gerührten (durchgehende Linie) und einem ungerührten (gepunktete Linie) Reaktor und Langzeitmessung des Niedrig-pH-Sensors S470-A bei pH 3,0, 4,0 und 4,5 in Komplexmedium mit je 3 gerührten (durchgehende Linie) und ungerührten (gepunktete Linie) Reaktoren. Die mit einer Glaselektrode am Ende der Langzeitmessung durchgeführte Kontrolle der Ansätze von Sensor S505-A ergab einen im Durchschnitt um 0,06 gesunkenen pH. Bei den Ansätzen von Sensor S470-A war der pH im Durchschnitt um 0,22 gesunken. 104
- Abbildung 5.37: Vergleich der Fluoreszenzspektrums von komplexe Medium bei 470 nm Anregungswellenlänge mit (A) und ohne (B) die komplexen Medienbestandteile Hefeextrakt und Pepton (je 20 g L^{-1}). 107
- Abbildung 5.38 A: Absorptionsspektrum von Komplexmedium. Die beiden Wellenlängen zur Anregung der Sensoren bei 470 nm und 505 nm sind hervorgehoben. B: Emissionsspektrum von Komplexmedium nach Anregung mit 470 nm (grau) und 505 nm (schwarz) Wellenlänge. Die beiden zugehörigen Wellenlängen zum Auslesen der Sensoren bei 550 nm und 600 nm sind hervorgehoben. 108
- Abbildung 5.39: Optische Dichte und Fluoreszenz bei den zwei unterschiedlichen Wellenlängen zum Auslesen der optischen Sensoren während einer Zulaufkultivierung von *E. coli* in definiertem Mineralsalz Medium (Riesenberg *et al.*, 1991) im Parallelbioreaktorsystem mit Mikrodosiereinheit. Mit der Zunahme der Biomassekonzentration wird eine ansteigende Medienfluoreszenz deutlich. Auch hier ist die bei 505 nm angeregte und bei 600 nm ausgelesene Fluoreszenz deutlich geringer. 109
- Abbildung 5.40: Kalibrierkurven der Sensoren S470-C, N470-B und iN470-B in definiertem Mineralsalz Medium nach-(Riesenberg *et al.*, 1991) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h. Kalibrierkurven der Sensortypen S470-C, N470-B und iN470-B in Komplexmedium nach (Kusterer *et al.*, 2008) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h (unterschiedliche Graustufen von hell nach dunkel). 111
- Abbildung 5.41: Kalibrierkurven der Sensoren S470-B, S505-B und iS505-B in definiertem Mineralsalz Medium nach (Riesenberg *et al.*, 1991) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h. Kalibrierkurven der Sensortypen S470-B, S505-B und iS505-B in Komplexmedium nach (Kusterer *et al.*, 2008) bei 7

- Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h (unterschiedliche Graustufen von hell nach dunkel). 112
- Abbildung 5.42: Kalibrierkurven des Niedrig-pH-Sensoren S505-B in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium. Die Mittelwerte der bei der Langzeitkalibrierung mit alten Ausleseeinheiten (-) und mit optimierten Ausleseeinheiten (-) ermittelten Kalibrierkurven wurden zusammen für beide Medien aufgetragen. Anhand der Fehlerbalken ist Signalstabilität der Kurven über den Zeitraum von 72 h ersichtlich..... 113
- Abbildung 5.43: Kalibrierkurven der drei Niedrig-pH-Sensoren S470-B, S470-C und S505-B in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium aus der 12 h Probe der Langzeitkalibrierung. Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (♦) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve (-), samt Standardabweichung (-) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,2 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (⋯)..... 114
- Abbildung 5.44: Kalibrierkurven des mit einer optischen Isolierung versehenen Niedrig-pH-Sensors iS505-B und der Neutral-pH-Sensoren N470-B ohne und iN470-B mit optischer Isolierung in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium aus der 12 h Probe der Langzeitkalibrierung. Entsprechend der Nomenklatur werden die Sensoren mit Licht einer Wellenlänge von 505 oder 470 nm angeregt. Die bei der Kalibrierung gemessenen Phasenwinkel (♦) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve (-), samt Standardabweichung (-) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,2 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (⋯)..... 115
- Abbildung 5.45: Kalibrierkurven der Niedrig-pH-Sensoren S505-B ohne optische Isolierung und iS505-B mit optischer Isolierung in Komplexmedium. Die bei der Kalibrierung mit und ohne eine an der Unterseite der Reaktoren befestigten Blende gemessenen Phasenwinkel (♦) wurden über dem pH aufgetragen. Basierend auf diesen Werten wurden die sigmoidale Kalibrierkurve (-), samt Standardabweichung (-) und Wendepunkt (○) berechnet. Der Anwendungsbereich bei dem die Sensoren mit einem maximalen Fehler von pH 0,2 betrieben werden können ist grau hinterlegt. Als Referenz dient die Kalibrierkurve in Pufferlösung gemäß Datenblatt des Herstellers (⋯)..... 117
- Abbildung 5.46: Vergleichende Darstellung der mit fluorimetrischen Sensoren (○) und Glaselektrode (♦) ermittelten pH bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* mit zugehöriger optischer Dichte (▲) bei 600 nm..... 120
- Abbildung 5.47: Per Hochleistungsflüssigkeitshromatografie ermittelte Substratkonzentrationen von Glucose (▲), Acetat (○), Butyrat (◇), Aceton (■), Butanol (●) und Ethanol (♦) bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum*. 120

