



Institut für Biotechnologie

Parallele Substratkontrolle in Bioreaktoren mit geringem Volumen

Evelyn P. Wolfram

Parallele Substratkontrolle in Bioreaktoren mit geringem Volumen

Evelyn P. Wolfram

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3982

ISSN 0944-2952

Institut für Festkörperforschung Jül-3982

D 19 (Diss., München, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Kurzfassung

Mikrobielle Prozesse werden in der ersten Entwicklungsphase in Parallelexperimenten in Kleinreaktoren (Schüttelkolben-Maßstab) reaktionstechnisch untersucht und optimiert. Substratkonzentrationen sind dabei eine zentrale Prozessgröße, deren Kontrolle zur Steigerung der Effizienz und Qualität dieser Entwicklungsphase beitragen kann. Daher wurde eine für kleine Reaktionsvolumen geeignete parallele, automatische und sterile Probenahmetechnik mit Hohlfaser-Dialysemembranen entwickelt und mit einem Substrat-Analysesystem gekoppelt. Durch Kombination der Messtechnik mit einem Regler und einem präzisen Mikrodosiersystem für Substrat wurde der Regelkreis geschlossen. Das Funktionsmuster wurde verfahrenstechnisch charakterisiert und seine Eignung zur Online-Überwachung und Regelung von Bioprozessen untersucht. Mit dieser Technik gelang erstmals die Messung und Regelung von Substratkonzentrationen in parallel durchgeführten Bioreaktionen (beispielsweise mit *Escherichia coli*) mit Abtastraten von nur wenigen Minuten je Bioreaktor.

Abstract

In the first developmental phase of microbial processes, relevant parameters for reaction engineering are investigated and optimized with parallel experiments in small reactors (shake flask scale). Substrate concentrations are central process parameters. Their control might help to increase efficiency and quality of this developmental phase. Thus, a parallel, automatic and sterile sampling technique with hollow fiber membranes was developed that suits the small reaction volume. The parallel sampling modules were connected to a substrate analysis system. The combination of the analytical technique with a controller and a precise microdosing system for substrate closed the control loop. The prototype device was characterized and its suitability for online monitoring and control of bioprocesses confirmed. This technique allows for the first time online measurement and control of substrate concentrations in parallel bioreactions (i.e. with *Escherichia coli*) with measuring rates of the order of minutes.

Vorwort

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH in der Zeit von September 1997 bis April 2001.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr.-Ing. D. Weuster-Botz, Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik an der Technischen Universität München für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung der Dissertation, die Übernahme des Hauptreferats und die vielen fruchtbaren Diskussionen und Anregungen.
- Herrn Prof. Dr. Chr. Wandrey für seine engagierte Betreuung und Unterstützung sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen insbesondere hinsichtlich Ausstattung und technischer Möglichkeiten am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH.
- Herrn Dr.-Ing. M. Arnold von der Firma DASGIPmbH, Jülich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und seine grenzenlose Einsatzbereitschaft, insbesondere bei allen Fragen der Steuerungs- und Regelungstechnik und für die guten konstruktiv-kritischen Diskussionen.
- Herrn Dipl.-Ing. A. Franz für seine stete Hilfsbereitschaft und die sehr gute Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit, die einen großen Meilenstein auf dem Weg zur parallelen Substratkontrolle darstellt.
- meinen Kolleginnen und Kollegen am Forschungszentrum für stets offene Ohren, Rat und Tat, und vor allem die Freundschaften. Besonderer Dank gilt Dipl.-Ing. A. Kreutzer, Dipl.-Chem. J. Haberland und Dipl.-Biol. T. Gerharts, G. Gelius-Dietrich u.a. für die gemeinsamen, erfolgreichen Experimente; Dipl.-Chem. A. Buchholz, Dipl.-Chem. M. Schmitz, Dipl.-Ing. M. Gerigk und Dipl.-Biotech. N. Rüffer u.a. für die konstruktiv-kritische Durchsicht der Arbeit. H. Kiehl danke ich für seine fachlich versierte Unterstützung bei der Lösung diverser Computerprobleme, Dipl.-Ing. H.-J. Brandt für die Hilfe im Technikum und H. Haase für die Durchführung der HPLC Analytik. Die vielen technischen Komponenten der Aufbauten und ihre bildliche Darstellung wären ohne das große Engagement und die Hilfsbereitschaft der Mitarbeiter aus den Werkstätten nicht entstanden, auch Ihnen herzlichen Dank.
- der Firma DASGIPmbH und dem BMBF für die finanzielle Unterstützung. Die Mitarbeiter der DASGIPmbH haben mich offen und kollegial aufgenommen: Herzlichen Dank dafür insbesondere an Dr. T. Drescher, Dr. F. Schneider, Dipl.-Ing. A. Müller, Dipl.-Ing. W. Carl, Dr. K. Rix und alle anderen, die mir helfende Hände geliehen haben.
- von ganzem Herzen meinen Eltern, meinem Lebensgefährten Stephan, meinen Schwestern Birgit und Karin und meiner Freundin Katja, denn ohne ihr offenes Ohr für Sorgen und Freuden und ihre Unterstützung bei all meinen vielseitigen Unternehmungen wäre ich nie so weit gekommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
2. Problemstellung und Zielsetzung	5
3. Theoretischer Hintergrund	11
3.1. Biologische Grundlagen der verwendeten Organismen	11
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	11
3.1.2. <i>Lactobacillus kefir</i>	14
3.2. Bioreaktoren	14
3.2.1. Bioprozessmodelle	15
3.2.2. Satzverfahren (Batch)	17
3.2.3. Zulaufverfahren (Fedbatch)	18
3.3. Parallele Kultivierung im Kleinmaßstab	18
3.3.1. Kleinreaktionsgefäße	19
3.3.2. Stand der Technik paralleler Kultivierung	21
3.4. Stand der Bioprozessmesstechnik	21
3.4.1. Begriffsbestimmung	21
3.4.2. Überblick über die Bioprozessmesstechnik	25
3.4.3. Fließanalysesysteme	25
3.4.4. Biosensoren	32
3.5. Dialyse als Probenahmestrategie in Kleinreaktionsgefäßen	38
3.5.1. Probenahme aus Bioprocessen	38
3.5.2. Dialyse über eine Hohlfasermembran	40
3.6. Substratregelung in mikrobiellen Prozessen im Zulaufbetrieb	44
3.6.1. Regelungstechnische Grundlagen	44
3.6.2. Substratregelung	46
4. Entwurf und Inbetriebnahme einer parallelen Probenahme- und Online-Messtechnik	51
4.1. Konzept und Auswahl der Probenahmetechnik für geringe Reaktionsvolumina	51
4.1.1. Probenahmeverfahren: Stop-Flow-Prinzip	51
4.1.2. Probenahmeverrichtung	53
4.2. Auswahl der Messtechnik	61
4.3. Konzeptstudien zur Anordnung einer Vielzahl von Probenahmestellen	62
4.3.1. Serielle Anordnung	64
4.3.2. Parallele Anordnung	64
4.4. Technische Realisierung	66

4.4.1.	Apparativer Aufbau des Funktionsmusters	66
4.4.2.	Sterile Integration von Hohlfasermembran-Modulen in Kleinreaktionsgefäße	68
4.4.3.	Steuerung der parallelen Probenahme- und Messtechnik	72
5.	Charakterisierung der parallelen Probenahme- und Messtechnik	77
5.1.	Charakterisierung der Messtechnik	77
5.1.1.	Sensoren	77
5.1.2.	Membranlängen	82
5.1.3.	Zusammensetzung des Akzeptormediums	84
5.1.4.	Sauerstoffkonzentration im Akzeptormedium	85
5.1.5.	Zusammensetzung des Reaktionsmediums	87
5.2.	Charakterisierung der Dialyse	87
5.2.1.	Diffusionszeit	87
5.2.2.	Temperatur	89
5.2.3.	Zusammensetzung des Reaktionsmediums	92
5.2.4.	Hydrodynamik	94
5.2.5.	Viskosität	97
5.2.6.	Eigenschaften des Membranmaterials	98
5.3.	Charakterisierung der Probenahme- und Messtechnik bei Einsatz in Bio- prozessen	99
5.3.1.	Entnahme von Stoffmengen	99
5.3.2.	Biofouling	100
5.3.3.	Überprüfung der Wahrung der Sterilität	103
5.3.4.	Überprüfung der Rückwirkungsfreiheit auf <i>Escherichia coli</i> K12 Kulturen	104
5.4.	Messtechnische Gütekriterien	104
5.5.	Zusammenfassung	107
6.	Funktionsprüfung der parallelen Substratanalytik	109
6.1.	Paralleles Online-Substrat-Monitoring in Kleinreaktionsgefäßen	109
6.1.1.	Online-Glucose-Monitoring von <i>Escherichia coli</i> 4pF20 in Fed- batch Mini-Blasensäulen	109
6.1.2.	Glucoseverbrauch von <i>Escherichia coli</i> in Batch Schüttelkolben . .	112
6.1.3.	Simultane Bestimmung des Glucoseverbrauchs und der Lactat- Bildung mit <i>L. kefir</i>	113
6.2.	Parallele Substratregelung in Schüttelkolben	115
6.2.1.	Parallele Substratregelung mit modifiziertem PID-Regler mit <i>Escherichia coli</i> K12 in parallelen Schüttelkolben	115
6.2.2.	Parallele Substratregelung mit parameteradaptivem Regler mit <i>Escherichia coli</i> 4pF20	118
7.	Zusammenfassung	123
8.	Ausblick: Grenzen und Möglichkeiten	129
8.1.	Ansätze zur Weiterentwicklung	129
8.1.1.	Verbesserung der Kalibrierung	129
8.1.2.	Minimierung von Messrauschen	130

8.1.3. Steriltechnik	131
8.2. Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten	131
8.2.1. Erweiterung der Technik auf 16 parallele Kleinreaktionsgefäße . .	131
8.2.2. Miniaturisierung	131
8.2.3. Erweiterung der Analysetechnik	132
8.2.4. Andere funktionale Zusammenhänge	133
8.3. Schlussfolgerungen	133
A. Methoden	135
A.1. Fertigungsmethode der Hohlfasermembranmodule	135
A.1.1. Kleber	135
A.1.2. Fertigung	135
A.2. Charakterisierungsmethoden	137
A.2.1. Einfluss der Viskosität	137
A.2.2. REM-Aufnahmen der Hohlfasermembranen	138
A.3. Fermentationen	139
A.3.1. Überblick über Versuchsbedingungen	139
A.3.2. Reaktionsgefäße	140
A.3.3. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> K12	141
A.3.4. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> 4pF20 zur L- Phenylalaninproduktion	142
A.3.5. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> YYC202 zur Pyruvatproduktion	143
A.3.6. Kultivierung von <i>Lactobacillus kefir</i> zur Ganzzellbiotransformation	144
A.3.7. Kultivierung von <i>Staphylococcus carnosus</i>	145
A.3.8. Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i>	145
A.4. Analytik	145
A.4.1. Optische Dichte	145
A.4.2. Biotrockenmasse (BTM)	146
A.4.3. Glucose	146
A.4.4. Acetat	147
A.4.5. L-Phenylalanin	147
A.4.6. Lactat	148
A.4.7. 2,5-Hexandion, 2,5-Hexandiol und 5-Hydroxyhexan-2-on	148
A.5. Datenauswertung	149
A.5.1. Statistik	149
A.5.2. Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Anpassung	149
A.5.3. Ausreißertest nach Nalimov	150
B. Materialien	151
B.1. Verwendete Geräte	151
B.2. Verwendete Labormaterialien	152
B.3. Verwendete Medien	154
B.4. Verwendete Pufferlösungen	155
B.4.1. Akzeptormedium	155
B.4.2. Tris-Maleat-Puffer	155
B.5. Verwendete Chemikalien und Enzyme	155
B.6. Verwendete Software zur Datenaufnahme und -auswertung	156

C. Herleitung wichtiger Gleichungen	157
C.1. Herleitung Gleichung der stationären Diffusion	157
C.2. Herleitung Gleichung der quasistationären Diffusion	158
C.3. Herleitung Gleichung der instationären Diffusion	159
D. Konstruktionszeichnungen	163
D.1. Flachmembran-Modul	163
D.2. Halterung zur Integration von Hohlfasermembranmodulen in Schüttelkolben	164
E. Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	167

1. Einführung

Lange bevor sich die Menschen der Existenz der Mikroorganismen bewusst waren, nutzten sie bereits das wertsteigernde Potenzial ihrer Stoffwechselleistungen. Die Herstellung von Bier, Wein, Essig, Sake und Sauermilchprodukten hatte bereits eine lange empirische Entwicklungsgeschichte hinter sich¹ als Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) das mikrobiologische Zeitalter mit der Sichtbarmachung der „kleinen Tierchen“ einläutete [Schlegel 1999].

Ab dem 19. Jahrhundert gesellte sich zu der Tradition der reinen Lebensmittelbiotechnologie die produzierende Biotechnologie, die den alchimistischen Traum erfüllte, Rohstoffe geringeren Wertes (Substrate) mittels 'Biokatalysatoren' in Lebensmittelzusatzstoffe, Feinchemikalien und heute auch vermehrt Pharmawirkstoffe umzusetzen. Der Begriff *Biokatalysator* wird für prozessbestimmende Komponenten biologischer Herkunft verwendet. Neben den prokaryontischen Mikroorganismen, die überwiegend industriell Anwendung finden [Weuster-Botz 1999], sind isolierte Enzyme, tierische und pflanzliche Zellen zu nennen. In der Zeit vor 1980 wurden die natürlichen Eigenschaften und Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen durch eine geeignete Prozessführungsstrategie gesteigert bzw. durch klassische Mutagenese zur Überproduktion gezüchtet [Schlegel 1999]. Die Gentechnik hat in den letzten Jahren eine gezielte Produktivitätssteigerung und die Herstellung von Wertstoffen ermöglicht, die auf natürliche Weise nicht von den etablierten Biokatalysatoren zu leisten gewesen wären (z.B. Produktion von Humaninsulin durch Transformation eukaryotischer DNA-Sequenzen in den Wirtsorganismus *Escherichia coli*). Es vollzog sich eine Wandlung von der Nutzung der natürlichen zur konstruierten Stoffwechselleistung [Schlegel 1999].

1999 stieg der Umsatz europäischer Biotechnologie Unternehmen im Vergleich zum Vorjahr um 45 % auf 5,4 Milliarden Euro, die Ausgaben für Forschungs- und Entwicklung dieser Unternehmen um 26 % auf 3,1 Milliarden Euro [YOUNG 2000]. Die daran abzulesende zunehmende wirtschaftliche Nutzung biotechnischer Produktionsverfahren in der chemischen und pharmazeutischen Industrie lässt auch auf eine stetige Steigerung der Aktivitäten auf dem Gebiet der Bioprozessentwicklung schließen, denn um im globalen Wettbewerb zu bestehen, gilt es fortwährend neue Prozesse zu entwickeln und bereits etablierte Produktionsverfahren in Effizienz und Produktivität zu steigern [Kovárová-Kovar u. a. 2000].

Unter *Bioprozessentwicklung* werden wissenschaftliche und technische Bemühungen verstanden, die der Erzeugung oder Umwandlung von Stoffen mit Biokatalysatoren

¹Bierherstellung der Babylonier ca. 6000 Jahre v. Chr. [Vasic-Racki 2000]

im Produktionsmaßstab dienen. Beispielsweise muss zu Beginn der Entwicklung eines neuen mikrobiell katalysierten Produktionsprozesses entweder aus der großen Zahl der natürlich vorkommenden überproduzierenden Organismen oder den im Gen-Labor erzeugten Mutanten möglichst effizient der geeignete Biokatalysator identifiziert und die für ihn optimale Reaktionsführung entwickelt werden.

Solche Entwicklungs- und Optimierungsverfahren müssen zeit- und personaleffizient durchgeführt werden. Traditionell finden dabei parallel einsetzbare geschüttelte Reaktionsgefäße mit geringem Volumen, z.B. Erlenmeyerkolben oder Reagenzröhrchen, verbreitet Verwendung. Mehr als 90 % aller Experimente zur mikrobiellen Kultivierung in der Bioprozessentwicklung werden gemäß [Büchs 2001] in kleinen geschüttelten Bioreaktoren mit geringem Reaktionsvolumen durchgeführt.

Die verfahrenstechnischen Defizite der Schüttel- gegenüber Rührkessel-Bioreaktoren betreffen vor allem die Möglichkeiten der Betriebsführung und Überwachung relevanter Zustandsgrößen [Hilton 1999]. Die Gefäße wurden meist nur als geschlossene Reaktionsräume, d.h. 'Batch'-Reaktoren betrieben. Mussten beispielsweise Nährstoffe oder induzierenden Substanzen während des Prozesses zugegeben werden, so erfolgte die Dosierung diskontinuierlich und mit manuellem Arbeitsaufwand.

Die Defizite der traditionell verwendeten Gefäße gegenüber Bioreaktoren abzubauen galt in der jüngeren Vergangenheit wissenschaftliche und kommerzielle Aufmerksamkeit. Am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH wurde eine Technik konzipiert, die den Betrieb von Schüttelkolben im halbkontinuierlichen Zulaufverfahren gestattet ([Weuster-Botz u. a. 2001], [Altenbach-Rehm 2000]). Eine automatische, präzise Mikrodosierung sorgt für die sterile Zugabe von Medium, Substrat und Titrationsmittel in diskreten Kleinstmengen ab 20 μL in bis zu 16 parallelen Reaktionsgefäßen² ([Altenbach-Rehm 2000]). Diese Entwicklung macht nicht nur den Schüttelkolben zu einem Fedbatch-Bioreaktor, sie ermöglicht auch die Nachdosierung von Substanzen im Verhältnis zu ihrem Verbrauch. So wurde durch Einbringen von pH-Elektroden in jedes der parallelen Gefäße eine pH-Kontrolle in Schüttelkolben oder anderen Kleinreaktionsgefäßen möglich.

Der Sauerstoffeintrag in geschüttelten Kleinreaktionsgefäßen ist für viele mikrobielle Kulturen nicht bedarfsdeckend [Büchs 2001]. Er ist u.a. von dem verwendeten Sterilverschluss, dem Design des Gefäßes (z.B. Schikanen), seiner Befüllung und der Exzentrizität des Schüttelgerätes abhängig. Als Alternative zu Schüttelreaktoren beim Einsatz von stark sauerstoffverbrauchenden Bioprozessen wurde ein Reaktionsgefäß gleichen Maßstabs mit zusätzlich integrierter Begasung entwickelt [Altenbach-Rehm 2000]: eine miniaturisierte, begaste Säule (Mini-Blasensäule). Über einen geeigneten, sterilen Gasverteiler im Boden der Flasche werden Gasblasen in der Reaktionslösung erzeugt. Diese verbessern den Sauerstoffeintrag wesentlich, was durch das Einbringen von pO_2 -Sonden und Bestimmung des $k_L a$ -Werts überprüft werden kann [Altenbach-Rehm 2000]. Bis zu 16 Miniblasensäulen können wie Schüttelkolben im parallelen Zulaufverfahren betrieben werden.

²Kommerzialisiert unter dem Name „fedbatch-pro“ von der Firma DASGIPmbH, Jülich

Tab. 1.1: Vergleichende Übersicht der Kleinreaktionsgefäße hinsichtlich Prozessführung und Informationsgewinn. Ergänzt auf Grundlage von [Weuster-Botz 1999]

	Labor-Rührkessel	Schüttelkolben	Mini-Blasensäule
In- und Online-Parameter	pH, pO ₂ , Temperatur, CO ₂ /O ₂ ^a , c _{Substrat} ^b	pH, pO ₂ , Temperatur	pH, pO ₂ , Temperatur
Kontrollierte Prozessgrößen	Anfangsbedingungen Temperatur Rührer-Drehzahl pH pO ₂ Reaktionsvolumen C _{Substrat} ^b	Anfangsbedingungen Temperatur Schüttelfrequenz pH	Anfangsbedingungen Temperatur Begasungsrate pH (pO ₂) ^c
Prozessführung	Batch Fedbatch kontinuierlich	Batch Fedbatch	Batch Fedbatch kontinuierlich ^d
Analytik	offline online	offline	offline

^aBestimmung im Abgas

^bOnline Glucose-Analysator oder Respirationskoeffizient

^cnur über manuelle Einstellung der Begasungsrate mittels Kugelrotametern möglich

^d[Curvers u. a. 2000]

Tab. 1.1 zeigt die wichtigsten Unterschiede zwischen Rührkesselbioreaktor und Kleinreaktionsgefäßen bezüglich Prozessführung und Informationsgewinn zum aktuellen Stand der Technik. Analog zu Rührkessel-Bioreaktoren können in den Kleinreaktionsgefäßen, sofern keine räumliche Limitierung vorliegt, *in-situ* Sonden verwendet werden, um in hoher zeitlicher Auflösung Prozessgrößen wie z.B. pH und pO₂ aufzuzeichnen. Sind solche Sonden nicht verfügbar, wie dies bei vielen Substraten, Produkten und Metaboliten der Fall ist, so ist der Forderung nach einer parallelen Online Analytik nicht in trivialer Weise zu entsprechen.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Der **Online-Bestimmung** der aktuellen Konzentrationen von Schlüsselkomponenten im Reaktionsmedium, vor allem der Konzentration des **limitierenden Substrats**, kommt bei der Bioprozessentwicklung eine große Bedeutung zu. Beim **Satzbetrieb** kann der zeitliche Verlauf der **Substrataufnahme** Aufschluss über die kinetischen Aspekte des Bioprozesses unter den gegebenen Versuchsbedingungen liefern. Bei Prozessen im **Zulaufverfahren** (Fedbatch) kann die Güte vorgegebener **Dosierprofile** überprüft und der Beginn der Dosierung auf das Erreichen einer Schwellenkonzentration des Substrats abgestimmt werden. Durch Kombination der Online-Messung mit entsprechenden **Steuer- oder Regeleingriffen** kann in der Kultur **Substratmangel** bzw. **Substratüberdosierung verhindert** werden und so der Prozess unter definierteren Bedingungen ablaufen.

In **Bioreaktoren** ab 1 L Arbeitsvolumen wird zur direkten Messung von gängigen Substraten, z.B. Glucose meist automatisch ein Probenstrom ohne oder mit Zellabtrennung (z.B. durch Filtration) entnommen und einem extern angeordneten Analysengerät zugeführt (z.B. Fließ-Injektions-Analyse - FIA oder Sequentielle-Injektions-Analyse - SIA). Dem Reaktor wird bei jeder **Probenahme** Reaktionsmedium in einer **Größenordnung von Millilitern** entzogen. Das insgesamt während der Prozesszeit entnommene Probenvolumen muss dabei gegenüber dem Gesamtreaktionsvolumen vernachlässigbar sein.

Im ersten Schritt der Bioprozessentwicklung werden die Experimente, wie in Kapitel 1 dargelegt, üblicherweise noch nicht in Bioreaktoren, sondern in **parallelen Kleinreaktionsgefäßen** durchgeführt. Informationen über die aktuellen Konzentrationen des limitierenden Substrats und anderer Schlüsselkomponenten können bei diesen Experimenten bisher nur über eine **direkte Probenentnahme** gewonnen werden. Dies geschieht **manuell**: entweder mit sterilen Einwegspritzen über ein Silikonseptum am Gefäß selbst oder mit einer sterilen Pipette unter der sterilen Werkbank. Die **Häufigkeit** der Volumenentnahme, die je nach Art der durchzuführenden Untersuchungen wenige Milliliter je Probenahme beträgt, ist **durch das geringe Reaktionsvolumen begrenzt**.

Der Informationsgewinn erfolgt daher in parallelen Kleinreaktionsgefäßen anhand weniger Proben über die Prozesszeit, in der industriellen Praxis sogar nur einzig aus einer Analyse bei Abbruch der Kultivierung. Der Grund liegt im hohen Zeit- und Arbeitsaufwand der manuellen Probenahme aus einer Vielzahl von Gefäßen. Die Zeitpunkte der Probenahme sind meist zufällig gewählt. Dieses Vorgehen birgt für die Entwicklung und Optimierung der Prozesse die Gefahr, dass durch den Informations-

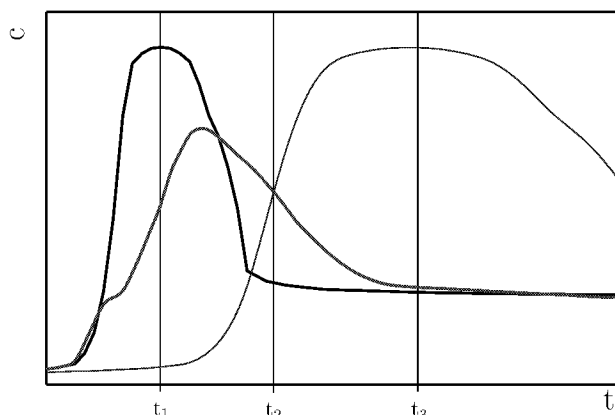


Abb. 2.1: Beispiele zeitlicher Konzentrationsverläufe eines Produkts in parallelen Versuchsansätzen. Bei Endpunktbestimmung an einem beliebig gewählten Zeitpunkt kommt es zu einer Fehlentscheidung.

mangel zwischen Anfangszustand, Probenahme und Endzustand des Prozesses das optimale Ergebnis des parallelen Experiments nicht erkannt wird. Abb. 2.1 zeigt dieses Problem anhand von drei möglichen Verläufen der Produktkonzentration in parallelen Versuchsansätzen. Je nach Probenahmezeitpunkt t_1 , t_2 oder t_3 stellt sich ein anderes Ergebnis dar, im Fall t_2 sogar ein uneindeutiges. Es kann daher zu Fehlentscheidungen in einer frühen Phase der Prozessentwicklung kommen.

Automatisierte Verfahren zur parallelen Probenahme und anschließenden Online-Messung in kleinen Reaktionsvolumina sind in parallelen Bioprozessen noch nicht bekannt. Eine Publikation behandelt die Online-Messung und Regelung von Methanol im geschlossenen Regelkreis mit *Pichia pastoris* in nur einem Schüttelkolben [Guarna u. a. 1997].

Die durch das Reaktionsvolumen begrenzte Zahl von Probenentnahmen und die Forderung einer Abtastzeit der Online-Messung im Bereich von Minuten¹ bei mikrobiellen Prozessen stellen das Kernproblem einer parallelen Probenahme- und Messtechnik in Kleinreaktionsgefäßen dar.

Eine Möglichkeit, das Problem des geringen Reaktionsvolumens bei Probenentnahme zum Zweck der Online-Analyse zu umgehen, wäre die Verwendung eines spezifischen Sensors für die interessierende Medienkomponente, der direkt in das Reaktionsmedium eingebracht werden könnte. In der Literatur finden sich zahlreiche Bemühungen, solche *in-situ* Messsonden für die Bestimmung von Substraten oder Metaboliten zu entwickeln ([Bradley u. a. 1991]², [Phelps u. a. 1995], [Brooks u. a. 1987], [Bilitewski u. a. 1993]). Als Messwandler fungieren verbreitet Standardprozesselektroden (pH, pO_2), die mit einer biologischen Komponente gekoppelt sind (Enzyme, Zellen oder Antikörper)

¹Als Richtwert für bakterielle Fermentationssysteme sollte ein Zeitabstand von 2-5 min angestrebt werden [Christensen u. a. 1996].

²Review mit Überblick über Entwicklungen bis 1991

und mit dem Analyt spezifisch reagieren³. Es handelt sich um sogenannte „Biosensoren“.

Bisherige Biosensor-Entwicklungen können nicht direkt im Bioprozess eingesetzt werden. Sie sind vor allem nicht mit Dampf und nur bedingt chemisch sterilisierbar. Schwankungen von pH und pO_2 sowie die Anwesenheit inhibierender Substanzen im Reaktionsmedium können Störungen des Signals hervorrufen und der lineare Messbereich deckt oft nicht die ganze Schwankungsbreite der Konzentrationen im Prozess ab. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist keine *in-situ* Sonde für Substrat, insbesondere Glucose, verfügbar, die sich hinsichtlich Stabilität, Sterilisierbarkeit und Messbereich eignet⁴.

Das bedeutet, dass eine Probenahme Voraussetzung für die Durchführung einer parallelen Online-Analyse in Kleinreaktionsgefäßen ist. Die Proben müssen mit einer Abtastzeit im Minutenbereich einem analytspezifischen Sensor, z.B. einem Biosensor, echtzeitnah zugeführt werden, der außerhalb des Reaktionsgefäßes unter definierten Analysebedingungen betrieben werden kann.

Aus dieser Problemstellung ergibt sich die allgemeine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:

Eine Technik ist zu entwickeln, die aus einer Vielzahl geringer Reaktionsvolumina paralleler Bioprozesse repräsentativ und reproduzierbar Proben automatisch gewinnt und diese mit minimaler Zeitverzögerung einer geeigneten Messeinrichtung zur Bestimmung von Substrat- und/oder Produktkonzentrationen zuführt. Das technische System soll zur parallelen Substratüberwachung und parallelen Substratregelung in Bioprozessen in Kleinreaktionsgefäßen einsetzbar sein. Kriterien zur Beurteilung der Funktionalität sind Präzision der Messungen, Sterilität, Rückwirkungsfreiheit und Stabilität über die Prozesszeit.

Dieses Vorhaben kann nur durch das schrittweise Erreichen folgender Teilziele umgesetzt werden:

1. Entwicklung einer dem Reaktionsvolumen angepassten Probenahmestrategie für parallele Kleinreaktionsgefäße

Mit einer dem Reaktionsvolumen angepassten Probenahmetechnik sollen aus parallelen Kleinreaktionsgefäßen repräsentative Proben automatisch, steril und rückwirkungsfrei gewonnen werden.

Eine Möglichkeit, das Reaktionsvolumen aus den Kleinreaktionsgefäßen durch die Probenahme nicht zu reduzieren, ist die diffusive Probenahme über Dialysemembranen.

³Siehe Übersicht dazu in [Schügerl u. a. 1987].

⁴In Einzelfällen und bei bestimmten Anwendungsbeispielen konnten einige Defizite von entwickelten Messsonden gelöst werden. Siehe dazu die Literaturübersicht in [Schügerl u. a. 1987] und [Bradley u. a. 1991].

Dem Reaktionsmedium werden über einen Konzentrationsgradienten zwischen einer analytfreien Lösung im Inneren der Membran (Akzeptorlösung) und der Reaktionslösung in Abhängigkeit von der Diffusionszeit Stoffmengen aber kein Flüssigkeitsvolumen entzogen. Es können die Stoffe die Membran passieren, deren Molekülgröße das Durchdringen der porösen Membran erlauben. Daher muss bei Auswahl des Membranmaterials darauf geachtet werden, dass der Analyt durch die Membran diffundieren kann.

Die Dialyseprobenahme soll in zwei Schritten erfolgen: Um eine für die Analyse ausreichende Menge des Analyten anzureichern, muss die Akzeptorlösung in der Membran für einen definierten Zeitraum ruhen und kann erst dann zum Transport zur Analysevorrichtung aus der Membran entfernt werden. Dieses Prinzip wird als „Stop-Flow-Probenahme“ oder zeitabhängige Probenahme bezeichnet. Dafür soll eine miniaturisierte Dialyseeinrichtung insbesondere unter Berücksichtigung von Hohlfasermembranen für parallel betriebene Kleinreaktionsgefäße im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden.

2. Auswahl und Integration einer spezifischen Online-Analytik

Eine geeignete Messtechnik soll ausgewählt und eingesetzt werden, die die spezifische Überwachung verschiedenster Substrate und/oder Produkte in Kleinreaktionsgefäßen aus der komplexen Matrix der Proben aus Bioprozessen gewährleistet.

Das Messverfahren soll die über Dialyse gewonnene Probe online vermessen können. Dies ist bei Durchflussdetektoren sichergestellt. Die Proben werden dem Detektor über ein Fluidsystem zugeführt. Diese Kombination aus diffusiver Probenahme und Fließanalysensystem wird „Fließdiffusionsanalyse“ (FDA) genannt.

Aus dem komplexen Gemisch aller bei der Dialyse diffundierten Substanzen im Akzeptormedium soll der Analyt spezifisch quantifiziert werden können. Auf Grundlage der zahlreichen Entwicklungen auf dem Gebiet der Biosensorik, die eine spezifische Detektion, beispielsweise durch immobilisierte Enzyme, gewährleisten, sollen geeignete Sensorsysteme identifiziert und verifiziert werden. Dabei soll sich die Arbeit auf Glucose als Modellsubstrat konzentrieren, da es in ca. 90 % aller Bioprozesse als Kohlenstoffquelle eingesetzt wird [Beuse 1999].

3. Entwicklung des Fluidsystems für Probenahme und Messtechnik an parallelen Kleinreaktionsgefäßen

Die parallelen Probenahmestellen und die Messtechnik sollen derart angeordnet werden, dass die Analyse zeiteffizient und mit hoher Abtastung durchgeführt werden kann. Dabei soll die Anzahl nötiger „Hardware“-Komponenten gering gehalten werden. Die Kriterien für eine reproduzierbare und repräsentative Probenahme gelten für die Evaluierung der Anordnungsalternativen.

Zwischen der Zuführung der Probe zum Analysesystem und dem Ablesen des nachfolgenden Messwertes liegt systembedingt stets ein Zeitabstand, so dass diese Art der Prozessüberwachung aus diskreten Messwerten besteht. Es gilt, diesen Zeitabstand so kurz wie möglich zu halten, um die Informationsdichte zu erhöhen und bei Rückführung über einen Regelkreis eine ausreichende zeitliche Auflösung der Regelgröße zu erzielen.

Zur technischen Ausgestaltung müssen die verschiedenen Möglichkeiten der Anordnung paralleler Messstellen geprüft und auf Grundlage der Ergebnisse eine Entwicklungsrichtung vorgegeben werden. Die Probenahmeverrichtungen können z.B. in Serie oder parallel zueinander bei Verwendung nur einer Sensoreinheit angeordnet werden. Wenn sich in den Untersuchungen zeigen sollte, dass diese beiden Konzepte nicht erfolgsversprechend sind, soll die Variante der Kopplung jeweils einer Probenahmeeinrichtung mit einer Sensoreinheit angesichts des technischen und finanziellen Mehraufwands betrachtet werden.

4. Verfahrenstechnische Charakterisierung der parallelen Probenahme und Substratmessung

Die wesentlichen Einflussparameter auf die Probenahme, die Sensorik und das Gesamtsystem sind zu identifizieren und bei der technischen Realisierung optimal zu gestalten.

Die Charakterisierung zeigt auf, wie sich Einflüsse aus der Umgebung, aus dem Bioprozess und von Parametervariationen durch den Anwender auf das technische System auswirken. Darüber hinaus wird untersucht, ob und welche Auswirkungen das Einbringen einer Probenahmeverrichtung auf den Bioprozess hat.

5. Evaluierung der Grundfunktionalität

Anhand der parallelen Online-Überwachung ausgewählter Bioprozesse in verschiedenen Reaktionsgefäßen und dem Vergleich der Messwerte mit Ergebnissen von Offline-Messungen, soll die Funktionsfähigkeit der parallelen Probenahme- und Messtechnik evaluiert werden.

Im praktischen Einsatz in bakteriellen Bioprozessen soll die Grundfunktionalität der parallelen Probenahme- und Messtechnik anhand des Modellsubstrats Glucose geprüft werden. Zeigen sich Abweichungen zwischen Online- und Offline-Messwerten, so sollten nach Möglichkeit die Ursachen identifiziert und Wege aufgezeigt werden, wie die Abweichungen zu verringern sind.

6. Anwendung zur Substratregelung paralleler Bioprozesse

Im geschlossenen Regelkreis soll die Substrat-Konzentration in parallelen Schüttelkolbenkulturen in einem bakteriellen Beispielsystem mit verfügbaren Regelalgorithmen parallel geregelt werden.

Im Vordergrund dieses Teilziels steht die Kopplung der entwickelten parallelen Probenahme- und Messtechnik mit der etablierten parallelen Dosiertechnik über einen Regler bei Einsatz in parallelen Schüttelkulturen. Es soll am Beispiel des Modellsubstrats Glucose untersucht werden, mit welcher Regelgüte die Glucosekonzentration mit verfügbaren Regelalgorithmen in parallelen Schüttelkolben auf dem Sollwert gehalten werden kann. Es wird dabei geprüft, ob das entwickelte System prinzipiell für den Einsatz im geschlossenen Regelkreis geeignet ist.

3. Theoretischer Hintergrund

3.1. Biologische Grundlagen der verwendeten Organismen

3.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli gehört zur Familie der Enterobacteriaceae, die den Namen als Darmbewohner von ihrem natürlichen Lebensraum (lat. enteron = Darm) erhalten haben. Das gram-negative, peritrich begeißelte und nicht sporenbildende Bakterium hat sich seit seiner Entdeckung 1885 durch Theodor Escherich (1857-1911) zum bestbeschriebenen und damit zu *dem* Modellorganismus in der mikrobiologischen Forschung entwickelt. Seine Bedeutung als einer der am häufigsten genutzten Biokatalysatoren in mikrobiellen Bioprozessen erlangte es erst durch die Möglichkeiten der DNS-Rekombinationstechnik (1972 erstmals beschrieben) [Schlegel 1999]. Geringe Generationszeiten unter optimalen Wachstumsbedingungen (37°C, pH 6,5-7,8, Verdopplungszeit 0,3-1 h [Altenbach-Rehm 2000]), der Grad seiner Erforschung und die im Verhältnis unproblematische molekulargenetische Manipulierbarkeit machen es oft zum biotechnischen Produzenten der Wahl.

Stoffwechsel

E. coli ist heterotroph und fakultativ anaerob, d.h. die Energiegewinnung erfolgt bei Abwesenheit von Sauerstoff durch gemischte Säuregärung und unter aeroben Bedingungen durch Veratmung von Hexosen (z.B. Glucose, Fructose, Lactose etc.), Glycerin und organischen Säuren. Die einzelnen Substrate gelangen über spezielle zelleigene Transportmechanismen in die Zelle. Für die Aufnahme von Glucose, Fructose, Mannose u.a. leicht zu verstoffwechselnde Zucker gibt es in *E. coli* das Phosphoenolpyruvat-Glucose-Phosphotransferase-System (PTS). Sie werden beim Import in die Zelle gleichzeitig phosphoryliert und auf diese Weise weiteren Abbaureaktionen des Stoffwechsels zugeführt.

Aerober Stoffwechsel

Das sehr häufig in Nährmedien verwendete Substrat Glucose wird unmittelbar nach Aufnahme in die Zelle in 6-Position durch Hexokinase und Adenosintriphosphat (ATP) als Phosphatdonator phosphoryliert. *E. coli* baut das entstandene Glucose-6-Phosphat zu 70 % über den Fructose-1,6-bisphosphatweg (FBP), auch Glycolyse oder Emden-Meyerhof-Parnas-Weg genannt, und zu etwa 30 % über den Pentosephosphatweg ab [Schlegel 1992] (Abb. 3.1). Der 2-Keto-3-desoxy-phosphogluconat-Weg wird nur zu einem vernachlässigbaren Anteil verwendet. Die Glycolyse dient der Erzeugung von

Energieäquivalenten (ATP) und dem C₃-Körper Pyruvat. Es ist eines der wichtigsten Intermediärmoleküle des Stoffwechsels, da es Ausgangsstoff zahlreicher Reaktionswege, wie anaplerotischer Sequenzen¹, im Ana- und Katabolismus der Zelle ist. Die Bilanz der Glycolyse: Aus 1 mol Glucose entstehen 2 mol Pyruvat, 2 mol ATP und 2 mol reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH). Der Pentosephosphatweg dient als Nebenweg des Stoffwechsels der Bereitstellung von Edukten und Reduktionsäquivalenten in Form von NADP/NADPH für die Biosynthese. Pyruvat wird unter aeroben Bedingungen zu Acetyl-CoA durch Pyruvat-Dehydrogenase oxidiert und in den Tricarbonsäure-Zyklus (TCS) eingeschleust. Der TCS-Zyklus dient der direkten Bildung von ATP durch Oxidation des C₂-Moleküls Acetat (als Acetyl-CoA) zu CO₂ unter Übertragung von H auf die Coenzyme NAD(P)⁺ und Flavinadenindinucleotid FAD²⁺. Anschliessende Oxidation der letztgenannten Reduktionsäquivalente in der Atmungskette über Elektronentransportphosphorylierung führt zur indirekten Bildung von ATP. Insgesamt werden bei *E. coli* 26 mol ATP pro mol Glucose über Glycolyse, TCS-Zyklus und Atmungskette produziert.

Anaerober Stoffwechsel

Unter Sauerstofflimitierung schaltet das Bakterium den Stoffwechsel auf Gärung um. Liegen die Enzyme des TCS-Zyklus noch bei ausreichender Sauerstoffversorgung in sehr hohen Konzentrationen vor, beträgt ihre Konzentration bei O₂-Limitierung nur noch 10 % [Schlegel 1992]. Enterobacteriaceae sind als Ameisensäure- oder auch gemischte Säuregärer bekannt. Der Abbau der Glucose erfolgt zunächst über die zuvor beschriebene Glycolyse bis zum Pyruvat (vgl. Abb. 3.1). Nun wird Pyruvat über das Enzym Formiat-Lyase zu Acetyl-CoA und Formiat gespalten. Das Enzym ist nur unter anaeroben Bedingungen aktiv und reagiert sehr empfindlich auf O₂ [Schlegel 1992]. Acetyl-CoA wird beim anaeroben Stoffwechsel nicht in den TCS-Zyklus eingeführt, sondern zu Ethanol reduziert. Ein Teil des Acetyl-CoA wird auch als Acetat, das charakteristische Nebenprodukt bei sauerstofflimitierenden Prozessbedingungen, ausgeschieden. Neben Formiat und Acetat treten Lactat und Succinat als Gärprodukte auf. Die Energieausbeute ist bei anaeroben Kulturbedingungen mit 1-4 mol gebildetem ATP pro mol Glucose wesentlich geringer als bei der Atmung (siehe oben)[Schlegel 1992]. Bei Sauerstoffmangel setzt *E. coli* mehr Substrat pro Zeiteinheit um, da für die zum Wachstum und Aufrechterhaltung des Stoffwechsels benötigte Menge ATP viel mehr Substratmoleküle umgesetzt werden müssen.

Glucose-Überschuss-Metabolismus

Bei hoher Glucose-Konzentration und ausreichender Sauerstoffversorgung wird die Synthese von Enzymen des TCS-Zyklus und der Atmungskette reprimiert. *E. coli* entledigt sich seiner Reaktionsäquivalente durch Gärung und die Folge ist eine verstärkte Bildung organischer Säuren (Acetat). Dies wird als „Glucose-Überschuss-Metabolismus“ oder auch in Analogie zum Stoffwechsel von Hefen bakterieller „Crabtree-Effekt“ [Dahlgren u. a. 1993] bezeichnet. Da hohe Acetatkonzentrationen das Wachstum und die Produktbildung inhibieren können, muss der Glucose-Überschuss-Metabolismus durch eine geeignete Prozessführung unterbunden werden.

¹Aus dem TCS-Zyklus werden fortlaufend Intermediate zur Biosynthese entnommen. Zur Sicherstellung des vollständigen Ablaufs des TCS-Zyklus müssen Auffüllsequenzen bereitgestellt werden, sog. anaplerotische Reaktionen.

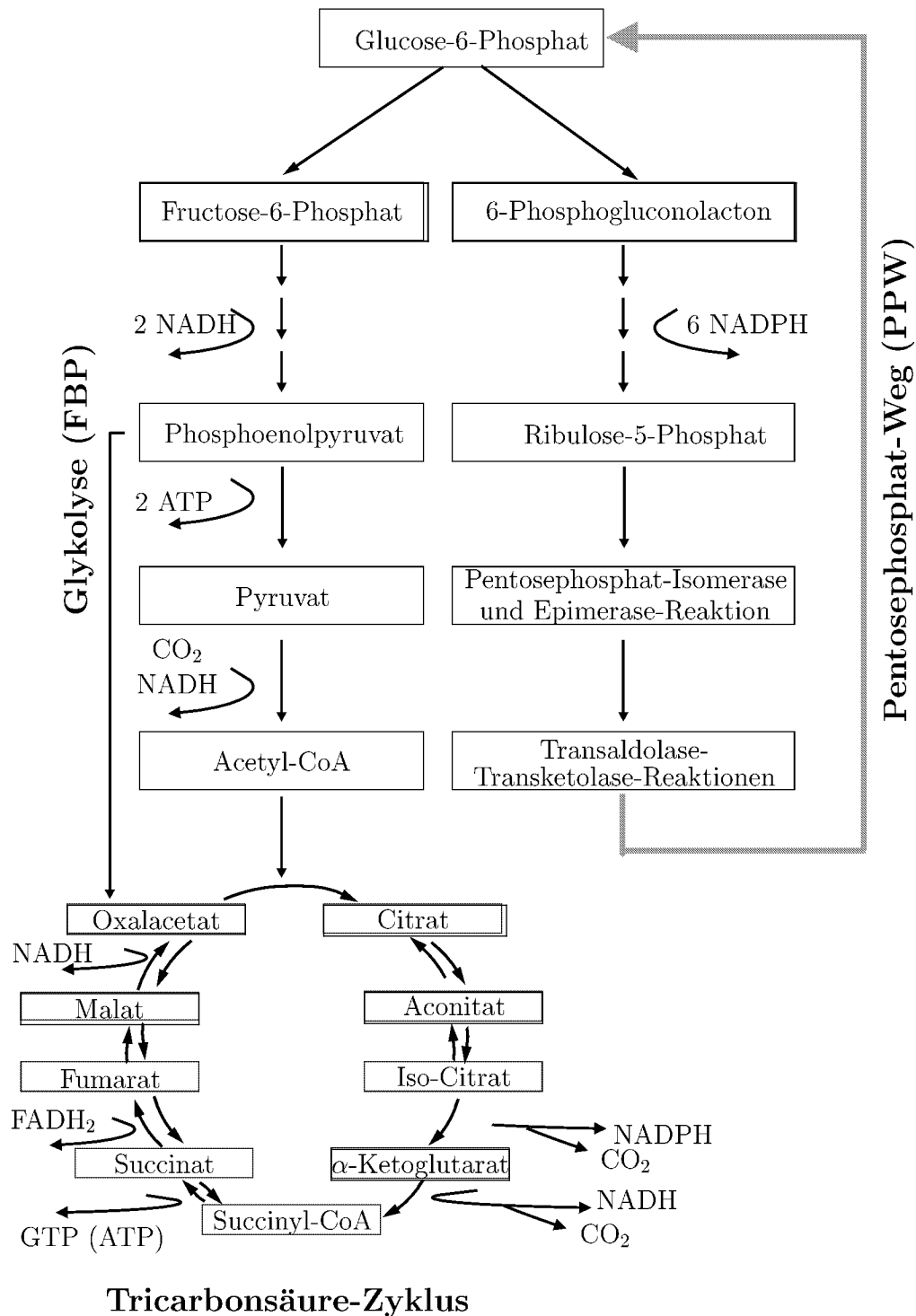


Abb. 3.1: Vereinfachte Darstellung wichtiger Stoffwechselwege in *E.coli*. FAD - Flavinadenindinucleotid, NAD - Nicotinamadenindinucleotid, NADP - NAD-Phosphat, ATP - Adenosintriphosphat

3.1.2. *Lactobacillus kefir*

L. kefir (DSMZ 20587) gehört zur Familie der Lactobacteriaceae (gram-positiv, keine Sporenbildner und unbeweglich) und wurde von [Kandler und Kunath 1983] aus Kefir-Körnern isoliert ($3 \cdot 10^9$ Lactobacilli pro g Korn). Nach [Schlegel 1992] handelt es sich um eine pleomorphe Familie, die Langstäbchen-, Kurzstäbchen sowie Kokken- und Streptokokkentypen einschließt. Sie sind obligate Gärer, jedoch aerotolerant, d.h. Wachstum ist in Gegenwart von Luftsauerstoff möglich. Sie gewinnen Energie aus Kohlenhydraten unter Ausscheidung von Lactat. Günstige Kulturbedingungen für Lactobacilli ist der Zusatz komplexer Medienbestandteile und eine Temperatur von 30°C [Kriegesmann 1999].

L. kefir zählt zu der Gruppe heterofermentativer Lactobacilli. Im Gegensatz zu den homofermentativen Artgenossen, die reines (mind. 90 %) Lactat bilden mit der Glycolyse als Hauptabbauweg für Glucose, nutzen die heterofermentativen *Lactobacilli* vorwiegend den Pentose-Phosphat-Weg. Die Enzyme der Glycolyse fehlen ihnen. Zusätzlich zu Lactat entsteht dabei Ethanol und CO₂.

3.2. Bioreaktoren

Die biochemische Leistung eines Biokatalysators ist wirtschaftlich erst dann verwertbar, wenn es gelingt, sie in einen industriellen Produktionsprozess umzusetzen.

[Sternad 1991] S. 268

Im Fokus der biotechnischen Produktion steht das Reaktionsgefäß, der Bioreaktor. In ihm wird der Biokatalysator mit Substrat unter den, nach Stand der Kenntnisse für die Produktion besten Reaktionsbedingungen kultiviert. Der Großteil dieser Reaktoren hat sich bereits in der chemischen Verfahrenstechnik bewährt, jedoch werden an den Bioreaktor zusätzliche Anforderungen gestellt, die sich für monoseptische Prozesse aus steriltechnischen Fragestellungen und den speziellen Bedürfnissen des Biosystems ergeben.

In aeroben Submerskulturen liegt ein Dreiphasensystem aus Zellen, flüssigem Nährmedium und dispergiertem Gas vor [Schügerl u. a. 1987]. Das Reaktorsystem muss dafür sorgen, dass das Nährmedium optimal durchmischt wird, die Zellen ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden und gasförmige Stoffwechselprodukte abgeführt werden können.

Man unterscheidet Oberflächenreaktoren, bei welchem die Biomasse an einem festen Träger haftet bzw. an der Oberfläche der Kulturbrühe auftritt und Submersreaktoren, in welchen die Biokatalysatoren in der Kulturbrühe suspendiert sind. Die Bioreaktoren werden auch nach Art des Energieeintrags oder der Strömungsführung klassifiziert [Chmiel 1991], z.B. Rührkessel-, Schlaufen- und Blasensäulenreaktor. Die Reaktionsgefäße werden nach ihrem Maßstab unterschieden, der von Mikroreaktoren,

über Schüttelkolben und Labor- bis zum Pilot- und Produktionsbioreaktor reicht.

Die charakteristischen Eigenschaften des Reaktionsgefäßes, die mit geeigneten Messmethoden ermittelt werden müssen, sind die Hydrodynamik, der Leistungseintrag, die Durchmischung und der Wärme- und Stofftransport im Bioreaktor.

3.2.1. Bioprozessmodelle

Drei Arten der Reaktionsführung sind zu unterscheiden: der Satz- oder auch Batch-Betrieb als geschlossenes, der kontinuierliche Betrieb als offenes und das Zulauf- oder „Fedbatch“ Verfahren als teiloffenes System. Während des Batch-Betriebs wird weder Substrat zugeführt, noch Reaktionsmedium abgeführt. In technisch ausgestatteten Reaktoren werden Batch-Prozesse hinsichtlich des Sauerstoffs verbreitet im „Fedbatch“ betrieben, da der Gelöstsauerstoffgehalt meist geregelt wird. Der Begriff Zulaufverfahren wird üblicherweise für Prozesse verwendet, bei welchen Substrate kontinuierlich dosiert werden unter gleichzeitiger Erhöhung des Flüssigkeitsvolumens. Dieses Verfahren wird meist dann gewählt, wenn die Anfangskonzentration des Substrats durch Wachstumsinhibierung des Biosystems gering gehalten werden muss oder die Löslichkeit des Substrats begrenzt ist [Chmiel 1991]. In der Praxis industrieller Produktion findet das Zulaufverfahren vorwiegend Anwendung [Mutzall 1993].

Zur Beschreibung, Entwicklung und Optimierung von Bioprozessen werden sogenannte „Bioprozessmodelle“ verwendet. Diese Modelle verknüpfen die Einflussparameter, die durch den gewählten Bioreaktor bedingt sind, mit den Einflussparametern der Makrokinetik des biologischen Reaktionssystems.

Massenbilanzen

Die Basis der Modelle sind Massenbilanzen. In vielen Fällen ist die modellhafte Beschreibung hinreichend, wenn Idealreaktoren angenommen und die Aspekte des Bioreaktors vernachlässigt werden. Die allgemeine Bilanzgleichung lautet:

$$\frac{d(\int c_i dV)}{dt} = \dot{V}_{ein} \cdot c_{iein} - \dot{V}_{aus} \cdot c_{iaus} + \int v_i dV \quad (3.1)$$

mit:

c_i	Konzentration der Komponente „i“	[kg/m ³]
V	Volumen	[m ³]
$\dot{V}_{ein}$	Volumenstrom des Zulaufs	[m ³ /s]
$\dot{V}_{aus}$	Volumenstrom des Ablaufs	[m ³ /s]
$iein$	Index für zugeführte Komponenten „i“	
$iaus$	Index für abgeführte Komponenten „i“	
v_i	spezifische Reaktionsgeschwindigkeit für Komponente i	[kg/m ³ /s]

Kinetische Ansätze

Die Kinetik des Wachstum von Mikroorganismen, ohne Berücksichtigung möglicher Inhibierungen, kann durch das einfache empirische Modell von [Monod 1949] beschrieben werden (Gl. 3.2)².

$$v_X = \mu \cdot c_X = \mu_{max} \cdot \frac{c_S}{K_S + c_S} \cdot c_X \quad (3.2)$$

mit:

v_X	spezifische Biomassebildungsrate	[kg/m ³ /s]
c_X	Biomassekonzentration	[g/L]
μ	spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
K_S	Monod-Konstante	[g/L]
c_S	Konzentration des wachstumslimitierenden Substrats	[g/L]

K_S wird auch Halbsättigungskonstante genannt. Sie ist die Substratkonzentration, bei der die Wachstumsgeschwindigkeit genau die Hälfte von μ_{max} beträgt. Die Konstante ist organismenspezifisch und ist ein Maß für die Affinität der Zellen zu dem verwendeten Substrat. Ihre Bestimmung kann nur experimentell erfolgen und ihr absoluter Wert ist daher mit großer Unsicherheit behaftet. [Bergter 1983]

Die Produktbildung kann wachstumsgekoppelt oder nicht-wachstumsgekoppelt erfolgen. Daher enthält die Gleichung für die spezifische Produktbildungsrate zwei entsprechende Geschwindigkeitskonstanten:

$$v_P = K_1 \cdot c_X + K_2 \cdot v_X \quad (3.3)$$

mit:

v_P	spezifische Produktbildungsrate	[kg/m ³ /s]
K_1	Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung	[1/h]
K_2	Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung	[-]

Die spezifische Substratverbrauchsrate setzt sich aus den einzelnen Senken des Substrats durch die Zellaktivität zusammen: Biomassebildung, Produktbildung und Erhaltungsstoffwechsel.

$$v_S = -\frac{v_X}{Y_{XS}} - \frac{v_P}{Y_{PS}} - m_s \cdot c_X \quad (3.4)$$

²Auf eine umfangreiche Darstellung von Wachstumskinetiken mit Inhibierungen etc. wird verzichtet und auf die Literatur [Schlegel 1992] und [Bergter 1983] verwiesen.

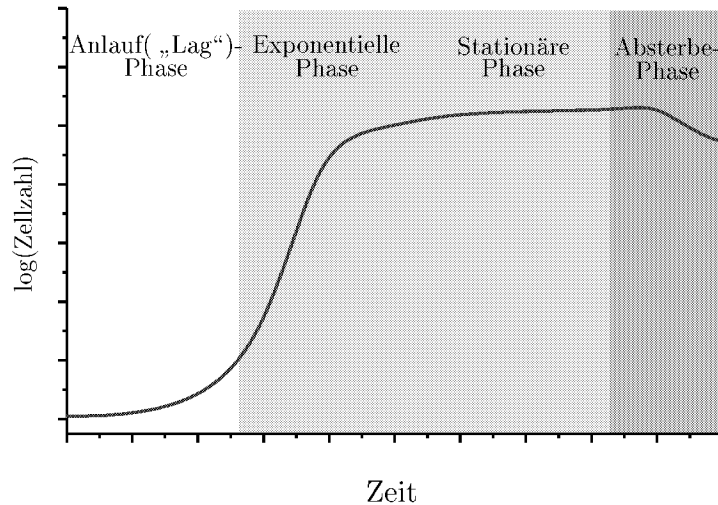


Abb. 3.2: Wachstumskurve einer Satzkultur mit Bakterien nach [Schlegel 1992]

mit:

v_S	spezifische Substratverbrauchsrate	$[\text{kg}/\text{m}^3/\text{s}]$
Y_{XS}	spezifischer Biomasse-Ausbeute-Koeffizient	$[\text{g}/\text{g}(\text{Substrat})]$
Y_{PS}	spezifischer Produkt-Ausbeute-Koeffizient	$[\text{g}/\text{g}(\text{Substrat})]$
m_S	zellspezifischer Erhaltungskoeffizient	$[\text{g}_S/(\text{g}_X \cdot \text{h})]$

Y_{XS} und Y_{PS} werden häufig als konstant angenommen und sind wie K_S biosystem-spezifisch.

3.2.2. Satzverfahren (Batch)

In der Batch-Kultur werden alle Medienbestandteile zusammen mit dem Biokatalysator im Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Mikroorganismen wachsen ab dem Zeitpunkt des Animpfens, bis mindestens ein Faktor im Versuchsansatz eine weitere Vermehrung limitiert [Schlegel 1992]. Über die Zeit zeigt die Zellzahl bei Bereitstellung nur einer verwertbaren Kohlenstoffquelle einen charakteristischen Verlauf: die allgemein bekannte sigmoide Wachstumskurve, veranschaulicht für Bakterien in Abb. 3.2. Während sich die Zellen nach dem Animpfen in der Anlaufphase auf die Nährstoff- und Reaktionsbedingungen einstellen, erreichen sie in der exponentiellen Phase ihre maximale Teilungsrate. Beispielsweise teilt sich *Escherichia coli* im Mittel bei 37°C alle 20 min [Schlegel 1992].

Die Modellgleichungen für den Satzreaktor ergeben sich aus der allgemeinen Massenbilanz (Gl. 3.1) und lauten:

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (3.5)$$

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X \quad (3.6)$$

$$\frac{dc_S}{dt} = -v_S \quad (3.7)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = v_P \quad (3.8)$$

3.2.3. Zulaufverfahren (Fedbatch)

Werden limitierende Medienbestandteile in das System beim Zulauf-Betrieb nachdosiert, so können je nach Art der Substratzufuhr Wachstum oder Produktbildung in der Kultur verlängert werden. Zum einen kann der metabolische Zustand der Mikroorganismen beeinflusst werden, zum anderen können im Reaktor Verdunstungsverluste und Viskositätseffekte³ bei langen Prozesszeiten ausgeglichen werden.

Die Modellgleichungen für den Zulaufreaktor ergeben sich aus der allgemeinen Massenbilanz (Gl. 3.1) und lauten:

$$\frac{dV}{dt} = \dot{V}_{ein} \quad (3.9)$$

$$\frac{dc_X}{dt} = \mu \cdot c_X - \frac{\dot{V}_{ein}}{V} \cdot c_X \quad (3.10)$$

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{\dot{V}_{ein}}{V} \cdot (c_{S_{ein}} - c_S) - \frac{v_S}{Y_{XS}} - \frac{v_P}{Y_{PS}} - m_S \cdot c_X \quad (3.11)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = v_P - \frac{\dot{V}_{ein}}{V} \cdot c_P \quad (3.12)$$

mit:

$c_{S_{ein}}$ Substratkonzentration im Zulauf [kg/m³]

3.3. Parallele Kultivierung im Kleinmaßstab als Werkzeug der Bioprozessentwicklung

Eine Möglichkeit zur effizienten Lösung bioverfahrenstechnischer Fragestellungen im Rahmen der mikrobiellen Prozessentwicklung ist die Durchführung von Untersuchungen im Parallelansatz. Eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen wird simultan bei gleichen Reaktionsbedingungen (Temperatur, Energieeintrag, etc.) betrieben. Weit verbreitet ist, nicht nur bei biologischen Untersuchungen, die Verwendung von Erlenmeyer-Kolben. Wegen des ungünstigen Sauerstoffeintrags wurden parallele Mini-Blasensäulen als alternative Kleinreaktionsgefäße entwickelt [Altenbach-Rehm 2000]. Sie eignen sich vor allem für parallele Experimente mit hohen Zelldichten, da die Kulturen mit ausreichend

³Je nach Art des Bioprozesses kann es, vor allem bei der Produktion von Biopolymeren, zu einer starken Veränderung der rheologischen Eigenschaften kommen, die Leistungseintrag und Stofftransport im Reaktor stark beeinflussen können. In diesen Fällen ist eine Verdünnung erwünscht. [Altenbach-Rehm 2000]

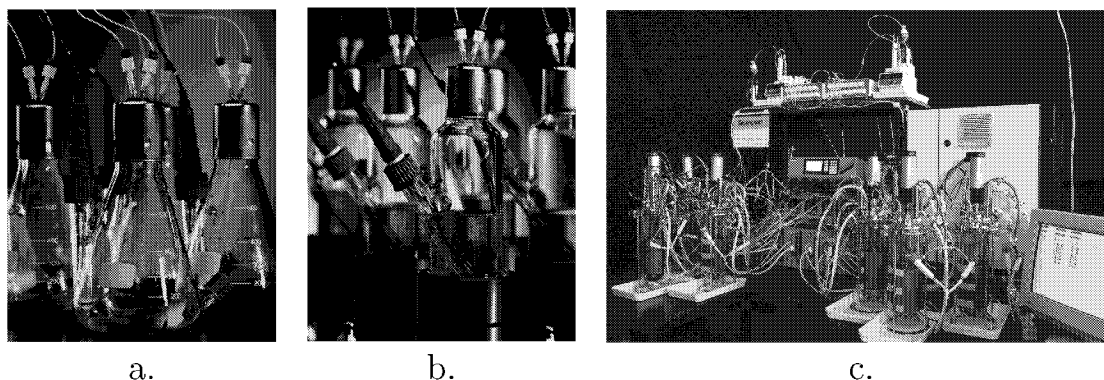


Abb. 3.3: Parallele Kleinreaktionsgefäße: a. Schüttelkolben und b. Mini-Blasensäulen mit integrierter pH-Elektrode und c. Labor-Rührkessel mit paralleler Mikrodosiertechnik

Sauerstoff versorgt werden können. Parallele Rührkessel-Systeme sind aufgrund ihrer apparatetechnischen Eigenschaften (Energiedissipation, Sauerstoffeintrag, Geometrie, etc.) dem Produktionsmaßstab wesentlich näher als die eben genannten Gefäße. Sie verlangen jedoch die Verwendung grösserer Volumina (Medienkosten) und sind in Anschaffung und Wartung teurer. Abb. 3.3 zeigt eine Übersicht der Gefäße. Im folgenden werden Schüttelkolben und Minblasensäulen genauer erläutert.

3.3.1. Kleinreaktionsgefäße

Schüttelkolben

Schüttelkolben sind Reaktionsgefäße aus der chemischen und biologischen Laboranwendung⁴, die in einem eigens für sie vorgesehenen Schüttelinkubator kreisförmig bewegt und in auf Versuchstemperatur geregelter Atmosphäre inkubiert werden (siehe Abb. 3.3a.). Oft werden sie im Entwicklungs- und Produktionsbereich zur Vermehrung von Biokatalysatoren als Impfgut für nächstgrößere Bioreaktoren eingesetzt. Im Rahmen der Bioprozessentwicklung sind sie ein zentrales Werkzeug, um auf eine praktisch einfache Weise eine Vielzahl verschiedener Reaktionsansätze (z.B. verschiedene Anfangsreaktionsbedingungen oder Biokatalysatoren) simultan zu betreiben und so schnell und kostengünstig Ergebnisse zu erzielen. In der industriellen Bioprozessentwicklung werden pro Jahr mehrere hunderttausend Experimente in Schüttelkolben durchgeführt [Büchs u. a. 2000a]. Trotz dieser langen Tradition in Industrie und Forschung ist das Gefäß verfahrenstechnisch erst in jüngster Zeit charakterisiert worden [Büchs 2001].

Gefäßbeschreibung

Die Volumina der zur mikrobiellen Kultivierung verwendeten Schüttelkolben reicht von 50 bis 2000 mL. Sie werden in der Regel mit 5 - 20 % Volumen befüllt [Altenbach-Rehm 2000]. Der Gefäßkörper ist meist aus Glas, wobei verbreitet die traditionelle Erlenmeyer Form (DIN 12380) durch Wand und Bodenschikanen verändert

⁴erstmalig von Kluver 1933 bei Stoffwechseluntersuchungen von Pilzen zur Herstellung von Penicillin beschrieben [Altenbach-Rehm 2000].

wird. Dies geschieht in der Absicht, die Durchmischung zu verbessern. Der Kolben wird mit einem Deckel oder Stopfen verschlossen. Für eine sterile Kultivierung von Mikroorganismen muss der Gefäßverschluss eine sterile Abgrenzung gegenüber der mikrobiell belebten Umgebung gewährleisten. Zum anderen muss er bei aeroben Biosystemen einen ausreichenden Gasaustausch zwischen dem Luftraum im Gefäß und der Atmosphäre gewährleisten. Üblicherweise finden entweder Tiefenfilter aus Baumwolle oder Zelluloseacetat oder Kappen aus Aluminium Anwendung [Weuster-Botz 1999].

Reaktionsbedingungen und Prozessführung

Für die Vergleichbarkeit von Entwicklungs-Ergebnissen und die Maßstabsübertragung sind definierte Reaktionsbedingungen erforderlich [Büchs u. a. 2000b]. Der Sauerstoffbedarf aerober Kulturen wird durch unzureichenden Sauerstofftransfer zwischen Atmosphäre und Flüssigphase im Schüttelkolben häufig nicht gedeckt ([Henzler und Schedel 1991], [Büchs u. a. 2000b]). Dabei wird der Austausch durch den diffusiven Stofftransport zwischen Gasraum im Gefäß und der Flüssigphase und den diesen Gradienten beeinflussenden Stofftransport über den Gefäßverschluss bestimmt.

Die Gefäße werden in Schüttelinkubatoren mit entsprechenden Haltern auf einer Platte (Tablar) befestigt, die mittels eines Motors exzentrisch mit einem gerätespezifischen Radius (Exzentrizität 2,5-5 cm) und einer einstellbaren Drehzahl horizontal bewegt wird. Vermischung der Reaktionslösung und Wärme- und Stofftransport werden von der Ausprägung dieses Leistungseintrages bestimmt [Weuster-Botz 1999].

Ein weiterer Unterschied zum Rührkessel bestand lange Zeit darin, dass die Schüttelkolben meist nur als Satzreaktoren betrieben wurden und Informationen über die Bedingungen im Gefäß nur über aufwendige manuelle Probenahme gewonnen werden konnten.

Mini-Blasensäulen

Das Problem des unzureichenden Sauerstoffeintrags in das parallele Reaktionsgefäß Schüttelkolben, vor allem bei hohen Zelldichten, führte zu Entwürfen steriler Belüftungseinrichtungen (siehe Beispiele in [Weuster-Botz 1999]), die sich nicht durchsetzten. In Anlehnung an die Anwendung von Blasensäulen in der chemischen Technik wurde in jüngster Zeit ein neues Kleinreaktionsgefäß entwickelt [Altenbach-Rehm 2000], das das Spektrum paralleler Kulturgefäße ergänzt.

Gefäßbeschreibung

Die Mini-Blasensäule besteht aus einem Flaschenkörper, der mit einer Aluminiumkappe wie ein Schüttelkolben verschlossen wird, und einem Gasverteiler im Flaschenboden. Feuchtigkeitsgesättigte Prozessluft wird steril durch Sinterglasplatten oder lasergebohrte Lochplatten als Gasverteiler in die Reaktionslösung eingeblasen [Altenbach-Rehm und Weuster-Botz 1997]. Auf diese Weise werden Volumenverluste durch Verdunstung reduziert. Das Gefäß ist in Abb. 3.3 b. dargestellt.

Reaktionsbedingungen und Prozessführung

Der Sauerstoffeintrag erfolgt über die Blasenoberfläche und die Durchmischung über die aufsteigenden Gasblasen, die aus der durch den Gasverteiler strömenden komprimier-

ten Luft erzeugt werden. Die parallelen Mini-Blasensäulen werden wie Schüttelkolben in einem Inkubator auf Reaktionstemperatur gehalten (Abb. 3.4), jedoch nicht mehr geschüttelt.

3.3.2. Stand der Technik paralleler Kultivierung

Wissenschaftliche Bemühungen der letzten Jahre führten zur Überwindung einiger Nachteile der miniaturisierten Kultivierung. Zum einen wurde am Institut für Biotechnologie in Kooperation mit DASGIPmbH eine parallele Mikrodosiertechnik entwickelt ([Altenbach-Rehm 2000], [Weuster-Botz u. a. 2001] und [DASGIPmbH]), so dass Kleinreaktionsgefäße halbkontinuierlich betrieben werden können (Zulaufverfahren). Zum anderen wurde eine parallele pH-Regelung etabliert ([Altenbach-Rehm 2000], [Weuster-Botz u. a. 2001]) und kommerzialisiert [DASGIPmbH]. Damit wurden zwei apparatetechnische Nachteile der parallelen Kultivierungstechnik obsolet.

In Abb. 3.3b. ist erkennbar, dass in jedem Schüttelkolben und jeder Mini-Blasensäule über einen Seitenstutzen eine pH-Elektrode integriert ist. Durch ein Silikonseptum im Deckel der Gefäße verbinden sterile Kanülen die Dosierleitungen mit dem Gefäßinneren⁵.

Abb. 3.4 zeigt den derzeitigen Stand der parallelen Kultivierungstechnik im Zulaufverfahren am Beispiel der Mini-Blasensäulen. Die Inkubatorhaube temperiert die Reaktionsgefäße durch Umluftbeheizung. In ihr werden die Reaktionsgefäße entweder mechanisch bewegt (Schüttelkolben) oder über geeignete Anschlüsse mit temperierter und befeuchteter Prozessluft begast. Darüber befinden sich präzise Hubkolbenpumpen, die zusammen mit Multiventilmodulen und PTFE-Schläuchen die Versorgung jeder einzelnen Kultur mit Nährstoffen, pH-Korrekturmitteln oder anderen Supplementen ermöglichen. Ein 16-fach paralleler pH-Messverstärker erlaubt die Online-Überwachung der H_3O^+ -Ionen Konzentration in der Reaktionslösung und bei Bedarf die pH-Regelung in Verbindung mit der zuvor beschriebenen Mikrodosiertechnik und einer entsprechenden Software zur Datenerfassung und Hardwareansteuerung.

3.4. Stand der Bioprozessmesstechnik

3.4.1. Begriffsbestimmung

Der Begriff Analytik umfasst in der chemischen Wissenschaft die Methoden zur Lösung einer analytischen Aufgabe. Das Wort Sensorik bezeichnet dagegen die Lehre von den Messfühlern, also den technischen Einrichtungen, um bestimmte Eigenschaften eines Messguts den menschlichen Sinnen zugänglich zu machen. Der Begriff *in-situ* oder *inline* Sensor wird für Messsonden verwendet, die mit dem Messgut in direktem Kontakt stehen und ein maschinell verwertbares Signal in eindeutigen Zusammenhang mit dem Messattribut ausgeben [Freytag u. a. 1992]. Demgegenüber existieren *ex-situ* angeordnete Sensorsysteme, denen ein dem Messgut entnommener Probenstrom zugeführt wird, sofern keine Messsonde für die geforderte Messaufgabe existiert. [Freytag u. a. 1992]

⁵siehe [Altenbach-Rehm 2000] und [Altenbach-Rehm u. a. 1999] für mehr Details

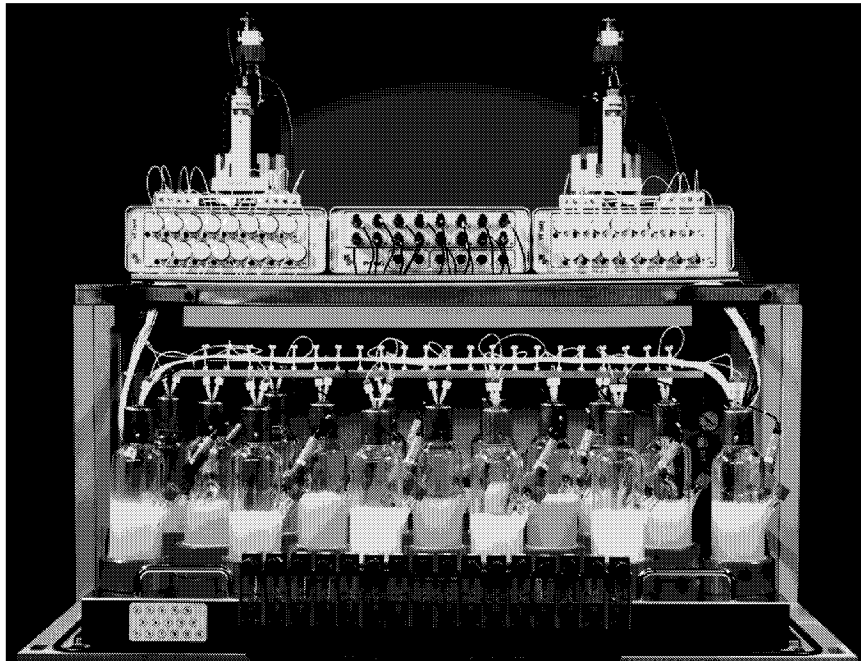


Abb. 3.4: Parallele Mini-Blasensäulen in Inkubatorhaube (Profors, INFORS AG) mit paralleler Mikrodosiertechnik zum Betrieb im Zulaufverfahren (fedbatch-pro, DASGIP mbH, Jülich): Präzise Hubkolbenpumpen, Multiventilmodule und Dosierschläuche. Entwicklung des Instituts für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich in Kooperation mit den genannten Firmen.

spricht auch von „extraktiven“ Sensorsystemen, wobei die dem verwendeten Sensor bereitgestellte Probe durch Verdünnung oder andersgeartete Behandlung von der Originalprobe abweicht. Dabei muss eine eindeutige Korrelation mit der Messgröße, beruhend auf dem genutzten physikalischen oder chemischen Effekten, bekannt sein.

Bei Prozessanalyseverfahren wird zwischen On- und Offline-Betrieb unterschieden. Bei einem Online-Analyseverfahren besteht ein enger Zeitbezug zwischen Prozess- und Datenerfassung, -verarbeitung und Informationsbereitstellung [Weber 1996]. Auf diese Weise ist eine stehende Verbindung des Mess- und Steuersystems zum Prozess möglich. Das Messsignal muss nicht zwingend kontinuierlich, sondern kann auch quasikontinuierlich (diskret) erfasst werden, sofern die Relaxationszeit der Eigenschaftsschwankungen größer als die Zeit ist, die zur Messwertgenerierung benötigt wird [Freytag u. a. 1992]. In der Regel sind Online-Analyseverfahren voll automatisiert [Sonnleitner 1999].

In Abb. 3.5 ist ein solches Online-Analysesystem dargestellt: Der Sensor wandelt die Eigenschaft E (z.B. Analytkonzentration) des Messgutes durch den Vorgang der Messung in ein Messsignal M um. Es handelt sich in der Darstellung um ein extraktives Sensorsystem, bestehend aus den Teilvorgängen Probenahme (repräsentative Probe entnehmen), Probentransport (ohne oder nur mit definierter Veränderung der Probe) und Probenaufbereitung (Anpassung an Messbereich des Detektors oder Umwandlung des Analyten in messbare Form). Die Abbildung zeigt außerdem eine Leiteinrichtung für das Sensorsystem, die eine Funktionskontrolle, Steuerung, Instandhaltungsprozeduren

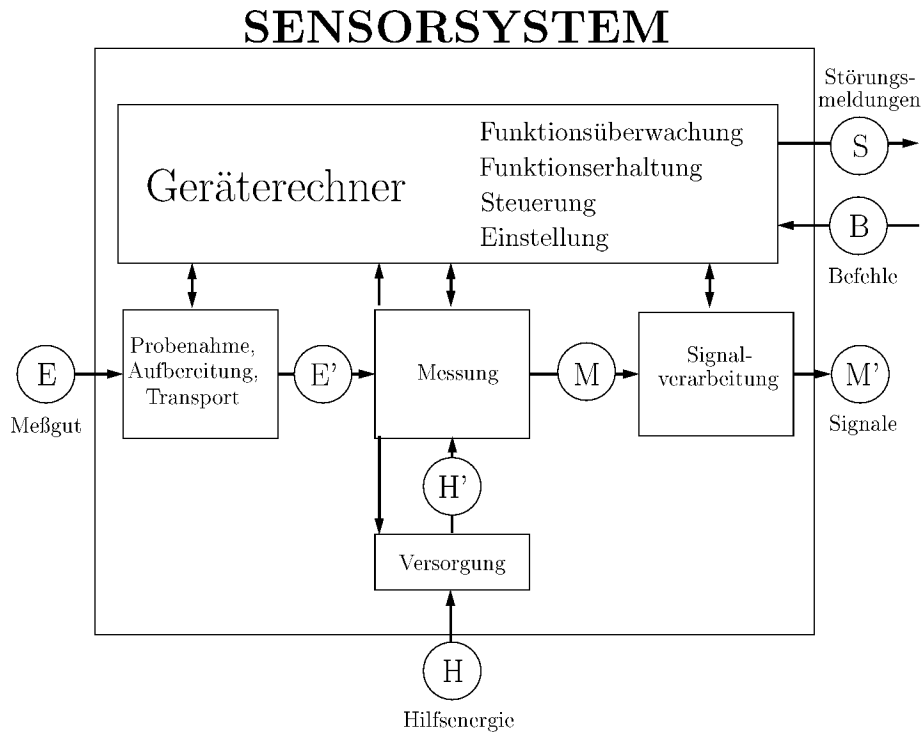


Abb. 3.5: Struktur eines Online-Sensorsystems mit Gerätorechner nach [Freytag u. a. 1992]

und Parametereinstellungen gewährleistet. Manuelle Eingriffe werden auf das nötigste Maß reduziert.

Die zur Analytik notwendigen Arbeitsvorgänge laufen beim Offline-Betrieb nicht simultan zum Prozess ab, sondern werden schrittweise und mit Verzögerung in Bezug auf den Zeitpunkt der Eigenschaftserfassung durchgeführt [Freytag u. a. 1992]. Dabei kann es sich um Speicherung der rohen Messdaten auf einem Speichermedium und einer zeitversetzten Ordnung der Daten, Verrechnung und Ergebniserstellung handeln. In der Bioprozessmesstechnik bedeutet diese Betriebsweise vielmehr das Einfrieren oder eine andere veränderungssichere Verwahrung entnommener Proben der Reaktionslösung und spätere Aufbereitung und Zuführung zu einer geeigneten Analyseverfahren.

Die verfügbare Zeit für Erfassung und Auswertung der gewonnenen Daten ist für Steuerungs- und Regelaufgaben in technischen Prozessen kurz bemessen. Viele Messstrecken benötigen Zeit für die Signalübertragung. Echtzeit-Messung liegt dann vor, wenn diese Ansprech- oder Totzeit sehr kurz gegenüber der Zeit ist, in der eine signifikante Änderung der Eigenschaft messbar ist. Tab. 3.1 gibt eine Übersicht über die behandelten Begriffe.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Begriffe der Bioprozessmesstechnik

Begriff	Erklärung
<i>Verfahrensweise</i>	
online	- voll automatisch - enger Zeitbezug zum Prozess - kontinuierliche bzw. quasikontinuierliche Datenbereitstellung
offline	- diskrete Messmethode - manuelle Einflussnahme notwendig - physikalische Entfernung zwischen Analysesystem und Prozess
atline	- physikalische Entfernung zum Prozess gering - prozessbegleitende Analyse möglich ohne automatisierte Probenzuführung
<i>Anordnung</i>	
<i>in-situ</i>	- direkter Kontakt mit Messgut im Prozess
inline	- synonym mit <i>in-situ</i>
<i>ex-situ</i>	- in physikalischer Entfernung zum Prozess
Bypass	- Messgut wird zur Analyse entnommen und nach Messung wieder zurückgeführt
<i>Zeitbezug</i>	
kontinuierlich	- ununterbrochene Datenbereitstellung
diskret	- Daten fallen in Zeitabständen an
in Echtzeit	- Dauer der Signalbildung des Messwertgebers ist vernachlässigbar gegenüber der Relaxationszeit des Bioprozesses.

3.4.2. Überblick über die Bioprozessmesstechnik

Der wirtschaftliche oder wissenschaftliche Erfolg mikrobieller Produktionsprozesse hängt allein von dem Erreichen des gewünschten Verlaufs der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen ab. Der Erfolg ist zum einen von dem verwendeten Reaktionsgefäß und seiner technischen Ausstattung abhängig. Zum anderen muss während der Prozesszeit die kontinuierliche Bereitstellung und Überprüfung der Lebensbedingungen im Reaktor über die technischen Einrichtungen erfolgen.

Informationen über die meisten biochemischen Vorgänge in den Zellen (*in-vivo*) sind dem Beobachter nur mit hohem technischen⁶ und analytischen Aufwand⁷ direkt und in Echtzeit zugänglich. Veränderungen in der umgebenden Nährlösung und in der Abluft des Prozesses sind mit wesentlich geringerem Aufwand zu messen und eignen sich zur Steuerung bzw. Regelung des Prozesses (z.B. verbrauchte Substrate, gebildete (Neben-)Produkte). Dazu ist eine kontinuierliche und automatische Messung der Steuer- bzw. Regelparameter Voraussetzung (Abb. 3.6) deutlich. Die Analytik ist ein Werkzeug der Prozessentwicklung und -betreuung, sofern sie hinreichend schnell, zuverlässig und spezifisch Prozessinformationen bereitstellt.

Mit der Beobachtung des biologischen Systems ist hier die Masse und der physiologische Zustand des Biokatalysators gemeint. Aktuelle Medienzusammensetzung und Zellzustand hängen stark voneinander ab. Dadurch kann oft indirekt aus der Kenntnis der aktuellen Medienzusammensetzung auf den Zellzustand geschlossen werden.

3.4.3. Fließanalyzesysteme

Zur Bestimmung von Substrat-, Produktkonzentrationen oder Konzentrationen anderer bioprozessrelevanter Komponenten muss eine Probe einem *ex-situ* angeordneten Analysegerät entweder manuell (offline) oder automatisch (online) zugeführt werden. Es sollen im Folgenden die wichtigsten Analyseverfahren und -systeme vorgestellt werden.

Säulenchromatographie

Chromatographische Analyseverfahren, wie Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) oder Gaschromatographie (GC), sind heutzutage fest etablierte Trenn- und

⁶Mittels 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie können neben NAD(P)H auch andere biogene Fluorophore - Proteine, Coenzyme und Vitamine - in mikrobiologischen Kulturen gemessen werden. Zellwachstum und wichtige metabolische Veränderung konnten von [Marose u. a. 1998] mit dieser Technik online nachgewiesen werden, z.B. Wechsel von aeroben zu anaeroben Stoffwechselzuständen. Die Prozessintegration (Installation, Datenauswertung) erscheint technisch aufwändig.

⁷[Schäfer u. a. 1999] beschreiben eine Probenahmeverrichtung, die im Abstand von 200 ms Proben entnehmen kann, um die Stoffwechseldynamik von Bakterienkulturen zu untersuchen. Es kann nur eine beschränkte Anzahl von Proben auf diese Weise genommen werden, die anschließend einem Zellaufschluss und speziellen Analysenverfahren für die interessierenden Metabolite zugeführt werden müssen.

Tab. 3.2: Beispiele wichtiger Prozessparameter und zugehörige Messmethoden

PARAMETER	BESTIMMUNG		ANORDNUNG
Bioreaktor			
Rührerdrehzahl	Tachogenerator	online	<i>ex-situ</i>
Leistungseintrag	Drehmoment, Stromverbrauch	online	-
Gasvolumenstrom	z.B. Hitzedrahtanemometer	online	<i>ex-situ</i>
Substratdosierung	Wägestrecke	online	<i>ex-situ</i>
Schaumbildung	Widerstand, Leitfähigkeit	online	<i>in-situ</i>
Druck	Membransensor	online	<i>in-situ</i>
Reaktionsmedium			
pH	Glaselektrode (galvanisch)	on-/offline	<i>in-situ</i>
pO ₂	Clark-Elektrode (amperometrisch)	online	<i>in-situ</i>
Redoxpotential	Redox-Elektrode	online	<i>in-situ</i>
Abluft (O ₂ , CO ₂)	Abgasanalysator ^a , MS (flüchtige Komponenten)	online	<i>ex-situ</i>
Substratkonzentration	div. Analysatoren (z.B. FIA, SIA)	online	<i>ex-situ</i>
	enzymatischer Assay	offline	-
Produktkonzentration	z.B. HPLC, FIA	on-/offline	<i>ex-situ</i>
Biomassekonzentration	Durchflussturbidometrie	online	<i>ex-situ</i>
	Fluoreszenz	online	<i>ex-/in-situ</i>
	Photometer (Trübung)	offline	-
Andere Metabolite	z.B. HPLC, FIA	on-/offline	<i>ex-situ</i>
Zellen			
Spez. O ₂ Aufnahmerate (OUR)	CO ₂ /O ₂ -Bilanz der Gasphase in Abluft	online	-
Spez. CO ₂ Bildungsrate (CER)	CO ₂ /O ₂ -Bilanz der Gasphase in Abluft	online	-
Respirationsquotient	$RQ = \frac{CER}{OUR}$ über Abluft	on-/offline	-
Substratverbrauch	Substratmessung	on-/offline	-
Produktbildungsrate	Produktmessung	on-/offline	-
Wachstumsrate	Biomassebestimmungen	on-/offline	-
ATP	Assay ^b	offline ^c	-
NADH/NADPH	Assay	offline	
(zellinterner Redoxzustand)	Fluoreszenzspektroskopie	online	
Zellmorphologie ^d	Mikroskop	on- ^e /offline	
	Fließzytometrie	online	

^aO₂ paramagnetische Messung, CO₂ Messung der Absorption im Infrarot-Photometer^bLichtemission bei der Oxidation von Luciferin mittels Luciferase in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und ATP^cÜber eine online Methode wurde von [Siro 1982] berichtet.^d[Locher u. a. 1992]^e[Bittner u. a. 1998] stellten ein Online-Mikroskop vor, mit dem sie u.a. Zellkonzentration und -morphologie mittels Bildanalyseverfahren bei Hefezellen bestimmen konnten.

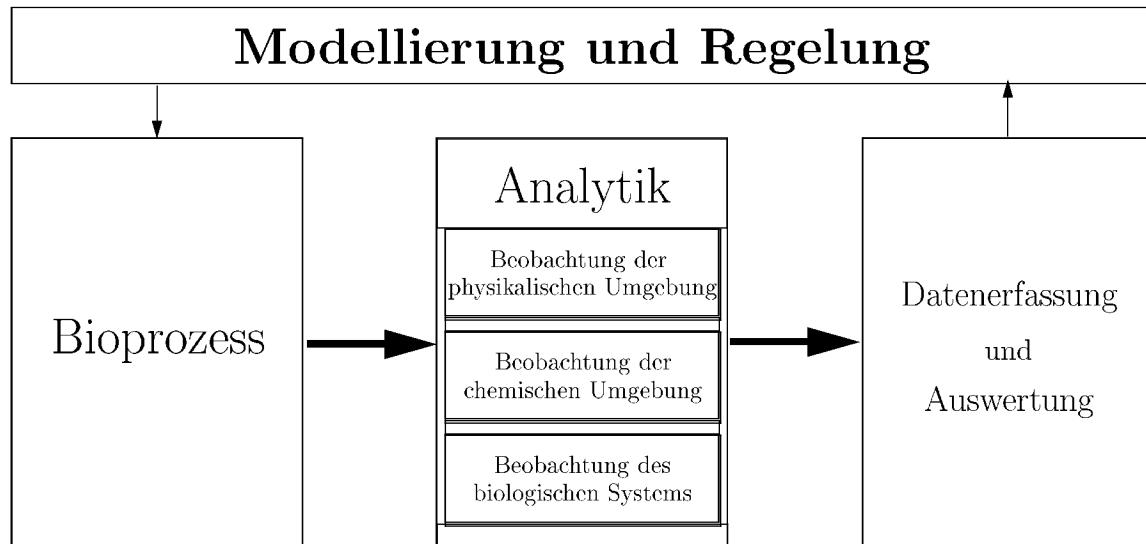


Abb. 3.6: Prinzip des Vorgehens der Kontrolle und Optimierung von Bioprocessen [Scheper 1991]

Analysetechniken im Labor. Bei chromatographischen Methoden erfolgt die substanzspezifische Detektion durch Trennung von Stoffgemischen durch stofftypische Wechselwirkungen mit einem Trennmaterial (stationäre Phase) und anschließender Messung eines unspezifischen Signals bei Passage der Stofffraktion durch die Detektorzelle. Als unspezifische Detektoren dienen beispielsweise Spektrophotometer, Refraktometrischer Index-Detektor und elektrochemische Detektoren.

Den Analyten, die mit dieser Methode bestimmt werden können, ist keine Grenze gesetzt, vorausgesetzt die Substanz ist in Form eines Standards verfügbar. Durch die Auftrennung der Probenmatrix durch geeignete Wahl des Säulenmaterials und des Eluenten können Bestandteile der Probe gleichzeitig analysiert werden und so wird dieser Analysetechnik eine große Informationsdichte zugeschrieben [Hybbert 1993].

Zur Bioprozessüberwachung oder sogar Kontrolle finden chromatographische Analysemethoden erst in letzter Zeit verstärkt Einsatz [Sonnleitner 1999]. Beispielanalyte sind Ethanol, Acetaldehyd, Cephalosporin, Penicillin, Aminosäuren und auch Zucker [Locher u. a. 1992]. Für die rasche Online-Bestimmung von Komponenten im Reaktionsmedium ist die Chromatographie nur bedingt einsetzbar. Die Analysezeiten sind durch Probenvorbereitung und Stofftrennung verhältnismäßig lang (im Bereich von 10 - 60 min) [Olsson u. a. 1998].

FIA und SIA

Die Fließinjektionsanalyse (FIA) und die Sequentielle Injektionsanalyse (SIA) gehören zur Gruppe der Fließanalysetechniken, durch die schnelle, häufige und automatische Analysen möglich sind. Ein Fließanalysegerät besteht im einfachsten Fall aus einem Leitungssystem mit Zu- und Ablauf in welches eine Probe injiziert wird und einem darin angeordneten Detektor, der die spezifische Detektion des Zielanalyten, bei gleichzeitiger Präsenz anderer Komponenten, ermöglichen muss.

Die Grundlage für die FIA- und SIA-Technik war die lange verwendete luftsegmentierte Fließanalyse („Continuous air segmented flow analyzer - CSFA“, siehe [Skeggs 1957]), in welcher definiert eingetragene Gasbläschen für eine geringe Dispersion und eine Separation der einzelnen Proben bei Transport zum Detektor sorgten. Das Einbringen von Luft im Fließsystem verlangt gerade bei gasblasenempfindlichen Detektoren eine zusätzliche Blasenabtrennung und machen das System sehr anfällig. Die Arbeiten von Ruzicka und Hansen ⁸ führten durch Eliminierung des Gaseintrags und Einführung eines Injektionsventils zur Fließinjektionsanalyse (FIA).

Die Vorteile der FIA-Technik liegen in ihrer kurzen Antwortzeit, hohen Messfrequenz, Flexibilität und den sich daraus ergebenden vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten. Die Nachteile der FIA liegen einmal in ihrer mangelnden Robustheit, beispielsweise verursacht durch Schwankungen im Volumenstrom und die Wahrscheinlichkeit des schnellen Verschleißes, durch die häufige Bedienung der vielen mechanischen Komponenten der FIA [Olsson u. a. 1998]. Der Reagenzverbrauch ist außerdem hoch, da das System kontinuierlich läuft.

Die Sequentielle Injektions-Analyse (SIA) umgeht einige Nachteile der FIA: Weniger Reagenzverbrauch und Erhöhung der Robustheit des Systems durch den Einsatz einer präzisen Hubkolbenpumpe sind als die beiden Hauptunterschiede zu nennen. Diese Verbesserungen sind jedoch nur auf Kosten der Messfrequenz möglich.

FIA und SIA gelten als Werkzeuge der biochemischen Analytik zur zeitdichten Informationsgewinnung der aktuellen Zusammensetzung von Nährmedien bei Bioprozessen [Olsson u. a. 1998]. Zeitaufwendige enzymkatalysierte Assays können automatisiert und in Minuten durchgeführt werden. Teilweise sind sie die einzigen Messanordnungen, die komplexe Aufgaben erfüllen können, wie z.B. die automatische Bestimmung der Enzymaktivität oder Konzentration von Antikörpern [Schulze 1994].

Kontrollierte Dispersion in Fließanalysesystemen

In Fließanalysesystemen wird ein definiertes Probenvolumen in einen kontinuierlich mit konstantem Volumenstrom geförderten Flüssigkeitsstrom injiziert und in einem Schlauchsystem zum Detektor transportiert. Mit zunehmendem Abstand des Probensegments vom Injektionsort ist eine Ausdehnung der Konzentrationsverteilung in axialer Richtung im Rohr zu beobachten. Diese Rückvermischung, oder Dispersion verläuft bei konstantem Volumenstrom und unveränderter Geometrie der Transportleitungen reproduzierbar. Eine Kombination von konvektiven und diffusiven Einflüssen ist für die Dispersion des Probensegments verantwortlich.

Die dimensionslose Kennzahl zur Charakterisierung der Strömungsverhältnisse in durchströmten Rohren ist die Reynoldszahl:

⁸erste Publikation: [Ruzicka und Hansen 1975]

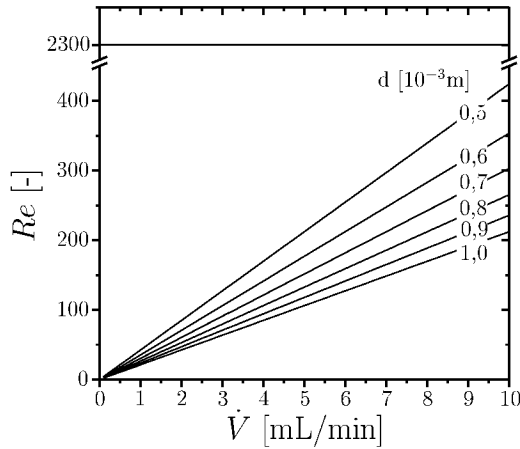


Abb. 3.7: Reynoldszahl in Abhängigkeit vom Volumenstrom $\dot{V}$ und dem Rohrdurchmesser d für Wasser.