- Abbildung 5.48: Vergleichende Darstellung der mit fluorimetrischen Sensoren (○) und Glaselektrode (◆) ermittelten pH bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* ohne Umstellung des Stoffwechsels mit zugehöriger optischer Dichte (▲) bei 600 nm. 121
- Abbildung 5.49: Per Hochleistungsflüssigkeitshromatografie ermittelte Substratkonzentrationen von Glucose (▲), Acetat (○), Butyrat (◇), Aceton (■), Butanol (●) und Ethanol (◆) bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* ohne Umstellung des Stoffwechsels. 121
- Abbildung 6.1: Vergleichende Darstellung der Gelöstsauerstoffkonzentrationen in je einem beispielhaft ausgewählten Reaktor bei der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) im Zulaufverfahren mit Mikrodosiereinheit und Pipettierroboter am Ende der exponentiellen Zulaufphase (II) und Übergang in eine konstante Zulaufphase (III) mit $321 \mu\text{L h}^{-1}$ 126
- Abbildung 6.2: Vergleichende Darstellung der mit fluorimetrischen Sensoren (○) und Glaselektrode (◆) ermittelten pH bei der Kultivierung von *Clostridium acetobutylicum* mit zugehöriger optischer Dichte (▲). 128
- Abbildung 8.1: Rampe im Kanal der PEEK-Platte (A) und im nachbearbeiteten, ausgefrästen Zustand (B); dargestellt am Beispiel der Position B6..... 136
- Abbildung 8.2: Einzelne Schritte während der Präparation zur Herstellung der Silikonmembranen (1) mit dünnem Spülmittelfilm beschichtete Formplatte; (2) beschichtete Formplatte mit beschichtetem Metallrahmen; (3) aufgetragenes Silikongemisch auf der Innenseite der Formplatte; (4) Packung der Formplatten in hitzestabiler Folie 138
- Abbildung 8.3: Polypropylen Schnellkupplung (Fa. CPC) mit Luftblase nach dem Ankuppeln 139
- Abbildung 8.4: Querschnitt und Seitenansicht eines Schirmventils der Firma miniValve..... 139
- Abbildung 8.5: Öffnungsdrücke der Schirmventile in Abhängigkeit der Verankerungstiefe, MiniValve..... 140
- Abbildung 8.6: Querschnitt einer Pumpkammer des neuen Prototyps mit Lippenrückschlagventil und Schirmventil 140
- Abbildung 8.7: Neuer Prototyp mit drei Pumpkammern mit Lippenrückschlag- und Schirmventilen..... 141
- Abbildung 8.8: Spulenplatte mit separater Steuerplatine mit Anschlüssen für Spannungsversorgung und PC..... 141
- Abbildung 8.9: Technische Zeichnung einer Ventilscheibe zur Aufnahme eines Schirmventils der Firma miniValve..... 142
- Abbildung 8.10: Querschnitt und Seitenansicht eines Belleville Ventils mit 4 mm Durchmesser der Firma miniValve..... 142
- Abbildung 8.11: Mit alten Ausleseseinheiten ermittelte Kalibrierkurven der Sensoren S470-C, N470-B und iN470-B in definiertem Mineralsalz Medium nach-(Riesenberg *et al.*, 1991) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h. Kalibrierkurven der Sensortypen S470-C, N470-B und iN470-B in Komplexmedium nach (Kusterer *et al.*, 2008) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h (unterschiedliche Graustufen). 143