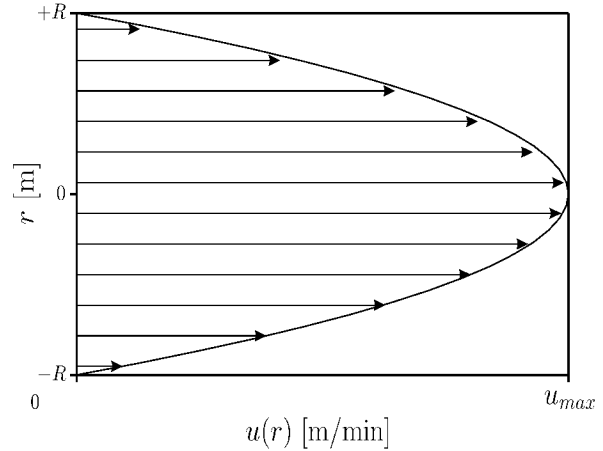


Abb. 3.8: Poiseuille Parabel bei laminarer Strömung im Rohr

$$Re = \frac{\bar{u} \cdot d}{\nu} \quad (3.13)$$

mit:

$\bar{u} = \frac{\dot{V}}{A}$	mittlere Strömungsgeschwindigkeit	[m/s]
$\dot{V}$	Volumenstrom	[m³/s]
A	Querschnittsfläche	[m²]
d	Rohrdurchmesser	[m]
ν	kinematische Viskosität	[m²/s]

Die Zahl beschreibt das Verhältnis der Kräfte, die die Strömung verursachen (Pumpe) zu den Reibungskräften zwischen Flüssigkeit und Festkörper bedingt durch die Viskosität. Liegt die Kennzahl deutlich unterhalb von 2300, so ist die Strömung laminar, d.h. die Geschwindigkeitsvektoren verlaufen parallel zueinander in Strömungsrichtung. Stoffaustausch erfolgt radial zur Strömungsrichtung nicht konvektiv sondern diffusiv. Abb. 3.7 zeigt die Reynoldszahlen für die in Niederdruck-Fließanalysesystemen üblichen Volumentröme und Durchmesser der Transportleitungen. Die Strömungsverhältnisse sind stets laminar.

Zur Beschreibung der Dispersion wird die Konvektions-Diffusionsgleichung für laminare Strömung in einem zylinderförmigen Rohr angesetzt [Vanderslice u. a. 1981]:

$$D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{\partial c}{\partial t} + u_{max} \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \frac{\partial c}{\partial x} \quad (3.14)$$

Das in der Gleichung enthaltene Geschwindigkeitsprofil (Poiseuille Parabel siehe Ab-

bildung 3.8) bei laminarer Strömung

$$u(r) = u_{max} \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \quad (3.15)$$

mit:

u_{max}	maximale Strömungsgeschwindigkeit in Rohrmitte	[m/s]
r	Abstand von Rohrmitte	[m]
R	Rohrradius	[m]
x	Ortskoordinate in Strömungsrichtung	

errechnet sich aus der Navier-Stokes Differential-Gleichung

$$\rho \frac{dV}{dt} = -\text{grad}p + \mu \Delta V + f \quad (3.16)$$

mit:

ρ	Dichte	[kg/m ³]
μ	dynamische Viskosität	[Pas]
V	Volumen	[m ³]
p	Druck	[Pa]
f	externe Kraft	[N]
$\text{grad}p$	$=\nabla p$	
∇	$i \frac{\partial}{\partial x} + j \frac{\partial}{\partial r}$ Nabla-Operator	
i, j	Einheitsvektoren der zugehörigen Raumkoordinate	
Δ	Laplace-Operator $\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial}{\partial r}$	

für den stationären Fall ($\frac{du}{dt}=0$) für laminare Strömung unter Vernachlässigung externer Kräfte f [Štulík und Pacáková 1987].

Gleichung 3.14 wird unter Berücksichtigung der folgenden Randbedingungen gelöst:

$$\begin{aligned} c(0, x, r) &= 0 & ; x > 0 \\ c(t, 0, r) &= 1 & ; t \geq 0 \\ c(t, \infty, r) &= 0 \\ \frac{\partial c}{\partial r}(t, x, 0) &= \frac{\partial c}{\partial r} \end{aligned}$$

Die Peclet-Zahl wird zur Beurteilung des kontrollierenden physikalischen Vorgangs des Stoffaustausches unter Berücksichtigung des Rohrradius herangezogen [Štulík und Pacáková 1987]:

$$Pe = \frac{R \cdot u_{max}}{D} \quad (3.17)$$

Bei großen Pe -Zahlen, wie sie häufig bei der Fließanalyse vorliegen, ist die Konvektion der vorherrschende Stofftransportvorgang. Angesichts der Geschwindigkeitsverteilung im Rohr (Abb. 3.8) wird deutlich, dass es an der Rohrwand eine Zone gibt, in der hauptsächlich diffusiver Stofftransport auftritt. Die Dispersion und die am Detektor

zu beobachtende Konzentrationsverteilung ist nun auch von der Verweilzeit abhängig. Bei konstantem Volumenstrom und Rohrdurchmesser wird sie durch die Länge der Strecke bestimmt, die vom Injektionsort zum Detektor zurückgelegt werden muss. Die Bodensteinzahl wird zur Beurteilung der Rückvermischung als Funktion der Transportlänge L zum Detektor analog zur Peclet-Zahl gebildet. Auch hier bedeuten große Bodensteinzahlen das Vorherrschen der axialen Konvektion:

$$Bo = \frac{L \cdot u_{max}}{D} \quad (3.18)$$

Gl. 3.14 wurde von Taylor gelöst, für den Fall, dass Stofftransport ausschließlich über radiale Diffusion und axiale Konvektion stattfindet. Dies ist erfüllt, wenn gilt [Cussler 1997]:

$$7,2 \left(\frac{L \cdot D}{R^2 \cdot u_{max}} \right) \gg 1 \quad (3.19)$$

dann ergibt sich die über den Rohrquerschnitt gemittelte Analytkonzentration $\bar{c}_a$ zu

$$\bar{c}_a = \frac{N}{(\pi R^2) \cdot \sqrt{4\pi Et}} \exp^{-\frac{x^2}{4Et}} \quad (3.20)$$

einer Gaussverteilung über die Zeit,
mit:

$\bar{c}_a$	über Rohrquerschnitt gemittelte Analytkonzentration	[mol/m ³]
N	Stoffmenge des Analyten	[mol]
R	Rohrradius	[m]
$E = \frac{(R \cdot \bar{u})^2}{48D}$	Dispersionskoeffizient	[m ² /s]
$x = \bar{u} \cdot t$	Transportstrecke	[m]
$\bar{u}$	Mittlere Strömungsgeschwindigkeit	[m/s]
t	Zeit	[s]

Wird die Bedingung in Gl. 3.19 nicht erfüllt, was in vielen Fließanalyseanwendungen der Fall ist, so wird Gl. 3.14 häufig durch numerische Integrationsverfahren gelöst (siehe dazu [Vanderslice u. a. 1981], [Painton und Mottola 1983], [Štulík und Pacáková 1987]).

3.4.4. Biosensoren

Definition

Auf die Frage: „Was ist ein Biosensor?“ gibt Eggins (1996) in seinem Buch über das Thema zur Antwort:

„Well, we all have two of them - our nose and our tongues !“.

Ein Sensor besteht aus einem Messelement und einem Messwandler, der das Signal des Messelements für den Beobachter in eine erfassbare Form übersetzt. Das Charakteristikum, das den Biosensor von einem Sensor im allgemeinen Sinne abhebt, ist die Verwendung eines Messelements, das biologischer Herkunft ist. Ein Biosensor ist charakterisiert durch die direkte räumliche Kopplung einer immobilisierten, biologischen Erkennungssubstanz mit einem Signalwandler und ggf. einem elektronischen Verstärker (Definition der IUPAC nach [Scheller 1992]). Dieser wandelt die am biologischen Messelement wahrgenommene Veränderung der physikalischen oder chemischen Zusammensetzung der Umgebung in ein messbares Signal um. Die biologische Komponente reagiert meist sehr spezifisch auf die Zielsubstanz, so dass eine störungsarme Bestimmung des Analyten aus komplexer Matrix möglich ist. Man unterscheidet vier Hauptgruppen:

- **Enzyme** (rein oder in ganzen Zellen) als biologische Katalysatoren
- **Antikörper** als selektive Bindungsstellen für Antigene ohne katalytische Wirkung
- **Nukleinsäuren** durch ihre Eigenschaft Basenpaare zu bilden
- **Rezeptoren** zur spezifischen molekularen Bindung

Die am häufigsten verwendete biologische Komponente zur Herstellung von Biosensoren sind Enzyme [Scheller 1992].

Biosensoren als Detektoren in Fließanalysesystemen

Aufgrund kurzer Antwortzeiten im Vergleich zu langwierigen biochemischen Testverfahren, wie z.B. Enzymassays, ist die Verwendung von Biosensoren bei der Prozessüberwachung und -regelung interessant geworden. Amperometrische Enzymelektroden weisen beispielsweise Antwortzeiten im Sekundenbereich auf. Als Ergänzung zu „real-time“ Aufzeichnung von pH, Temperatur, CO₂ und O₂ in Bioprozessen erschienen daher auf dem Markt in den letzten Jahren Online-Messgeräte zur Bestimmung von Glucose, Lactat, Saccharose und Alkoholen, deren Herzstück eine Enzymelektrode ist.

Der Biosensor benötigt für diese Aufgabe eine Peripherie zur Messung und muss außerhalb des Reaktors platziert werden. Dies wird durch die Empfindlichkeit des Biokatalysators auf Veränderungen in der Reaktionslösung von pH, Temperatur und osmotischem Druck verursacht. Dampfsterilisationsprozesse z.B. überstehen die wenigsten Enzyme. Bei Verwendung von Biosensoren ist die Robustheit der biologischen Komponente gegenüber Temperaturschwankungen, Querempfindlichkeiten und Inhibierungen durch Medienbestandteile zu beachten [Bradley u. a. 1991]. In der Literatur werden zahlreiche Fließanalysesysteme zur Bioprozessüberwachung mit Biosensoren als Detektoren beschrieben: [Bilitewski u. a. 1993], [Keay u. a. 1992], [Tothill u. a. 1997], [White u. a. 1996], [Schuhmann u. a. 1995], [Ding u. a. 1993], [Cleland und Enfors 1984], [Umoh u. a. 1996], [Tran-Minh 1996].

Enzymatische Glucose-Sensoren mit amperometrischem Messwandler

Enzyme sind komplexe Makromoleküle, die zum größten Teil aus Proteinen bestehen. Enzyme werden meist hinsichtlich der spezifischen Reaktion, die sie katalysieren, charakterisiert. Redoxreaktionen-katalysierende Enzyme gehören zur Familie der Oxidoreduktasen. Diese werden bei Biosensoren häufig eingesetzt, da die Reaktionen mit dem Zielanalyten elektrochemisch gut nachgewiesen werden können.

Enzyme als spezifische Detektionskomponenten eines Biosensors werden häufig immobilisiert verwendet. Folgende Gründe sprechen für eine Immobilisierung [Bradley u. a. 1991]:

- Erhöhte Stabilität des Enzyms
- Kostenreduzierung durch Nutzung von wenig Enzym für eine Vielzahl von Proben
- Vereinfachung des Messsystems, da kein Ansetzen und Transportieren von Enzymlösung notwendig ist

Die Kinetik der enzymkatalysierten Reaktion wird üblicherweise mit dem Michaelis-Menten Modell beschrieben. Der Katalysemechanismus lautet:



mit:

S	Substrat	
E	Enzym	
ES	Enzym-Substratkomplex	
P	Produkt	
k_1	kinetische Konstante	$[\text{h}^{-1}]$
k_{-1}	kinetische Konstante	$[\text{h}^{-1}]$
k_2	kinetische Konstante	$[\text{h}^{-1}]$

Da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Umsetzung zum Produkt ist [Scheller 1992], liegt das Enzym bei hohen Substratkonzentrationen nahezu vollständig als ES vor und die Reaktionsgeschwindigkeit erreicht abhängig von k_2 ihr Maximum. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration wird aus der Michaelis-Menten-Beziehung deutlich:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E][S]}{K_M + [S]} \quad (3.22)$$

mit:

v	Reaktionsgeschwindigkeit	$[\text{M/s}]$
$[\dots]$	Konzentrationen	$[\text{M}]$
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	$[\text{M}]$

Das Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit $v_{max} = k_2[E]$, gemäß Gleichung 3.22, stellt sich bei $[S] \gg K_M$ ein. Ist die Substratkonzentration $[S] = K_M$, so beträgt die Reaktionsgeschwindigkeit $v = \frac{v_{max}}{2}$.

Messwandler

Das spezifische Signal der biologischen Komponente kann nicht direkt erfasst werden, sondern muss in ein für den Beobachter zugängliches Signal von einem Messwandler „übersetzt“ werden. Mit dem biologischen Element werden verbreitet elektrochemische und optischen Messgeräte gekoppelt. Anwendungen finden auch piezoelektrische Kristalle⁹ (Messung der Frequenz) und Thermistoren (Messung der Reaktionswärme).

Bei elektrochemischen Messwandlern werden drei verschiedene elektrochemische Messverfahren unterschieden [Eggins 1996]:

Potentiometrie	Messung eines Zellenpotenzials im stromlosen Zustand
Voltammetrie	Messung des Stroms zwischen zwei Zellelektroden nach Anlegen einer Spannung
Konduktometrie	Messung der Leitfähigkeit - des reziproken Widerstands bei einer Wechselstrom-Brückenmethode

Da in dieser Arbeit ausschließlich amperometrische Biosensoren verwendet wurden, wird auf dieses Nachweisverfahren, als Teilgebiet der Voltammetrie, näher eingegangen.

Bei amperometrischen Sensoren macht man sich heterogene Elektronentransferreaktionen zunutze, d.h. Oxidation oder Reduktion elektrodenaktiver Substanzen [Scheller 1992]. Nach Anlegen und konstant halten einer Polarisationsspannung (Auslenkung des Redoxpotenzials) sinkt der an der Arbeitselektrode gemessene Strom allmählich ab. Auf der Elektrodenoberfläche bildet sich, analog zu dem Aufladungsvorgang eines Kondensators, eine elektrische Doppelschicht (Helmholtz-Schicht) mit entgegengesetzten Ladungen aus. Das angelegte Potenzial ist so bemessen, dass nicht die heterogene Ladungsübertragung an der Elektrode, sondern der Stofftransport der elektrodenaktiven Substanz der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist. Auf diese Weise ist das Stromsignal an der Elektrode direkt proportional zur Konzentration der nachzuweisenden Substanz:

$$I_d = \frac{nFADc_{ox}}{\delta} \quad (3.23)$$

mit:

I_d	Diffusionsgrenzstrom an der Elektrode	[A]
δ	Dicke der Diffusionsschicht	[m]
F	Faradaykonstante = $9,6485 \cdot 10^7$	[C kmol ⁻¹]
A	Fläche	[m ²]
D	Diffusionskoeffizient des Analyten in z.B. der Membran oder der Immobilisierungsmatrix der biologischen Komponente, die die Elektrode bedeckt	[m ² /s]
c_{ox}	Konzentration des Oxidanten	[M]

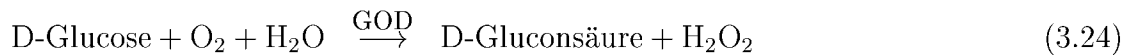
⁹Crystal Microbalances (CMB)

Der Elektrodenstrom ist also der Konzentration des Oxidanten direkt proportional. Der Stofftransport limitiert die Elektrodenreaktion, die notwendige Voraussetzung für eine Konzentrationsbestimmung.

Um die Polarisationsspannung zwischen den Elektroden des Sensors konstant zu halten, auch wenn reaktionsbedingt Elektrodenstrom fließt, bedarf es eines Spannungsreglers: ein „Potentiostat“. Er stellt die Regelung einer konstanten Polarisationsspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode durch die Generierung eines Ausgleichstroms durch die 3. Elektrode („auxiliary electrode“) sicher.

Glucose-Biosensoren und ihr stationäres Verhalten

Glucose-Enzymelektroden sind die am umfassendsten untersuchten Biosensoren, deren Vermarktung am weitesten vorangeschritten ist [Eggins 1996]. Die meisten dieser Sensoren machen sich die durch Glucose-Oxidase (GOD) katalysierte Oxidation von D-Glucose mit molekularem Sauerstoff zu D-Gluconsäure und Wasserstoffperoxid zunutze:



Aus diesen Reaktionsgleichungen ergeben sich zwei Möglichkeiten, das Ausmaß der enzymatischen Umsetzung amperometrisch nachzuweisen. Zum einen mit einer Polarisationsspannung von -0,6 bis -0,9 V zwischen O₂-Kathode und Bezugslektrode, um die O₂-Abnahme in Abhängigkeit der Glucosekonzentration zu messen, zum anderen die H₂O₂-Bildung mit einer Polarisationsspannung von +0,4 bis +1,0 V [Scheller 1992]. Die Clark Sauerstoffelektrode, welche meist verwendet wird, besteht aus einer Platinkathode und einer Ag/AgCl-Bezugslektrode - als Elektrolytösung dient KCl.

Das an der Elektrode gemessene Stromsignal ist durch die Faraday'sche Gleichung (Gl. 3.23) direkt proportional zu der durch die Enzymreaktion gebildeten Menge der elektroaktiven Komponente. Der Anstieg des Signals folgt im stationären Fall mit wachsender Konzentration des Substrats einer Michaelis-Menten-Kurve [Scheller 1992]. Ihr absoluter Verlauf ist von der Enzymbeladung der Elektrode abhängig, was anhand Abb. 3.9a. deutlich wird. Folglich kann mit den bekannten Methoden zur Linearisierung der Enzymkinetik der K_M -Wert der Elektrode, d.h. der „scheinbare“ K_M -Wert des Enzyms im immobilisierten Zustand ermittelt werden (3.9b.).

Zeitverhalten von amperometrischen Glucosesensoren

In welcher Weise das Ausgabesignal eines Sensors raschen Konzentrationsänderungen im Messmedium folgen kann, ist in den kinetischen Eigenschaften des Sensor begründet. Die Zusammenhänge, die zu diesem Verhalten führen sind komplex und für den verwendeten Detektor nicht unmittelbar bekannt. Daher kann analog zur Vorgehensweise in der Systemanalyse, der Detektor als „black box“ betrachtet werden [Štulík und Pacáková 1987]. Das Detektorsignal ist nicht nur von der aktuellen Konzentration zur Zeit t , sondern auch von dem vorhergehenden Konzentrationsverlauf abhängig. Zur Untersuchung des Zeitverhaltens wird meist eine Sprungfunktion, also

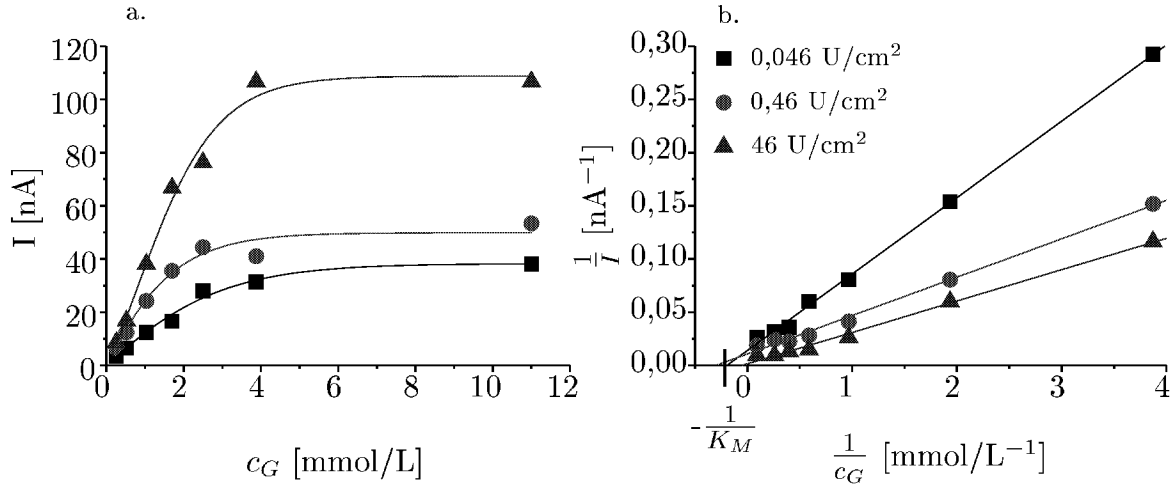


Abb. 3.9: Konzentrationsabhängigkeit des stationären Stroms eines amperometrischen Glucose-Biosensors bei unterschiedlicher Enzymbeladung. a. nicht-linearisierte b. linearisierte Darstellung. Daten nach [Scheller 1992]: +600mV Elektrodenpotenzial (gegen Ag/AgCl), 0,22 mm² Elektrodenfläche. Glucose (c_G) in luftgesättigter Lösung.

eine stufenförmige Erhöhung des Konzentrationsniveaus $c_e(t) = c_{e0} \cdot e(t)^{10}$ dem Detektor zugeführt und die resultierende Signal-Zeit-Kurve $I(t)$ aufgezeichnet. Das Ausmaß der Unterscheidung der gemessenen Antwortkurve von einer stufenförmigen Änderung der Eingangsgröße lässt eine Beurteilung des sog. Ansprechverhaltens zu.

[Schulmeister und Scheller 1985] gehen über solche empirischen Betrachtungen der Sensorantwort hinaus und geben eine mathematische Lösung zur Modellierung des Anodenstroms einer amperometrischen Enzymelektrode mit immobilisierter Glucose-Oxidase (Reaktionsschema in Gleichungen 3.24 und 3.25). Das kombinierte Diffusions-Reaktionssystem der Enzymelektrode lautet:

$$\frac{\partial c_G}{\partial t} = D_G \frac{\partial^2 c_G}{\partial x_E^2} - v_2 \quad (3.26)$$

$$\frac{\partial c_O}{\partial t} = D_O \frac{\partial^2 c_O}{\partial x_E^2} - v_2 \quad (3.27)$$

$$\frac{\partial c_H}{\partial t} = D_H \frac{\partial^2 c_H}{\partial x_E^2} - v_2 \quad (3.28)$$

mit:

$$v_2 = \frac{v_{max}}{1 + k_O/c_O + k_G/c_G} \quad \text{Pseudo-2-Substratkinetik bzgl. Sauerstoff und Glucose} \quad [\text{M/s}]$$

¹⁰ $e(t)$ wird Einheitssprungfunktion genannt: $e(t) = \begin{cases} 0 & \text{für } t \leq 0 \\ 1 & \text{für } t > 0 \end{cases}$

c_G	Konzentration der D-Glucose	[M]
c_O	Konzentration des gelösten Sauerstoffs	[M]
c_H	Konzentration des Wasserstoffperoxids	[M]
k_{index}	kinetische Konstanten	[M]
D_{index}	Diffusionskoeffizient des indizierten Stoffs	[m ² /s]
G,O,H	Indexbezeichnungen entsprechend Konzentrationsangaben	
x_E	Position in der Enzymschicht von der Elektrodenoberfläche ($x=0$)	[m]

Dabei wird die Geschwindigkeit der Enzymreaktion mit einer Pseudo-2-Substratkinetik beschrieben. Die Lösungen der Gleichung 3.28 wird unter der Berücksichtigung der Randbedingungen ermittelt:

$$\begin{aligned}
 c_G(0, t) &= c_G^{bulk} \left(\frac{\partial c_G}{\partial x_E} \right) (d_E, t) = 0 && \text{für } t > 0 \\
 c_G(x_E, 0) &= 0 && \text{für } 0 < x_E < d_E \\
 c_O(0, t) &= c_O^{bulk} \left(\frac{\partial c_O}{\partial x_E} \right) (d_E, t) = - \left(\frac{D_H}{D_O} \right) \left(\frac{\partial c_H^{bulk}}{\partial x_E} \right) (d_E, t) && \text{für } t > 0 \\
 c_O(x_E, 0) &= \alpha c_O^{bulk} && \text{für } 0 < x_E < d_E \\
 c_H(0, t) &= 0 && \text{für } t > 0 \\
 c_H(d_E, 0) &= 0 && \text{für } t > 0 \\
 c_H(x_E, 0) &= 0 && \text{für } 0 < x_E < d_E
 \end{aligned}$$

mit:

α	Verteilungskoeffizient von Sauerstoff zwischen Wasser und Luft	[-]
d_E	Dicke der Enzymschicht auf der Arbeitselektrode	[m]

Unter Annahme, dass $c_G(x_E, t) \leq c_G^{bulk}$ und $c_O(x_E, t) \leq \alpha \cdot c_O^{bulk}$ ist die Sauerstoffkonzentration kein reaktionsbestimmender Parameter. So vereinfacht sich das Modell zu der Beschreibung einer Reaktionskinetik erster Ordnung. Mit der Näherung $v \approx k \cdot c_G(x_E, t)$ und unter Nutzung der Green-Funktion¹¹ erhält man eine Raum-Zeit-Konzentrationsverteilungen für H₂O₂ mit $k = \frac{v_{max}}{k_G}$:

$$\begin{aligned}
 c_H(x_E, t) &= \frac{2k}{\pi} c_G^{bulk} \sum_{m=1}^{\infty} \sin(m\pi \frac{x_E}{d_E}) \left\{ \frac{1 - (-1)^m}{mw} [1 - \exp(-wt)] \right. \\
 &\quad + \frac{4(-1)^m}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \left[\frac{(-1)^n}{(2n+1)(k+u)} \left(\frac{k[1 - \exp(-wt)]}{w} + \right. \right. \\
 &\quad \left. \left. \frac{u[\exp(-(k+u)t - \exp(-wt))]}{w - k - u} \right) \frac{4m}{4m^2 - (2n+1)^2} \right] \left. \right\} \quad (3.29)
 \end{aligned}$$

mit:

¹¹Für Details zur Lösung dieser Differentialgleichungen siehe [Schulmeister und Scheller 1985]

c_G^{bulk}	Glucosekonzentration in freier Lösung	[M]
c_O^{bulk}	Sauerstoffkonzentration in freier Lösung	[M]
d_E	Dicke der Enzymschicht auf der Arbeitselektrode	[m]
w	$= D_H(m\pi/d_E)^2$	$[s^{-1}]$
u	$= \frac{D_G(2n+1)^2\pi^2}{(2d_E)^2}$	$[s^{-1}]$
m, n	$=$ numerische ganzzahlige Laufzahlen	$[-]$

Das Stromsignal, welches aus der Reaktion von H_2O_2 an der Anode resultiert, errechnet sich aus dem Faraday'schen Gesetz (vgl. Gl. 3.23 S. 34):

$$I(t) = 2FA_ED_Gc_G^{bulk}\left(\frac{\partial c_H}{\partial x_E}\right)(d_E, t) \quad (3.30)$$

mit:

$I(t)$	Strom an der Arbeitselektrode	[nA]
A_E	Elektrodenfläche	$[m^2]$

Für hydrophile Gelmembranen als Immobilisierungsmatrix auf amperometrischen Biosensoren wird das Verhältnis $D_H = 2,46 \cdot D_G$ angegeben [Schulmeister und Scheller 1985]. D_G beträgt in einer gequollenen Enzymschicht z.B. $1,63 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ [Scheller 1992].

Mit dem vorgestellten Modell ist es möglich, Aussagen über Merkmale amperometrischer Biosensoren zu machen, wie z.B. A_E , d_E und die kinetische Konstante k . Diese Daten sind bei kommerziell erhältlichen Sensoren oft nicht bekannt und variieren durch fertigungsbedingte Ungenauigkeiten von Sensor zu Sensor. Eine Modellanpassung kann dazu beitragen, das dynamische Verhalten eines amperometrischen Biosensors zu interpretieren und gegebenenfalls vorherzusagen.

3.5. Dialyse als Probenahmestrategie in Kleinreaktionsgefäßen

3.5.1. Probenahme aus Bioprozessen

Bei der Entwicklung von Probenahmeverfahren aus Bioprozessen ist die zentrale Aufgabe die Wahrung der Sterilität nach innen und außen [Hilmer und Scheper 1995]. Der monoseptische Prozess darf einerseits nicht durch Kontamination gefährdet werden. Die Abtrennung der Zellen unmittelbar bei der Probenahme verhindert andererseits eine Veränderung der Probe durch Zellaktivität. Als Sterilbarrieren finden Membranen zur Probenahme verbreitet Anwendung. Nach Schügerl gibt es folgende Varianten für die membrangestützte Probenahme aus Flüssigkeiten [Schügerl u. a. 1987]:

- Filtrationsverfahren - Entzug eines Probevolumens über einen Druckgradient durch Mikro- (0,1 - 1 μm Porengröße)- oder Ultrafiltrationsmembranen (0,001 - 0,1 μm Porengröße).
- Dialyseverfahren - Entzug einer bestimmten Stoffmenge über einen Konzentrationsgradient durch Dialysemembranen.

Tab. 3.3: Membranbasierte Probenahmeverfahren Filtration und Dialyse im Vergleich

	Filtration	Dialyse
Treibende Kraft	Druckdifferenz	Konzentrationsdifferenz
Separation nach Membranen	Partikel- und Molekülgröße Mikrofiltration (Poren) 0,100 - 1,000 μm Ultrafiltration (Poren) 0,001 - 0,100 μm	Molekülgröße 0,5 - 500 kD MWCO
Geschwindigkeit	Filtrationsrate	Diffusionszeit
Akzeptorphase	nicht nötig	nötig
Anordnung	<i>ex-</i> und <i>in-situ</i> möglich	<i>ex-</i> und <i>in-situ</i> möglich
Vorteil / Nachteil	quantitativ	nicht quantitativ Kalibration notwendig (ggf. Driftkorrektur)
	schnell	relativ langsam
Nachteil / Vorteil	Volumenverlust neigt zu Fouling Stabilitätsverlust bei Verstopfen	volumenschonend wenig Foulingneigung

In Tab. 3.3 sind die Unterschiede zwischen Filtration und Dialyse zusammenfassend aufgezeigt.

Die Filtration ist ein verbreitetes Mittel der Wahl, um automatisch dem Prozess ein zellfreies Probenvolumen zu entziehen [van de Merbel u. a. 1996]. Um dabei eine Deckschichtbildung durch Protein- und Zellablagerungen auf der Membranoberfläche (Fouling) zu verhindern, ist die Entnahme eines kontinuierlichen Filtratstroms von Vorteil [Hilmer und Scheper 1995].

Die Dialyse ermöglicht den diffusiven Stofftransport ausschließlich von Molekülen der Reaktionslösung in Abhängigkeit von der Durchlässigkeit der Membran. Diese sind nicht charakterisiert durch Angabe einer Porengröße sondern durch Angabe einer Grenz-Molekülgröße („Molecular-Weight-Cut-Off“ - MWCO).

Dialyse

Das Dialyseverfahren dient nicht nur der Probenahme sondern wird häufig zur Probenvorbereitung in der FIA-Technik oder der Säulenchromatographie verwendet, um vor allem bei biologischen Proben die niedermolekularen Analyte von Makromolekülen, Partikeln und Zellfragmenten präanalytisch zu trennen ([van de Merbel u. a. 1992], [Verette u. a. 1995] und [van de Merbel u. a. 1994]). Bei unvollständigem Konzentrationsausgleich aber definierter Diffusionszeit über die Membran ist es möglich, die Probe durch Dialyse reproduzierbar zu verdünnen und so den Messbereich des Analysegerätes anzupassen. Aufgrund dieses nicht-quantitativen Charakters des Verfahrens ist die Kalibrierung des Stoffübergangs der kritische Schritt, um auf die tatsächliche Konzentration

schließen zu können [van de Merbel u. a. 1996].

Ein Dialysemodul wurde zur automatischen Probenahme aus Bioprozessen erstmals 1965 von [Ferrari u. a. 1965] eingesetzt. Während bei diesen frühen Arbeiten das Modul außerhalb des Bioreaktors angeordnet war, wurde 1974 von Glaxo Laboratories eine *in-situ* Dialysesonde patentiert [Gardiner und Briggs 1974] und 1978 ein in einem Stromstörer integrierter Dialysekanal vorgestellt [Zabriskie und Humphrey 1978]. Die Anordnung im Reaktor ist gegenüber der Integration in einem Bypass zu bevorzugen. Der Anbau eines Bypasses an einen Bioreaktor birgt ein gesteigertes Kontaminationsrisiko [Hilmer und Scheper 1995].

[Valentini und Razzano 1982] verwendeten eine Dialysesonde zur Online-Bioprozessanalytik, indem der Akzeptor in einem Kreislauf durch das Dialysemodul geführt wurde. So kommt es zu einem Konzentrationsausgleich über die Trennmembran auch bei Durchströmung. Aus diesem Kreislauf wird durch die Probenschleife eines Injektionsventils ein definiertes Probenvolumen in ein geeignetes luftsegmentiertes Analysesystem injiziert. Aus der so gewonnenen Probe wurde u.a. Ammonium, Phosphat und Glucose online bestimmt. Für Glucose wurde bis zum Erreichen von 90 % des Gleichgewichts eine Zeit von 60 min benötigt. Dieser Zeitraum ist angesichts möglicher Verdopplungszeiten von 20 min für eine Prozessüberwachung oder -regelung zu lang. Daher muss mit unvollständiger Diffusion bei der Probenahme gearbeitet werden.

Zwei Arten der diffusiven Probenahme sind zu unterscheiden. Das Akzeptormedium kann kontinuierlich durch die Membran gepumpt werden, wobei sich in Abhängigkeit des Volumenstroms ein konstanter Anteil der außenseitigen Konzentration einstellt. Dabei werden diffundierende Stoffe aus der dialysierten Lösung ausgetragen. Alternativ dazu kann der Volumenstrom für eine definierte Zeitdauer unterbrochen werden. Das Akzeptorvolumen im Dialysemodul reichert sich dann mit Molekülen durch den Konzentrationsgradienten an und wird bei erneutem Start der Durchströmung wie ein injiziertes Probensegment abgeführt. Wird dieses Probensegment gleich im Anschluss einer Detektion im Trägerstrom zugeführt, wird ein solches Messsystem Fließdiffusionsanalyse (FDA) genannt ([Mohns und Künnecke 1995a], [Künnecke und Bilitewski 1995]).

Ein so geartetes Online-Monitoring-System wurde erfolgreich zur Messung von Ethanol in Wein und Bier eingesetzt [Mohns und Künnecke 1995a]. Mit der zeitabhängigen Anreicherung hat der Anwender den großen Vorteil, die Probenkonzentration an den Messbereich des verwendeten Detektors anzupassen. Vor allem bei Einsatz von Biosensoren ist ein solches Vorgehen sinnvoll.

3.5.2. Dialyse über eine Hohlfasermembran

Membranen

Die Durchlässigkeit oder Porosität von Ultrafiltrations- und Dialysemembranen wird anhand ihrer molekularen Ausschlussgrenze (Molecular Weight Cut-Off - MWCO) quantifiziert. Die Angabe bezieht sich auf das stoffliche Molekulargewicht M (die Einheit g/mol entspricht Dalton (D)), das sich graphisch aus dem Diagramm der empirisch ermittelten,

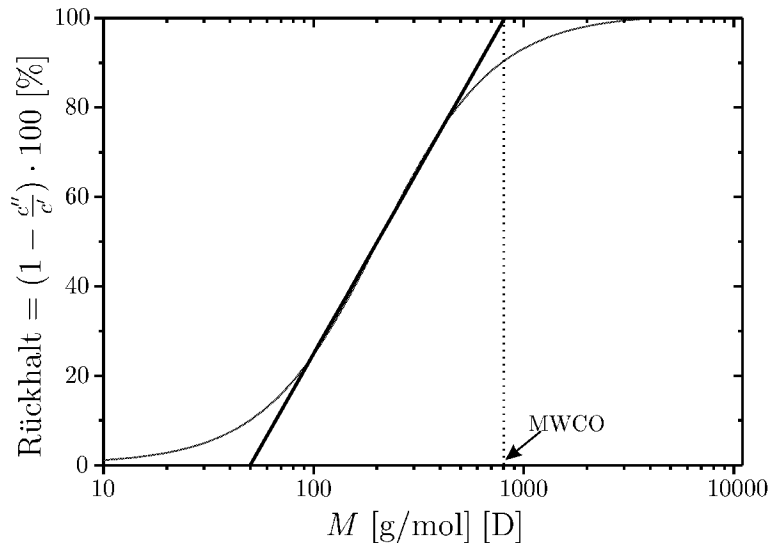


Abb. 3.10: Bestimmung der Membranausschlussgrenze (Molecular Weight Cut-Off - MWCO) gemäß [Staudé 1992] am Beispiel einer empirisch ermittelten Ausschlusssummenkurve für eine Dialysemembran. M bezeichnet das stoffliche Molekulargewicht, c' die Konzentration in der Rohlösung und c'' die Konzentration im Permeat

sigmoiden Ausschlusssummenkurve der Membran ermitteln läßt (Abb. 3.10). Eine Tangente wird am Wendepunkt der Ausschlusssummenkurve angelegt und der Schnittpunkt bei 100 % Rückhaltung an der x -Achse abgelesen.

Grundlagen der Diffusion im Fluid

Das Phänomen der Diffusion wird verursacht durch zufällige molekulare Bewegungen in gasförmiger, flüssiger und sogar fester Phase [Cussler 1997]. Der Vorgang ist in der Natur, in unserem täglichen Leben, z.B. im menschlichem Körper ebenso bedeutend, wie sein Auftreten und seine Nutzung in den Ingenieur- und Naturwissenschaften. Der Grund liegt in der Langsamkeit des Prozesses, so dass sein Auftreten zusammen mit anderen zeitabhängigen Phänomenen ihm oft die Rolle des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes überträgt.

Die ersten Wissenschaftler die sich im 19. Jahrhundert dem Studium der Diffusion widmeten waren Thomas Graham und Adolf Eugen Fick [Cussler 1997]: Während Graham die treibende Kraft des Konzentrationsgradienten erkannte und zeigte, dass die Diffusion in Gasen wesentlich schneller abläuft und sich mit zunehmender Zeit verlangsamt, konnte Fick auf Grundlage der Ergebnisse Grahams ein Modell zur Beschreibung des Phänomens entwickeln. Er erkannte die Analogie zum Fourier'schen Gesetz der Wärmeleitung und dem Gesetz zur elektrischen Leitung und formulierte aus diesen Überlegungen heraus die als erstes Fick'sches Gesetz bekannte Gleichung für eindimensionale Diffusion:

$$J_a = A \cdot j_a = -A \cdot D \cdot \frac{\partial c_a}{\partial z} \quad (3.31)$$

mit:

A	Fläche über die Substanzen diffundieren	$[\text{m}^2]$
j_a	Stofffluss von Stoffkomponente „a“ pro Fläche	$[\text{kg}/(\text{s m}^2)]$
c_a	Stoffkonzentration der Komponente „a“	$[\text{M}]$
z	Ortskoordinate senkrecht zur Austauschfläche	$[\text{m}]$
D	Diffusionskoeffizient	$[\text{m}^2/\text{s}]$

Stationäre Diffusion über Membranen

Die Gleichungen für das Konzentrationsprofil und den Diffusionsstrom über eine dünne homogene Membran im stationären Fall ergibt sich aus einer Massenbilanz ohne chemische Reaktion über eine dünne Schicht Δz . Es wird zunächst angenommen, dass die Membran zwei gut durchmischte Flüssigkeiten voneinander trennt:

$$0 = A \cdot (j_a|_z - j_a|_{z+\Delta z}) \quad (3.32)$$

Die Gleichung lautet im einfachsten Fall¹² für mikroporöse Membranen, die als mit dem Lösungsmittel gequollene dünne Schicht betrachtet werden (siehe auch Anhang C.1):

$$j_a = \frac{D \cdot H}{\delta} (c_{a0} - c_{a\delta}) \quad (3.33)$$

mit:

δ	Dicke der Diffusionsgrenzschicht	$[\text{m}]$
$\frac{D}{\delta} \equiv \beta$	Stofftransportkoeffizient ¹³	$[\text{m}/\text{s}]$
c_{a0}	Konzentration in freier Lösung	$[\text{M}]$
$c_{a\delta}$	Konzentration in Diffusions-Grenzschicht	$[\text{M}]$
H	Membran- und modellabhängiger Faktor	$[-]$

Aufgrund eines häufig bestehenden Mangels an exakten Angaben über Porosität und Porenverteilung des Membranmaterials, wird anstelle des Diffusionskoeffizienten D ein sogenannter effektiver Diffusionskoeffizient D_{eff} verwendet, definiert als $D_{eff} = D \cdot H$. Bei Lösungsdiffusionsmembranen kann H den Verteilungskoeffizienten des Analyten im Membranpolymer, bei der Betrachtung der Membran als porösen Körper, den Anteil der zur Diffusion zur Verfügung stehenden Fläche darstellen.

Quasistationäres Diffusionsmodell

Zur empirischen Ermittlung von Diffusionskoeffizienten, die die Stofftransportgeschwindigkeit von Komponenten in wässrigen Medien bestimmen, werden sog.

¹²Unter der Annahme der Stofftransport über die Membran sei der geschwindigkeitslimitierende Schritt wurden die Widerstände der beiden Flüssigkeitgrenzschichten an der Membranoberfläche vernachlässigt. Sonst müsste die Gleichung lauten: $j_a = \frac{c_{a0} - c_{a\delta}}{\frac{1}{k_1} + \frac{\delta}{DH} + \frac{1}{k_3}}$

¹³Der Quotient des Diffusionskoeffizienten zu einer charakteristischen Länge, hier der Dicke der von der Diffusions zu überwindenden Schicht, wird als Stofftransportkoeffizient häufig zur Beschreibung von Stofftransportvorgängen verwendet.

Diaphragmazellen verwendet [Cussler 1997]. Ein dünnes poröses Material trennt zwei ideal durchmischte Kompartimente voneinander, in welchen sich die jeweilige Analytkonzentration unterscheidet. Es wird dabei angenommen, dass sich der Konzentrationsgradient zwar über die Zeit ändert, das thermodynamische System jedoch den stationären Zustand nach jeder Änderung rasch erreicht. Die Herleitung der relevanten Gleichung folgt den Ausführungen von [Cussler 1997] und ist in Anhang C.2 wiedergegeben. Aus den Massenbilanzen für beide Kompartimente

$$V'' \frac{dc_a''}{dt} = -A j_a = -V' \frac{dc_a'}{dt} \quad (3.34)$$

ergibt sich die Lösung für die Beschreibung der quasistationären Diffusion zu

$$c_a'' = c_a' (1 - \exp^{-\phi \cdot D \cdot t}) \quad (3.35)$$

mit:

V'	Volumen der freien Lösung, z.B. Reaktionslösung	[m ³]
V''	membranseitiges Volumen z.B. im Inneren einer Hohlfasermembran	[m ³]
c_a'	Konzentration der Komponente „a“ in der Donorlösung	[M]
c_a''	Konzentration der Komponente „a“ im membranseitigen Permeat	[M]
ϕ	$\frac{A}{\delta_m} H \left(\frac{1}{V''} + \frac{1}{V'} \right)$ geometrische Konstante der Diaphragmazelle	[1/m ²]
δ_m	Dicke der Membran	[m]
H	Anteil der Membranfläche, die der Diffusion zur Verfügung steht	[-]

Instationäre Diffusion über zylindrische Membranen

Die Betrachtungen zur quasistationären Diffusion basieren auf der Annahme, das System bestehe aus einer Summe von raschen Konzentrationsveränderungen, nach welchen sich der stationäre Zustand des Systems stets ohne signifikante Zeitverzögerung einstellt. Will man den dynamischen Diffusionsvorgang ohne eine solche Approximation beschreiben, um z.B. zu prüfen, ob diese Approximation zulässig ist oder eine genauere Betrachtung der physikalischen Vorgänge erhalten¹⁴, so gestaltet sich dies komplizierter.

Ein Modell zur instationären Diffusion in Hohlfasermembranen wird auf der Grundlage der Abhandlungen von Cussler [Cussler 1997] zur instationären Diffusion in einen porösen zylinderförmigen Körper erstellt. Im ersten Schritt wird eine Massenbilanz formuliert unter Berücksichtigung der geometrischen Verhältnisse eines Zylinders der Länge L und mit dem Radius r_m der zu betrachtenden Schale und deren Fläche ($A = 2\pi Lr$) und Volumen ($V = 2\pi Lr_m \Delta r_m$):

$$\frac{\partial}{\partial t} (2\pi Lr \Delta r_m c_a^m) = (2\pi Lr j_a)_{r_m} - (2\pi Lr_m j_a)_{r_m + \Delta r_m} \quad (3.36)$$

¹⁴Eine phänomenologische Betrachtung reicht dann nicht, wenn Kenntnisse über die Veränderungen geometrischer oder chemischer Einflussparameter auf das Ergebnis für Auslegungsüberlegungen eines technischen Systems notwendig sind.

Man erhält nach längerer Rechnung (siehe Anhang C.3) die Gleichung für die Konzentrationsverteilung in der Membranwand $c_a^m(r_m, t)$:

$$\frac{c_a^m(r_m, t)}{c_{a0}} = 1 - 2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp \frac{-D_{eff} \alpha_n^2 t}{\delta_m^2} J_0(\alpha_n \frac{r_m}{\delta_m})}{\alpha_n J_1(\alpha_n)} \quad (3.37)$$

mit:

$c_a^m(r_m, t)$	Stoffkonzentration der Komponente „a“ in der Hohlfasermembran in Abhängigkeit von Zylinderradius r_m und Zeit	[M]
c_{a0}	Konzentration der Komponente „a“ in freier Lösung	[M]
D_{eff}	$= D \cdot H$ effektiver Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
$J_0(x)$	die Besselfunktion nullter Ordnung	
$J_1(x)$	die Besselfunktion erster Ordnung	
α_n	Nullstellen der Funktion $J_0(x)$	

Die Diffusion des Analyten aus der porösen Membranwand in die im Inneren der Hohlfaser ruhende Akzeptorflüssigkeit kann nun entweder als Diffusion in einen zylinderförmigen Körper analog zu dem eben Behandelten unter Verwendung des Diffusionskoeffizienten in freier Lösung beschrieben werden. Dabei muss das Konzentrationsprofil über den Radius des zylinderförmigen Flüssigkeitssegments integriert werden und man erhält $c_a''(t)$. Die zeitabhängige Konzentration im Probensegment berechnet sich in Abhängigkeit vom Radius des Flüssigkeitszylinders R folglich zu:

$$c_a''(t) = \int_{r=0}^R \frac{c_a''(r, t)}{c_a^m(R, t)} \cdot dc_a^m(R, t) \quad (3.38)$$

3.6. Substratregelung in mikrobiellen Prozessen im Zulaufbetrieb

3.6.1. Regelungstechnische Grundlagen

Ein Bioprozess kann als technisches System betrachtet werden, dem ein charakteristisches und dynamisches Verhalten eigen ist. Für die Bioprozesstechnik ist es von großer Bedeutung, einzelne Zustandsvariablen über die Zeit einem gewünschten Verlauf zuführen zu können, um ein gutes Prozessergebnis zu erzielen. Die Regelungstechnik bietet Werkzeuge, mit welchen eine solche Beeinflussung definiert und automatisiert vorgenommen werden kann.

Der Begriff Regelstrecke bezeichnet das Element eines technischen Systems, auf das Einfluss genommen werden soll. Zur Regelung eines Prozessparameters eines Bioprozesses beispielsweise wird von außen die zeitabhängige Stellgröße $y(t)$ angelegt. Mit der auf das dynamische System hinführenden Störgröße $z(t)$, werden sämtliche nicht oder nur ungenau bekannten Einflüsse, beschrieben. Abb. 3.11 zeigt das Schema der *Regelstrecke*, in der die Regelgröße $x(t)$ das Ergebnis des von Stell- und Störgröße beeinflussten Teils des technischen Systems darstellt.

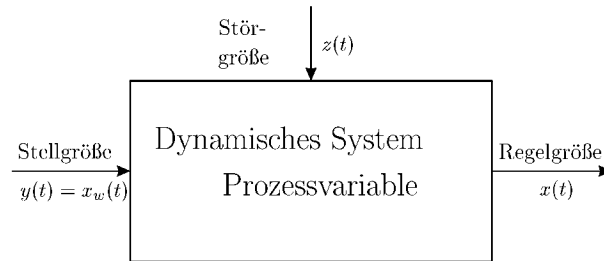


Abb. 3.11: Die Prozessvariablen eines Bioprozesses können als dynamische Systeme mit Ausgangsgröße $x(t)$ unter Einfluss einer undefinierten Störung $z(t)$ betrachtet werden. Der Beobachter nimmt auf das Verhalten mit der Stellgröße $y(t)$ Einfluss, um einen gewünschten Verlauf $x_w(t)$ zu erzielen [Föllinger 1994].

Eine Regelung ist nach [Föllinger 1994] wie folgt definiert :

Unter einer Regelung versteht man eine Anordnung, durch welche bei unvollständig bekannter Strecke, insbesondere unvollständiger Kenntnis der Störgröße, die Regelgröße, d.h. die Ausgangsgröße der Strecke laufend gemessen und mit der Führungsgröße verglichen wird, um mittels der so gebildeten Differenz die Regelgröße an den Sollverlauf anzugleichen.

Nach DIN 19226 kennzeichnet der Begriff Regelung eine Kopplung von Vergleichsglied und Regelglied. Der Regler, also Vergleichs-, Regelglied und Steller zusammen werden nach DIN als *Regeleinrichtung*¹⁵ bezeichnet.

Abb. 3.12 stellt die grundlegenden regelungstechnischen Begriffe vor. Die oben eingeführte Ausgangsgröße $x(t)$ findet sich in einem *Regelkreis* in der Regelgröße - hier eine Zustandsgröße des Bioprozesses - wieder. Die Beobachtung der Strecke anhand dieser Zustandsgröße wird durch eine Messeinrichtung gewährleistet. Diese stellt das Messergebnis über eine Rückführgröße r dem Prozess wieder zur Verfügung. Der Vergleich der Rückführgröße r am Vergleichsglied (Nr. 5 in Abb. 3.12) mit der Führungsgröße w , die vom Prozessbeobachter vorgegeben ist, führt zur Bildung der Regeldifferenz $e = (w - r)$. Über die Stelleinrichtung wird im Bestreben, die Differenz auszugleichen, auf die Strecke mit einer entsprechenden Regelstrategie, verborgen im Regelglied, eingewirkt.

Das zeitliche Verhalten (Übergangsverhalten) der Änderung der Stellgröße $y(t)$ als Funktion der Abweichung der Regelgröße vom vorgegebenen Sollwert muss bekannt sein. Die experimentelle Ermittlung der Übertragungsfunktion $y(t) = f(e)$ kann mit dem Korrelationsverfahren, der Frequenzgangmethode und der Aufnahme der Antwortfunktion nach Aufgabe einer Sprungfunktion erfolgen [Lutz und Wendt 1998]. Die Erläuterung der einzelnen Methoden findet sich in [Lutz und Wendt 1998] und [Föllinger 1994].

¹⁵Für diesen Begriff gibt es in der Praxis oft den synonymen Sprachgebrauch „Regler“.

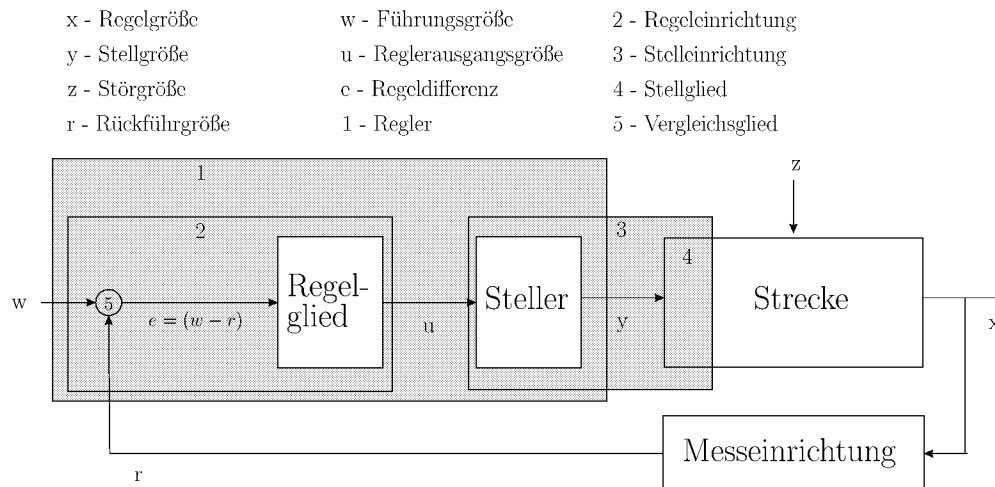


Abb. 3.12: Blockscheema und Veranschaulichung der Begriffe in einem geschlossenen Regelkreis nach [Föllinger 1994]

3.6.2. Substratregelung

Die Stoffwechselleistung des Biokatalysators selbst ist bei Bioprozessen meist die entscheidende Betriebsgröße. Diese ist u.a. abhängig von Temperatur, Leistungseintrag und Konzentrationen von Medienkomponenten und dabei vor allem von den limitierenden Substraten. Die Anwendung regelungstechnischer Standardalgorithmen wie z.B. PID-Regler ist für die Kontrolle von Temperatur, pH und pO_2 im Bioreaktor etablierte Technik. Die Messung dieser Zustandsgrößen ist durch Sensoren möglich, die in Echtzeit ein kontinuierliches Abtasten der Rückführgröße ermöglichen.

Um gezielt Einfluss auf andere Parameter von Bioprozessen nehmen zu können, bedarf es zum einen einer geeigneten Informationsquelle für die Zustandsgröße (Messeinrichtung). Zum anderen werden Regelstrategien benötigt, die ohne zu große Zeitverzögerung dem Bedarf des Biokatalysators gerecht werden.

Im Falle einer direkten Regelung des limitierenden Substrats stellen sich Probleme, die u.U. einer einfachen und stabilen regelungstechnischen Lösung entgegenstehen:

- nichtlineares Systemverhalten bezüglich Substratverbrauch im Bioreaktor
- totzeitbehaftete, zeitdiskrete Messwerte
- Analysewerte behaftet mit Messungenauigkeiten

Die für die Messung von Substraten etablierten Analysesysteme zur Messung von Substraten, z.B. HPLC, FIA oder SIA mit enzymatischen Biosensoren liefern zeitdiskrete Werte mit einer Totzeit, die sich aus der Probenahmezeit und der Messzeit addiert¹⁶. Die Totzeit liegt in der Größenordnung von Minuten. Im Verhältnis zur Zeitkonstanten der Prozesse von 20 - 60 min ([Chmiel 1991]) und angesichts der bestehenden Messunsicherheit liegen zu wenige Messwerte vor, um Standardregelstrategien

¹⁶NIR- und FTIR-Spektrometer bilden eine Ausnahme [Weuster-Botz 1999], da sie über geeignete *in-situ*-Messfühler direkt mit dem Reaktor gekoppelt sind. Ihr Nachteil liegt in der geringen Spezifität des Analyseverfahrens und der mathematisch aufwendigen Datenanalyse.

unmittelbar für eine stabile Regelung einsetzen zu können.

Nichtlineare Systeme können nach einer Linearisierung mit Standardregelalgorithmen behandelt werden [Striegel 1993]. Dabei wird entweder mit einer Linearisierung um den Betriebspunkt gearbeitet, oder ein Modell wird für das System identifiziert, dessen Linearisierungsparameter während des Prozesses an das über die Rückführgröße beobachtete Systemverhalten angepasst werden. „Gehobene“ Regelstrategien arbeiten im Gegensatz zu dieser altbewährten Vorgehensweise mit Prädiktion der Regelgröße mit Hilfe von Modellbildung zum Zeitverhalten der Regelgröße, stochastischen (Kalman-Filter [Weuster-Botz u. a. 1994]) oder unscharfen Methoden (Fuzzy-Logik [Guthke u. a. 1998]) sowie neuronalen Netzen [Kovárová-Kovar u. a. 2000].

PID-Regler

In der verfahrenstechnischen Praxis findet der PID-Regler verbreitet Verwendung [Pahl und Flemming 1997]. Er gehört zur Klasse der linearen, stetigen Regler. Die Kombination von P-, I- und D-Übertragungsgliedern ermöglicht den Ausgleich der Nachteile eines reinen Proportionalreglers, der die Stellgröße linear zur Abweichung der Regelgröße vom Sollwert verändert unter Berücksichtigung der zeitlich bleibenden Änderung der Regelabweichung und ihrer Änderungsgeschwindigkeit.

Die Übergangsfunktion eines PID-Reglers ist in Abb. 3.13 dargestellt. Die Gleichung für das PID-Verhalten eines Reglers lautet :

$$y_{PID}(t) = K_p \cdot (x_w + \frac{1}{T_n} \int x_w dt + T_v \frac{dx_w}{dt}) \quad (3.39)$$

mit:

x_w	Regelabweichung
K_p	Proportionalanteil
T_n	Nachstellzeit
T_v	Vorhaltezeit

Die Nachstellzeit ist die Zeit, die ein I-Regler ohne Kombination mit einem P-Anteil benötigt, um dieselbe Stellgröße zu erzeugen wie ein PI-Regler zum Zeitpunkt $t=0$, wenn eine Sprungfunktion aufgeschaltet wird. Die Vorhaltzeit ist die Zeit, die ein P-Regler gebraucht hätte, um eine sprunghafte Änderung der Regelgröße auszugleichen.

Die Verwendung des PID-Reglers bei der Kontrolle der Substratkonzentration in Bioprozessen birgt das Problem, dass die Reglerparameter K_p , T_n und T_v nicht fest eingestellt werden können. Bei dem exponentiell wachsenden Substratverbrauch in Zulaufprozessen wäre ein exponentiell steigender anstelle eines linearen Regeleingriffs notwendig. Daher wird in der Praxis häufig mit mehreren Parametersätzen in Abhängigkeit von der Prozessphase gearbeitet [Striegel 1993].

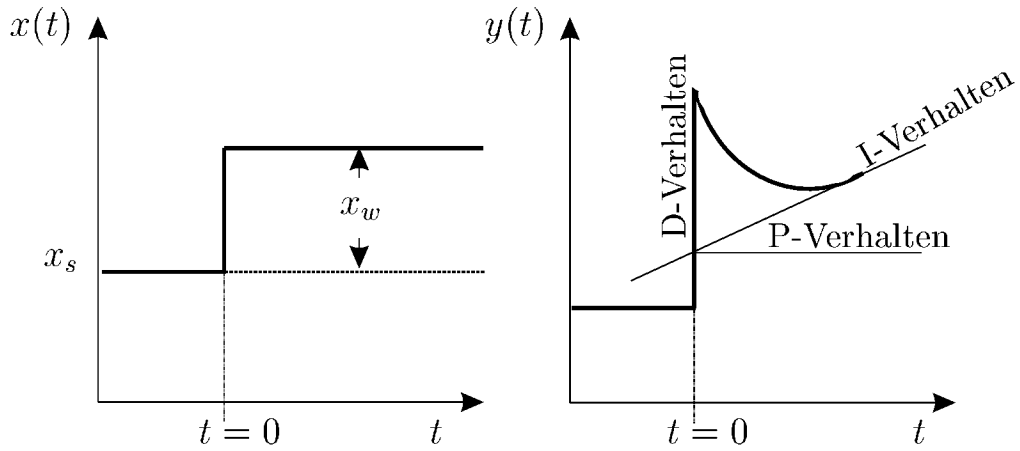


Abb. 3.13: Übergangsfunktion $y(t)$ und P-, I- und D-Verhalten eines PID-Reglers bei Aufschalten einer Sprungfunktion $x(t) = x_s + x_w$ für $t \geq 0$, wobei x_s für den Sollwert steht

Prädiktiver Regler mit linearer Regression

Bioprozesse zeigen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Substratkonzentration ein nichtlineares Systemverhalten. Bei nur diskret im zeitlichen Abstand einer Abtastzeit Δt zur Verfügung stehenden Messwerten kann die Substratkonzentration nur dann zufriedenstellend geregelt werden, wenn Annahmen über das Systemverhalten zwischen den Messungen getroffen werden. Bei dem von [Kleman und Chalmers 1991] vorgestellten Regler-Prinzip wird näherungsweise ein konstanter Substratbedarf zwischen den einzelnen Messzeitpunkten angenommen.

Der Regler besteht daher aus zwei Komponenten, a. „Feed-forward“ d.h. einer Dosierung auf Grundlage einer Bedarfsschätzung in der Zukunft und b. „Feed-back“ d.h. einer Dosierung auf Grundlage der aktuellen gemessenen Substratkonzentration:

a. Basierend auf einem Bilanzmodell zur Beschreibung der Substrataufnahmerate des biologischen Systems wird eine Voraussage der Substrataufnahmerate bis zum Zeitpunkt des nächsten Messwerts durch eine gleitende lineare Regression über n Messwerte in Abhängigkeit der Prozesszeit erreicht:

Bilanz:

$$R_S = \frac{F(t - \Delta t)}{V} \cdot c_{S_{ein}} - \frac{c_S(t) - c_S(t - \Delta t)}{\Delta t} \quad (3.40)$$

b. Ein P-Regler gleicht den Einfluss von Schätzfehlern auf die Stellgröße auf Grundlage des zuletzt gewonnenen Messwerts aus:

$$F(t) = \hat{R}_S + K_p \cdot (c_{SP} - c_S(t)) \quad (3.41)$$

mit:

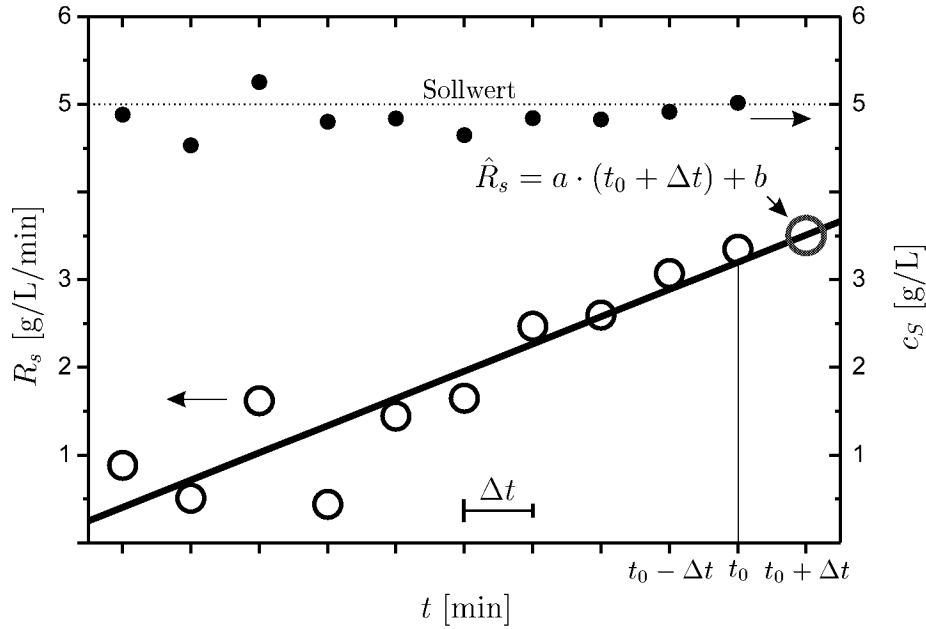


Abb. 3.14: Extrapolative Schätzung der Substrataufnahmerate durch lineare Regression nach [Kleman und Chalmers 1991] anhand von eigenen Daten.

R_S	Substrataufnahmerate	[g/L/h]
$\hat{R}_S$	geschätzter Substratverbrauch aus Extrapolation einer Regressionsgerade der letzten n Werte von R_S über die Zeit auf den Zeitpunkt $t + \Delta t$	[g/L/h]
$F(t)$	aktuelle Dosierate (Stellgröße)	[L/h]
$c_S(t)$	aktuelle Substratkonzentration	[g/L]
$c_{S_{ein}}$	Substratkonzentration der Dosierlösung	[g/L]
c_{SP}	Sollwert der Substratkonzentration	[g/L]
K_p	Proportionalfaktor	[h ⁻¹]
V	Reaktionsvolumen	[L]
Δt	Abtastzeit, Dauer eines Probenahmeintervalls	[min]

Durch das statistisch basierte extrapolative Element $\hat{R}_S$ werden Messwertschwankungen ausgeglichen und der Steigerung des Substratverbrauchs während der exponentiellen Wachstumsphase in Näherung Rechnung getragen. Obwohl der Proportionalanteil während des Experiments konstant bleibt, wird die Dosierung damit an Prozessphasen mit höherem Substratbedarf angepasst. Abb. 3.14 veranschaulicht die Funktionsweise der Extrapolation. Mit dem aktuellen ($t = t_0$) Messwert und $(n - 1)$ Messwerten der Substratkonzentration c_S werden die Substrataufnahmeraten in Abhängigkeit der Zeit berechnet und eine lineare Regression durchgeführt. Durch Einsetzen der Zeit des nächsten Messzeitpunkts ($t = t_0 + \Delta t$) in die Geradengleichung wird der zukünftige Substratbedarf der Kultur geschätzt und vor dem Erhalt des nächsten Messwerts in der Berechnung der Stellgröße berücksichtigt.

4. Entwurf und Inbetriebnahme einer parallelen Probenahme- und Online-Messtechnik

Der erste Schritt der verfahrenstechnischen Entwicklung besteht in der Durchführung einer Vorstudie, die alternative Konzepte auf ihre Eignung zur Problemlösung prüft und die Entscheidungsgrundlage für das Vorgehen in der Hauptstudie bildet [Blaß 1989]. Im konkreten Fall ist das Ziel der Vorstudienphase dieser Arbeit ein Funktionsmuster, das die grundlegenden Anforderungen an das technische System erfüllt und mit dem die Hauptstudie durchgeführt werden kann.

4.1. Konzept und Auswahl der Probenahmetechnik für geringe Reaktionsvolumina

4.1.1. Probenahmeverfahren: Stop-Flow-Prinzip

Eine Probennahmestrategie mit Volumenentnahme, wie z.B. direkte Probenentnahme oder Filtration, ist für geringe Reaktionsvolumina bei hohen Messfrequenzen wenig geeignet. Probenahmeverfahren die auf Diffusion basieren reduzieren das Reaktionsvolumen nicht, sondern entnehmen der Lösung Moleküle proportional zu ihrer aktuellen stofflichen Zusammensetzung:

Diffusionsprozesse sind Stoffaustauschprozesse, die den Ausgleich von Konzentrationsunterschieden in einem Volumenelement bewirken. Findet ein solcher Diffusionsprozess über eine semipermeable Membran statt, nennt man das Verfahren Dialyse. Sie macht sich die treibende Kraft eines Konzentrationsgradienten zum transmembranen Stofftransport zunutze. Zur Probenahme wird eine Dialysemembran einseitig mit der Reaktionslösung in Kontakt gebracht, die auf der Gegenseite an eine geeignete Akzeptorlösung grenzt. Bei einem entsprechend gerichteten Konzentrationsunterschied kann der Zielanalyt aus der Reaktionslösung in der Akzeptorlösung angereichert werden. Soll es dabei nicht zu einem Konzentrationsausgleich kommen, weil das Erreichen dieses Zustands zu viel Zeit benötigt, so ist für eine reproduzierbare Probenahme eine definierte Zeitspanne bei der Diffusion exakt einzuhalten. Dieses Probenahmeverfahren wird auch als „time-based-sampling“, d.h. zeitabhängige Probenahme bezeichnet [Bilitewski u. a. 1995]. Die Konzentration des Akzeptormediums in der Membran zur Zeit $t=0$ muss dabei bekannt sein (z.B. $c=0$). Wird die Probe direkt nach der diffusiven Probenahme von einem Durchflussdetektor gemessen, so wird in Anlehnung an die

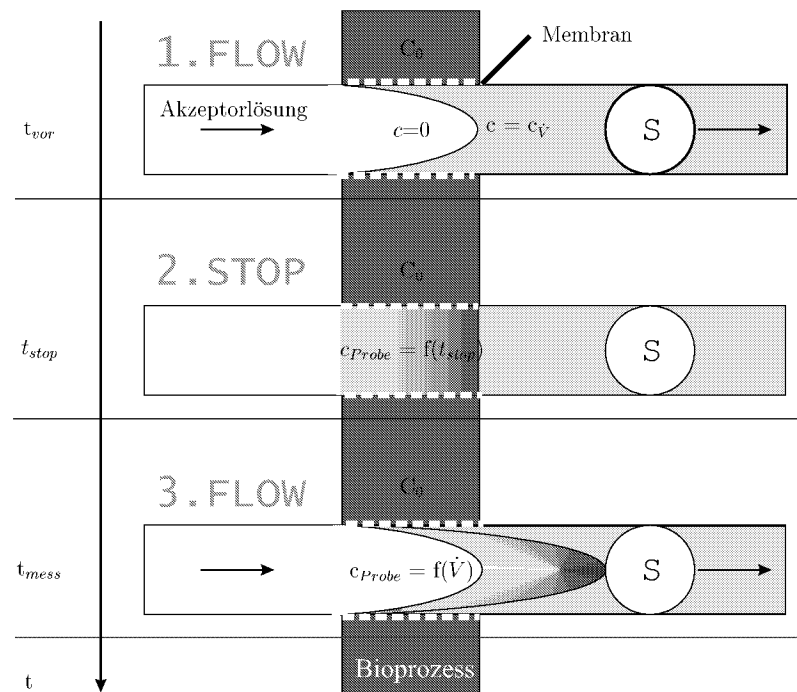


Abb. 4.1: Die drei wesentlichen Schritte des Stop-Flow Probenahme-Prinzips innerhalb der Fließdiffusionsanalyse (FDA):

1. Vorspülen; 2. Stop des Volumenstroms und Diffusion des Analyten; 3. Transport der Probe zur Durchflussdetektion (S). c_0 ist die Konzentration der Reaktionslösung

Fließinjektionsanalyse (FIA) das Verfahren „Fließdiffusionsanalyse“ (FDA) genannt [Künnecke und Bilitewski 1995]. Die Dialysemembran ersetzt das Injektionsventil der FIA.

Anhand Abb. 4.1 lässt sich das Prinzip der Stop-Flow-Probenahme als Teil der FDA im Einzelnen nachvollziehen:

1. FLOW: Das Probenahmemodul muss im ersten Schritt mit frischer Akzeptorlösung ausreichend vorgespült werden (t_{vor}). Anreicherungen über nicht-definierte Zeiträume werden auf diese Weise entfernt.
2. STOP: Der Volumenstrom wird im zweiten Schritt der Probenahme im Membranmodul abrupt unterbrochen. Nun beginnt die Diffusionsphase, deren Dauer t_{stop} vom Anwender empirisch festgelegt werden muss. Beispielsweise kann bei der Konfiguration der optimale Messbereich der verwendeten Analytik berücksichtigt werden.
3. FLOW: Im dritten Schritt wird das angereicherte Flüssigkeitssegment aus dem Modul transportiert. Ein im Abstrom angeordneter Detektor (S) wird daraufhin eine Konzentrationsverteilung in der strömenden Flüssigkeit feststellen, die in einem charakteristischen Ausschlag des Detektorsignals (Peak) resultiert.

Die Vorgänge stellen sich im Detail jedoch komplexer dar: Bei Eintritt der Akzeptorflüssigkeit in die rohrförmigen Membranen bewirkt der Konzentrationsgradient bereits

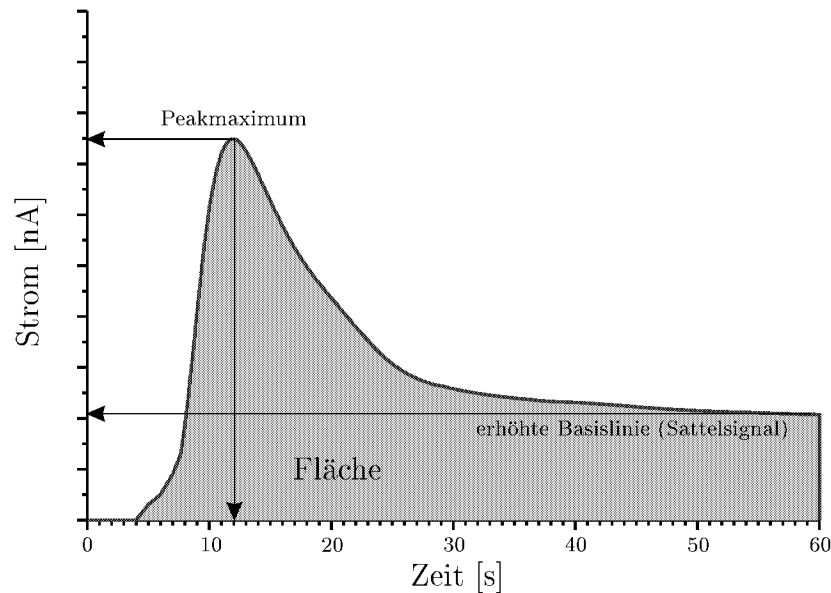


Abb. 4.2: Beispiel des Peak-Signals mit erhöhtem Signal im Abstrom (Sattelsignal) bei der Stop-Flow-Probenahme. Zur Auswertung können Peakmaximum, Fläche und Sattelsignal verwendet werden.

einen Stoffübergang, so dass seine Quantität von der Verweilzeit der Volumenelemente der Lösung im Modul und damit, bei konstanter Modullänge, vom Volumenstrom der Lösung abhängt.

Im Probensegment befindet sich bei Stop des Volumenstroms zur Zeit $t=0$ eine Lösung mit einer Konzentration $c \neq 0$. Über die Länge der einzelnen Hohlfasern liegt ein Konzentrationsprofil mit steigender Konzentration in Richtung Modulausgang vor. Ist der Volumenstrom beim Spülen vor jeder Probenahme konstant, so stellt sich das Konzentrationsprofil reproduzierbar ein. Bei Durchströmung des Membranmoduls und Transport des akkumulierten Probensegments zum Detektor ergibt sich eine konstante Konzentration $c=c_{flow}$ im ausströmenden Akzeptormedium. Der Signal-Zeit-Verlauf sinkt deshalb nach Aufzeichnung eines Peakmaximums nicht auf die Basislinie des Detektors ab, sondern es stellt sich ein stationäres Signal aufgrund der konstanten Konzentration im Akzeptorstrom ein („Konti-Dialyse-Effekt“). Das konkrete Konzentrationsniveau ist vom Volumenstrom, der Membranlänge und dem Konzentrationsgradienten abhängig. Abb. 4.2 zeigt ein repräsentatives Signal der Stop-Flow-Probenahme.

4.1.2. Probenahmeverrichtung

Anforderungen

Die zur Durchführung einer diffusiven Probenahme notwendigen Membranmodule müssen folgende Anforderungen erfüllen:

1. Die Membranfasern sollten in gewünschter Anzahl und Länge an die Transportschläuche, die ein geeignetes wässriges Akzeptormedium in das und aus dem Modul transportieren, zu koppeln sein.

2. Die Anschlüsse müssen so abdichten, dass das Akzeptormedium nur über die Membran Kontakt mit der Bioprozesslösung hat.
3. Eine maximale mechanische Stabilität aller Verbindungen muss gewährleistet sein (Belastung im Schüttler).
4. Der zulässige Bereich des Volumenstroms durch das Modul muss den Transport des angereicherten Probensegments in einem zeitlich akzeptablen Zeitraum ermöglichen.
5. Die Module müssen bei 121°C für mindestens 20 min (Bedingungen der Dampfsterilisation) thermisch stabil sein.
6. Die Probenahme muss reproduzierbar durchführbar sein (relative Standardabweichung $s \leq 10\%$).
7. Die Module müssen kommerziell erhältlich oder in einer Serienfertigung herzustellen sein.

Hohlfasermembranmodule

Haupteinsatzgebiet von Hohlfasermembranen sind Hemodialysatoren und Hohlfaserkontakoren für Extraktion oder Filtration in verfahrenstechnischen Trennprozessen¹. Die Hohlfasern sind üblicherweise in ein flüssigkeitsdichtes Gehäuse eingebracht, in welchem die Reaktionslösung, je nach Verfahrensweise Donor oder Akzeptor, an den Fasern vorbeigeleitet werden kann.

Zur Probenahme aus Schüttelkolben sollen die Hohlfasern direkt in Kontakt mit der Reaktionslösung im Schüttelkolben stehen. Die Prüfung der wenigen dafür kommerziell erhältlichen Membranmodule zeigte die geringe Eignung dieser Produkte für die Anwendung zur Probenahme in Bioprozessen [Franz 1999]: Die mechanische Stabilität war nicht gegeben und die Anschlüsse wiesen Toträume auf. Die Entwicklung eines Membranmoduls, das die in Abschnitt 4.1.2 formulierten Anforderungen für den Einsatz in Kleinreaktionsgefäßen erfüllt, war daher notwendig.

Im Detail muss die Entwicklungsaufgabe wiederum in die Anforderungen für die drei Teilfunktionselemente „Membranen“, „Schlauchanschluss“ und die verbindende „Eingusstechnik“ (Potting) aufgeschlüsselt werden.

Materialauswahl

Hohlfasermembranen aus Cellulose Acetat (CA), Polysulfon (PS) und Polyethersulfon (PES) sind als Rohmaterial erhältlich und wurden auf ihre Anwendbarkeit in Membranmodulen, gemäß der Anforderungsliste, untersucht. Da die CA-Membran leicht brach, die PES-Membran leicht knickte und auch die Materialherstellung 1998 eingestellt wurde, fiel die Wahl auf die PS-Membran. Erhältlich ist diese in 0,5 und 1,0 mm Durchmesser und mit molekularen Ausschlussgrenzen von wenigstens 1000 D. Dabei erwiesen sich die Membranen mit einem Durchmesser von 0,5 mm bei der FDA als die geeignetsten (Abb. 4.3).

¹Hohlfasermodule werden auch als Bioreaktoren eingesetzt, bei welchen das Medium über die Hohlfasern perfundiert oder die Organismen im Reaktor zurückgehalten werden. Siehe dazu [Schultz und Gerhardt 1969] und [Chung und Chang 1990].

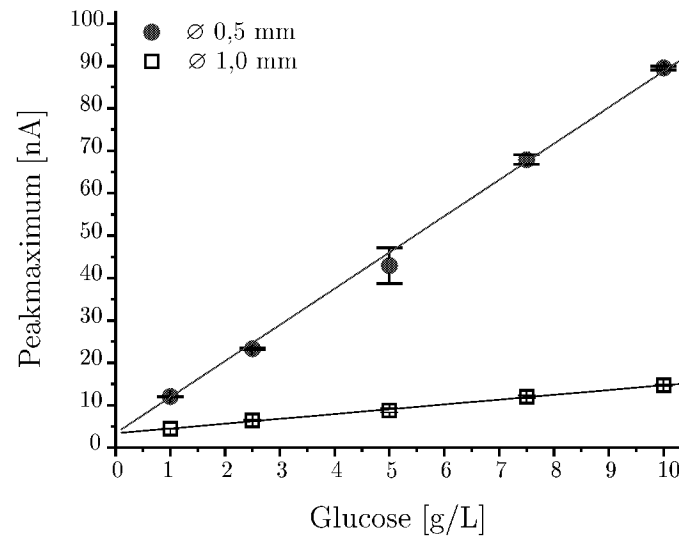


Abb. 4.3: Vergleich von Kalibrierversuchen mit PS Hohl-faser-Membranen (1 kD) mit den verfügbaren Durchmessern. $t_{stop} = 3$ min, Glucose in Akzeptormedium, $T = T_R$

Tab. 4.1: Anforderungen an Teilfunktionen eines zu entwickelnden Hohl-faser-Membran-moduls

	Membranen	Anschlüsse	Potting
Material	- Chemische und biologische Beständigkeit - Autoklavierbarkeit		
	- Verfügbarkeit - Ausschlussgrenze ≥ 500 D - Biofouling gering - Sterilbarriere	- verklebbar - nicht toxisch	- nicht toxisch - mechanisch bearbeitbar - Aushärtung ohne Volumenverlust
Ausführung	- Anzahl - Länge	- steril - Verbindung zu Schläuchen	- kein Totraum - dicht

Modulkonstruktion

Ebenso wichtig wie die Verfügbarkeit geeigneter Membranmaterialien ist die Modulkonstruktion [Winzeler 1990]. Das Modul ist der zentrale Bestandteil einer Membrananwendung und dient der bestimmungsmäßigen Anordnung der Membran und der Strömungsführung.

In einem iterativen Prozess wurde ein für die Anwendung angepasstes Hohl-faserdialysemodul, gemäß der Anforderungsliste in Tab. 4.1, entwickelt. Die Entwicklungsschritte sind aus Abb. 4.4a. ersichtlich. Wurden die Membranfasern am Anfang in thermisch aufgeweitete PTFE-Schläuche mit Epoxidharz fixiert², steht am vorläufigen Ende der

²PTFE ist prinzipiell mit keinem Material verklebbar, die Verbindung hält nur kurze Zeit.

Entwicklung ein in Standard-Hohlschrauben³ aus Polypropylen (PP) mit Epoxidharz vergossenes Membranmodul mit 3 Hohlfasern aus Polysulfon (PS)⁴ und einem Gestrick als Berührungs- und Knickschutz aus V4A-Stahl (Abb. 4.4b).⁵ Das Potting ist in der Aufsicht auf die Hohlschraube zu sehen (Abb. 4.4 c.).

Moduldimensionierung

Bei der Frage nach der Dimensionierung des Moduls geht es um die Anzahl der Fasern, den daraus resultierenden Durchströmungsquerschnitt und die nutzbare Länge. Die Länge ist kein feststehender Parameter, sie kann auf die Bedürfnisse der Anwendung zugeschnitten werden.

Die Anzahl der gewählten Fasern bestimmt den Strömungsquerschnitt des Membranmoduls. Ideal ist ein Modulquerschnitt der gleich dem Querschnitt des Transportschlauchs ist. Es werden oftmals PTFE-Schläuche verwendet mit einem inneren Durchmesser (i.d.) von etwa 0,8 mm (0,16 inch) [Schuhmann u. a. 1995], [Valero u. a. 1990]⁶. Die Querschnittsfläche beträgt rund 0,5 mm². Entspricht der Strömungsquerschnitt des Membranmoduls aufgrund der festgelegten Geometrie der Hohlfasermembranen diesem Wert nicht genau, so ist ein geringfügig grösserer Querschnitt zur Vermeidung einer Druckerhöhung zu wählen. Abb. 4.4 b. zeigt, wie die Hohlfasern mit einer Gesamt-Innenquerschnittsfläche von 0,59 mm² in eine Hohlschraube mit 1/4" 28G UNF Gewinde eingegossen sind. In einer Kupplungsschraube zwischen Modul und Transportschlauch dichtet ein O-Ring das Modul ab, der um die dreiecksförmige Anordnung auf dem Potting aufliegt. Das Fertigungsverfahren ist in Anhang A.1 detailliert beschrieben.

Flachmembranmodule

Flaches Membranmaterial für die Dialyse ist in einer weitaus größeren Auswahl verfügbar als Hohlfaser-Membranen. Viele der in der Literatur beschriebenen Dialysemodule funktionieren mit Flachmembranen ([van de Merbel u. a. 1994], [Mandenius u. a. 1984], [van Staden 1995], [Mohns und Künnecke 1995b]), aber nur wenige solcher Dialysemodule sind auch kommerziell verfügbar.

Um die Modulentwicklung redundant zu gestalten und eine Alternative zu Hohlfasermodulen zur Probenahme bereitzustellen, wurde eine Dialysekammer entworfen, die die Verwendung von flachen Dialysemembranen erlaubt. Das Modul soll als Halbzelle einseitig über die Flachmembran mit der freien Reaktionslösung in Berührung treten. An ihrer entgegengesetzten Seite liegt die Membran auf einem Fließkanal auf, durch den die Akzeptorlösung strömt. Dieser Fließkanal mit Ein- und Auslass kann entweder ein Hohlraum, ein geradliniger, ein schlangelinienförmiger oder ein spiralförmiger Kanal sein.

³1/4" 28G UNF

⁴Dimensionen: $\varnothing$ 0,5 mm, $d_a - d_i = 80 \mu\text{m}$

⁵Die Einzelteile sind auf der Fotografie in Abb. 4.16 auf Seite 71 gezeigt.

⁶[Karlberg und Pacey 1989] empfehlen für FIA Schläuche zwischen 0,35 und 0,9 mm i.d., da sich der Dispersionskoeffizient bei diesen Durchmessern in einem engen Bereich zwischen 3,0 und 3,8 s⁻¹ bewegt.

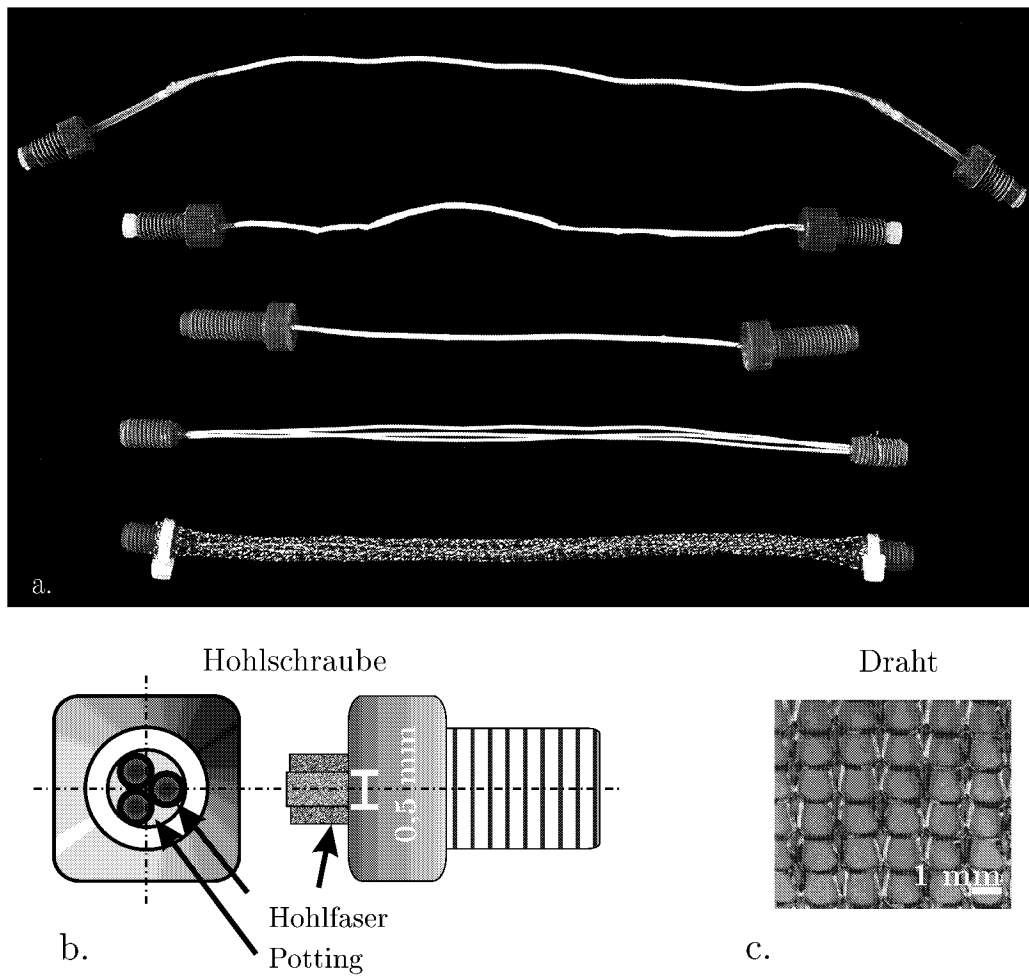


Abb. 4.4: Evolution der Membranmodule. a.: Überblick über Produkte der einzelnen Membranentwicklungsstufen. b.: Potting in Hohlschraube 1/4"28G UNF. c.: Vergößierung des Drahtgestricks als Knick- und Berührungsschutz des unteren Membranmoduls in a.

Da eine einfache und kostengünstige Konstruktion für parallele Membranmodule bevorzugt wird und sich das spiralförmige Modul als raumeffizient und strömungstechnisch vorteilhaft erwiesen hat [Winzler 1990], wurde eine solche Halbzelle entworfen und getestet.

Abb. 4.5 zeigt den ersten Prototyp⁷, der sich an die Bauart einer Sauerstoffelektrode anlehnt. Die Diffusionsmembran ist über die flache Seite der Zelle gespannt und in einer seitlichen Nut mit einem O-Ring fixiert. Die mit Schrauben befestigte Deckplatte presst die Membran auf den Steg zwischen den Kanälen. Auf der Rückseite des Moduls befinden sich die Anschlüsse für die Transportschläuche. Es ist vorgesehen, das Modul durch einen Standardstutzen seitlich, durch die Bodenfläche in den Schüttelkolben oder an der Seite der Mini-Blasensäule einzubringen, so dass das Modul stets von Reaktionslösung benetzt ist.

Mit der dargestellten Anordnung wurde in einer Glucose-Standardlösung FDA ($t_{stop}=6$ min) durchgeführt und ein reproduzierbares Signal, wie in Abb. 4.5 dargestellt, aufgezeichnet. Die grundsätzliche Eignung des Moduls konnte damit gezeigt werden.

Bei der Handhabung des Moduls zeigten sich noch Abdichtungsprobleme, die durch konstruktive Verbesserungen voraussichtlich lösbar sind. In Anhang D.1 ist in der Konstruktionszeichnung eine Nut um den Fließkanal vorgesehen, in der ein O-Ring, der durch die Deckplatte auf den Modulkopf gepresst wird, die gespannte Membran von oben abdichtet. Da die Modulentwicklung mit Hohlfasern schneller zu einem anwendbaren Produkt geführt hatte, wurden die vorgeschlagenen Flachmodule nicht weiter entwickelt und nicht zur parallelen Probenahme eingesetzt.

Mikrodialylenadeln

Die Mikrodialysetechnik wurde erstmals in den 70er Jahren zur Messung niedermolekularer Bestandteile in Körperflüssigkeiten *in-vivo*, insbesondere im Gehirn, vorgestellt [Ungerstedt]. Zur Anwendung kommt dabei eine semipermeable Membran, die wie ein künstliches Blutgefäß in das Körpergewebe chirurgisch eingebracht ist. Die Dialyse wird hier bei kontinuierlicher Durchströmung durchgeführt, auch Perfusion genannt. Über bidirektionale Konzentrationsgradienten können Stoffe dem Gewebe zur Konzentrationsbestimmung entzogen werden oder beispielsweise Wirkstoffe für pharmakologische Tests direkt im Gewebe verabreicht werden.

Solche miniaturisierten Membranmodule in Nadelform sind kommerziell und wegen der medizinischen Anwendung steril erhältlich. Als Probenahmeverrichtung für Kleinreaktionsgefäße sind sie wegen ihrer Form sehr gut geeignet, da sie einfach über ein Septum steril in das Gefäß gesteckt werden können. Abb. 4.6 zeigt das Funktionsprinzip der doppelt konischen Apparatur. Die Anreicherung erfolgt bei Durchfluss der Nadel mit geeigneter Akzeptorlösung, für deren Ausmaß die Kontaktzeit des Akzeptors an der Membran und der Konzentrationsgradient maßgebend ist. Gemessen wird die Anreicherung mit dem „Recovery“-Faktor Rf :

⁷Konstruktionszeichnung siehe Anhang D.1

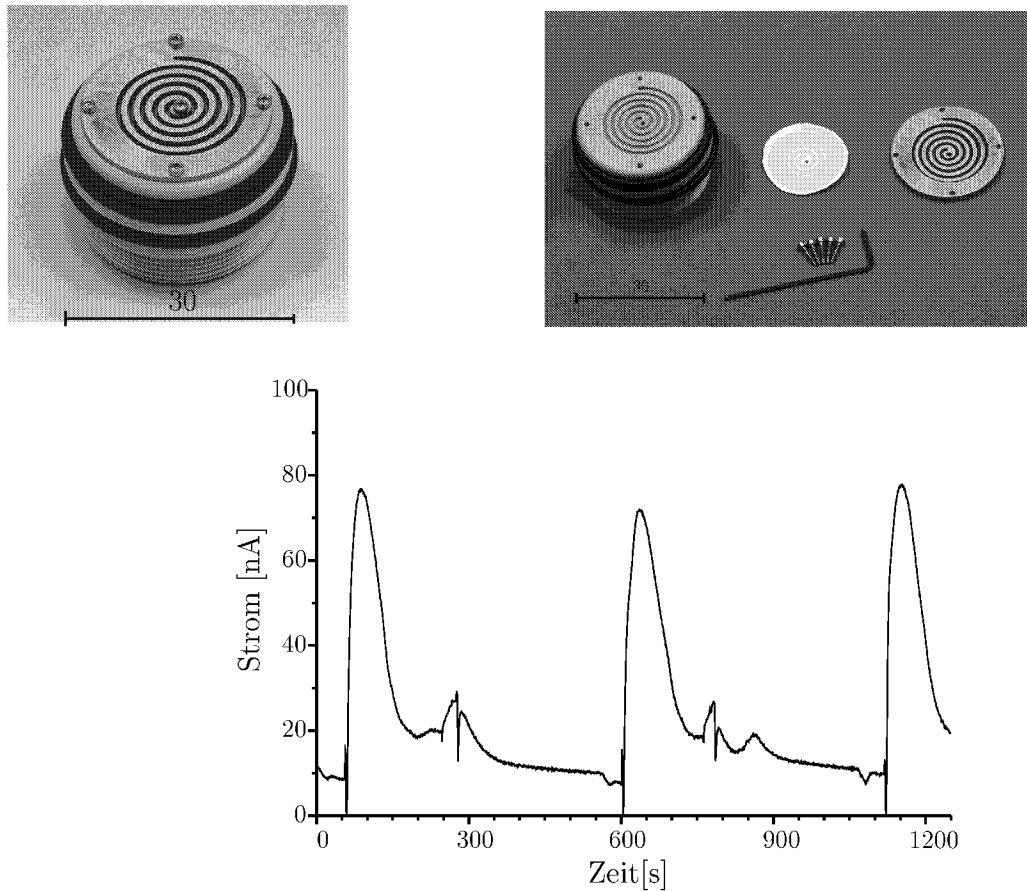


Abb. 4.5: a.: Alternative zu Hohlfasernmodulen: Halterung für flache Dialysemembranen mit spiralförmigem Fließkanal zur Einbringung in das Reaktionsgefäß über einen GL45 Norm-Stutzen. b.: Messdaten einer FDA ($t_{stop}=6$ min) mit Flachmembran-Spiralmodul in 4 g/L Glucose-Standardlösung gelöst in LB-Medium. Peakmaxima-Mittelwert: $75,2 \pm 2,8$ nA ($s = \pm 3,7$ %)

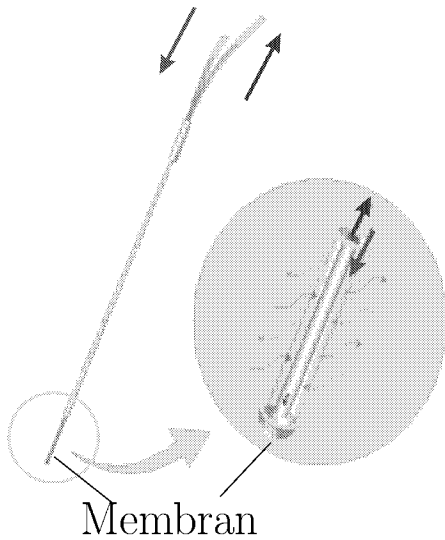


Abb. 4.6: Funktionsprinzip einer doppelt konischen Apparatur

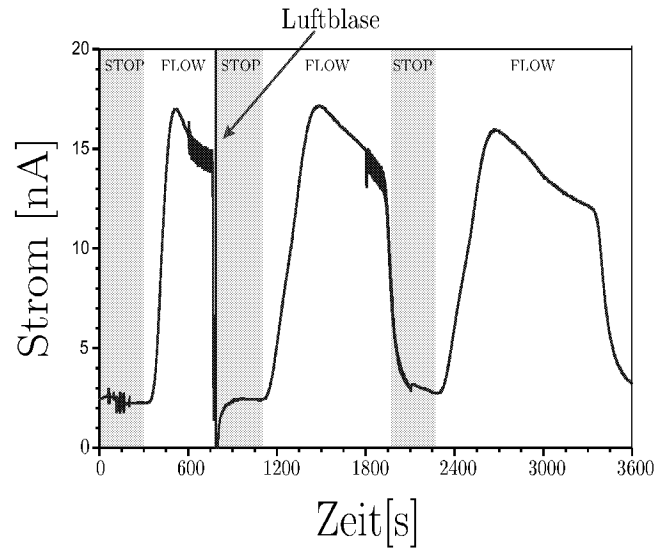


Abb. 4.7: Ergebnisse der Durchführung der Mikro dialyse in 5 mM Glucose-Standardlösung (in Akzeptorlösung). $t_{stop}=5$ min, $\dot{V}=2$ $\mu\text{L}/\text{min}$, $T=T_R$.

$$Rf = \frac{c_{Perfusat}}{c_{Standard}} \quad (4.1)$$

Diese Technik wurde zur Online-Überwachung von Bioprozessen zur Ethanol- und Penicillin-Produktion erstmals von [Marko-Varga u. a. 1993] verwendet. Das Perfusat wurde durch die in das Fermentationsmedium eingetauchte Mikro dialyse-Nadel gewonnen und direkt in das Analysesystem injiziert, nachdem die Anreicherung Rf in Standardlösung bestimmt wurde.