Abbildung 8.12:	Mit alten Ausleseeinheiten ermittelte Kalibrierkurven der Sensoren S470-B, S505-B und iS505-B in definiertem Mineralsalz Medium nach (Riesenberg <i>et al.</i> , 1991) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h. Kalibrierkurven der Sensortypen S470-B, S505-B und iS505-B in Komplexmedium nach (Kusterer <i>et al.</i> , 2008) bei 7 Messungen nach 0, 12, 24, 36, 48, 60 und 72 h (unterschiedliche Graustufen). 144
Abbildung 8.13:	Vergleich Sensor S470-C, S470-B, N470-B und iN470-B in definertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium. Die Mittelwerte der bei der Langzeitkalibrierung mit alten Ausleseeinheiten (-) und mit optimierten Ausleseeinheiten (-) ermittelten Kalibrierkurven wurden zusammen für beide Medien aufgetragen. Anhand der Fehlerbalken ist Signalstabilität der Kurven über den Zeitraum von 72 h ersichtlich. (Daten S470-C und S470-B in Komplexmedium nicht abgebildet)..... 146
Abbildung 8.14:	Vergleich Sensor S505-B und iS505-B in definiertem Mineralsalz Medium und Komplexmedium. Die Mittelwerte der bei der Langzeitkalibrierung mit alten Ausleseeinheiten (-) und mit optimierten Ausleseeinheiten (-) ermittelten Kalibrierkurven wurden zusammen für beide Medien aufgetragen. Anhand der Fehlerbalken ist Signalstabilität der Kurven über den Zeitraum von 72 h ersichtlich. 147

8.9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1	Sensorchargen und Betriebsparameter bei der Funktionsprüfung47
Tabelle 4-2:	Übersicht der Befüllung der Mikrodosiertechnik mit Medien unterschiedlicher pH zur Langzeitkalibrierung57
Tabelle 4-3:	Parameter der Langzeitkalibrierung der pH-Sensoren57
Tabelle 4-4:	Reaktormedien mit variierenden komplexen Bestandteilen und zugehörigen pH-Werten für die Emissionsmessung60
Tabelle 4-5:	Zusammensetzung des Mineralsalz Mediums für die Langzeitkalibrierung der pH-Sensoren nach (Riesenberg <i>et al.</i> , 1991).....62
Tabelle 4-6:	Zusammensetzung des komplexen Mediums für die Langzeitkalibrierung der pH-Sensoren (Kusterer <i>et al.</i> , 2008)63
Tabelle 4-7:	Zusammensetzung des MS-MES Mediums, modifiziert nach Monot <i>et al.</i> , 198264
Tabelle 4-8:	Zusammensetzung des <i>Clostridial Growth</i> Medium (CGM)64
Tabelle 4-9:	Zusammensetzung einer 1xPBS-Lösung.....65
Tabelle 5-1:	Aufeinanderfolgende Messungen der Aktorfunktion an Kanal X und Z mit unmagnetischer Flussplatte. Jede Pumpe wurde für 18 Minuten bei 1 Hz betrieben wobei die Anzahl der Hübe der Aktoren akustisch gemessen und prozentual angegeben wurde.69
Tabelle 5-2:	Berechnete Anwendungsbereiche und Wendepunkte der fluorimetrischen pH-Sensoren 103
Tabelle 5-3	Aus der 12 h Probe der Langzeitkalibrierung berechnete Anwendungsbereiche und Wendepunkte der fluorimetrischen pH-Sensoren..... 116

Tabelle 5-4:	Anwendungsbereiche und Wendepunkte der mit optischen Isolierungen und Blenden versehenen Sensoren.....	118
Tabelle 8-1:	Geräteliste Herstellung von Silikonmembranen	137
Tabelle 8-2:	Chemikalienliste Herstellung von Silikonmembranen	137
Tabelle 8-3:	Spezifikationen und Einstellungen für die optimierte Methode zur Herstellung von Silikonmembranen basierend auf der integrierten Software der Plattenpresse; Einstellung von Temperaturrampen in s•K-1; T - Temperatur; t - Zeit; p - Druck; x - keine Eintragung	138
Tabelle 8-4:	Einzelkomponenten des Aufbaus des ml-Bioreaktor mit Mikrodosiertechnik	148
Tabelle 8-5:	Allgemein verwendete Geräte	149
Tabelle 8-6:	Verbrauchsmaterialien.....	150
Tabelle 8-7:	Verwendete Software	150
Tabelle 8-8:	Verwendete Chemikalien.....	151