Da die Nadeln sehr klein sind, können nur Volumenströme im Bereich 2-50 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingestellt werden. Dazu sind spezielle Pumpen, zumeist pulsarme Spritzenpumpen notwendig. Die getesteten Dialysenadeln mit einem inneren Konusdurchmesser von 0,2 mm können nur mit 2 und 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ Akzeptormedium durchströmt werden. Eine Nadel wurde zur Durchführung der Stop-Flow-Probenahme ($t_{stop}=5$ min) in Glucose-Standardlösung (5 mM) getaucht und das Signal am Glucose-Biosensor gemessen. Abb. 4.7 zeigt, dass ein reproduzierbares Signal hinsichtlich des Maximums aufgezeichnet werden konnte. Insgesamt verläuft die Probenahme über die Dialysenadeln durch den sehr geringen Volumenstrom zu langsam. Es dauerte Minuten, bis das Peakmaximum bei einer Schlauchlänge von ca. 15 cm erreicht wurde (Durchmesser 0,12 mm i.d.). Um diesem Nachteil zu begegnen, müsste ein Sensor unmittelbar an der Nadel angebracht werden. Eine parallele Messung könnte dann nur mit einem Sensor an jeder Probenahmestelle stattfinden. Dies würde einen unverhältnismäßig hohen messtechnischen Aufwand erfordern.

Ein weiterer Nachteil ist, dass für die erforderlichen Schlauchdimensionen (0,12 mm i.d.) Standardanschlüsse und geeignete Ventile nicht oder nur mit hohen Kosten verfügbar sind. Dies erschwert die Entwicklung einer parallelen Probenahmetechnik mit Mikrodialyse. Da die gleichzeitig voranschreitende Entwicklung mit Hohlfasermembranen schneller zum Ziel einer technischen Realisierung des parallelen Probenahmekonzepts für Kleinreaktionsgefäße führte, wurde die Mikrodialyse nicht weiter verfolgt.

4.2. Auswahl der Messtechnik

Bei der Auswahl der Messtechnik sind folgende Kriterien anzuwenden:

- Spezifische Substratmessung aus dem dialysierten Stoffgemisch der Reaktionslösung
- Sofortige Verfügbarkeit des Messergebnisses
- Kommerzielle Verfügbarkeit des Sensors
- Messbereich passend für typische Konzentrationen im Dialysat
- Keine Querempfindlichkeiten
- Möglichkeit des Betriebs im Durchfluss
- Ansprechverhalten des Sensors hinreichend schnell zur Messung des Zeit-Konzentrationsverlaufs im Durchfluss

Eine spezifische Substratmessung, insbesondere von Glucose als Modellsubstrat, aus der Menge aller durch die Membran diffundierenden Bestandteile der Reaktionslösung ist bestmöglich durch ein enzymatisches Nachweisverfahren gegeben. Biosensoren mit immobilisierten Enzymen und elektrochemischem Nachweisverfahren sorgen für einen spezifischen und quantitativen Nachweis innerhalb von Sekunden bis Minuten. Solche Sensorsysteme können im Durchfluss betrieben werden. Drei verschiedene Glucose-Biosensoren wurden auf ihre Eignung geprüft. Ihre Merkmale sind in Tab. 4.2 zusammengefasst. Der Glucose-Sensor der Firma Senslab zeigte ein stabiles Signal und ein im Vergleich zum BST-Sensor rasches Ansprechverhalten und wurde daher in allen folgenden Untersuchungen verwendet. Der Sensor von TNO war zwar prinzipiell geeignet, konnte aber nicht kommerziell bezogen werden. Die Verfügbarkeit war daher nicht mit Sicherheit gewährleistet.

Der gewählte Glucose Biosensor ist mittels eines Mehrschichten-Druckverfahrens auf einem Kunststoffträger gefertigt (siehe Abb. 4.8). Abb. 4.9 zeigt die dazugehörige Doppeldurchflusszelle für amperometrische Biosensoren. Es handelt sich um eine Detektion im Dreielektrodensystem mit Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode. Die Sensoren für verschiedene Analyte unterscheiden sich nur hinsichtlich der Enzymsysteme, die mittels Polymerpasten-Dickschichttechnologie auf der Arbeitselektrode in Poly(carbamoyl)sulphonat-Hydrogel immobilisiert sind. Zwei Sensoren können in die Durchflusszelle eingeschoben und mit einem Klemmbügel fixiert werden⁸. Das Analysat

⁸Es können weitere Doppeldurchflusszellen zur Erstellung eines erweiterten Sensorarrays hintereinandergeschaltet werden.

Tab. 4.2: Übersicht über getestete kommerzielle Glucose-Sensoren

Hersteller	Senslab GmbH	BST GmbH	TNO
Enzym	Glucose-Oxidase		
Messprinzip	Amperometrische Detektion von H_2O_2		
Potenzial [mV]	450	600	350
linearer Bereich [mM]	0,01 - 1,00	0,01 - 1,00	0,01 - 15,00
Ansprechzeit ^a [s]	< 20	< 30	~ 30
Stabilität [d]	30	>15	k.A.
Immobilisierung	Polycarbamoylsulfonat (PCS) Hydrogel Dickschicht	auf Cellulose Acetat Membran mittels Dünnschichttechnik	Immobilisierung in leitendem Polymer (Polypyrrol)
Kosten [DM/St.]	40	60	k.A.
Messzelle [DM]	500	1100	k.A.
Weitere Merkmale	günstiger Stofftransport zur Elektrode, konstante Anströmung	langsame Antwortzeit durch zusätzliche Diffusionsbarriere	Detektion unabh. von O_2 Konzentration (3. Biosensorgeneration).

^aHerstellerangabe

wird im 45° Winkel an den Messkopf heran- und abgeführt. Da die Strömung auf die Sensoroberfläche „prallt“, wird eine solche Zellenkonstruktion als „wall-jet-design“ bezeichnet. Der Bohrungsdurchmesser der Zu- und Ableitungen der Zelle beträgt 0,8 mm. Als Trägermedium wird ein 0,1 M Phosphatpuffer versetzt mit 0,1 M KCl (vgl. Anhang B.4.1) empfohlen [Gründig 2000].

Der zum Betrieb eines amperometrischen Biosensors notwendige Potentiostat für ein Dreielektrodensystem wurde von der Firma DASGIPmbH bezogen (Abb. 4.9). Dieser elektrochemische Messverstärker zur Regelung der Polarisationsspannung (U_{pol}) ist für den Betrieb vier paralleler Sensoren ausgelegt. Für jeden Kanal ist die Polarisationsspannung in Stufen von 1 mV einstellbar. Für die Detektion von H_2O_2 beträgt sie $U_{pol} = -450$ mV.

4.3. Konzeptstudien zur Anordnung einer Vielzahl von Probenahmestellen

Nach Auswahl der zentralen Komponenten der parallelen Probenahme- und Messtechnik muss in Vorversuchen die für die Aufgabe günstigste Anordnung einer Vielzahl von Probenahmemodulen gefunden werden. Dabei sind folgende Kriterien zu beachten:

- geringe Messzeit
- hohe Reproduzierbarkeit
- hohe Genauigkeit
- geringer gerätetechnischer Aufwand

Abb. 4.10 zeigt die beiden Anordnungsmöglichkeiten, die sich unter der Voraussetzung ergeben, dass nur ein Sensor für eine Vielzahl von Probenahmestellen verwendet

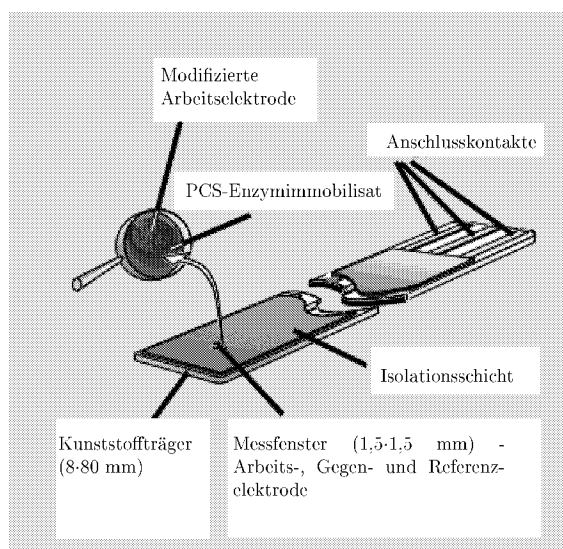


Abb. 4.8: Aufbau des gewählten Biosensorsystems (Bild mit freundlicher Genehmigung der Firma Senslab GmbH, Leipzig)

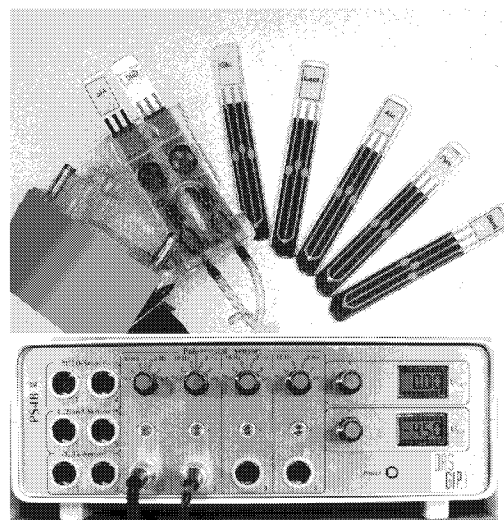


Abb. 4.9: Enzymatische Biosensoren (Senslab GmbH) und zugehörige Durchflussmesszelle. Vierkanal Potentiostat (unten) der Firma DASGIP mbH, Jülich zum Betrieb von vier amperometrischen Sensoren mit Arbeits-, Gegen- und Referenzelektroden (Dreielektrodensystem).

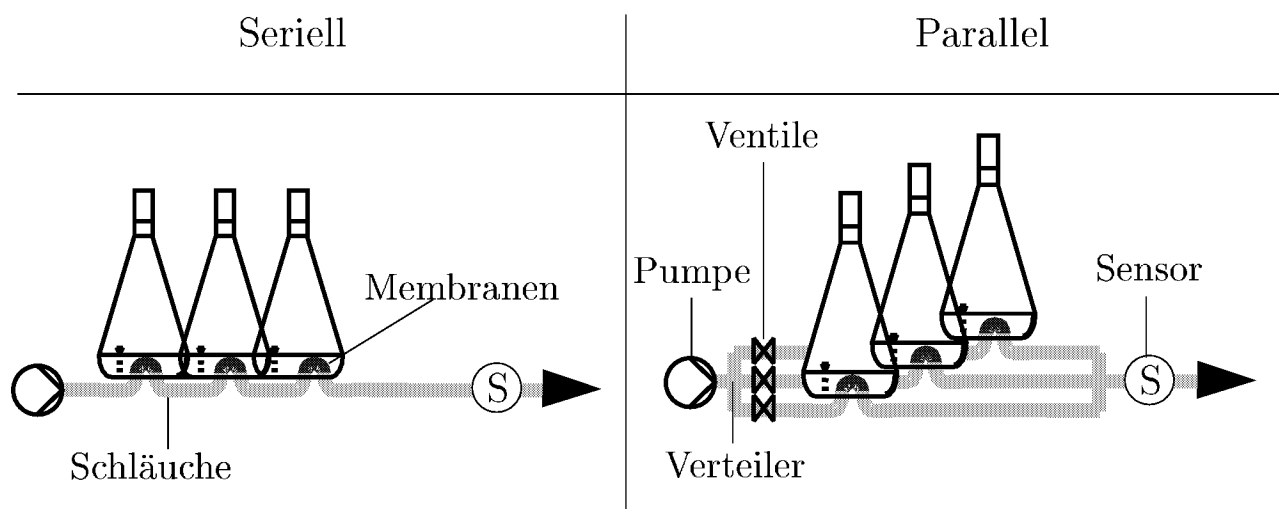


Abb. 4.10: Möglichkeiten der Anordnung paralleler Probenahmestellen im Verhältnis zum zentralen Sensor

wird. Bei der seriellen Schaltung sind die einzelnen Probenahmemodule mit Schläuchen in Reihe miteinander verbunden. Um zum Sensor zu gelangen, muss das im ersten Modul angereicherte Probensegment einen kürzeren Weg zurücklegen, als das aus dem letzten Modul in der Reihe. Die Proben müssen zusätzlich noch die anderen Probenahmemodule passieren.

Bei der parallelen Anordnung wird der Akzeptorstrom in parallele Strecken über einen Fluidverteiler unterteilt. Ventile sorgen für die Steuerung, welche der Strecken gerade mit Akzeptor durchströmt werden soll. Im Folgenden werden die beiden Konfigurationen auf ihre Eignung zur Probenahme aus parallel betriebenen Reaktionsgefäßen unter Beachtung oben genannter Kriterien untersucht.

4.3.1. Serielle Anordnung

Das Konzept der seriellen Anordnung wurde mittels Membranmodulen aus der Eigenentwicklung mit Polyethersulfon-Hohlfasern mit einem MWCO von 5 kD und einer Länge von 15,0 cm realisiert. Die Längen der PTFE-Schläuche ($\varnothing$ 0,8 mm) zwischen den Modulen betrug 2,00 m. Der Akzeptor-Volumenstrom (0,1 M Phosphat-Puffer) wurde auf $\dot{V}=1$ mL/min eingestellt. Die Probenahme erfolgte in 10 mM Glucose-Standardlösung in gerührten Bechergläsern bei Raumtemperatur ($T_R=23^\circ\text{C}$). In Abb. 4.11 sind die Ergebnisse für unterschiedliche Dialysezeiten (t_{stop}) zwischen den einzelnen Modulen aufgetragen.

Das Signal-zu-Rausch Verhältnis verschlechtert sich deutlich mit zunehmendem Abstand der Module vom Detektor. Die Dispersion sorgt für eine Verbreiterung des Signals, da von den einzelnen Modulen unterschiedliche Wegstrecken zurückgelegt werden müssen. Der „Konti-Dialyse-Effekt“, der an der erhöhten Basislinie zu erkennen ist, führt vermutlich zu einer Rückwirkung auf die nachfolgenden Proben. Die Rückwirkung führt je nach Konzentration in den einzelnen Gefäßen zu diffusivem Analyt-Verlust oder zu einer zusätzlichen Analyt-Anreicherung in der Probe bei Passage des Membranmoduls. In diesem Experiment wurde in allen Gefäßen die gleiche Glucose-Konzentration eingestellt, daher wurde dieser Effekt nicht separat nachgewiesen. Diese Vorgänge können nicht mehr durch rechnerische Behandlung aus dem Ergebnis gefiltert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Konzept der Serien-Probenahme nicht realisiert.

4.3.2. Parallele Anordnung

Drei Membranmodule wurden entsprechend Abb. 4.10 parallel zueinander angeordnet und die Stop und Flow-Phase mit manuellen Ventilverteilern in den einzelnen Strecken unter Zeitnahme gesteuert. Temperatur, Konzentration, Akzeptorvolumenstrom und Module, wie in Abb. 4.11 beschrieben, wurden zum Vergleich beibehalten. In Abb. 4.12 sind die Ergebnisse der wiederholten Parallelprobenahme in drei parallelen Strecken mit einer Dialysezeit von 5,0 min aufgezeichnet. Die relative Standardabweichung (s) der Peakmaxima betrug 9,5%. Da ein manueller Ventilverteiler verwendet wurde, konnte durch eine Automatisierung der Ventilschaltung mit einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit gerechnet werden. Das absolute Sensorsignal fand an dieser Stelle noch keine Beachtung, da in erster Linie die Form des Signals und die Höhe der Signale zueinander die zu diesem Stand der Entwicklung relevanten Erkenntnisse lieferte.

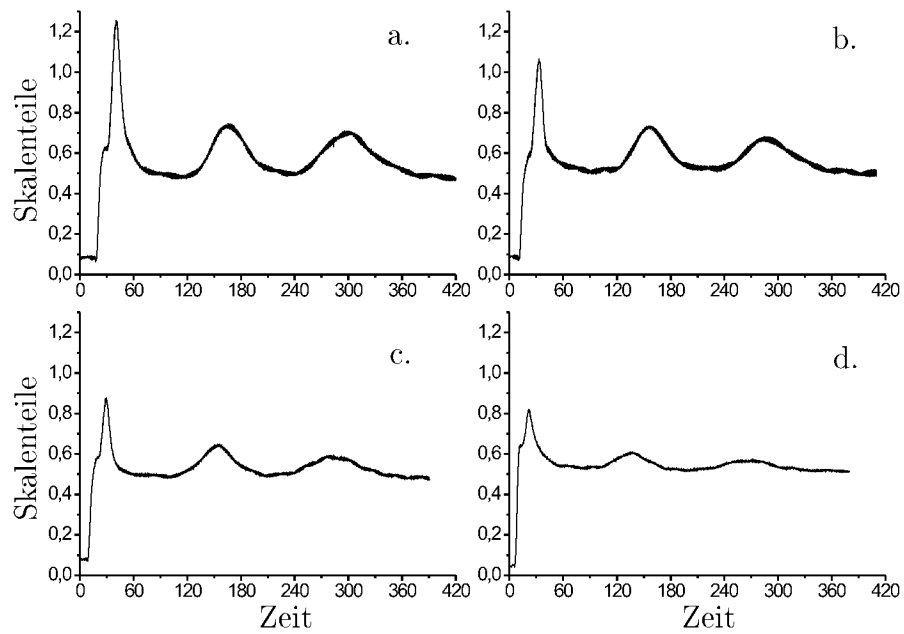


Abb. 4.11: Stop-Flow-Probenahme in 10 mM Glucose-Standardlösung in gerührten Bechergläsern mit drei Membranmodulen in Serie. Schlauchabstand 2 m (PTFE-Schlauch $\varnothing 0,8$ mm). t_{stop} : a.: 5,0 min; b.: 3,0 min; c.: 1,0 min; d.: 0,5 min

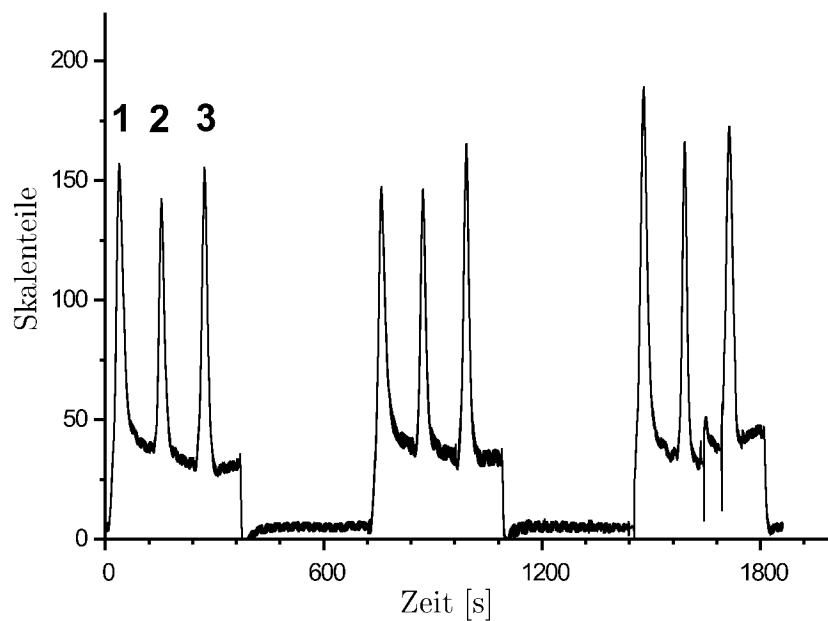


Abb. 4.12: Stop-Flow-Probenahme in 10 mM Glucose-Standardlösung ($t_{stop}=5,0$ min) mit drei parallelen Membranmodulen (1,2,3) mittels manueller 3/2-Wege Ventile

Schlussfolgerung

Der Vergleich der Ergebnisse anhand der Signalform der vermessenen Probensegmente in der jeweiligen Konfiguration zueinander sprechen klar für eine Anordnung der Membranmodule in parallelen Strecken. Der nachfolgend beschriebenen technischen Ausführung als Funktionsmuster wird dieses Konzept zugrundegelegt.

4.4. Technische Realisierung

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie auf Grundlage der Auswahlentscheidungen für Probenahmeverrichtung und Messtechnik ein Funktionsmuster für den Laborbereich in Betrieb genommen wird. Die in Abschnitt 4.1.1 beschriebene Probenahme läuft darin ebenso automatisiert ab, wie die Datenerfassung und Online-Auswertung der Messtechnik.

4.4.1. Apparativer Aufbau des Funktionsmusters

Abb. 4.13 zeigt das Schema des apparativen Aufbaus, der in Abb. 4.14 fotografisch abgebildet ist.

Die kontinuierlich fördernde Peristaltik-Pumpe (8 Rollen) speist ein geeignetes Akzeptormedium in das Analysesystem ein. Ein gleichmäßiger, pulsarmer Akzeptor-Volumenstrom ($\dot{V}=2,5 \text{ mL/min}$) ist erforderlich, da die Dialyse und die Signalhöhe des amperometrischen Biosensors von der Strömungsgeschwindigkeit beeinflusst werden. Eine Blasenfalle verhindert das Eindringen von Luftblasen in das Fluidsystem, da sie das Sensorsignal stören können.

Das Stop-Flow Probenahme-Prinzip wird durch computergesteuertes Öffnen und Schliessen eines Schlauchquetschventils an einer Multiventilanordnung erreicht. Zu einem Zeitpunkt wird nur jeweils eine der parallelen Strecken oder eine zusätzliche Flüssigkeitsleitung ohne Probenahmemodul (Bypass) durchströmt. Nach dem Durchfluss der jeweiligen Messstrecke wird das Fluid zu einem Fluidsammler geleitet, an welchem alle Transportleitungen von den parallelen Modulen und dem Bypass zusammengefasst werden. Die Ableitung führt zu einem Durchflussdetektor, der das ihn durchströmende Fluid kontinuierlich analysiert und mit dem Messverstärker und dem Prozessrechner verbunden ist. Im Abstrom wird die Flüssigkeit in ein Abfallgefäß geleitet. Es wird darauf geachtet, dass sich die Höhe des Schlauchendes während eines Experiments nicht verändert, um den Volumstrom der Pumpe konstant zu halten.

Der Leitungsdruck wird mit Hilfe einer vor dem Multiventilmodul angeordneten Druckmesszelle überwacht. Eine deutliche Absenkung des Drucks, bei konstantem Volumenstrom in einer der parallelen Strecken, ist ein Anzeichen für ein Leck, z.B. an einem Membranmodul. Die Strecke kann dann gezielt abgeschaltet werden. Um bei Auftreten eines Lecks die Störung des Gesamtsystems zu vermeiden, werden vor dem Sammler Rückschlagventile integriert.

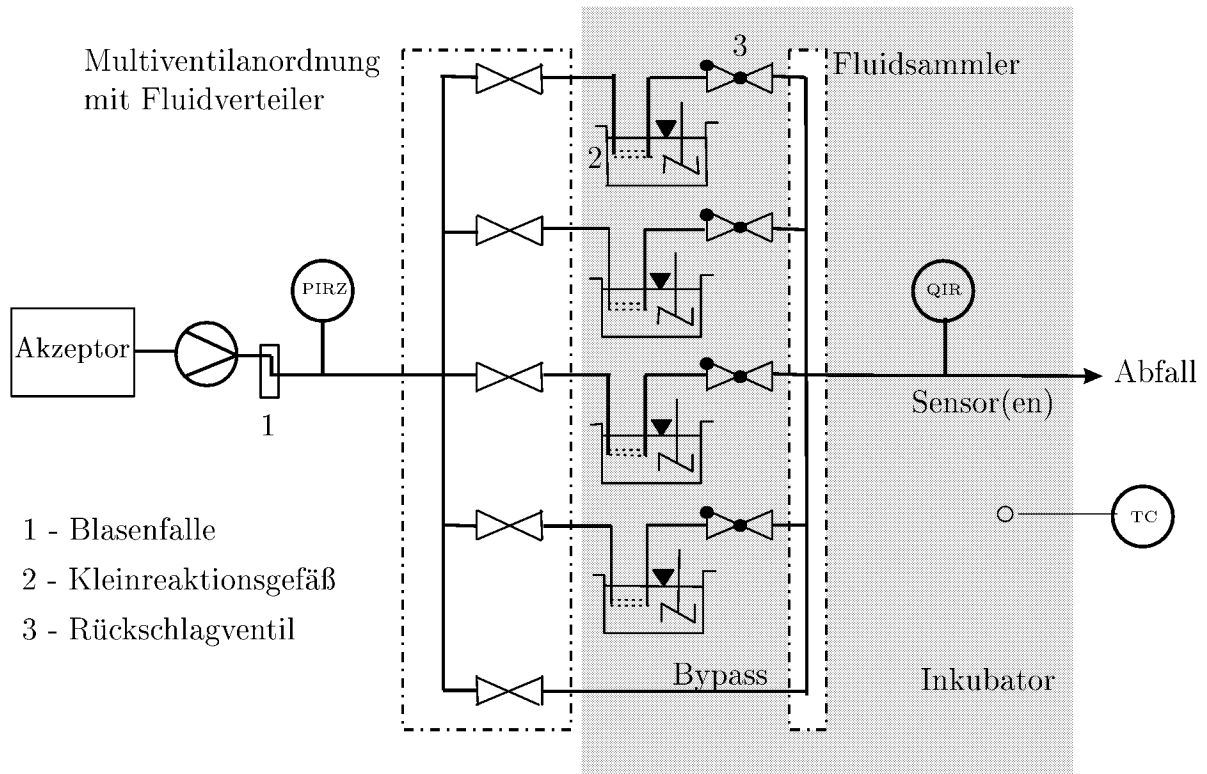


Abb. 4.13: Fließschema der parallelen Probennahme- und Messvorrichtung am Beispiel von vier parallelen Kleinreaktionsgefäßen. Akzeptorflüssigkeit wird über eine peristaltische Pumpe gefördert. Eine Probenahme wird nach dem Stop-Flow-Prinzip über die Multiventilanordnung in den parallelen Dialysestrecken nach einem vorgegebenem Zeitplan durchgeführt. In der Sensorzelle wird der Akzeptorstrom kontinuierlich analysiert. Findet zu einem Zeitpunkt in allen Strecken Dialyse statt, so wird die Bypassleitung geöffnet. Das System wird von den parallelen Zuleitung der Dialysemodule bis einschließlich der Sensorzelle auf Reaktionstemperatur gehalten (Integration in Inkubator). Kennbuchstaben für EMSR-Technik nach DIN 19227 Teil 1, 10/93.

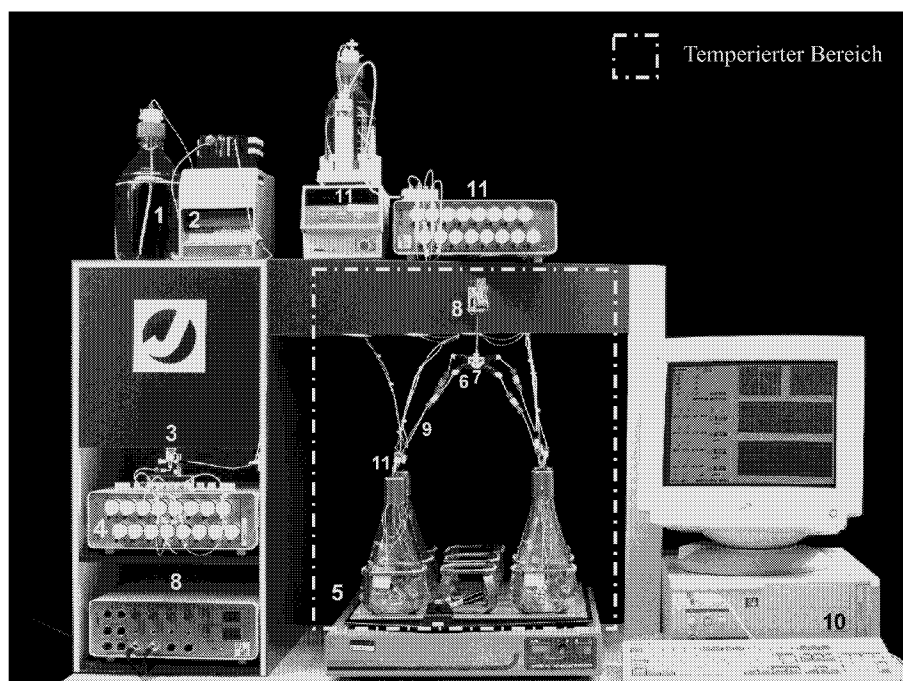


Abb. 4.14: Photo des apparativen Aufbaus der parallelen Probenahme- und Messvorrichtung: (1) Vorratsgefäß, (2) Pumpe, (3) Verteiler und Blasenfalle, (4) Multiventilmodul, (5) Schüttler und Tablar, (6) Rückschlagventile, (7) Fluidsammler, (8) Biosensor-Durchflusszelle und zugehöriger Potentiostat, (9) PTFE-Transportschläuche, (10) Mess- und Steuerungsrechner, (11) präzise Mikrodosierung

Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Membrandiffusion und des Biosensorsignals bestand die Anforderung Akzeptormedium und Sensorzelle zu temperieren. Da Kleinreaktionsgefäße üblicherweise in temperaturgeregelten Inkubatoren betrieben werden, wurde das parallele Probenahmesystem darin eingepasst: Die Länge jeder der parallelen Strecken vom Multiventilmodul zum Fluidsammler beträgt 140,0 cm. 100,0 cm davon sind im Inkubator angeordnet. Fluidsammler und Sensor sind mit einem 2,0 cm langen Schlauch verbunden.

4.4.2. Sterile Integration von Hohlfasermembran-Modulen in Kleinreaktionsgefäße

Schüttelkolben

Zur Modulintegration in einen Schüttelkolben müssen zwei wesentliche Eigenschaften des Schüttelkolbens und dessen Betriebsweise beachtet werden:

Zum Einen werden die Schüttelkolben häufig mit geringen Füllmengen betrieben. Üblich ist z.B. für einen 1 Liter Schüttelkolben eine Füllmenge von 100 mL. Dies entspricht einer Füllhöhe von ca. 1 cm. Daraus folgt, dass das Modul möglichst bodennah eingebracht werden muss.

Zum Anderen werden die Kolben auf einem Schütteltablar kreisförmig bewegt. Die Flüssigkeit im Kolben strömt in einer umlaufenden Wellenform, so dass die Füllhöhe

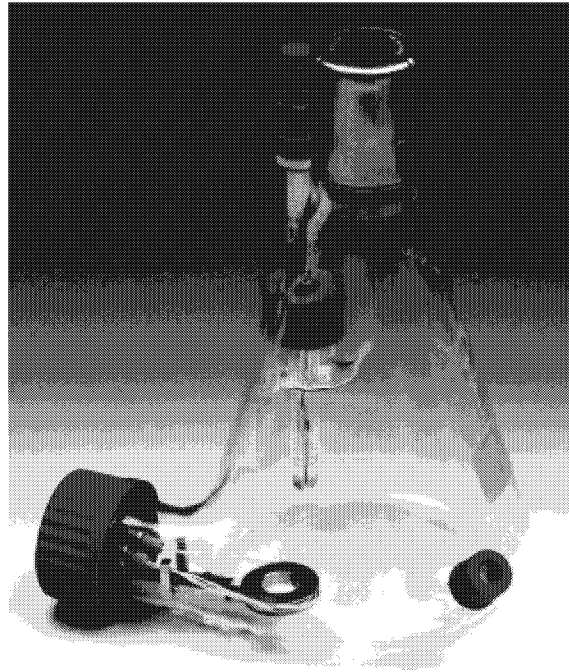


Abb. 4.15: Seitlicher Membranmodulhalter aus V4A Stahl befestigt in einem GL45-Stutzen im 1L Schüttelkolben

zyklisch absinkt und wieder ansteigt.

Um eine reproduzierbare Probenahme zu verwirklichen, ist es notwendig, dass die Membranen vollständig und dauerhaft in das Probenahmemedium eintauchen und in den parallelen Reaktionsgefäßen immer auf die gleiche Art und am gleichen Ort fixiert sind. Die Membranen müssen mechanisch gegen Knicken oder Abreißen geschützt werden, um einen Membranbruch zu vermeiden. Die Masse aller einzubringenden Teile ist zu minimieren, damit keine zusätzlichen Unwuchten auftreten.

Im ersten Schritt wurde versucht, analog zur Integration einer pH-Elektrode, das Membranmodul in einem dem Glasgefäß hinzugefügten Stutzen zu fixieren. Dazu wurde eine spezielle Membranhalterung konstruiert, die das Membranmodul am Boden des Schüttelkolbens in die rotierende Flüssigkeit tauchen lässt (Abb. 4.15 und Konstruktionszeichnungen in Anhang D.2). Der Halter wurde zunächst aus Edelstahl gefertigt. Er besteht aus einer Durchführung, die mit einer Überwurfmutter in dem GL45-Glasstutzen und einer Flachdichtung fixiert wird. Das Membranmodul ist mit zwei Kupplungsaufnehmern verbunden, die in die Aufnehmerbohrungen der Durchführung gepresst werden und mit O-Ringen die Durchführung abdichten. Diese Anordnung birgt verschiedene Nachteile, die dazu führten den Ansatz nicht weiter zu verfolgen:

1. Die eingebrachte Masse belastet den Schüttelkolben mechanisch und die Handhabung ist erschwert.
2. Der Stutzen muss, um eine Abdeckung mit einem Verschluss für Norm-Gewinde zu gewährleisten, weit nach außen gezogen werden (Zeichnung siehe Anhang D.2).

Es entsteht dadurch ein unerwünschter Totraum.

3. Der Arbeitsaufwand bei der Zusammensetzung der sterilen Durchführung wird angesichts einer Vielzahl paralleler Gefäße als zu groß angesehen.
4. Steriltests verliefen mit der vorgestellten Halterung bereits nach ein bis zwei Tagen negativ (Durchführung vgl. Abschnitt 5.3.3). Die Ursache wird in einer mangelnden Abdichtung am Verschluss des GL45-Glasstutzens vermutet.

Alternativ wurde eine Möglichkeit untersucht, das Membranmodul am Gefäßboden über die Sterilkappe im Zentrum des Schüttelkolbens zu fixieren. Abb. 4.16 zeigt die für diese Integrationsanordnung notwendigen Elemente sowie einen Schüttelkolben mit einem auf diese Weise integrierten Membranmodul. Die Kopplung der Hohlfasermembranmodule an Hohlschrauben der PTFE-Schläuche, die von der Pumpe Akzeptormedium und das Probensegment dem Sensor zuführen sollen, erfolgt über zwei 1/4" 28G UNF Kupplungsschrauben (Beschriftung (a) in Abb. 4.16) aus V4A Stahl. Auf jeder Seite sorgt ein O-Ring (Viton) (b) für zusätzliche Abdichtung. Eine Nut in den beiden Kupplungen ermöglicht ihre Verbindung (Kabelbinder), so dass die angeschlossene Hohlfasermembran eine Öse bildet (c). (g) zeigt die Einzelteile des Hohlfasermoduls. Ein kegelförmiger Silikonstopfen (d) wird mittels einer Bohrung mit demselben Kabelbinder zusätzlich am Modul befestigt und bildet so eine Stützfläche. Die Membranöse reicht von dieser Stützfläche auf den Gefäßboden und so in die Reaktionslösung. Die PTFE-Schläuche werden durch das Silikon-Septum in der Metallkappe des Kleinreaktionsgefäßes geführt (e), das dem sterilen Einbringen von Kanülen der parallelen Mikrodosierung dient. An einem V4A-Draht (f), der ebenfalls im Septum der Sterilkappe befestigt wird, wird das Membranmodul durch Einstecken des Drahts in den Silikonstopfen befestigt. Das Silikon haftet am Glasboden und fixiert das Modul zusammen mit dem Draht im Zentrum des Schüttelkolbens. Das Modul mit den Stahlkupplungen schlägt bei der Schüttelbewegung weder gegen die Gefäßwand, noch reibt es am Glasboden. Diese flexible Konstruktion erlaubt es, den Deckel mit dem Modul vom Kolben abzunehmen. Das Drahtgerüst ist wie das Membranmodul autoklavierbar.

Mini-Blasensäule

Beim Entwurf einer Integrationstechnik eines Membranmoduls in Mini-Blasensäulen ist darauf zu achten, dass sich die aufsteigenden Gasblasen nicht in der Halterung des Moduls sammeln und so ein Teil der Membranoberfläche nicht mehr benetzt wäre. Wie im Schüttelkolben wird das Membranmodul als Öse über das Septum in der Sterilkappe in die Reaktionslösung in der Blasensäule getaucht. Zeigt die Öse des Membranmoduls senkrecht nach unten, so bietet sich die geringste Fläche für eine mögliche Anlagerung von Blasen. Auf die stabilisierende Drahtkonstruktion wird verzichtet, da der Silikonstopfen einen Teil des Gasverteilers verdecken würde und damit der Gaseintrag verringert würde. Daher ziehen die verwendeten Kupplungen aus Edelstahl das Modul nach unten. Das Modul schwebt frei und in senkrechter Ausrichtung zum Gasverteiler.

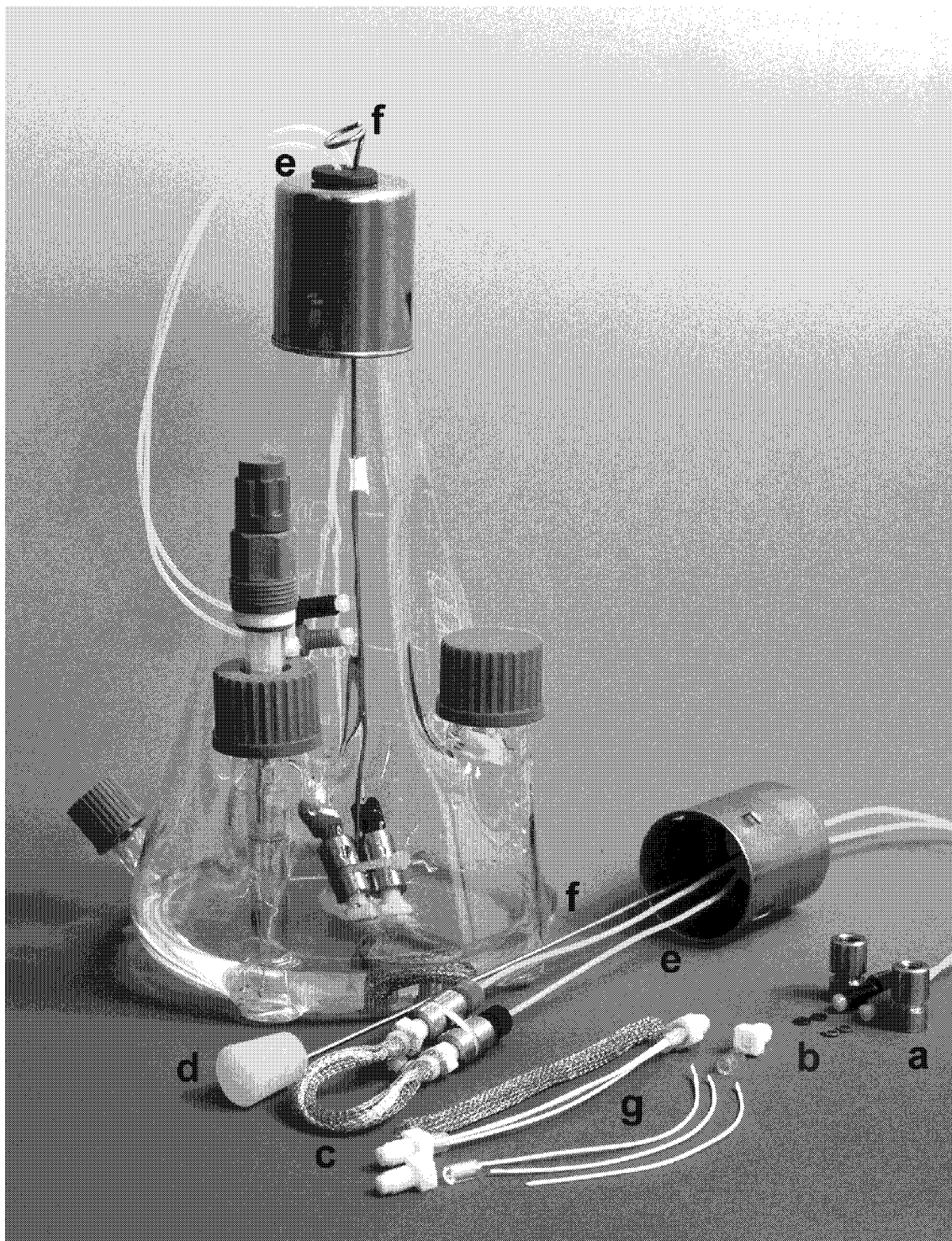


Abb. 4.16: Überblick über die Bestandteile der Integrationstechnik für Membranmodule zur Probenahme in Schüttelkolben mit einem fertig integrierten Modul in einem 1 L Erlenmeyerkolben. (a) Edelstahlkupplung, (b) O-Ringe (Viton), (c) Hohlfasermodul als Öse zusammengefasst, (d) Fuß der Halterung (Silikonstopfen), (e) Silikon-Septum, (f) V4A-Draht, (g) Einzelteile des Hohlfasermoduls

4.4.3. Steuerung der parallelen Probenahme- und Messtechnik

Steuerungs- Auswertungs und Datenerfassungssoftware

Die Automatisierung der Probenahme- und Messtechnik erfolgt durch einen Prozessrechner mit angepasster Steuerungs- und Datenerfassungssoftware. Als flexible, individuell programmierbare Plattform wurde das grafische CAE-Software-Tool FLOWCHART® (DASGIPmbH, Jülich) verwendet. Das auf dieser Grundlage erstellte Programm „analyze-pro“ zur Ablaufsteuerung der Probenahmen, Messdatenerfassung und parallelen Substratregelung wurde von DASGIPmbH nach einem zuvor erstellten Pflichtenheft programmiert.

Das Programm erfüllt folgende Aufgaben:

- Steuerung des Multiventilmoduls zur Realisierung der Fließdiffusionsanalyse
- Erfassung des Biosensorsignals bei Durchfluss des Probensegments
- Simultan zur Datenerfassung: Signalauswertung (Maximum, Sattelsignal)
- Substratregelung: Verarbeitung der Regelgröße über Regelalgorithmus und Ansteuerung der präzisen Mikrodosiertechnik
- Kontinuierliche Erfassung der Temperatur im Inkubator
- Kontinuierliche Erfassung des Drucks in den Fluidleitungen zur Identifizierung von Leckagen
- Visualisierung der erfassten Daten auf der Benutzeroberfläche

Die wichtigsten Funktionskomponenten sollen näher erläutert werden.

Ventilsteuerung

Bei der Konzeption der Ventilsteuerung war die Randbedingung zu beachten, dass aus technischen Gründen zu einem Zeitpunkt nur ein Ventil am Multiventilmodul geöffnet werden kann. Die Zeitdauern der Diffusion und der Durchströmung zum Zweck des Proben transports zum Detektor können über die Benutzeroberfläche der Software für jede der parallelen Strecken individuell eingestellt werden. Durch diese Flexibilität der Zeitsteuerung können Dialysezeiten je nach Konzentrationsbereich der Reaktionslösung und/oder der Sensitivität des verwendeten Biosensors angepasst werden. Beispielsweise können bei hoher Empfindlichkeit des Sensors und/oder hoher Analytkonzentration kurze Dialysezeiten gewählt werden. Es stehen prinzipiell zwei Arten des Anlagenbetriebs zur Verfügung, ein zeitflexibles „Sukzessiv“- und ein zeiteffizientes „Effektiv“-Programm. Diese werden im Folgenden näher erläutert:

„Sukzessiv“-Programm

Tab. 4.3 zeigt den Ablauf eines für den Anwender sehr flexiblen Steuerprogramms, das Sukzessiv-Programm. Die Dauer der Probenahme bis zur Messwertbestimmung addiert sich aus den Zeiten t_{vor} , t_{stop} und t_{mess} (vgl. Abb. 4.1):

t_{vor}	Vorspülzeit - Segment mit zeitlich undefiniert diffusiv akkumulierter Analytkonzentration wird aus der Membran entfernt. Herstellung eines definierten Grundzustands.
t_{stop}	Diffusionsdauer
t_{mess}	Zeitdauer zur Erfassung des charakteristischen Peaks.

Tab. 4.3: Ablaufschema Sukzessivprogramm

Zeit [s]	60-90	10-240	40-90	60-90	10-240	40-90	60-90	10-240	40-90
Gefäß 1	VOR	STOP	MESS						
Gefäß 2				VOR	STOP	MESS			
Gefäß 3							VOR	STOP	MESS
Gefäß 4									

VOR Vorspülzeit t_{vor}

STOP Dialyse-(Stop-)zeit t_{stop}

MESS Messzeit t_{mess}

Tab. 4.4: Ablaufschema Effizienzprogramm

Zeit [s]	40-90	40-90	40-90	40-90	40-90	40-90	40-90	40-90
Gefäß 1	MESS	STOP			MESS	STOP		
Gefäß 2	STOP	MESS	STOP			MESS	STOP	
Gefäß 3	STOP		MESS	STOP			MESS	STOP
Gefäß 4	STOP			MESS	STOP			MESS

STOP Dialyse-(Stop-)zeit t_{stop}

MESS Messzeit t_{mess}

Für eine Anzahl von n parallelen Messstrecken ergibt sich daher die Messfrequenz (f_{MS}) der Messstrecke zu:

$$f_{MS} = \frac{1}{(t_{vor} + t_{stop} + t_{mess}) \cdot n}$$

Bei einer konservativen Konfiguration von 60 s für jede der Zeitdauern bedeutet dies bei $n=4$ parallelen Gefäßen ein Messintervall von $\frac{1}{f_{MS}}=12$ min. Für die Online-Messung in Bioprozessen nähert sich dieser Wert der Zeitkonstanten und ist für das Abtasten einer Regelgröße zu groß. Das Sukzessivprogramm ist für Anwendungen gedacht, bei welchen eine Messung bei unterschiedlichen Diffusionszeiten in den verschiedenen Gefäßen durchgeführt werden soll, denn dazu ist eine Spülung vor Beginn der Diffusionsdauer notwendig.

„Effizienz“-Programm

Die zur Reduktion der Abtastzeit zu bevorzugende Variante ist das Effizienzprogramm. Die Messzeit eines Gefäßes stellt die Vorspülzeit für den nächsten Probenahmezyklus dar. Es ergibt sich eine Diffusionsperiode wenn die soeben gemessene Strecke auf ihren nächsten Messzyklus wartet. Tab. 4.4 veranschaulicht das Ablaufprinzip.

Die Messfrequenz ergibt sich daher zu:

$$f_M = \frac{1}{t_{mess} \cdot n}$$

Nachteil der Verfahrensweise ist, dass die Effizienzsteigerung nur mit Einschränkung der Flexibilität möglich ist. Die minimal einstellbare Diffusionszeit kann nur in Abhängigkeit von der Messzeit und der Anzahl der Gefäße variiert werden. Die minimale Probenahmezeit pro Gefäß ergibt sich gemäß $t_{stop} = (n - 1) \cdot t_{mess}$ aus den Messzeiten aller n anderen Gefäße, die parallel beprobt werden.

Für die Untersuchungen, deren Ergebnisse in Kapitel 5 und 6 dargestellt sind, wurde hauptsächlich das Effizienzprogramm genutzt.

Konfiguration der Zeiten

Die Diffusionszeit t_{stop} wird, gemäß der Kenntnisse des Anwenders über den Stoffübergang, am verwendeten Membranmodul und dem Messbereich des Biosensors eingestellt. Die Spül- und Messzeit wird gemäß der Dimensionierung des Fließsystems und so nach der Verweilzeit des undefiniert angereicherten Segments (Spülphase) oder des Probensegments (Messphase) vom Membranmodul zur Sensorzelle bei gegebenem Volumenstrom bemessen. Konkret soll die Spülphase so lange andauern, bis sich der Gleichgewichtszustand der Dialysekonzentration bei konstanter Durchströmung am Sensor eingestellt hat.

Die Messzeit definiert sich anhand des für die Auswertung notwendigen Merkmals der Signal-Zeit-Kurve: z.B. Peakmaximum, maximale Steigung der Vorderflanke oder Fläche. Bei einem Volumenstrom von beispielsweise $\dot{V}=2,5$ mL/min beträgt die Messzeit 60 s, bis das Signal die Sattel-Linie erreicht hat. Legt man sich auf die ausschließliche Verwendung des Peakmaximums als proportionale Größe zur Substratkonzentration in der Reaktionslösung fest, so sind Messzeiten von 40 s und darunter möglich.

Online-Datenauswertung

Peakauswertung

Peak-Maximum und Mittelwert werden von m Messwerten des Sattelsignals (erhöhte Basislinie) aus den erfassten Rohdaten des Biosensors ermittelt (vgl. Abb. 4.2). Die Rohdaten werden mit einer Frequenz von 10 Hz aufgezeichnet. Da der Zeitbereich des Auftretens des Peakmaximums nach Start der Messzeit bekannt ist, gibt der Anwender dem Auswertungstool ein Zeitfenster an, in welchem nach dem maximalen Wert gesucht wird. Analog wird der Zeitraum t_{Sattel} für die Sattellinie bestimmt über die gemittelt werden soll. Daher gilt:

$$m = 10\text{Hz} \cdot t_{Sattel}$$

Berechnung der Glucose-Konzentration

Eine Vorkalibrierung wird mit mindestens drei Glucose-Standardlösungen in den parallelen Probenahmestrecken durchgeführt. Aus den Dateien der Peakauswertung muss der Anwender die Glucose-Konzentration gegen das Peakmaximum⁹ auftragen und eine Ausgleichskurve mit einem der möglichen Modelle festlegen. In der Software kann

⁹Als Signalmerkmal wurde zur Auswertung in dieser Arbeit meist das Peakmaximum herangezogen, einige Male auch das Sattelsignal im Abstrom des Peaks. Es ist mit der Software auch möglich, die Fläche und die maximale Steigung der Vorderflanke zu verwenden.

der Benutzer zur Umrechnung zwischen linearer, polynomer (2. Grades) und exponentieller Kalibrierung wählen. Auf der Benutzer-Oberfläche können die Konstanten des gewählten Ausgleichsmodells für jede der parallelen Messstrecken eingetragen werden. Die Glucosekonzentration wird nach Ablauf jeder Messzeit berechnet und steht dann für eine Verwendung durch einen Regelalgorithmus zur Verfügung.

Substratregelung

Derzeit sind zwei Regelalgorithmen zur parallelen Substratkontrolle implementiert worden. Die modifizierte PID-Regelstrategie mit „Anti-Wind-up“-Mechanismus wurde von früheren Arbeiten ([Altenbach-Rehm 2000] und [Arnold 2000]) zur parallelen pH-Regelung übernommen und von [Arnold 2000] angepasst. Die parameteradaptive Regelstrategie mit einem zugehörigen Simulationswerkzeug wurde gemäß den Arbeiten von [Kleman und Chalmers 1991] programmiert [Arnold 2000].

Überwachung des Leitungsdrucks

Der Leitungsdruck des Fließsystems wird ständig überprüft und liegt stets zwischen 150 und 300 mbar. Bei Verstopfung der Membranen oder einem sich nicht öffnendem Ventil steigt der Druck stark an. Bei Überschreitung eines vom Benutzer einstellbaren Wertes wird ein Alarmton ausgegeben bis dieser vom Benutzer abgeschaltet wird. Die Visualisierung des aktuellen Drucks (p-t-Diagramm) auf der Benutzeroberfläche erlaubt das Erkennen von Undichtigkeiten im Schlauchsystem. Der Anwender kann dann Maßnahmen zur Lokalisierung und Behebung des Problems ergreifen.

5. Charakterisierung der parallelen Probenahme- und Messtechnik

Der Begriff der Charakterisierung entstammt der Validierungsprozedur für analytische Methoden [Kromidas 1999]: Die Validierung gibt die Antwort auf die Frage nach der Eignung einer bestimmten Messmethode oder Prüfeinrichtung für eine definierte Aufgabenstellung. Die Charakterisierung hingegen dient der Ermittlung der Leistungs- und Verfahrensmerkmale der analytischen Methode.

Dieses Kapitel umfasst zum einen eine Überprüfung und Beurteilung der Sensitivität der in Kapitel 4 vorgestellten parallelen Probenahme- und Messtechnik auf Variation der Systemparameter. Die Erkenntnisse sollen dazu dienen, optimale Betriebsparameter und Messfehlerquellen zu identifizieren und Messunsicherheit durch entsprechende technische Ausgestaltung des apparativen Aufbaus zu minimieren. Darüber hinaus wird untersucht, ob das technische System die Anforderungen für seine Einsetzbarkeit in Bioprozessen erfüllt.

5.1. Charakterisierung der Messtechnik

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten der identifizierten Einflüsse auf das Signal des in Abschnitt 4.2 vorgestellten Durchflussdetektors behandelt, die Ergebnisse gezielter Untersuchungen präsentiert und diskutiert. Über die Betrachtung der Eigenschaften des amperometrischen Biosensors hinaus wird auf den Einfluss der verwendeten Membranzlänge und die Beschaffenheit des Akzeptormediums auf das Sensorsignal eingegangen.

5.1.1. Sensoren

Der gewählte amperometrische Biosensor stellt die zentrale Schnittstelle zwischen der Probenkonzentration und dem Prozessbeobachter dar. Sein absolutes Messsignal, der Elektrodenstrom, hängt vom Stofftransport des Analyten zu und von der Elektrode ab. Der Stofftransport wird von der Morphologie der Elektrode, der Dauer der Elektrodenpolarisation und der Strömungsgeschwindigkeit des Transportmediums beeinflusst [Štulík und Pacáková 1987].

Konditionierungsdauer vor Experimentbeginn

Bevor ein neuer enzymatischer Biosensor zur Messung bereit ist, muss der Sensor durch Anschluss an die Polarisationsspannungsquelle und Eintauchen in Akzeptorlösung

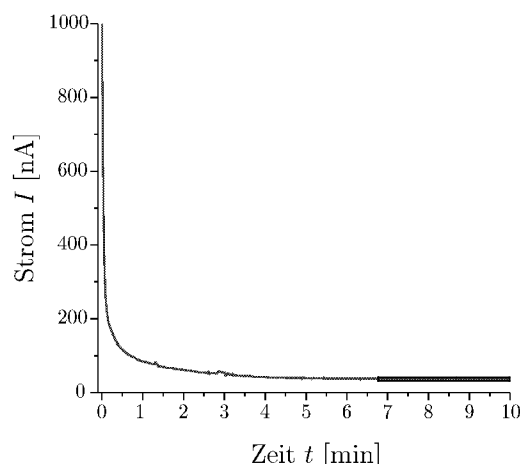


Abb. 5.1: Konditionierungsvorgang des amperometrischen Glucose-Biosensors (Senslab GmbH, Leipzig) unmittelbar nach Anlegen der Polarisationsspannung von -450 mV.

konditioniert werden. Dabei sind zwei Vorgänge für die Dauer bis zum Erreichen der Messfähigkeit entscheidend [Gründig 2000]:

1. das Poly(carbamoyl)sulphonat-Hydrogel, in dem das Enzym immobilisiert ist, muss in der Pufferlösung quellen¹; dadurch verbessern sich die Diffusionseigenschaften der Quellschicht, was den Stofftransport des Sekundäranalyten H_2O_2 zur Elektrode und somit auch das dynamische Verhalten beeinflusst.
2. der Elektrodenstrom strebt beim Konditionieren einem konstanten Polarisationszustand zu: unmittelbar nach Anlegen der Polarisationsspannung, also Spannungsänderung von 0 auf -450 mV, fließt ein sehr hoher Strom an der Elektrode, der mit fortschreitender Zeit allmählich abklingt und seinen, bei dieser Spannung stationären Wert², den Grundstrom, anstrebt (siehe Abb. 5.1).

Vom Hersteller wird eine Konditionierungszeit von 30 min angegeben. Nach Untersuchungen mit einer Vielzahl von Sensoren, war eine Konditionierungszeit von mindestens 2 h und länger erforderlich. Der Grundstrom des Sensors betrug dann zwischen 2,0 und 10,0 nA.

Dynamisches Verhalten

Die Kenntnis des Zeitverhaltens ist zur Beurteilung der Eignung des Sensors für die Messung von sich rasch ändernden Konzentrationen im Akzeptorstrom von großer Bedeutung [Štulík und Pacáková 1987]. Der Sensor muss während der Verweilzeit des

¹Die Sensoren werden in gut verschlossenen Aluminiumfolien geliefert in welchen kleine feuchte Schwämmchen die Enzymschicht bedecken. Dennoch trocknet die Matrix mit längerer Lagerzeit aus.

²Der absolute Strom resultiert aus der Elektrolytkonzentration im Trägermedium, in diesem Fall 0,1 M KCl und den in der Lösung enthaltenen leitfähigen Verunreinigungen.

Probensegments in der Sensorzelle ein reproduzierbares und rauscharmes Signal liefern können. Übliche Kenngrößen für das Zeitverhalten von Sensoren sind die Zeiten t_{10} und t_{90} . Sie bezeichnen die Zeitdauern nach sprunghafter Änderung der Messgröße, nach der 10 % bzw. 90 % (siehe Indizes) des stationären Sensorsignals erreicht werden.

Ausgehend von reiner Akzeptorlösung wird zur Messung des dynamischen Sensorverhaltens eine stufenförmige Konzentrationsänderung im konstantem Volumenstrom ($\dot{V}=0,5$ mL/min) erzeugt. Es wurde ein geringer Volumenstrom gewählt, um das Sensorverhalten konservativ zu untersuchen.

In Abb. 5.2 sind die Ergebnisse für verschiedene Konzentrationsstufen dargestellt, wobei jeweils die gemittelte Kurve aus drei Messungen ($n=3$) bei Raumtemperatur (T_R) aufgezeichnet ist. Das Sensorsignal wurde mit dem maximalem Signal (I_{max}) normiert. Dadurch ergibt sich eine F-Kurve, wie sie zur Ermittlung der Verweilzeit in Reaktoren bei Aufgabe von Stufenfunktionen verwendet wird. Die schattierte Fläche A entspricht bei dieser Betrachtung der mittleren Verweilzeit im System. Diese Betrachtung ist trotz der zeitbehafteten Messmethode sinnvoll, da das Sensorsignal das Zielprodukt des „Reaktors“ Detektorzelle ist.

Bei der so ermittelten mittleren Verweilzeit von $19 \text{ s} \pm 3 \text{ s}$ in der Detektorzelle wird eine Signalthöhe aus dem dynamischen, steil ansteigenden Bereich der Zeit-Antwort-Kurve unterhalb des stationären Bereich erreicht, die um ein Vielfaches über der Rauschamplitude des Signals liegt. Bei exaktem Einhalten der Strömungsgeschwindigkeit ist ein reproduzierbares Signal zu erwarten.

Die ermittelten Kenngrößen t_{10} und t_{90} sind in Tab. 5.1 zusammengestellt. $t_{10} = 8,0 \pm 5,2 \text{ s}$ und $t_{90} = 34,1 \pm 9,7 \text{ s}$ streut. Die Untersuchungen werden über mehrere Tage verteilt durchgeführt. Eine Zeitabhängigkeit der Antwortfunktion wird aus den Ergebnissen deutlich. Bei der Verwendung des Sensors über längere Zeitdauern, z.B. bei Prozessen über mehr als zwei Tage, ist eine Rekalibrierung notwendig.

Stationäres Verhalten

Bei der Durchführung der FDA stellt sich nach der Passage des diffusiv angereicherten Probensegments eine konstante Analytkonzentration im Trägerstrom ein („Konti-Dialyse-Effekt“, vgl. Abschnitt 4.1.1). Diese Konzentration ist proportional zur Konzentration in der Reaktionslösung. Die Proportionalität ist abhängig vom Gradienten und dem Volumenstrom. Daher wird das Verhalten des Sensors bei einer konstanten Glucose-Konzentration im Akzeptorstrom untersucht, um das Ausmaß des Messrauschens und den Messbereich des Sensors abschätzen zu können.

Abb. 5.3a. zeigt das stationäre Signal des Biosensors bei Anströmung mit Glucose-Standardlösung mit konstantem Volumenstrom ($\dot{V}=0,5$ mL/min) und die Auftragung des mittleren Stromsignals gegen das Konzentrationsniveau. Das Messrauschen ist mit einer maximalen Abweichung von $\pm 1,1 \text{ nA}$ und mit einem Basislinienrauschen von $\pm 0,7 \text{ nA}$ sehr gering. Die Standardabweichung σ des Sensorsignals wird zu $1,1 \text{ nA}$ angenommen und damit die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification-LOQ) gemäß

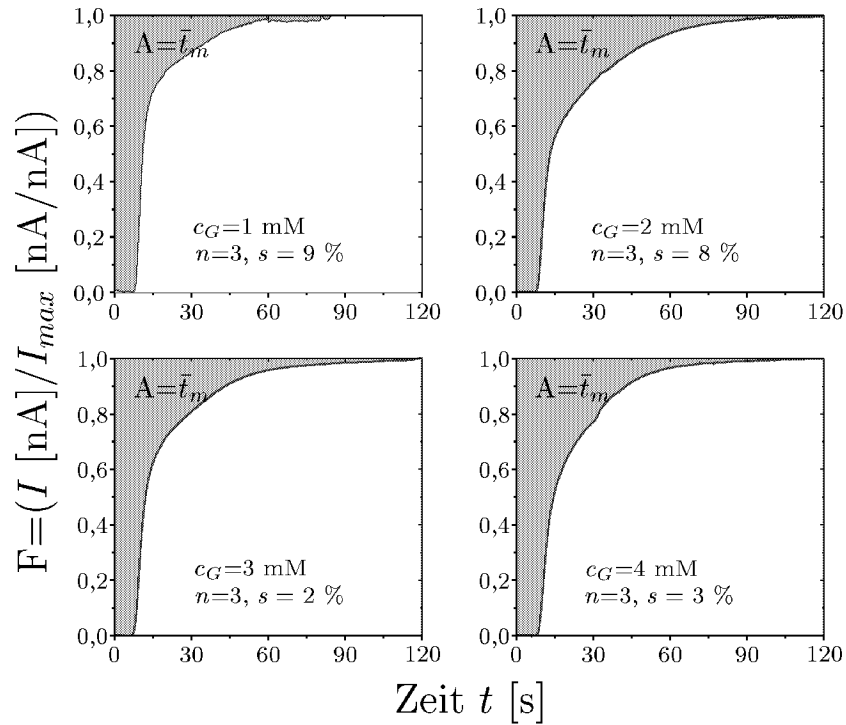


Abb. 5.2: Normiertes Zeitverhalten (F-Kurven) des enzymatischen Glucosesensors mit amperometrischem Messprinzip bei Aufgabe einer Stufenfunktion mit verschiedenen Glucoselösungen (c_G). Mittlere Antwortfunktionen je Konzentration ($n=3$) bei $\dot{V}=0,5$ mL/min, $T=T_R$, s relative Standardabweichung. Aus A (graue Fläche) wird die mittlere Verweilzeit ($\bar{t}_m$) in Tab. 5.1 ermittelt.

Tab. 5.1: Ergebnisse der Untersuchungen des Zeitverhaltens des amperometrischen Glucose-Biosensors aus Abb. 5.2. $n=3$, $\dot{V}=0,5$ mL/min, $T=T_R$

c_G [mM]	n [-]	t_{10} [s]	σ [s]	t_{90} [s]	σ [s]	$\bar{t}_m$ [s]	σ [s]	Tag [-]
1	3	7,5	$\pm 0,1$	34,0	$\pm 4,2$	17,1	$\pm 2,4$	1
2	3	7,9	$\pm 0,3$	48,9	$\pm 8,5$	21,6	$\pm 3,6$	4
3	4	7,3	$\pm 0,3$	41,7	$\pm 1,0$	19,3	$\pm 0,6$	4
4	3	8,4	$\pm 0,3$	41,4	$\pm 0,5$	17,8	$\pm 3,8$	5
Mittelwert	13	7,7	$\pm 0,5$	41,5	$\pm 6,5$	19,0	$\pm 2,9$	-

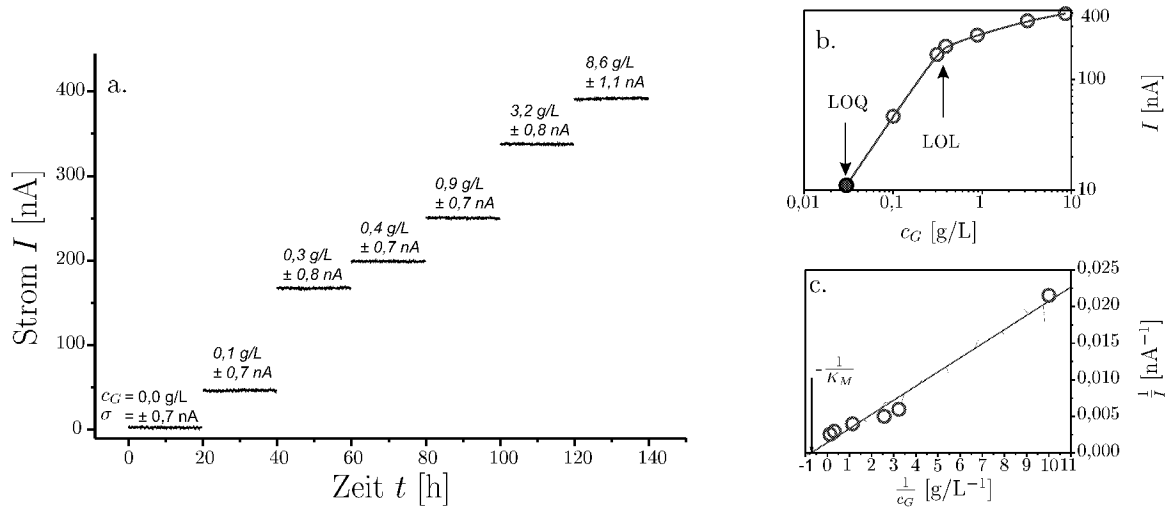


Abb. 5.3: Stationäres Signal über eine Standardreihe. a.: Anströmung des Sensors mit Glucose-Standardlösung (c_G) in Akzeptormedium mit $\dot{V} = 0,5$ mL/min. Mittelwerte und Standardabweichung (σ) berechnet über je 20 s (Datenaufnahmefrequenz 10 Hz) b.: Mittelwert des Stromsignals in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration. LOQ nicht gemessen, sondern berechnet aus Standardabweichung (siehe Text). c.: Lineweaver-Burk-Auftragung; Anpassungsgerade $R^2=0,986$, scheinbarer $K_M=0,74$ g/L=4,1 mmol/L

der Regel $LOQ = l \cdot \sigma$ berechnet, wobei $l = 10$ [Skoog und Leary 1992]³. Der lineare Messbereich (LOQ bis LOL - Limit of Linearity) des untersuchten Sensors liegt demnach und gemäß Abb. 5.3b. im stationären Fall zwischen 0,03 und 1,00 g/L.

Chargenunterschiede

Obwohl die Sensoren durch eine Druckpastentechnik auf miniaturisierte Träger reproduzierbar gefertigt werden können, kann es Varianzen bezüglich Elektrodenoberfläche und Gelschichtdicke sowie Enzymaktivität und tatsächlicher Beladung des Sensors geben [Gründig 2000]: Die Elektroden werden beim Hersteller in Chargen gefertigt und werden unter Angabe einer Lot-Nummer geliefert⁴.

Abb. 5.4 zeigt eine stationäre Kalibrierung zweier Sensoren aus unterschiedlichen Chargen. Die Sensoren werden mit Glucose-Standardlösung (gelöst in luftgesättigtem Akzeptormedium), mit konstantem Volumenstrom ($\dot{V}=0,5$ mL/min) angeströmt. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Empfindlichkeit bis 0,4 g/L ähnlich ist. Die Enzymelektroden zeigen einen unterschiedlichen Sättigungsstrom, was durch eine unterschiedliche Enzymbeladung verursacht werden kann (vgl. Abb. 3.9 S. 3.9).

³Die Nachweisgrenze (Limit of Detection-LOD) wird mit $l \in \{3, 4, 5\}$ analog zum LOQ berechnet.

⁴Die Sensoren werden für die vorliegende Aufgabenstellung, vor allem wegen Vorgaben des Messbereichs gesondert vom Hersteller angefertigt, wodurch keine Angaben über die Streubreite der Empfindlichkeit möglich sind. Bei ähnlich gefertigten Sensoren, die für eine Anwendung in einem Handmessgerät vorgesehen sind, wird eine relative Abweichung von 50 % genannt [Gründig 2000]

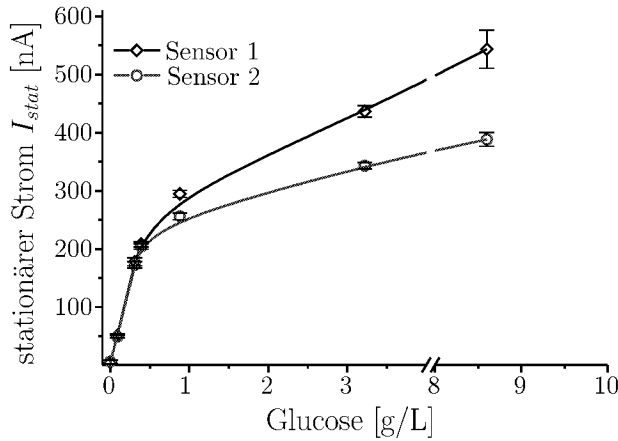


Abb. 5.4: Vergleich des stationären Sensorsignals von zwei Glucose-Biosensoren aus zwei unterschiedlichen Chargen bei konstanter Anströmung ($\dot{V}=0,5$ mL/min) mit Glucose-Standardlösung in Akzeptormedium, $n=3$, $T=T_R$.

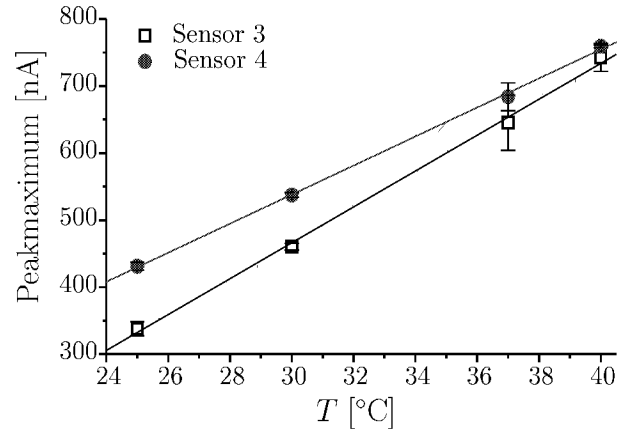


Abb. 5.5: Chargenunterschiede werden anhand der Empfindlichkeit auf Temperaturänderung sichtbar: $t_{stop}=3$ min, $\dot{V}=2,5$ mL/min, 5 g/L Glucose

Bei Variation der Temperatur von Flüssigkeit, Membran und Sensorzelle wird FDA ($t_{stop}=3$ min) mit einem Hohlfasermembranmodul in einer 5 g/L Glucose-Standardlösung mit zwei simultan im Array eingesetzten Glucose-Sensoren durchgeführt. Gemäß Abb. 5.5 zeigen sich Unterschiede in der Temperaturempfindlichkeit der beiden Sensoren. Es lässt sich daraus schließen, dass keine allgemein gültige Beziehung für eine Temperaturkompensation angegeben werden kann. Bei jedem neu verwendeten Sensor muss daher eine Kalibrierung bei der gewählten Versuchstemperatur durchgeführt werden.

Sensorarrays

Mittels der in Abschnitt 4.2 beschriebenen und in Abb. 4.9 gezeigten Doppeldurchflusszelle können mindestens zwei amperometrische Biosensoren simultan betrieben werden. Eine Serienschaltung weiterer Zellen ist ohne großen technischen Aufwand möglich. Da den Sensoren stets das gleiche amperometrische Messprinzip, Detektion von H_2O_2 , zugrunde liegt, stellt sich die Frage, inwieweit eine Querbeeinflussung der Sensoren durch Absonderung dieses Sekundäranalyten in das Trägermedium gegeben ist.

Um dies zu prüfen, wird ein Glucose- und ein Lactat-Sensor simultan im Sensorarray verwendet und FDA in reinen und gemischten Standardlösungen durchgeführt ($t_{stop}=3$ min). Die Ergebnisse in Abb. 5.6 lassen keine Querempfindlichkeit erkennen.

5.1.2. Membranlängen

Die Länge der Hohlfaser-Membranmodule bestimmt die Länge des Probensegments. In der gegebenen Geometrie des Schlauchsystems bis zur Sensorzelle sorgt die Dispersion für eine reproduzierbare Rückvermischung. Das Antwortsignal des Sensors auf Konzen-

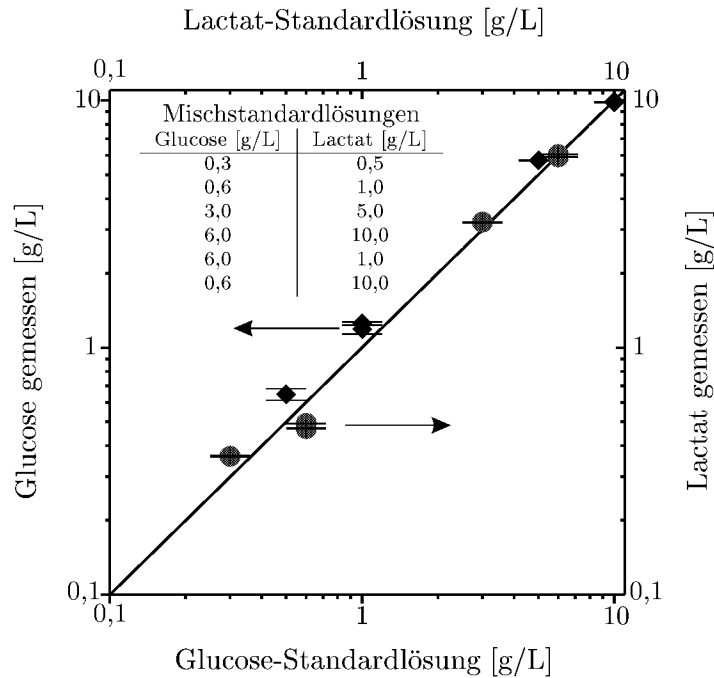


Abb. 5.6: Vergleich der FDA in verschiedenen Mischstandardlösungen mit einem Glucose-Biosensor und einem Lactat-Biosensor im Array. Sensoren zuvor kalibriert in reiner Standardlösung. $n=3$, $t_{stop}=3$ min, $T=T_R$

trationsänderungen im Akzeptorfluid ist wie oben dargelegt im ersten Reaktionsschritt von der Diffusion des Analyten aus dem vorbeifließenden Probensegment in die Enzymschicht abhängig. Das Ausmaß der dabei vom Enzym umsetzbaren Menge ist u.a. von der Kontaktzeit am Sensor abhängig. Die Länge des Moduls entspricht im Prinzip dem Volumen der Probenschleife eines Injektionsventils in einem Chromatographie- oder FIA-System.

Der Zusammenhang zwischen Modullänge und Peakmaximum ist in Abb. 5.7 aufgezeichnet. Ab einer Länge von mehr als 10 cm scheint am Sensor die Kontaktzeit nicht der limitierende Faktor des Umsatzes zu sein. Eine Vergrößerung von 10 auf 15 cm bewirkt keine weitere Änderung der Empfindlichkeit. Die Diffusionsgeschwindigkeit am Sensor könnte der geschwindigkeitslimitierende Schritt sein. Die praktische Bedeutung dieser Erkenntnis wäre, die Membranmodule stets länger als 10 cm zu fertigen, um so die Zahl der Einflussparameter zu verringern.

Kürzere Module können dagegen zur Einstellung des Messbereichs des Sensors verwendet werden. Der Anwender sollte für den in seinem Prozess abgedeckten Konzentrationsbereich vor dem Experiment die für den jeweiligen Sensor geeignete Länge empirisch festlegen. Aus den Untersuchungen wird deutlich, dass sich die Reproduzierbarkeit mit sinkender Länge nicht verschlechtert. Die relative Standardabweichung beträgt bei Dreifachbestimmung stets $< 5\%$. So kann ein 2 cm langes Modul ohne Verlust an Genauigkeit verwendet werden.

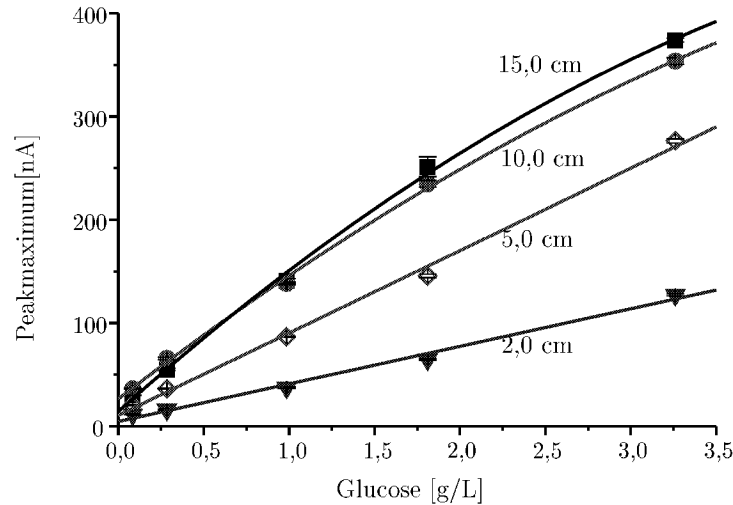


Abb. 5.7: Einfluss der Membranlängen auf die Sensorantwort. $n=3$, $t_{stop}=3$ min, $T=T_R$.

5.1.3. Zusammensetzung des Akzeptormediums

Die Diffusion bei der Probenahme ist nicht nur ein einseitiger Prozess in Richtung des Membraninneren, sondern es gehen auch Bestandteile des Akzeptormediums in die Prozesslösung über. Das Akzeptormedium erfüllt zwei Funktionen:

1. Zum einen sorgt es für den Ausgleich von pH-Unterschieden zwischen Akzeptormedium und Prozesslösung - die immobilisierte Glucose-Oxidase muss bei pH Werten zwischen 6,0 und 7,0 (Optimum 6,5) betrieben werden.
2. Zum anderen sichert ein Elektrolyt die Leitfähigkeit zwischen den elektrochemischen Elektroden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird 0,1 M Phosphatpuffer versetzt mit 0,1 M KCl verwendet. Bei einer niedrigen Phosphatkonzentration im Medium würde über die Membran eine Phosphat-„Dosierung“ erfolgen und u.U. das Prozessergebnis dadurch beeinflusst. Vor jeder Anwendung sollte daher geprüft werden, ob der Puffer für das verwendete biologische System unter diesem Gesichtspunkt geeignet ist. Die durchgeführten Wachstumstests zeigten keine wachstumsfördernde Wirkung bei *Escherichia coli* K12 (Abschnitt 5.3.4).

Abb. 5.8 zeigt die Sensorantwort bei Durchführung von zwei FDA ($t_{stop}=3$ min) in 5 g/L Glucose-Lösung (gelöst in H₂O (bidest.)) mit fünf verschiedenen Akzeptorlösungen. Die zugehörige Tabelle beinhaltet die Zusammensetzung und die pH-Werte der verwendeten Akzeptorlösungen. Die Ergebnisse zeigen, dass der gemessene Strom bei gleicher Glucosekonzentration von der KCl-Konzentration abhängt. Das Leitungswassers enthält zwar eine Hintergrundkonzentration verschiedener Salzionen, diese reichen entweder für ein stabiles Signal nicht aus oder die Störungen werden von elektroaktiven Substanzen verursacht.

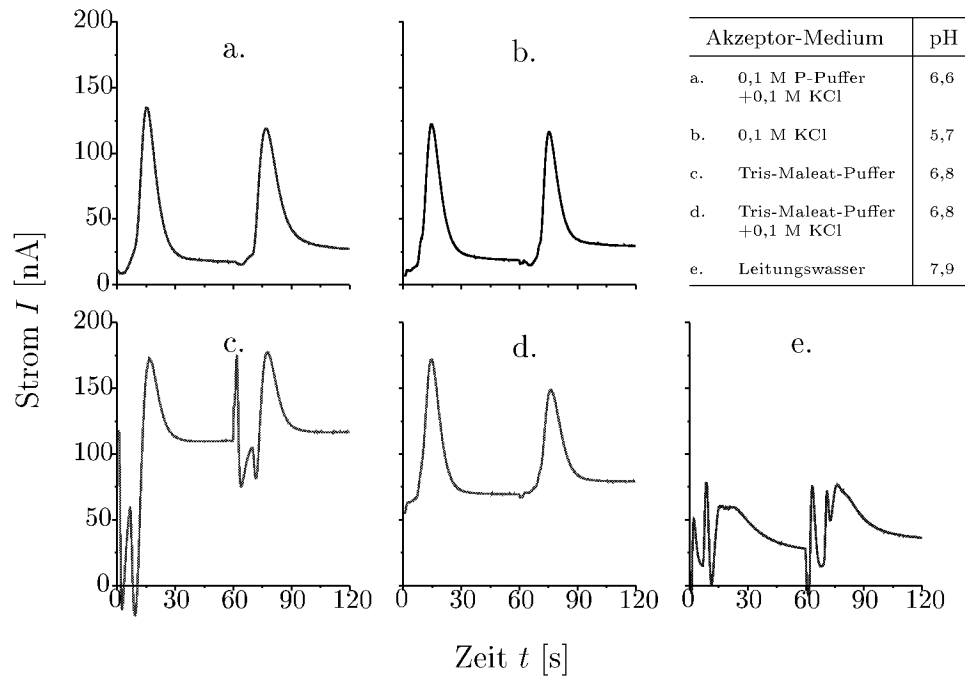


Abb. 5.8: Einfluss des Akzeptormediums auf das Sensorsignal: je 50 mL 5 g/L Glucose-Standardlösung in 500 mL Schüttelkolben bei 150 Upm, zwei parallele Membranmodule, $t_{stop}=3$ min, $\dot{V}=2,5$ mL/min, $T=T_R$

Bei Verwendung des Tris-Maleat-Puffers (TRIS) ist das Signal nur unter Zusatz von KCl störungsarm. Der Grundstrom des Sensors steigt im Vergleich zu Phosphat-Puffer deutlich an, dies jedoch ohne Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. Das Signal ist dem Grundstrom entsprechend erhöht.

Wird ein Ersatz des bisher verwendeten Phosphatpuffers für den Anwendungsfall gewünscht, sind alternativ einsetzbare Pufferlösungen noch zu identifizieren und zu testen. Citrat-, BES⁵- und MOPS⁶-Puffer kommen dazu in Frage. Dabei ist auf die Zugabe eines geeigneten Elektrolyten zu achten. Abgesehen von Cl^- können als Elektrolyt auch andere Halogenide eingesetzt werden. [Gründig 2000]

5.1.4. Sauerstoffkonzentration im Akzeptormedium

Bei der Verwendung eines Glucose-Biosensors mit immobilisierter Glucose-Oxidase muss stets eine ausreichende Sauerstoffkonzentration im Akzeptormedium vorhanden sein, da Sauerstoff während der enzymatischen Umsetzung der Glucose verbraucht wird (siehe Gleichung 3.24 S. 35).

Während der Kultivierung von *E. coli* im Schüttelkolben⁷ hat sich durch Messungen mit einer pO_2 -Elektrode gezeigt, dass die Sauerstoffkonzentration in der exponentiellen

⁵N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure

⁶3-[N-Morpholino]propansulfonsäure

⁷50 mL in 500 mL Erlenmeyer mit zwei Schikanen

Wachstumsphase dauerhaft 0 % betragen kann. Es ist möglich, dass in einem solchen Fall dem Akzeptormedium während der Stop-Phase Sauerstoff über die Hohlfasermembran diffusiv entzogen wird. Es ist daher zu überprüfen, ob sich dieser Sauerstoffmangel im Probensegment auf die Biosensor-Messung negativ auswirkt.

Die Enzym-Immobilisierungsmatrix Poly(carbamoyl)sulphonat-Hydrogel des verwendeten Biosensors hat einen hohen Wassergehalt und begünstigt so den Sauerstofftransfer durch die Matrix [Muscat u. a. 1995]. Der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff ist in hydrophilen Gelmembranen drei bis vier mal größer als der der Glucose ($D_O \approx 3,4 \cdot D_G$) [Schulmeister und Scheller 1985]. Der durch die Enzymreaktion verbrauchte Sauerstoff wird an der Elektrodenoberfläche stöchiometrisch regeneriert (Gl. 3.25 S.35). Verlust tritt ausschließlich durch laterale Diffusion in der Gelschicht auf.

Um den Sauerstoffverbrauch an der Elektrode zu messen, wird ein Biosensor nicht mit der sonst üblichen Polarisationsspannung von -450 mV für die Detektion von H_2O_2 sondern mit +600 mV polarisiert. Das Stromsignal der daraus resultierenden Reduktion von Sauerstoff an der Elektrode wird im fließenden Akzeptormedium ($\dot{V}=2,5$ mL/min) gemessen. Der Sensor wird mit prozessluftgesättigter Lösung auf 100 % und mit stickstoffentgaster Lösung auf 0 % kalibriert. Zunächst wird das stationäre Stromsignal bei Kontakt mit luftgesättigter Akzeptorlösung aus dem Bypass aufgenommen. In einem Schüttelkolben mit integriertem Hohlfasermembranmodul wird Akzeptorlösung durch das Einblasen von Stickstoff vollständig entgast und Fließdiffusionsanalyse durchgeführt. Abb. 5.9 zeigt die Ergebnisse für a. 1 min und b. 3 min Dialysezeit (t_{stop}). Es ergibt sich eine minimale relative Sauerstoffkonzentration bei einer Dialysezeit von 3 min von 55 %.

Im nächsten Schritt soll abgeschätzt werden, ob die unvollständige Sauerstoff-Sättigung die Messung beeinträchtigt. Für eine konservative Berechnung wird ein maximaler Strom des Biosensors von 1000 nA angenommen, dieser Wert wird von den verwendeten Sensoren kaum erreicht. Für den Diffusionsgrenzstrom der Umsetzung von H_2O_2 an der Anode gilt das Faraday'sche Gesetz nach [Scheller 1992]:

$$I_d = n \cdot A \cdot F \cdot D_H \cdot \frac{[H_2O_2]}{d_E} \quad (5.1)$$

wobei $n=2$ die Anzahl der ausgetauschten Ladungen, $F=9,6485 \cdot 10^4$ C/mol die Faradaykonstante, $D_H=4,01 \cdot 10^{-6}$ cm²/s der Diffusionskoeffizient von H_2O_2 [Schulmeister und Scheller 1985], $A=0,02$ mm² die Elektrodenoberfläche, und $d_E=0,33$ mm die Schichtdicke auf der Elektrode ist⁸.

Aus Gleichung 5.1 errechnet sich die H_2O_2 -Konzentration und damit die nötige O_2 -Konzentration zu 21,3 µmol/L. Bei beispielsweise 40°C beträgt die in wässrigem Medium gelöste Sauerstoffkonzentration rund 1030 µmol/L [Chmiel 1991]. Selbst bei einer Reduktion um 50 % auf etwa 515 µmol/L liegt Sauerstoff im 24fachen Überschuss vor.

⁸Werte für A und d_E aus Herstellerangaben [Gründig 2000]

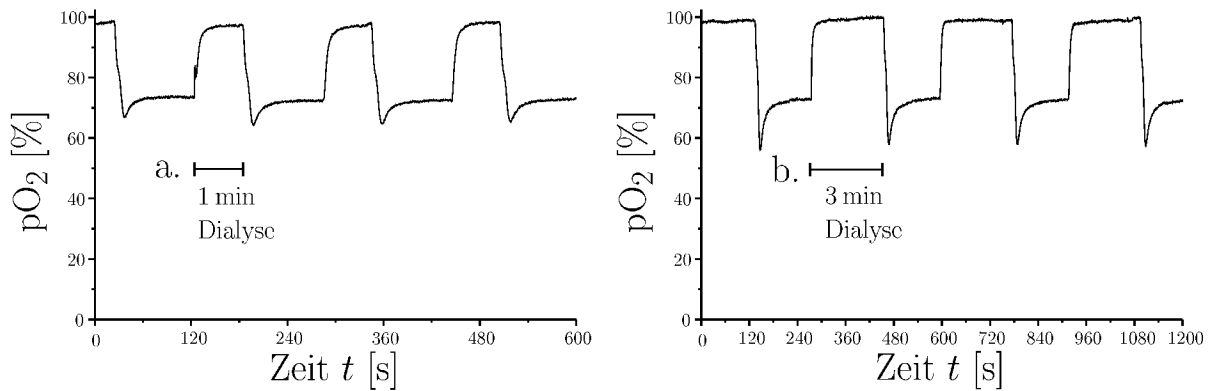


Abb. 5.9: Überprüfung der Sauerstoffkonzentration im Akzeptormedium bei einer Gelöstsauerstoffkonzentration im Fermentationsmedium von 0 % bei einer Probenahmedauer von a. $t_{stop}=1$ min und b. $t_{stop}=3$ min. Ein pO₂ von 100 % entspricht dem Elektrodenstrom bei Anströmung mit sauerstoffgesättigter Akzeptorlösung $\dot{V}=2,5$ mL/min.

Es kann gefolgert werden, dass die enzymatische Umsetzung nicht durch eine geringere Sauerstoffkonzentration als die Sättigungskonzentration bei Versuchstemperaturen bis 40°C beeinträchtigt wird.

5.1.5. Zusammensetzung des Reaktionsmediums

Der amperometrische Biosensor soll unabhängig von der Gegenwart anderer Medienkomponenten den Analyten, die Glucose, spezifisch messen können. In der folgenden Untersuchung wurde der Sensor in einer SIA betrieben. Ihm wurden so Standardlösungen zugeführt, die in verschiedenen Medien gelöst waren. Abb. 5.10 zeigt, dass der Sensor die Glucose unabhängig von der Hintergrundkonzentration anderer Medienbestandteile bestimmen kann.

5.2. Charakterisierung der Dialyse

In diesem Abschnitt erfolgt zum einen eine modellhafte Beschreibung der zeitabhängigen Probenahme über Dialyse. Zum anderen werden die wichtigsten, identifizierten Einflüsse auf die Membranprobenahme behandelt: diese sind Temperatur, Zusammensetzung des Reaktionsmediums, Hydrodynamik im Reaktionsgefäß, Viskosität und die Beschaffenheit des verwendeten Membranmaterials.

5.2.1. Diffusionszeit (t_{stop})

Messungen des zeitabhängigen Stofftransports bei der Probenahme mit Hohl-faser-Membranen

Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente war es, die Konzentration in den Hohlfasermembranen in Abhängigkeit der Dialysezeit zu messen. Da das Probensegment während des Transports zur Sensorzelle Dispersion unterworfen ist, musste die in den Hohlfasern befindliche Lösung nach Abschluss der Dispersionszeit direkt gewonnen werden.

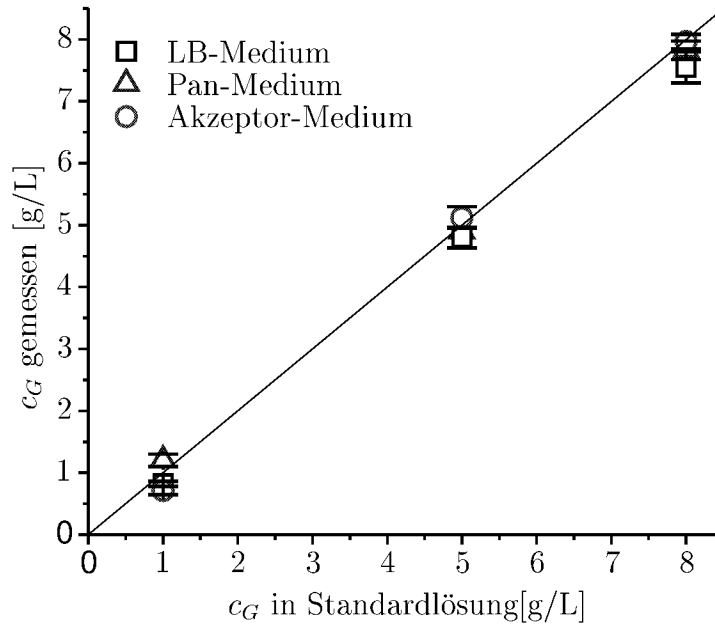


Abb. 5.10: Vergleich der in einer SIA mit dem amperometrischen Glucosesensor gemessenen Glucosekonzentrationen bei Verwendung von Standardlösungen gelöst in verschiedenen Reaktionsmedien

Mit Hohlfasermembranmodulen mit je 3 Fasern einer Polysulfon Hohlfasermembran (MWCO 1 kD) mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einer Wandstärke $\delta_m = 0,08$ mm werden Stoffübergangsuntersuchungen bei $T = 37^\circ\text{C}$ durchgeführt. Das mit Akzeptorflüssigkeit gefüllte Modul wird über den definierten Probenahmezeitraum t_{stop} in eine Standardlösung getaucht und das innere Flüssigkeitsvolumen ($89 \mu\text{L}$) anschließend in Probengefäßen aufgefangen. Da sich in den Anschluss-Hohlschrauben des Membranmoduls ein Totvolumen von $16,5 \mu\text{L}$ befindet, werden die gemessenen Konzentrationen mit diesem Volumen korrigiert.⁹

In Abb. 5.11 sind die Daten in Abhängigkeit von der Probenahmezeit dargestellt. Alle Messungen werden insgesamt dreimal durchgeführt und für jeden Datenpunkt der Ausreißertest nach Nalimov (vgl. Anhang A.5.3) angewandt. Zusätzlich sind die Anpassungskurven der beiden Modelle an die Daten eingezeichnet. Die Ergebnisse der Modellanpassung sind in Zahlen in Tab. 5.2 zusammengefasst. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Anwendung des komplexen Stoffübergangsmodells für den vorliegenden Fall nicht zwingend notwendig ist, sondern der Stofftransportvorgang auch mit hinreichender statistischer Sicherheit ($\chi^2 < \chi_{krit,\alpha 1\%}^2$ und $d_{max} < d_{max}^{krit,\alpha 1\%}$) mit dem quasistationären Modell beschrieben werden kann. In der Tabelle fällt auf, dass sich die durch die Anpassung berechneten effektiven Diffusionskoeffizienten um den Faktor 2 unterscheiden. Dies liegt daran, dass der Anpassungsparameter H in den beiden Modellen unterschiedliche Details des Diffusionsvorgangs ausdrückt und als empirischer Hilfsfaktor dient, da nicht alle Details zur vollständigen Modellbeschreibung

⁹Aus diesem Grund findet sich bei 1 Stunde Diffusionszeit der Vorlagekonzentration 10 g/L ein Mittelwert etwas größer 1 und ein entsprechender Fehlerbalken. Vermutlich kann bei einer langen Wartezeit t_{stop} Diffusion in Längsrichtung nicht ausgeschlossen werden.

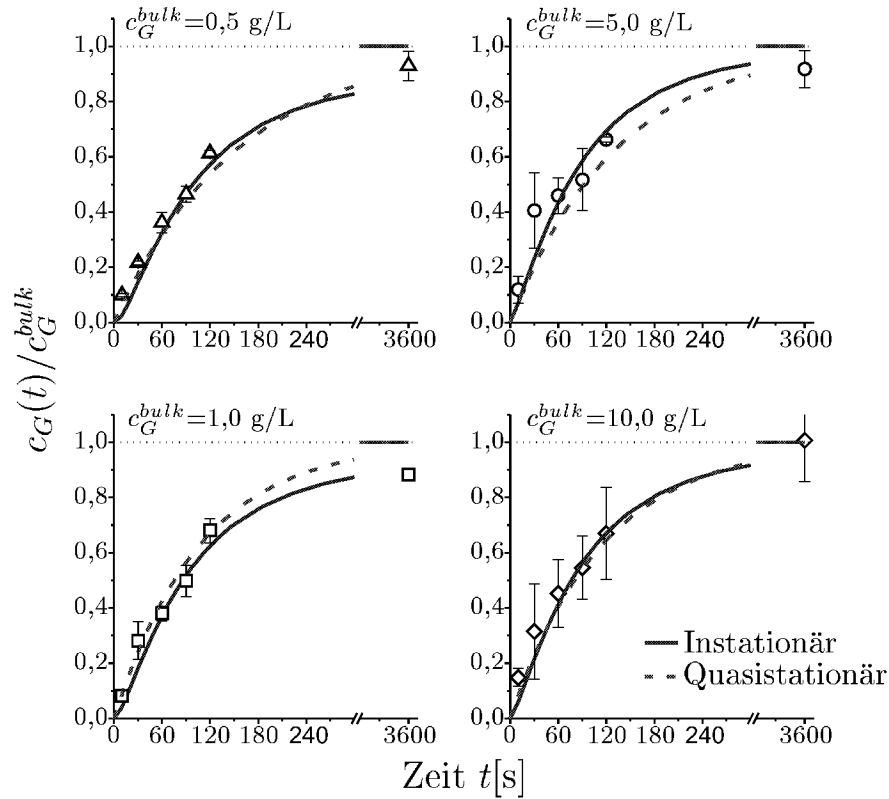


Abb. 5.11: Anpassung des instationären und das quasistationären Modells an die gemessenen Daten ($T=37^\circ\text{C}$), wobei $c_G(t)$ die Glucosekonzentration im Akzeptormedium im Membraninneren zum Zeitpunkt t und c_G^{bulk} die Glucosekonzentration in freier Lösung außerhalb der Membran bedeuten.

des Systems bekannt sind. Das heisst, der Wert des effektiven Diffusionskoeffizienten ist nur für das jeweilige Modell gültig.

Das instationäre Modell hat den Vorteil, dass mittels Simulationen die Auswirkung von Parametervariationen, wie z.B. der geometrischen Verhältnisse der Hohlfasermembran, differenziert betrachtet werden können, da Zylinderkoordinaten verwendet werden. In Abb. 5.12 ist der Stoffübergang in Abhängigkeit von Variationen a. des effektiven Diffusionskoeffizienten und b. des Außendurchmessers d_a über die Diffusionszeit aufgezeichnet. Abb. 5.12c. zeigt die dimensionslose Konzentrationsverteilung innerhalb der zylindrischen Hohlfaser. Es wurde die Annahme getroffen, $D_{\text{eff}}=5,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ gelte auch in der Akzeptorflüssigkeit, da die Geschwindigkeit des Stofftransports durch die Membran limitiert wird.

5.2.2. Temperatur

Der Parameter Temperatur beeinflusst alle Systemglieder der Messanordnung. Die Enzymaktivität ist davon ebenso abhängig wie die Diffusion des Analyten durch die Probenahmemembran, bzw. des durch die Enzymreaktion entstehenden H_2O_2 zur Sensoroberfläche. Dies sei anhand einer FDA aus einer 5 g/L Glucose-Standardlösung in einem Schüttelkolben, durchgeführt bei verschiedenen Temperaturen in einem Schüttelinkubator (200 Upm) in Abb. 5.13 veranschaulicht. Das Peakmaximum sinkt linear zur Temperatur. Daher ist auf eine Temperaturregelung im Fermentationsmedium, in den Transportschläuchen und dem Akzeptormedium, sowie am Sensor besonderen Wert zu legen.

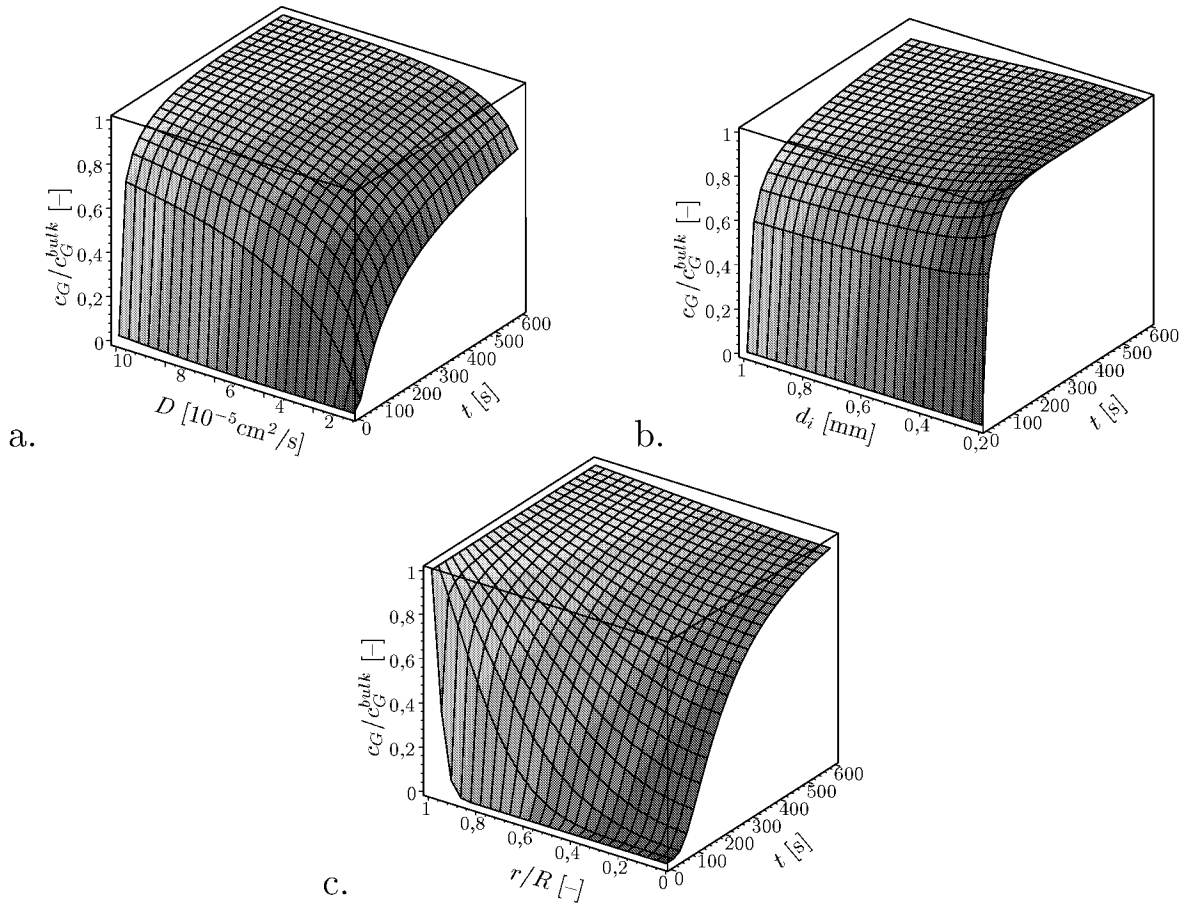


Abb. 5.12: Untersuchung der Parameterräume mit dem instationären Modell. a.: Variation des Diffusionskoeffizienten für 5 g/L Glucose und $D = D_{eff}/H$; dabei gilt $c = \int_0^R c(r)$ und $R = 0,58$ mm. b.: Variation des Hohlaserinnendurchmessers d_i ; dabei gilt $c = \int_0^R c(r)$ und $D_{eff} = 2,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. c.: Konzentrationsverteilung in einer zylindrischen Hohlasermembran, wobei R der halbe Außendurchmesser ist; dabei gilt $D_{eff} = 2,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, $R = 0,29$ mm.

Tab. 5.2: Ergebnisse der Anpassung der verwendeten Modellgleichungen an die empirisch ermittelten Konzentrations-Zeit-Daten mit Glucose (c_G) bei 37°C in der Hohlfasermembran mit der Methode der kleinsten Quadrate nach dem Levenberg-Marquardt Algorithmus. $D_G=6 \cdot 10^{-6}$ cm²/s [Bartels u. a. 1960]

Glucosekonzentration	0,5 g/L	1 g/L	5 g/L	10 g/L
INSTATIONÄRES MODELL				
Anpassungsparameter H [-]	0,2168	0,3156	0,5797	0,4684
Mittelwert H [-]	0,4±0,2			
$D_{eff} = H_m \cdot D_g$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	2,4±1,0			
R^2 aus Mittelwerten	0,992	0,990	0,953	0,960
χ^2 -Anpassung ($\chi^2_{krit.} = 4,32(\alpha = 1 \%)$)	1,194	1,323	2,031	2,352
Kolmogoroff ^a : $d_{max}^{krit} = 0,381(\alpha = 1 \%)$	0,131	0,132	0,204	0,286
QUASISTATIONÄRES MODELL				
Anpassungsparameter H [-]	0,6708	0,7840	0,9600	0,9001
Mittelwert H_m [-]	0,8±0,1			
$D_{eff} = H_m \cdot D_G$ [10 ⁻⁶ cm ² /s]	5,0±0,8			
R^2 aus Mittelwerten	0,993	0,990	0,959	0,968
χ^2 -Anpassung ($\chi^2_{krit.} = 4,32(\alpha = 1 \%)$)	0,829	1,065	1,739	1,991
Kolmogoroff: $d_{max}^{krit} = 0,381(\alpha = 1 \%)$	0,132	0,158	0,317	0,284

^aKolmogoroff-Smirnov Anpassungstest für kleine Stichprobenumfänge

Die Kleinreaktionsgefäße werden in der Regel in einem Inkubator während des Experiments angeordnet, dessen Luftinhalt im Umwälzstrom auf der vorgewählten Temperatur geregelt wird. Die Komponenten der Probenahme- und Messtechnik, Biosensor, 1,40 m der PTFE-Schläuche und die in die Reaktionslösung getauchten Membranen werden im Inkubator auf diese Weise ebenfalls auf Versuchstemperatur temperiert. Das Vorratsgefäß der Akzeptorlösung ist aufgrund seiner Größe außerhalb des Inkubators bei Raumtemperatur aufgestellt. Es stellt sich nun die Frage, ob die Länge der Transportschläuche, die im Inkubator verlaufen ausreicht, um die Akzeptorlösung bis zum temperaturempfindlichen Detektor auf Versuchstemperatur zu erwärmen. Andernfalls müsste die Akzeptorlösung auf die Versuchstemperatur temperiert werden.

Abb. 5.14 zeigt die Messungen der Temperatur der Akzeptorflüssigkeit am Auslauf der Sensorzelle bei einem Volumenstrom von $\dot{V}=2,5$ mL/min. Um konservativ vorzugehen, wurde eine Akzeptorflüssigkeit verwendet, die nicht wie sonst üblich Raumtemperatur sondern 7°C aufwies. Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, dass eine zusätzliche Temperierung des Akzeptor-Vorratsgefäßes nicht notwendig ist.

Störungen der Temperaturregelung im Inkubator treten vor allem durch Durchführung von Probenahmen auf, da die Inkubatortüren zu diesem Zweck geöffnet werden müssen. In Abb. 5.15 ist der Temperaturverlauf der Schüttlerhaubenluft und von 100 mL wässrigem Medium in einem 1 L Schüttelkolben bei 150 Upm aufgezeichnet, wenn der Inkubator für einen definierten Zeitraum (2 und 5 min) geöffnet wird. Es wird deutlich, dass die Probenahme so kurz wie möglich gehalten werden sollte. Bei zwölf bis sechzehn parallelen Gefäßen ist diese Zeitdauer aus Erfahrung nicht unter 2 min zu verkürzen.

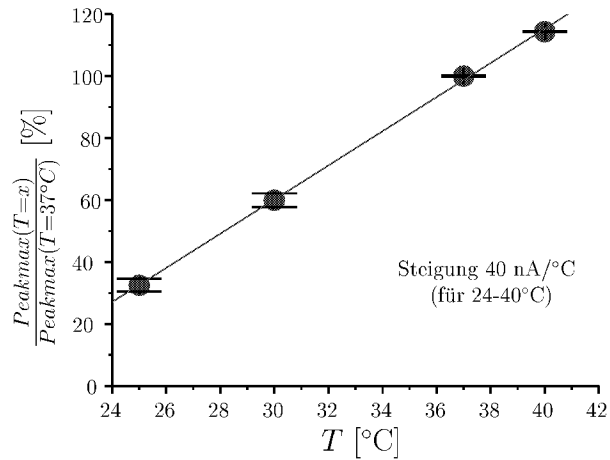


Abb. 5.13: Temperaturempfindlichkeit des amperometrischen Biosensors. 5 g/L Glucose in temperiertem Akzeptormedium, Schüttelkolben 200 Upm, $t_{stop} = 3$ min, $\dot{V} = 2,5$ mL/min

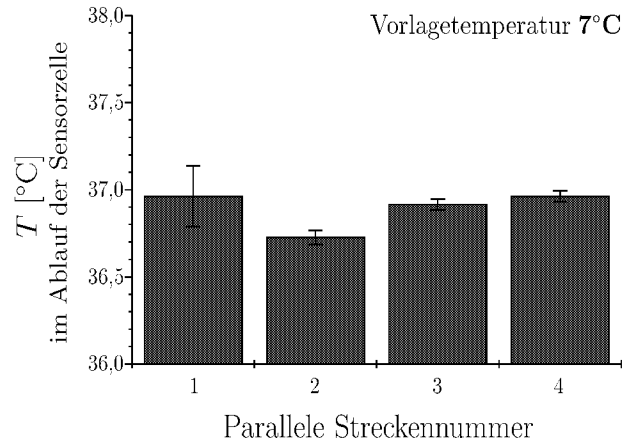


Abb. 5.14: Überprüfung der Temperatur im temperierten Schlauchsystem bei einer Temperatur von 7°C im Akzeptor-Vorratsgefäß, $\dot{V} = 2,5$ mL/min

Die Diffusion durch die Dialysemembran mag in 50 mL Flüssigkeit in einem 500 mL Standard-Glas-Schüttelkolben mit einem Oberflächen zu Volumenverhältnis von $\approx 1,2 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ (Glas/Flüssigkeit - Wärmeleitfähigkeit $\lambda_w \approx 1,1 \text{ W/mK}$ bei 23°C von DURAN-Glas) weniger von der beobachteten Temperaturänderung beeinflusst sein, als die Flüssigkeit in den 0,8 mm PTFE-Schläuchen ($\approx 3,3 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ und $\lambda_w = 0,2 \text{ W/mK}$ bei 23°C) oder der Sensorzelle. Tatsächlich wird eine Erniedrigung des Signalmaximums unmittelbar nach Öffnung des Inkubators beobachtet. Es sind daher Maßnahmen zu treffen, die Sensorzelle entweder mit Isolationsmaterial zu umgeben oder sie in ein temperaturgeregeltes Gehäuse zu kapseln, um sie vor rascher Auskühlung zu schützen.

5.2.3. Zusammensetzung des Reaktionsmediums

Die Diffusion eines Analyten in einem wässrigen Medium ist von dessen Zusammensetzung, besonders von der Ionenstärke beeinflusst. Bei der Kalibrierung der FDA stellt sich also die Frage, ob die Standardlösungen in Reaktionsmedium gelöst werden sollten, oder ob der Medieneinfluss zu vernachlässigen ist, wie sich dies bereits beim Sensor gezeigt hatte.

Bei Aufnahme von Standardreihen mit einem Komplexmedium (LB-Medium) und einem definierten Medium für *E. coli* (Pan-Medium) im Vergleich zu Akzeptormedium zeigen sich in Abb. 5.16 deutlich Unterschiede in Empfindlichkeit und Messbereich. Die FDA wurde mit $t_{stop} = 1$ min durchgeführt. Diese unüblich kurze Wartezeit wird gewählt zur Verkürzung der Versuchszeit, um so einem Einfluss durch eventuelle Drifterscheinungen am Sensor vorzubeugen. Die Kalibrierung ist folglich mit Analytstandard, gelöst im Reaktionsmedium durchzuführen.

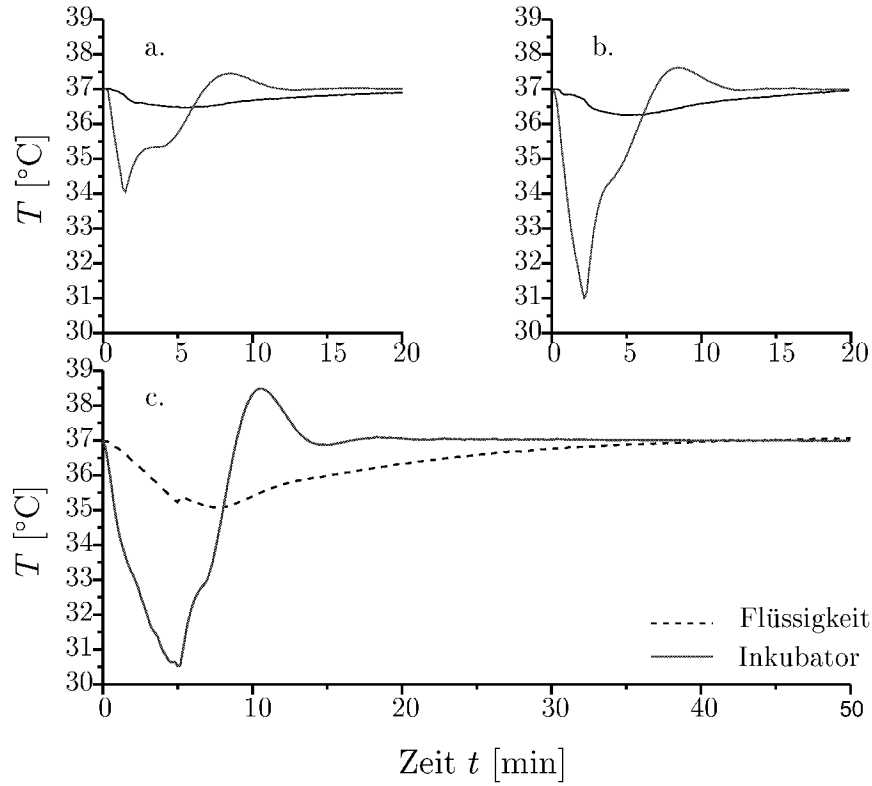


Abb. 5.15: Temperaturverlauf in Schüttlerhaube und Flüssigkeit (100 mL in 1 L Schüttelkolben, 150 Upm) bei einem Sollwert von 37°C und einer Öffnung von a.: $t_{auf}=1$ min, b.: $t_{auf}=2$ min und c.: $t_{auf}=5$ min. Außentemperatur $T_a=T_R$

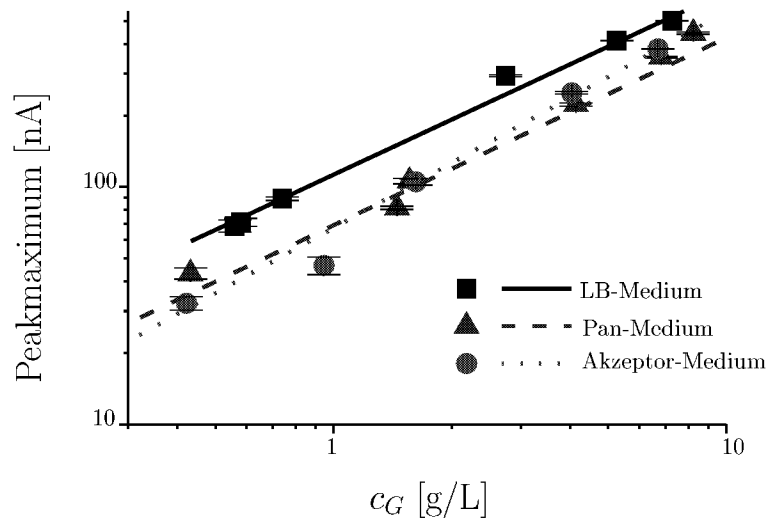


Abb. 5.16: Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Dialyse am Beispiel von Standardlösungen gelöst in Pan- und LB-Medium im Vergleich zu Phosphatpuffer. 250 mL Bechergläser gerührt (300 Upm), $n=3$, $T=23^{\circ}\text{C}$, $t_{stop}=1$ min

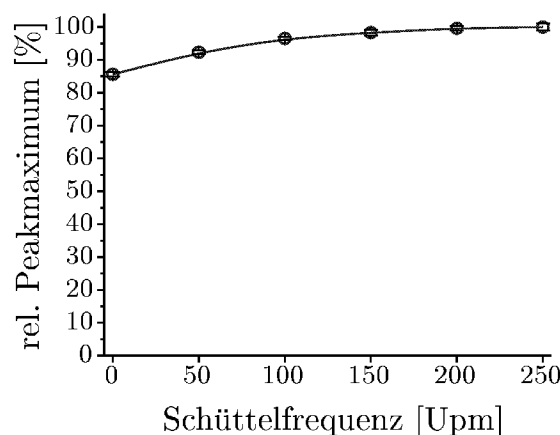


Abb. 5.17: Untersuchungen des Einflusses der Schüttelfrequenz auf die FDA in Schüttelkolben. 5 g/L Glucoselösung (50 mL in 500 mL Kolben) gelöst in Akzeptormedium, $\eta = 1$ mPas, $n=3$, $t_{stop}=3$ min, $T= 37^{\circ}\text{C}$. Die gemessenen Peakmaxima wurden auf den Mittelwert bei 250 Upm bezogen.

5.2.4. Hydrodynamik

Überströmung der Membran im Reaktionsgefäß

Die Überströmung der Oberfläche einer Dialysemembran wirkt sich bei der Ausbildung der Grenzschicht an der Phasengrenze zwischen Bioprozesslösung und porösem Material auf den transmembranen Stofftransport aus. Dies soll im Folgenden geprüft werden.

Während in einem Rührkessel durch das Rührorgan Leistung in die Reaktionslösung eingetragen wird, geschieht dies im Schüttelkolben durch den Motor unter dem Tablar, das kreisförmig bewegt wird und die Flüssigkeitsvolumina in den Kolben im Kreis schwenkt. Vom Anwender kann die Zahl der Umdrehungen pro Minute geregelt werden. Wie Abb. 5.17 zeigt, ist die FDA ab einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 Upm signifikant unabhängig von der Drehzahl. Bei in der Industrie üblichen Schüttelfrequenzen von > 300 Upm ist kein weiterer Einfluss auf die Dialyse zu erwarten.

In Mini-Blasensäulen ohne Rührer¹⁰ ist der Leistungseintrag durch die Energie einer Zwangsbegasung über einen Gasverteiler gegeben. Die Oberflächenbildungsarbeit bei der Blasenbildung am Gasverteiler, die Verdrängungsarbeit von Flüssigkeitsvolumen der aufsteigenden Gasblasen, ihre Verlustenergie zur Überwindung der Trägheitskräfte sowie die Expansionsarbeit der Gasblasen zur Überwindung des hydrostatischen Drucks sind die Bestandteile des Leistungseintrags [Altenbach-Rehm 2000]. Der Volumenstrom des Gases kann über Kugelrotameter zwischen 10 und 60 NL/h in den Flaschen manuell eingestellt werden. Das Volumen der Blasen und damit ihre individuelle Aufstiegsgeschwindigkeit und Verdrängung ist vom verwendeten Gasverteiler und dem verwendeten Medium abhängig (Blasenkoaleszenz).

Der Einfluss der Begasung auf die diffusive Probenahme wurde mit einer Sinter-

¹⁰Im Augenblick ist ein gerührtes Mini-Blasensäulen-System in der Entwicklung [Weuster-Botz]

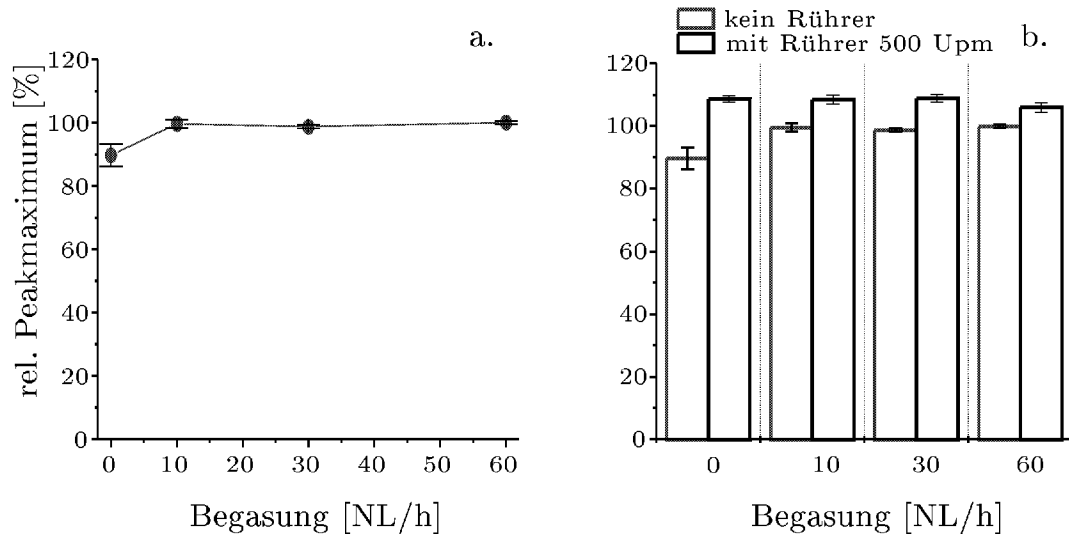


Abb. 5.18: Untersuchungen des Einflusses der Begasungsrate auf die Probenahme in Mini-Blasensäulen. a. Ohne Magnetrührer b. Vergleich der Daten ohne und mit Magnetrührer (500 Upm). 200 mL einer 5 g/L Glucose-Standardlösung gelöst in Akzeptormedium, $\eta = 1$ mPas, $n=3$, $t_{stop}=3$ min, $\dot{V}=2,5$ mL/min, $T=37^\circ\text{C}$. Die gemessenen Peakmaxima wurden auf den Mittelwert bei 60 NL/h bezogen.

glasplatte¹¹ als Gasverteiler in Standardglucoselösung (gelöst in Akzeptormedium) untersucht. Abb. 5.18 macht deutlich, dass bereits bei geringer Begasung die Überströmung der Dialysemembran ausreicht, so dass kein Einfluss messbar ist.

Da zur Zeit Mini-Blasensäulen mit integriertem Rührer entwickelt werden, sollte auch der Einfluss des zusätzlichen Leistungseintrags durch ein Rührorgan geprüft werden. Dazu wurde die Mini-Blasensäule mit einem mobilen Gasanschluss auf einem Magnetrührmotor angeordnet, mit dem ein mit PTFE beschichtetes Rührstäbchen¹² auf dem Gasverteiler angetrieben wurde.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5.18 aufgetragen. Es wird deutlich, dass sich bei Einsatz eines Rührers der Stofftransport verbessert: es zeigt sich ein höheres Peakmaximum, als bei nicht-gerührter Flüssigkeit. Bei Einsatz eines Rührers in der Blasensäule wird der Stofftransport offensichtlich vollständig unabhängig von der Begasung.

Strömung des Akzeptormediums

Die Geschwindigkeit mit der das Akzeptormedium durch die Hohlfasermembranen und die Transportschläuche im Analysesystem gepumpt wird, beeinflusst in dreierlei Hinsicht das Detektorsignal: Die Verweilzeit und damit die Dispersion des Probensegments im Schlauch (Peakmaximum) und die „Konti-Dialyse-Konzentration“ im Abstrom des Peaks (Sattelsignal) werden durch den Volumenstrom beeinflusst. Das Signal des Glucose-Biosensors ist ebenfalls abhängig von der Überströmung, da an der Elektro-

¹¹Druckverlust 0,186 bar bei 60 NL/h, $T=T_R$

¹²3,5 cm lang und 0,5 cm im Durchmesser

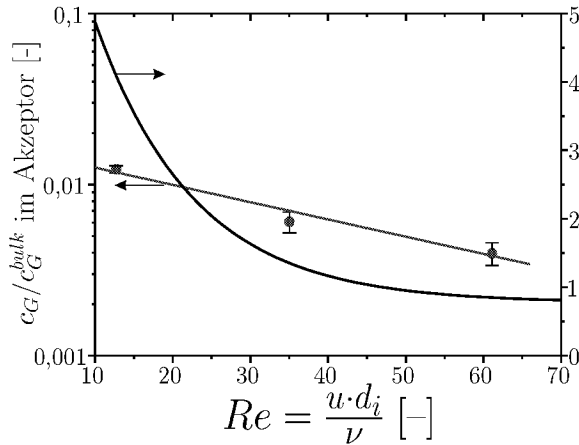


Abb. 5.19: Untersuchung des Einflusses des Volumenstroms, bzw. der mittleren Verweilzeit $\bar{t}_m$ auf die Glucose Konzentration c_G im Akzeptormedium bei kontinuierlicher Durchströmung, die das Sattelsignal am Sensor hervorruft. Gemessen mit Membranmodul in einem 500 mL Schüttelkolben (200 Upm) mit 5 g/L Glucose-Standardlösung c_G^{bulk} (50 mL gelöst in Akzeptor, $\eta = 1$ mPas), $n=3$, $T=37^\circ\text{C}$. Hohlfaserrinnen-durchmesser $d_i=0,5$ mm und -querschnitt $A_{quer}=0,59$ mm².

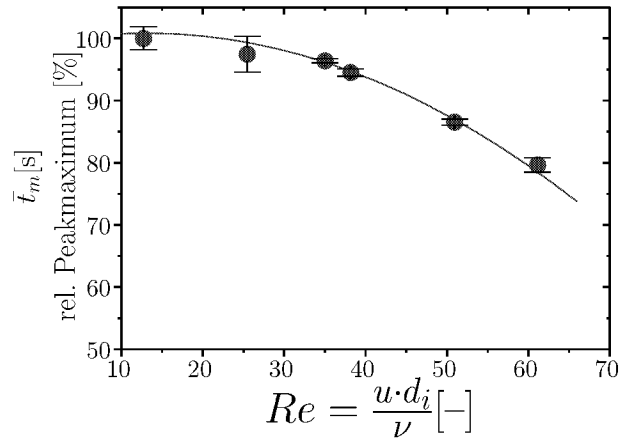


Abb. 5.20: Untersuchungen des Einflusses des Volumenstroms auf das Peakmaximum bei Durchführung einer FDA in 5 g/L Glucose-Standardlösung (50 mL gelöst in Akzeptor, $\eta = 1$ mPas) in einem 500 mL Schüttelkolben (200 Upm), $n=3$, $t_{stop}=3$ min, $T=37^\circ\text{C}$. $d_i=0,5$ mm, $A_{quer}=0,59$ mm².

denoberfläche ein diffusionsgesteuerter Prozess vorliegt. Der Einfluss der Variation des Volumenstroms soll im Rahmen des Operationsbereichs der verwendeten Pumpe im Folgenden näher beleuchtet werden.

Abb. 5.19 zeigt die Konzentration im Akzeptormedium bezogen auf die Vorlagekonzentration im Reaktionsgefäß bei kontinuierlicher Durchströmung der Membranmodule und Gleichgewichtseinstellung. Die Unterschiede der mittleren Verweilzeit in den Hohlfasern ($L_m=100$ mm) ist gering: sie entspricht bei $Re=13$ $\bar{t}_m=4$ s und $Re=61$ $\bar{t}_m=1$ s. Die übliche Betriebs-Reynoldszahl beträgt bei 2,5 mL/min $Re=35$.

Die Veränderung des Peakmaximums bei Veränderung des Volumenstroms wird mit zwei Membranmodulen untersucht. Zwei Dinge sind beim Einfluss auf das Sensorsignal maßgebend: das Biosensorsignal ist, da es diffusionskontrolliert ist, abhängig von der Strömungsgeschwindigkeit in der Detektorzelle. Zum anderen ist die Rückvermischung (Dispersion) direkt proportional zum Volumenstrom. Abb. 5.20 zeigt das Ergebnis der Untersuchung. Das Peakmaximum fällt von $Re=10$ bis $Re=60$ um rund 20 % nicht-linear ab. Bei leichten Schwankungen der Förderleistung der Pumpe um die Betriebsreynoldszahl $Re=35$ wird daher am Ergebnis des Signalmaximums nur ein Fehler kleiner 5 % erwartet.

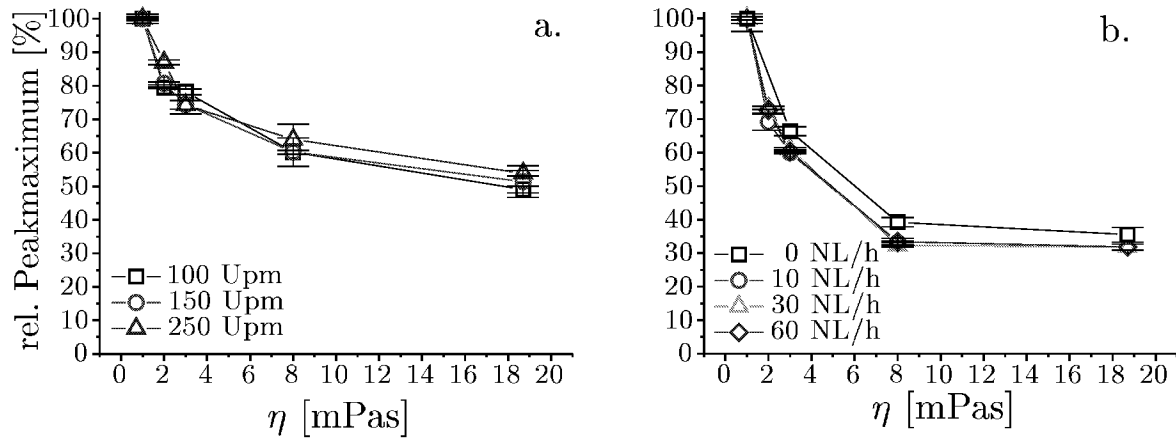


Abb. 5.21: Abhängigkeit der Dialyse von der Viskosität der Reaktionslösung in a. Schüttelkolben und b. Blasensäulen. Die Messwerte sind bezogen auf den Mittelwert der Peakmaxima bei 1 mPas. $n=3$, $t_{stop}=3$ min, $c_G=5$ g/L, $T=25^\circ\text{C}$

5.2.5. Viskosität

Viele der in der Bioverfahrenstechnik verwendeten Medien sind zu Beginn einer Fermentation wässrige Gemische mit dynamischen Viskositäten um 1 mPas. Bei Zunahme der Zellmasse, bei myzelbildenden Mikroorganismen und konzentrierten Biopolymerlösungen¹³ können auch höhere Viskositäten auftreten. Die Viskosität der Flüssigkeit wirkt sich auf die Hydrodynamik in der Reaktionslösung und den Diffusionskoeffizienten des Analyten aus. Die Stokes-Einstein-Gleichung 5.2 beschreibt die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom Radius des diffundierenden Moleküls, der Temperatur und der Viskosität. Mit zunehmender Viskosität sinkt der Diffusionskoeffizient.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta\epsilon} \quad (5.2)$$

mit:

η	dynamische Viskosität	[mPas]
ϵ	Radius des diffundierenden Moleküls	[m]
k	Boltzmann-Konstante = $1,4 \cdot 10^{-23}$	[J/K]

Durch Zugabe von Polyethylenglykol (PEG-400) wurde die Viskosität in einer 5 g/L Glucose-Standardlösung in Schüttelkolben (50 mL in 500 mL) bei maximaler Schüttelfrequenz (250 Upm) und Mini-Blasensäulen (200 mL) bei maximal einstellbarer Begasungsrate (60 NL/h) zwischen 1 und 18,7 mPas variiert und der Einfluss auf den Stoffübergang mittels FDA untersucht. Dabei ist zu beachten, dass PEG die Membran nicht durchdringen kann. Das resultierende Signalmaximum wurde auf die Signalthöhe bezogen, die bei 1 mPas gemessen wird (Abb. 5.21). Das Experiment wurde mit einem anderen, baugleichen Hohlfasermembranmodul wiederholt, aus dessen Ergebnis keine Unterschiede in der Viskositätsabhängigkeit festzustellen sind.

¹³Siehe dazu [Henzler und Schäfer]

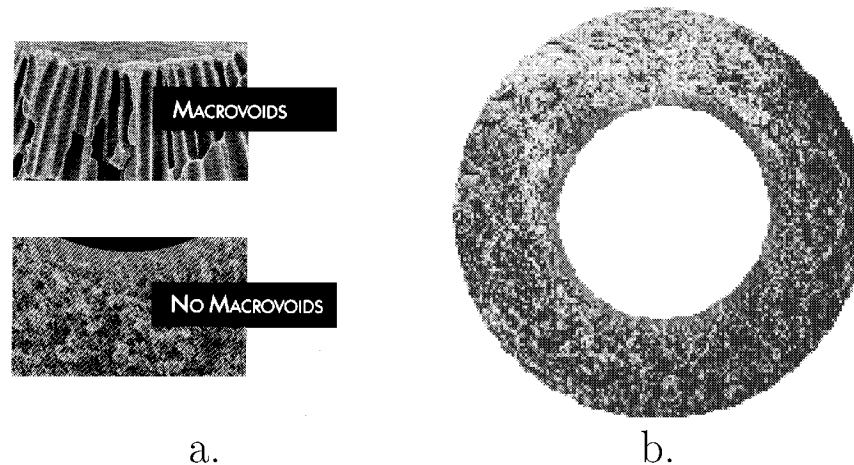


Abb. 5.22: a. Vergleich der Strukturen herkömmlicher Polysulfon Hohlfasermembranen mit Makroporen („Macrovoids“) und der in dieser Arbeit verwendeten amorphen Polysulfon-Schaumstruktur („No Macrovoids“). b. Querschnitt der Polysulfonschaum-Hohlfasermembran. Bilder mit freundlicher Genehmigung von AG Technology Inc., Massachusetts, USA.

5.2.6. Eigenschaften des Membranmaterials

Im Folgenden soll untersucht werden, wie die Durchlässigkeit der gewählten Polysulfon-Membran die FDA beeinflusst. Die Abhängigkeit der Dialyse von dem effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} ist bereits in Abschnitt 5.2.1 anhand von Stofftransportuntersuchungen dargestellt worden. Die Stofftransporteigenschaften der Membran werden zum einen durch Auswahl von Membranen mit einer bestimmten Durchlässigkeitspezifikation, wie beispielsweise die molekulare Ausschlussgrenze, gesteuert und zum anderen durch Hitzebehandlung bei der Dampfsterilisation verändert.

Molekulare Ausschlussgrenze

Die Polysulfon-Hohlfasermembranen sind zwischen 1 kD und 500 kD MWCO erhältlich. Im Gegensatz zu herkömmlichen Polysulfonmembranen mit Makroporen (Abb. 5.22a.) weisen die hier verwendeten Membranen eine amorphe Schaumstruktur auf (Abb. 5.22b.). Da mit der Analyseanordnung bisher nur niedermolekulare Analyte mit Molekulargewichten unter 1 kg/mol ($M_{Glucose}=180$ g/mol) von Interesse waren, werden Membranen mit Ausschlussgrenzen von 1 kD und 5 kD getestet.

In Abb. 5.23 sind Kalibrierreihen mit FDA ($t_{stop}=3$ min) mit baugleichen Hohlfasermembranen ($L=10$ cm) unterschiedlicher Ausschlussgrenzen aufgetragen. Die geringere Steigung der Geraden der Membran mit 1 kD MWCO deutet auf eine geringere Stofftransport-Geschwindigkeit hin. Der limitierende Schritt des Stofftransports liegt unter den gewählten Bedingungen beim Transport des Analyten durch die Membran. Die geringere Ausschlussgrenze wird durch eine dichtere Polymermatrix erreicht. Die Angabe des MWCO sagt nichts über die Gesamtporosität der Schaumstruktur aus.

Ein reduzierter Stofftransport kann bei Messungen in höheren Konzentrationsbereichen als Verdünnung der Probe für einen empfindlichen Sensor gewünscht sein. Es ist also

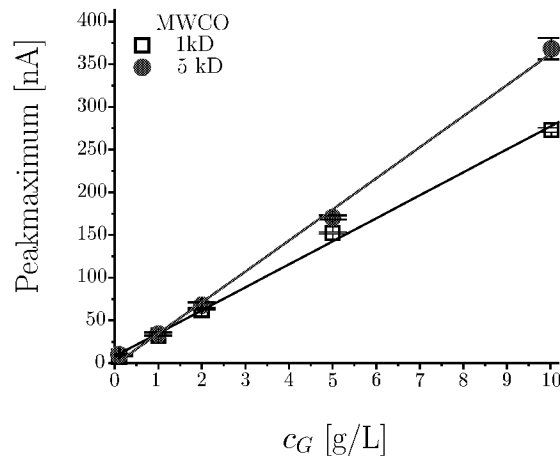


Abb. 5.23: Einfluss der molekularen Ausschlussgrenze der Membran auf die Probenahme in Mini-Blasensäulen (200 mL, Begasung 60 NL/h). $n=3$, $t_{stop}=3$ min, $\dot{V}=2,5$ mL/min, $T=T_R$

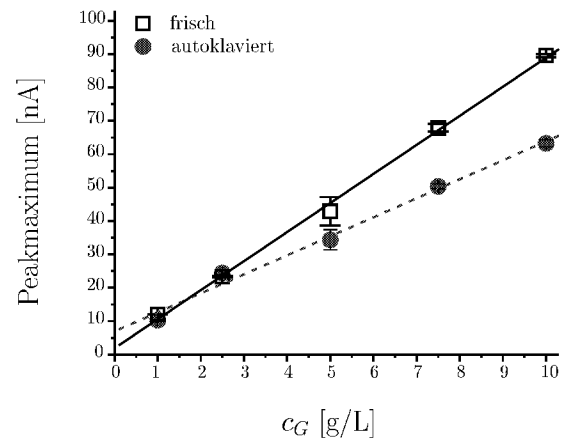


Abb. 5.24: Einfluss des Autoklavierens auf eine Hohlfasermembran mit 1 kD MWCO. Versuchsbedingungen wie in Bildunterschrift Abb. 5.23.

im Anwendungsfall zu entscheiden, welches Membranmaterial verwendet werden soll. In der Handhabung oder Stabilität unterscheiden sich nach den praktischen Erfahrungen die beiden Materialien nicht.

Dampfsterilisation

Bei Anwendung der parallelen Analysetechnik im monoseptischen Bereich werden die Hohlfasermembranmodule zusammen mit den parallelen Reaktionsgefäßen dampfsterilisiert. Es soll nun überprüft werden, inwieweit sich der Stofftransport eines Moduls nach der Exposition bei 121°C über 20 min von der nicht thermisch behandelten Membran unterscheidet.

Abb. 5.24 zeigt anhand von FDA in Glucose-Standardlösungen ($t_{stop}=3$ min) eine Reduzierung der Diffusionsrate im autoklavierten Modul. Die Steigung der Kalibriergerade reduziert sich im vorliegenden Fall um 22 %. Diese Erkenntnis erschwert die Kalibrierung des Systems, da die Kalibrierung zu Beginn jedes biologischen Experiments im sterilisierten Zustand durchgeführt werden muss. Es wurde nicht untersucht, wie sich weitere Sterilisationszyklen auf die Messung auswirken, da die Membranmodule jeweils nur in einem Experiment eingesetzt wurden.

5.3. Charakterisierung der Probenahme- und Messtechnik bei Einsatz in Bioprozessen

5.3.1. Entnahme von Stoffmengen

Bei der FDA werden dem Kleinreaktionsgefäß sowohl in der Stop-Phase, als auch in der Flow-Phase („Konti-Dialyse-Effekt“) eine bestimmte Menge Moleküle entnommen.

Tab. 5.3: Verdunstungsverluste in Schüttelkolben und Blasensäulen gemessen mit H₂O (bidest.) bei $T=37^{\circ}\text{C}$, $n=3$.

Schüttelkolben mit Schikanen (250 Upm)	Verlust um [%/d]
50 mL Startvolumen in 500 mL Kolben	$7,44 \pm 0,52$
100 mL Startvolumen in 1000 mL Kolben	$1,38 \pm 0,3$
Blasensäule (60 NL/h)	Verlust um [%/d]
200 mL Startvolumen	$9,7 \pm 0,63$

Vernachlässigt man in einer ersten Schätzung unter Annahme vollständigen Konzentrationsausgleichs den Verlust durch kontinuierliche Dialyse bei Durchströmung, so ergibt sich ein Verlust in 24 h von 2 %.

Zur Überprüfung dieser Schätzung wird in einem 500 mL Schüttelkolben 50 mL in Glucose-Standardlösung (5,3 g/L gelöst in sterilem M9-Medium) alle 4 min ($t_{stop}=3$ min und 1 min Messzeit mit Moduldurchströmung $\dot{V}=2,5$ mL/min) über 24,2 h FDA durchgeführt. Dies entspricht $n=364$ Probenahmen. Aus der Untersuchung, dargestellt in Abb. 5.25, und den Ergebnissen eines Parallelversuchs dazu, ergibt sich eine mittlere Entnahme von 51 % der Stoffmenge pro Volumeneinheit in 24 h ($0,7 \mu\text{mol}$ pro Probenahme bzw. $0,87 \text{ mmol/d}$). Diese nicht zu vernachlässigende Stoffmenge kann und sollte durch eine Nachdosierung bei Monitoring von Batch-Ansätzen über Zugabe von Medienbestandteilen im Akzeptormedium entsprechend ausgeglichen werden. Zu beachten ist dabei noch, dass in den Kleinreaktionsgefäßen über einen längeren Zeitraum Verdunstung auftritt, die die Konzentrationsabnahme durch Volumenverlust leicht abschwächt. Tab. 5.3 zeigt Ergebnisse von Verdunstungsexperimente in Schüttelkolben und Blasensäulen.

Abb. 5.25 zeigt die online über 24 Stunden gemessenen Peakmaxima der mit Dialyse angereicherten Probenvolumina. Es fällt auf, dass es teilweise systematische Abweichungen vom erwarteten Verlauf gibt. Die Ursachen hierfür sind nicht genau bekannt. Die Temperaturregelung im Inkubator wurde nicht mit einem Temperaturfühler überprüft. Schwankungen der peristaltischen Pumpe durch Schwankungen im Stromnetz könnten für die Abweichungen ebenfalls verantwortlich sein. Die Abweichung beträgt maximal rund 13 % und liegt damit in einem akzeptablen Bereich.

5.3.2. Biofouling

Jede Oberfläche, die sich in einem Bioreaktor befindet, kann von Mikroorganismen zur Anhaftung und Bildung von Biofilmen genutzt werden [Flemming u. a. 1997]. Ob und in welchem Ausmaß eine solche Interaktion stattfindet ist von den sessilen Eigenschaften des Organismus, den hydrophoben Eigenschaften der Membranoberfläche und den Scherkräften an der Membranoberfläche abhängig [Kabsch-Korbutowicz 1992].

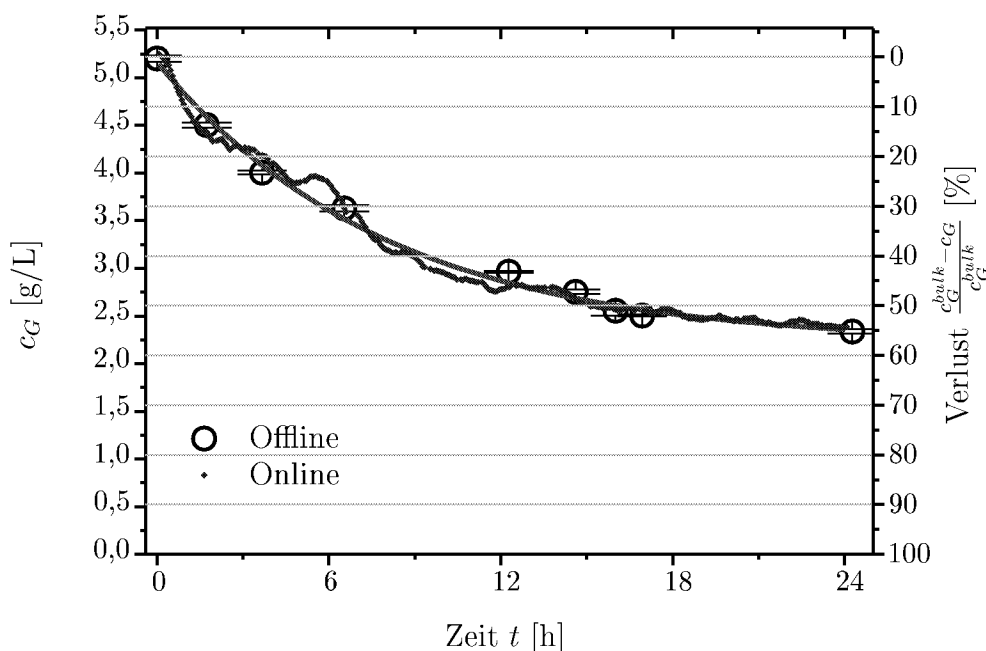


Abb. 5.25: Entnahme von 0,88 mmol Analytmolekülen über 24 h bei Durchführung von $n=364$ Messungen am Beispiel von Glucose. $c_G=5,2$ g/L, 50 mL in 500 mL Schüttelkolben 150 Upm, $t_{stop}=3$ min, $T=37^\circ\text{C}$, $\dot{V}=2,5$ mL/min

Aufnahmen von Membranen mit dem Raster-Elektronenmikroskop

Um die Neigung zur Anhaftung von Bakterien zu testen, wurden die Polysulfon-Hohlfasermembranen (MWCO=1 kD) ohne Anschluss an das Analysesystem jeweils 30-48 h in Bioprozesse mit verschiedenen Bakterien eingebracht und anschließend elektronenmikroskopisch (REM) untersucht.

Die Fasern wurden an beiden Enden flüssigkeitsdicht verschlossen, damit nur die äußere Oberfläche zur Anhaftung zugänglich war. Im Anschluss an die Kultivierung von *Escherichia coli* (BTM $\approx$ 30 g/L) *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus carnosus* (BTM $\approx$ 20 g/L) in Mini-Blasensäulen wurden die Hohlfasern zweimal in Puffer gewaschen und mit einem Raster-Elektronenmikroskop untersucht.

Abb. 5.26 zeigt die erstellten Aufnahmen von Ausschnitten der Membranoberfläche¹⁴. Es zeigte sich eine Affinität zur Anlagerung an die Membran bei *B. subtilis* und etwas geringer bei *E. coli*. *S. carnosus* hingegen lagert sich kaum an die Membran an.

Überprüfung der Kalibrierung vor und nach einer Fermentation

Bei Auftreten von Biofouling wäre die Genauigkeit der FDA während laufenden Bioprozessen in ihrer Funktionsfähigkeit gefährdet. Zum einen würde sich der Stofftransport der Membran verschlechtern, da das Substrat durch eine zusätzliche Schicht diffundieren müsste. Zum anderen würde der Biofilm für einen Verbrauch der Glucose während des

¹⁴Pro Membran werden mehrere Abschnitte auf den Membranen betrachtet und schließlich der Ausschnitt gewählt, der den mittleren subjektiv optischen Eindruck der Ablagerungen wiedergab.

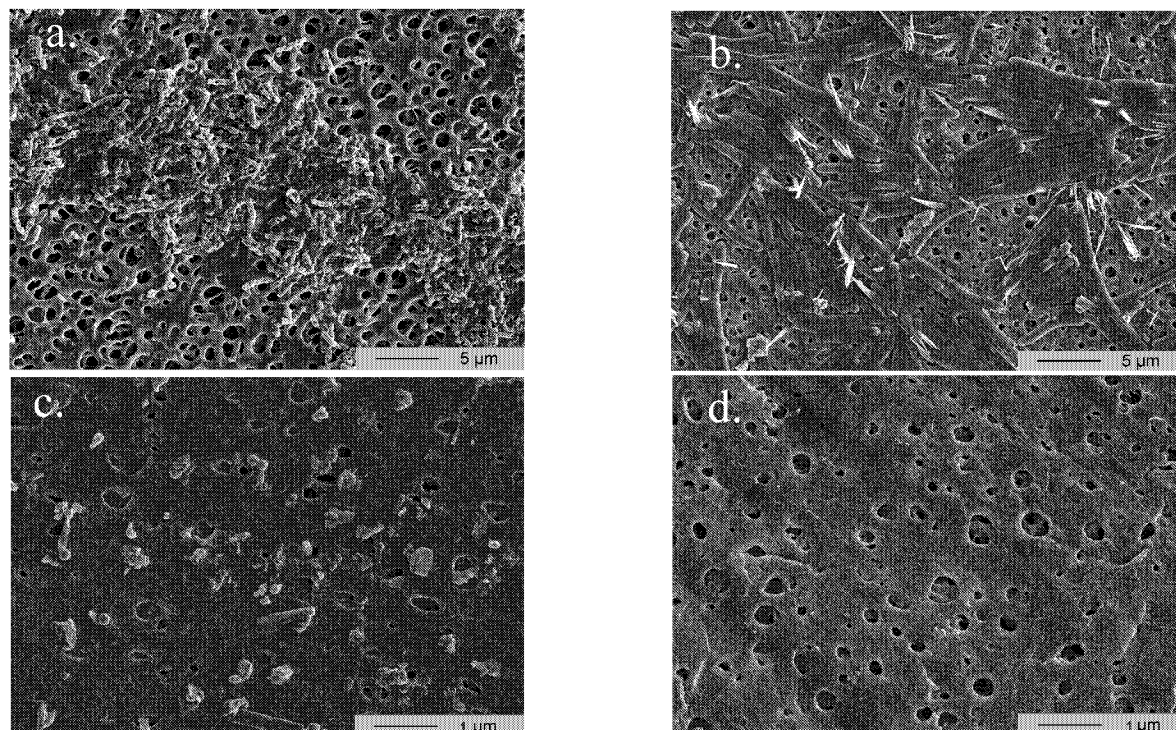


Abb. 5.26: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hohlfasermembranen aus 1-2 täglichen Bioprozessen mit a.: *E.coli*, b.: *B. subtilis*, c.: *S. carnosus* im Vergleich zu d.: frischem Membranmaterial

Diffusionsvorgangs und einer zusätzlichen Verfälschung des Ergebnisses sorgen. In einem solchen Fall steht keine Möglichkeit zur Verfügung, diese Veränderungen rechnerisch zu kompensieren.

Daher kommt der Überprüfung der Veränderung der Kalibrationskurve während einer Fermentation große Bedeutung zu.

Mit *E. coli* 4pf20 zur L-Phenylalanin Produktion wurde eine Kultivierung in parallelen Mini-Blasensäulen über 30 h durchgeführt. Vor dem Experiment und nach der Kultivierung wurde eine Kalibrierung mit Glucose-Standardlösungen (gelöst in Reaktionsmedium) unter Versuchsbedingungen durchgeführt ($T=37^{\circ}\text{C}$). Um den Einfluss der angehafteten und substratreduzierenden Biomasse auf den ggf. veränderten Stofftransport zu untersuchen, wurden die Membranmodule zusätzlich über 8 h mit UV zur Abtötung von Mikroorganismen bestrahlt und anschließend erneut vermessen.

Aus Abb. 5.27 ist keine signifikante Verschlechterung der Kalibriergeraden vor und nach der Fermentation zu erkennen. Die Kurve nach 30 h ist sogar etwas steiler als zu Beginn, was mit einer leichten Erhöhung der Empfindlichkeit des Sensors mit zunehmender Betriebszeit zusammenhängen kann [Gründig 2000].

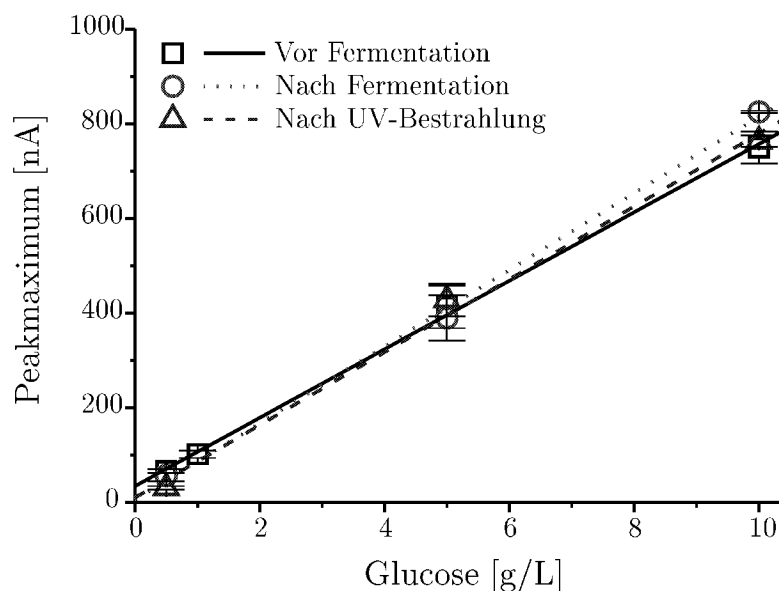


Abb. 5.27: Vergleich von Kalibriergeraden mit Glucose gelöst in sterilem Fermentationsmedium vor, unmittelbar nach der Fermentation und nach 8 h UV Inaktivierung

5.3.3. Überprüfung der Wahrung der Sterilität

Die dauerhafte sterile Abschirmung der Reaktionsgefäße gegen unerwünschte Keime aus der Umgebung ist für eine monoseptische Prozessführung von zentraler Bedeutung. In Kapitel 4 wurde dieser Anspruch als Anforderungen an die Entwicklung eines Probenahmemoduls bereits formuliert. Während für bakterielle Prozesse „dauerhaft“ einen Zeitraum von wenigen Tagen bis Wochen umschreibt, wird für Zellkulturanwendungen ein Zeitraum von mehreren Monaten angestrebt. In der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Anwendung in bakteriellen Systemen.

Um zu prüfen, ob die entwickelte Probenahmeverrichtung die Anforderung erfüllt, wurden „Steriltests“ in Schüttelkolben durchgeführt. Eine Mischung aus Hefeextrakt, Pepton und Kochsalz (LB-Medium) ermöglicht es kontaminierenden Mikroorganismen jeder Art, sich innerhalb kurzer Zeit zu vermehren. Das Wachstum von Fremdkeimen kann anhand der Trübung des Mediums durch Sichtprüfung nachgewiesen werden.

Die Membranmodule wurden in die sterilen und mit sterilem LB-Medium gefüllten Gefäße integriert und für 20 min bei 121°C dampfsterilisiert. Anschließend wurden die Membranmodule mit unsteriler Akzeptorflüssigkeit ständig durchspült. Ein solcher Steriltest wurde vor einer Batch-Fermentation nach 4 Tagen ohne Kontamination durch den Start eines Fermentations-Experiments beendet [Franz 1999]. Ein zweiter Test war 21 Tage erfolgreich. Am 22. Tag zeigte sich ein myzelartiger Bewuchs (nachgewiesen durch Sichtprüfung) auf einem der drei getesteten Membranmodule.

Es ist anzunehmen, dass sich die Dauer der Sterilität durch Verwendung von sterilem Akzeptormedium noch verlängern lässt. Das Schlauchsystem bestehend aus dem Pumpenschlauch und den Ventil-Quetschschläuchen am Multiventilmodul aus Silikon und Verbindungsschläuchen aus PTFE ist bis zur Sensorzelle als Ganzes sterilisierbar. Der Sensor und die zugehörige Zelle sind nicht dampfsterilisierbar. Es müssten entweder

bis zum Abfallgefäß chemische Sterilisationsmaßnahmen ergriffen werden, oder geprüft werden, ob der Leitungsabstand zwischen Membranmodulen und insteiler Sensorzelle genügt, um die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination zu minimieren.

5.3.4. Überprüfung der Rückwirkungsfreiheit auf *Escherichia coli* K12 Kulturen

Das Einbringen der Probenahmeverrichtung darf auf die parallelen Kulturen in den Kleinreaktionsgefäßen keine dem Prozessziel abträgliche Wirkung haben. Die Voraussetzung der Rückwirkungsfreiheit muss aus diesem Grund überprüft werden. Das durch die Membranmodule in die Reaktionslösung eingebrachte Material könnte ggf. toxische Komponenten aus den Polysulfon-Hohlfasern, Polypropylen-Hohlschrauben und Epoxidharz-Klebstoffe in das Medium absondern. Zudem kann der bilaterale Vorgang der Diffusion unerwünschte Komponenten nachdosieren oder Bestandteile des Mediums signifikant entfernen.

Escherichia coli K12 wird in Batch-Kulturen in sechs Mini-Blasensäulen bei 37°C in Pan-Medium mit einer Startkonzentration von 10 g/L Glucose kultiviert. Dabei wird in nur 3 Säulen je ein Hohlfasermembranmodul eingebracht und eine FDA ($t_{stop}=3$ min) durchgeführt. Aus den über sterile Kanülen gewonnenen Proben wird die optische Dichte (OD) bei $\lambda=620$ nm im Laborphotometer bestimmt. In Abb. 5.28 sind die mittleren Wachstumskurven von je 3 Säulen mit und ohne Membran aufgezeichnet. Daraus ist kein negativer Einfluss auf die Kultur zu erkennen.

Die Rückwirkungsfreiheit des Probenahmesystems ist damit für *E. coli* geprüft. In der biotechnologischen Praxis gibt es eine Vielfalt bakterieller Biosysteme, die in sehr unterschiedlicher Weise auf Veränderungen von Umgebungsbedingungen reagieren können. Das bei den Membranmodulen verwendete Epoxidharz könnte unter Umständen eine toxische Wirkung haben. Daher sollte die Rückwirkungsfreiheit vor dem Einsatz der parallelen Probenahme mit dem jeweiligen Biokatalysator geprüft werden. Darüber hinaus kann der diffusive Eintrag von Phosphat durch das Akzeptormedium, das in vielen Prozessen ein wachstumslimitierender Nährstoff ist, unter Umständen das Prozessergebnis stark beeinflussen. Die Diffusion von Bestandteilen des Akzeptormediums muss beim praktischen Einsatz des Analysesystems berücksichtigt werden und gegebenenfalls ein für den Prozess geeignetes Akzeptormedium unter Berücksichtigung des Sensorverhaltens gewählt werden.

5.4. Messtechnische Gütekriterien

Zur Beurteilung von analytischen Systemen werden Gütekriterien herangezogen, die in Tab. 5.4 zusammengefasst sind [Skoog und Leary 1992]. Das Präzisionskriterium ist dabei als das wichtigste anzusehen. Eine analytische Aufgabe wird als zufriedenstellend gelöst angesehen, wenn die einzelnen Messwerte (x_i) höchstens 10 %, besser höchstens 5 % um den aus mehreren Stichproben berechneten Mittelwert ($\bar{x}$) schwanken. Ob diese Anforderung von der parallelen Probenahme- und Messtechnik erfüllt wird, muss mit wiederholten Messungen mit Standardlösungen statistisch ermittelt werden. Dabei muss

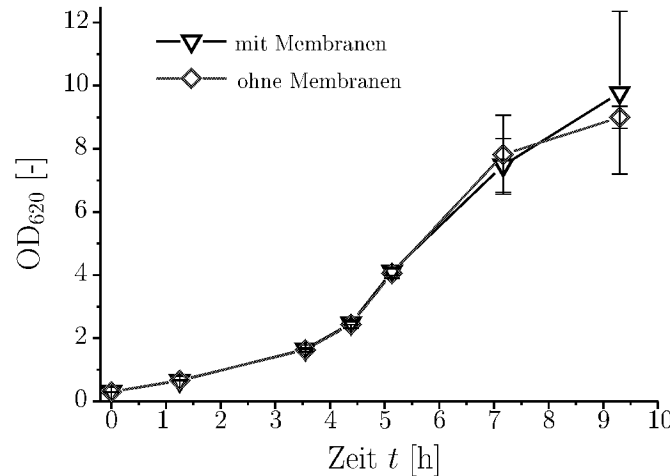


Abb. 5.28: Überprüfung der Rückwirkungsfreiheit anhand von mittleren Wachstumskurven von *E. coli* K12 in je 3 Mini-Blasensäulen mit und ohne integrierte Hohlfasermembranen

Tab. 5.4: Gütekriterien zur Beurteilung der FDA aus den vorliegenden Untersuchungen [Skoog und Leary 1992]

Kriterium	Erklärung	Beurteilung
Präzision	Absolute Standardabweichung (σ), relative Standardabweichung (s)	$s < 5 \%$
Bias	Absoluter systematischer Fehler	n.b.
Sensitivität	Steigung oder bei gleicher Steigung Präzisionskriterium	Kalibrierung
Limit of Detection (LOD)	Mit Vertrauensbereich von 89 % wird ein Wert von dreimal der Standardabweichung des Leerwerts empfohlen [Skoog und Leary 1992] ($\text{LOD} = 3 \cdot \sigma_{\text{blank}}$)	nicht relevant
Limit of Quantification (LOQ)	$\text{LOQ} = 10 \cdot \sigma_{\text{blank}}$	0,1 g/L
Selektivität	keine signifikante Signalantwort auf andere Analyte als Zielanalyt	100 %

mit dem Funktionsmuster nicht nur die Reproduzierbarkeit der Messung am Glucose-Biosensor, sondern die Probenahme über die Dialysemembranen, der Probentransport zum Durchflusssensor und die anschließende Durchflussmessung ganzheitlich statistisch überprüft werden. Die Angaben zu den Gütekriterien sind in Tab. 5.4 zusammengefasst.

Da die Präzision das wichtigste Kriterium zur Charakterisierung des parallelen Probenahme- und Analysesystems ist, wird die relative Standardabweichung ($n \leq 3$) aller durchgeführten Messungen in Standardlösung zusammengefasst (Abb. 5.29). Es werden Daten verglichen, die unter verschiedensten Versuchsbedingungen (Reaktionsgefäße, Medien, Temperatur) gewonnen wurden. So ist es möglich, die Messunsicherheit unabhängig von den Reaktionsbedingungen zu beurteilen. Die durchschnittliche relative Standardabweichung von 148 Messungen beträgt 4,8 % und liegt damit wie erwünscht unterhalb des Unsicherheitskriteriums. Es sind einige Ausreißer bis zu 16 % Abweichung zu beobachten.

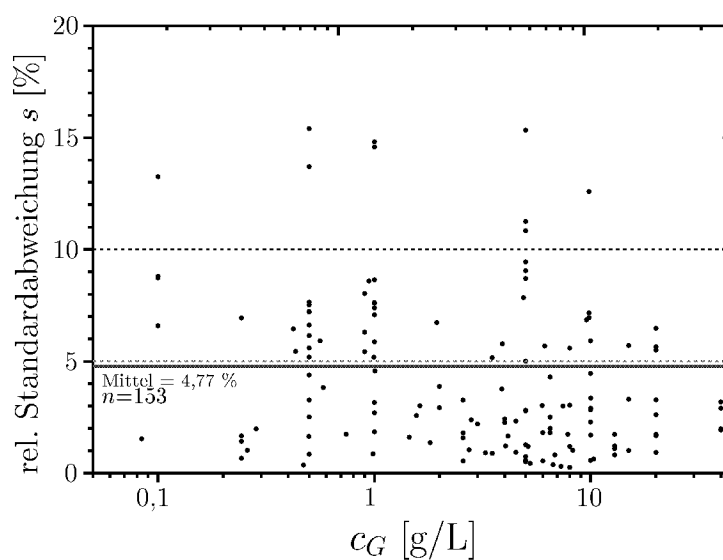


Abb. 5.29: Reproduzierbarkeit der FDA mit dem amperometrischen Glucose-Biosensor. Daten aus Kalibrierungen mit $3 < n < 10$ aus verschiedenen Reaktionsgefäßen (gerührten Bechergläser, Schüttelkolben, Blasensäulen), mit Glucose-Standardlösung in verschiedenen Medien (Akzeptor, Pan, LB, M9) bei verschiedenen Temperaturen (T_R , 30°C, 37°C). $t_{stop}=3$ min, $\dot{V}=2,5$ mL/min.

5.5. Zusammenfassung

Die wichtigsten Ergebnisse aus Kap. 5, mit praktischer Relevanz für den Betrieb und die Konfiguration der Probenahme- und Messtechnik, sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst:

Tab. 5.5: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen aus Kap. 5

1. Messtechnik	
Konditionierung	Sensor mehr als 6 h polarisieren
Stationäres Signal	Rauschen $< \pm 1$ nA
Dynamisches Verhalten	$t_{10}=8$ s, $t_{90}=34$ s
Chargenvarianz	Kalibrierung jedes Sensors bei Versuchstemperatur
Querempfindlichkeiten	Für Glucosebiosensor bei Lactat und Saccharose nicht feststellbar
Membranlängen	Sensorsignal unabhängig von Längen > 10 cm; Einstellung des optimalen Messbereichs möglich
Akzeptor	Geeigneter Elektrolyt notwendig, z.B. 0,1 M KCl; Tris-Maleat-Puffer und Leitungswasser ungeeignet
Sauerstoffkonzentration	Reduktion pO_2 im Akzeptormedium auf 55 % (vollständige Sauerstoffzehrung im Reaktionsmedium und $t_{stop}=3$ min); Sensorverhalten nach Schätzung nicht beeinträchtigt.
2. Probenahmeteknik	
Zeit	Gleichgewicht wird erst nach mehr als 1 h erreicht; nach 3 min Konzentration im Probensegment ca. 60 % der in Reaktionslösung
Modellierung	Stofftransportbeschreibung mit instationärem und quasistationärem Modell möglich; Simulationen mit inst. Modell bei Variation geometrischer und Membran-Parameter möglich
Temperatur	abhängig von Sensor z.B. gemessen 36 nA/°C
Inkubator-Temperierung	Transportschläuche und Flüssigkeit ausreichend temperiert; Öffnen des Inkubators zur Probenahme: Beschränkung auf wenige Minuten.
Reaktionsmedium	Kalibrierung mit Standardlösungen gelöst im jeweiligen Medium notwendig
Hydrodynamik	
a. Im Reaktionsgefäß	Probenahme unabhängig bei Schüttelfrequenz >200 Upm und Begasung >10 NL/h; Rührer in Mini-Blasensäulen führt zu besserem Stoffübergang.
b. Volumenstrom des Akzeptormediums	Reduzierung des Peakmaximums um 20 % bei Veränderung von Re von 10 auf 60. Übliche $Re=35$.
Viskosität	Zunahme von 1 auf 2 mPas: Abnahme Signalmaximum um ca. 20 %
Membranmaterial	
a. Trenngrenze	Bei einer Trenngrenze von 5 kD im gleichen Zeitraum höherer Stofffluss als bei 1 kD
b. Dampfsterilisation	Stoffübergang gegenüber frischer Membran reduziert
3. Einfluss auf und durch den Prozess	
Stoffentnahme	0,7 μ mol Glucose/Probenahme; 0,87 mmol Glucose/d ($t_{stop}=3$ min)
Wachstumstest	Keine signifikante Wachstumsstörung durch Einbringen von Membranmodulen
Sterilität	Sterilität 21 d bei Verwendung insterilen Akzeptormediums nachgewiesen
Biofouling	REM-Aufnahmen zeigen Anlagerungen von Bakterien Nachkalibrierung nach 30 h Fermentation zeigt keine signifikante Veränderung in der Steigung der Kalibriergeraden: Verschlechterung des Stofftransports und Sensordrift nicht beobachtet.

6. Funktionsprüfung der parallelen Substratanalytik zur Überwachung und Regelung mikrobieller Bebielprozesse

Mit der in Kapitel 4 in ihrer Funktionsweise vorgestellten und in Kapitel 5 charakterisierten Probenahme- und Messtechnik werden hier Ergebnisse aus Anwendungsexperimenten mit mikrobiellen Bebielsystemen dargestellt.

6.1. Paralleles Online-Substrat-Monitoring in Kleinreaktionsgefäßen

Im ersten Schritt wird geprüft, ob das Funktionsmuster zur parallelen Probenahme- und Messtechnik die aktuelle Konzentration in parallelen Kulturen wiedergibt. Das geschieht anhand eines Vergleiches mit offline vermessenen Proben. Diese werden in regelmäßigen Abständen den Bioprozessen über eine direkte Probenahme entnommen.

6.1.1. Online-Glucose-Monitoring von *Escherichia coli* 4pF20 in Fedbatch Mini-Blasensäulen

Die auf pH 6,5 geregelten parallelen Fedbatch-Prozesse werden in Reaktionsgefäßen vom Typ Mini-Blasensäule in Anlehnung an ein Standardfermentationsprotokoll für die Kultivierung im Rührkessel bei 37°C über 30 h durchgeführt [Gerigk 2000]. Ein Unterschied besteht in der Verwendung eines vorgegebenem Glucose-Dosierprofils im Kleinreaktionsgefäß anstelle einer Substrat-Regelung.

Die Glucosekonzentration wird mit der parallelen Probenahme- und Messtechnik in vier parallelen Säulen aufgezeichnet. Je eine hinsichtlich der Substratkonzentration überwachten Säulen entstammt einer Vierergruppe paralleler Versuchsansätze, die sich gemäß Tab. 6.1 unterscheiden.

Vor der Fermentation wird zur Kalibrierung mit jeder Membran in Glucose-Standardlösung (gelöst in Akzeptormedium) von 0,5-20 g/L bei Fermentationstemperatur von 37°C FDA durchgeführt und eine Kalibrierreihe aufgezeichnet.

Tab. 6.1: Versuchsbedingungen in Gruppen von je vier Mini-Blasensäulen

Gruppe	Tyrosin [g/L]	Hefeextrakt [g/L]
I ^a	0,5	0
II ^a	0,75	0
III ^a	0,5	1
IV ^a	0,75	1

^aJeweils eine der vier Säulen jeder Gruppe wird nicht mit IPTG induziert.

In Abb. 6.1 sind die Glucosekonzentrationen über die Fermentationsdauer für jede Säule aufgetragen. Die Messwerte auf der Grundlage der durchgeführten Kalibrierung gaben nicht die durch offline Messungen (enzymatischer Glucose Assay) ermittelten Konzentrationen im Prozess wieder. Aus diesem Grund wurden die, dem Zeitpunkt der Offline Probenahme zeitlich am nächsten, gemessenen Peakmaxima nachträglich mit den offline gemessenen Werten korreliert und die Online Messwerte damit in Abb. 6.1 korrigiert. Die korrigierte Kurve zeigt, dass der zeitliche Verlauf der Substratkonzentration gut wiedergegeben ist. Es ist daraus zu schließen, dass sich die Messtechnik zur parallelen Online-Überwachung eignet, aber die bisherige Kalibrierstrategie einen systematischen Messfehler beinhaltet. Die Ursache wird angesichts der Ergebnisse der verfahrenstechnischen Charakterisierung in der Zubereitung der Glucose-Standardlösungen mit Akzeptor- anstatt mit Reaktionsmedium vermutet. Ausserdem ist es möglich, dass die Standardlösungen bei der Probenahme nicht exakt Versuchstemperatur hatte, was nicht geprüft wurde.

Aus Abb. 6.1 wird außerdem deutlich, welche Bedeutung das Substratmonitoring für die Bioprozessentwicklung hat. Auf der Grundlage der Substratüberwachung kann die Güte des Dosierprofils für eine Prozessführung mit Glucose-Überschuss beurteilt werden. D.h. Glucose soll stets in Konzentrationen über dem K_S -Wert¹ vorliegen. Ab 12 h wird Glucose in allen Säulen schneller verbraucht, als durch das vorgegebene Dosierprofil nachdosiert wird. In drei der Säulen tritt sogar über mehrere Stunden ein vollständiger Substratverbrauch auf, so dass die Glucosekonzentration auf einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze absinkt.

Mit dem Einsatz der parallelen Online-Glucosebestimmung hätte der Prozessverlauf in diesem Maßstab physiologisch günstiger gesteuert bzw. geregelt werden können. Die Übertragbarkeit von gewonnenen Daten aus dem Kleinmaßstab in den Rührkessel, wäre auf diese Weise verbessert worden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse fällt auf, dass der Signalverlauf starken Schwankungen unterworfen ist. Zwei Ursachen kommen für dieses Phänomen in Betracht.

¹Wert für *E. coli* 4pF20 liegt nicht vor. K_S -Wert von *E. coli* K12 liegt in der Größenordnung von 4 mg/L [Chmiel 1991].

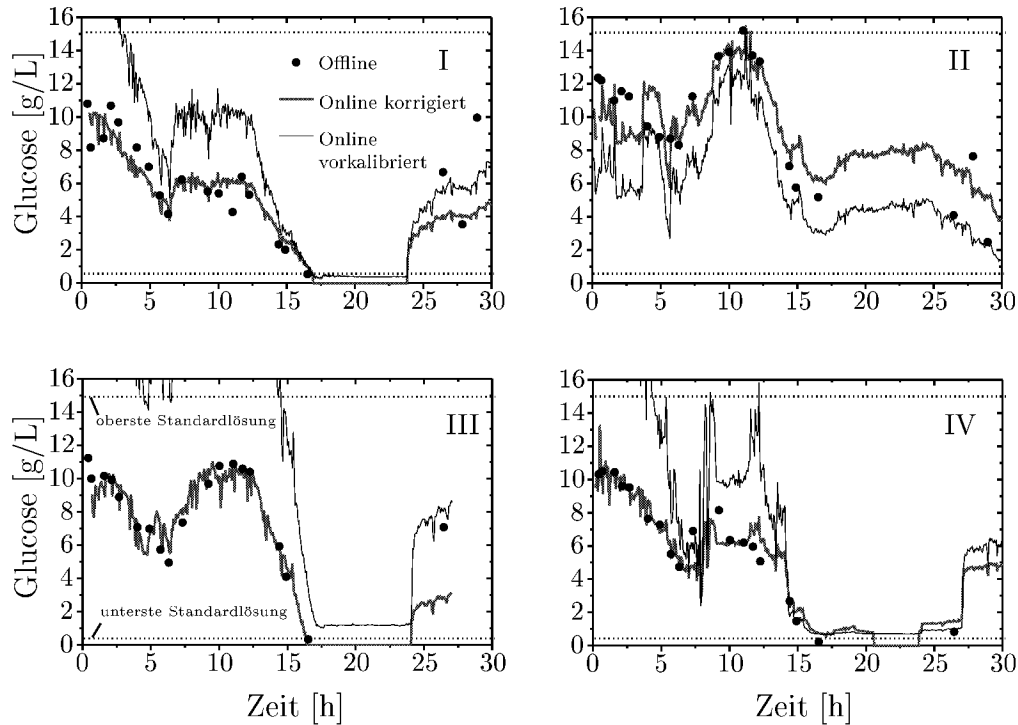


Abb. 6.1: Paralleles Glucosemonitoring in *E. coli* Fedbatch-Kulturen in vier von sechzehn parallel bei 37°C kultivierten Mini-Blasensäulen (I-IV siehe Tab. 6.1). Aufgrund ungenügender Vorkalibrierung wurden die Online Messwerte nachträglich durch Korrelation mit Offline Messwerten korrigiert (rote Kurve).

1. **Intermittierende Dosierung:** Die Glucose wird über eine Mikrodosiertechnik intermittierend zugegeben. D.h. zwischen jeder Dosierung entsteht eine Pause, da die parallelen Gefäße nacheinander mit der Glucoselösung versorgt werden. Die Konzentration steigt nach dem Dosierhub zunächst sprunghaft an und wird dann durch die biologische Aktivität reduziert.
2. **Temperaturschwankungen:** Die Inkubatorhaube wird zur Betreuung der Fermentation und Probenahme häufig geöffnet. Dadurch verursachte Temperaturschwankungen am Sensor und in der Flüssigkeit können die Ursache für niedrigere Messwerte sein. Dieses Phänomen läßt sich experimentell nachweisen: Es wird ein Absinken des Signals kurz nach Öffnen des Inkubators während der Fermentation beobachtet.

In Abb. 6.2 sind die Wachstums- und Produktkonzentrationsverläufe der vier überwachten Säulen und der jeweils drei parallelen Säulen (Mittelwert) der verschiedenen Versuchsansätze dargestellt. An diesen Daten soll deutlich werden, dass sich die überwachten Säulen nicht signifikant von den zwei anderen parallelen Ansätzen unterscheiden.

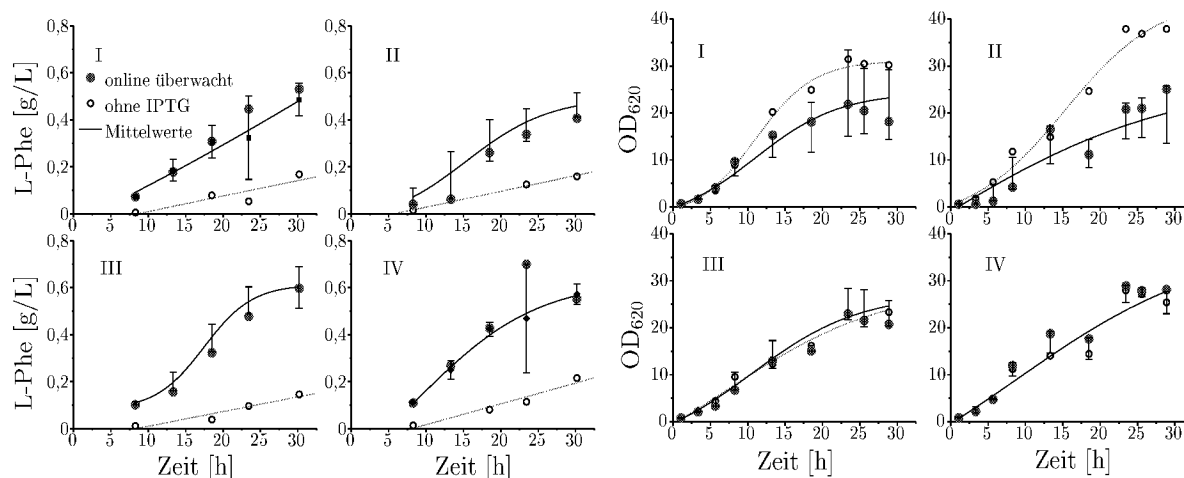


Abb. 6.2: Wachstum anhand der optischen Dichte (OD_{620}) und Produktbildung (L-Phe) in sechzehn parallelen Ansätzen gemäß Tab. 6.1.

6.1.2. Glucoseverbrauch von *Escherichia coli* in Batch Schüttelkolben

Im Folgenden soll die Funktionsfähigkeit der Membranprobenahme nach Integration in den während der gesamten Kulturdauer mechanisch bewegten Schüttelkolben gezeigt werden.

E. coli YYC202 wird in 50 mL M9-Medium in 500 mL Schüttelkolben mit zwei Schikanen vierfach parallel bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Der pH-Wert wird online aufgezeichnet. Der Organismus kann weder aerob noch anaerob Acetat bilden (Acetatauxotrophie) und ist daher auf die Zugabe dieses Stoffwechselintermediärs angewiesen. In dem vorliegenden Versuch sollten zwei verschiedene Ausgangskonzentrationen von Glucose, 2 g/L und 16 g/L, in je zwei parallelen Kolben getestet werden, wobei Acetat jeweils im Verhältnis 1:5 (Acetat:Glucose) zugegeben wurde. Die Probenahme- und Messtechnik ist wie zuvor konfiguriert. Der apparative Aufbau wurde lediglich von dem Blasensäulen- in den Schüttelkolbeninkubator transferiert. Die Membranen wurden in Glucose-Standardlösung (gelöst in sterilem Reaktionsmedium M9) kalibriert.

Abb. 6.3 zeigt on- und offline gemessene Glucosewerte. Die Ergebnisse zeigen auch hier die praktische Anwendbarkeit des Labormusters zum parallelen Online-Monitoring von Glucose. Im Versuchansatz d. wurde vermutlich ein Fehler bei der Medienherstellung gemacht, da sich die Biomassebildung stark vom gleichen Versuchsansatz c. unterscheidet. Bei den gemessenen Online-Daten sind Schwankungen sichtbar. Da es sich um Batch-Ansätze handelt, können nur Temperaturschwankungen und in geringem Maße das Anhalten des Schüttlers bei jeder Probenahme die Ursachen sein. Der Inkubator wird zur Durchführung der direkten Probenahme sehr häufig geöffnet. Bei Vergleich der Online-Messkurve und der Verteilung der Offline-Probenahme kann ein Zusammenhang zwischen der Öffnung des Schüttelinkubators und gleichzeitigem Stop der Überströmung und dem Auftreten einer Messwertschwankung vermutet werden. Ein auf Minuten genauer Zeitpunkt der Offline-Messung kann nicht angegeben werden, da die manuelle Probenahme in parallelen Gefäßen zeitlich nicht so präzise abläuft. Die Regelmäßigkeit der Störungen richtet sich scheinbar nach der Probenahmefrequenz, was die These der Temperaturschwankungen als Ursache stützt.

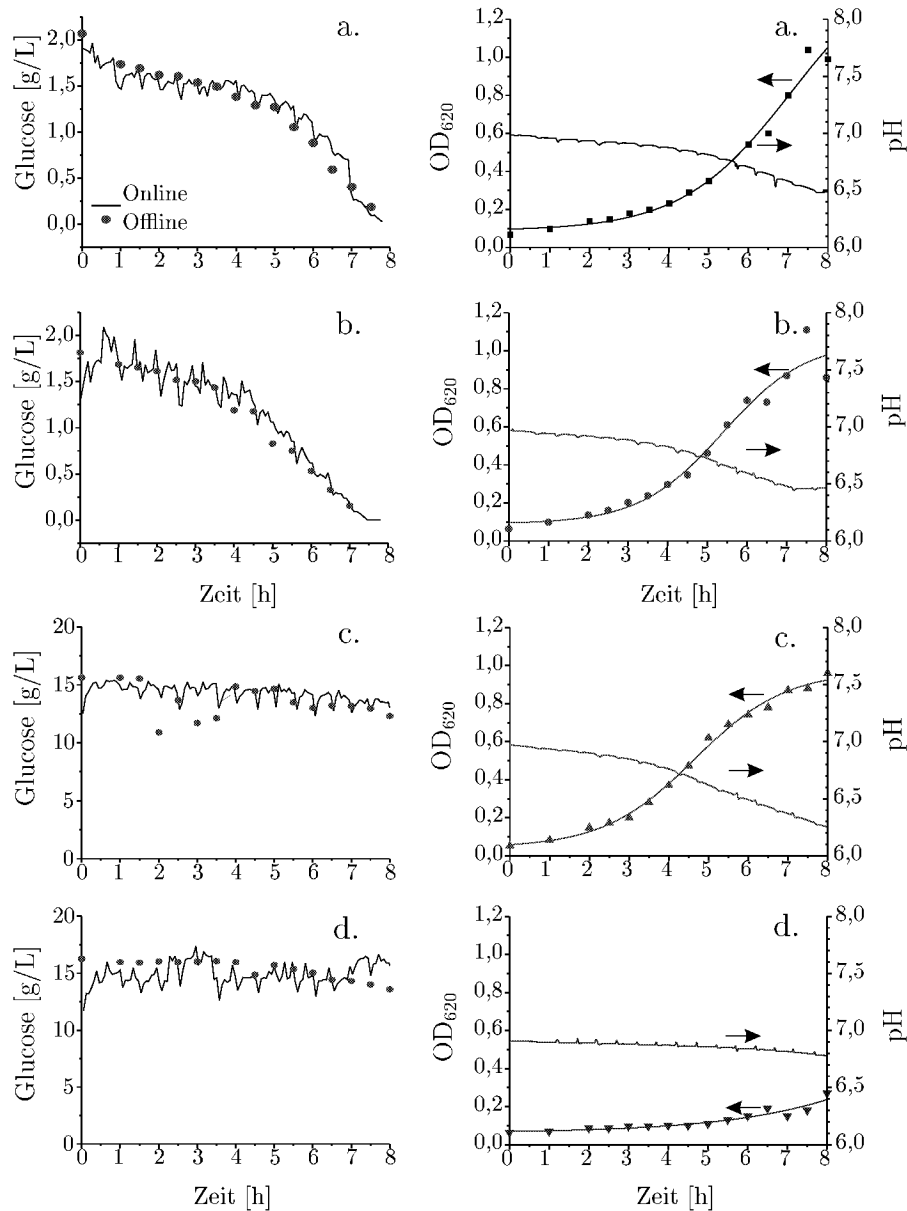


Abb. 6.3: Substratmonitoring im Schüttelkolben: Pyruvat überproduzierender *E. coli* 37°C, 200 Upm, 50 mL Startvolumen/500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Endkonzentration Pyruvat [mM]: a. 8,1; b. 8,0; c. 42,6; d. 14,4. Spezifischer Produkt-Ausbeute-Koeffizient Y_{PS} [g/g]: a. 0,81; b. 0,80; c. 0,43; d. 0,14.

6.1.3. Simultane Bestimmung des Glucoseverbrauchs und der Lactat-Bildung mit *L. kefir*

Rührkessel

Um die Reproduzierbarkeit der parallelen Probenahme im Bioprozess zu überprüfen, wurden drei parallele Membranen in einen Rührkessel eingebracht. Mit dem Effizienzprogramm wird alle 45 s aus einer Biotransformation von 2,5-Hexandion zu 2,5-Hexandiol mit ruhenden Zellen von *Lactobacillus kefir* ein diffusiv angereichertes Probensegment auf seinen Glucose- und Lactat-Gehalt untersucht. Glucose wird dabei verbraucht und

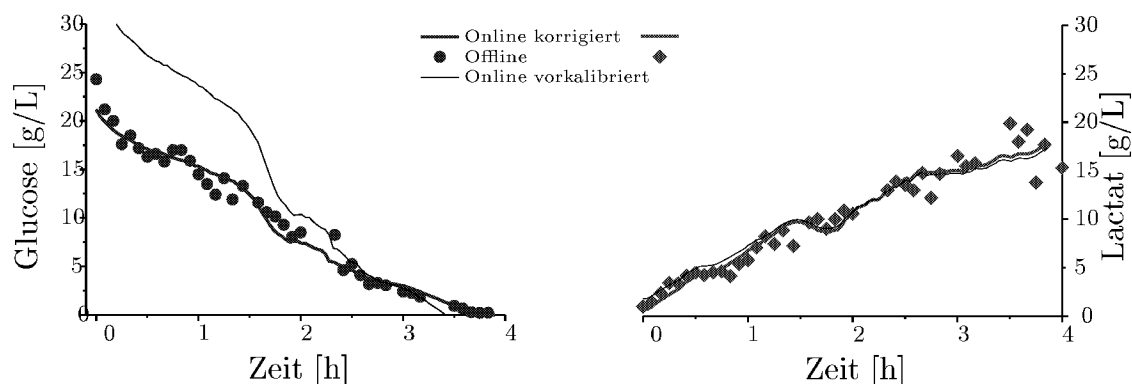


Abb. 6.4: Simultanes Substrat- und Nebenprodukt-Monitoring: Dreifach parallele Probenahme aus einer Biotransformation mit *L. kefir* im 1 L Rührkessel bei $T=30^{\circ}\text{C}$ zur Online-Bestimmung von Glucose und Lactat. Bei Lactat wurde aufgrund des zu begrenzt eingestellten Messbereichs des Verstärkers ausnahmsweise die Sattelkonzentration statt des Peakmaximums zur Auswertung herangezogen. $t_{stop}=135$ s, Sensorzelle und Schläuche bei $T=T_R$). Da es nicht möglich war, die Sensoren im Reaktionsmedium zu kalibrieren, wurden Standardlösungen gelöst in VE Wasser verwendet und die Online Messwerte mit Offline Messwerten korrigiert (lineare Verschiebung).

u.a. Lactat und Produkt gebildet. Dazu wird ein Glucose- und ein Lactat-Biosensor in einem Sensorarray angeordnet, die bei diesem experimentellen Aufbau nicht auf Reaktionstemperatur gebracht, sondern bei Raumtemperatur betrieben wurden.

Abb. 6.4 zeigt den Vergleich der online und offline ermittelten Konzentrationsverläufe. Die relative Standardabweichung der drei Online-Messkurven war kleiner als 5 %. Die Ergebnisse bestätigen die Möglichkeit der simultanen Verwendung der Senslab-Biosensoren in einem Sensorarray für das Bioprozessmonitoring.

Der Einsatz von Zellmaterial, in welchem noch undefinierte Mengen von Medienbestandteilen aus der Biomassevermehrung enthalten sind, birgt für die korrekte Vorkalibrierung der Dialysetechnik ein Problem: Die Hintergrundionenkonzentration kann schwanken. In Abschnitt 5.2.3 wurde hingegen gezeigt, dass Standardlösungen gelöst im verwendeten Reaktionsmedium zur Vorkalibrierung verwendet werden müssen.

Bei diesem Experiment wurde in Standardlösungen mit VE-Wasser kalibriert. Es zeigen sich Abweichungen zwischen Online- und Offline-Rohwerten, die im Anschluss an das Experiment zur Visualisierung des gleichen Zeitverlaufs durch Korrelation der Peakmaxima zu den Offline-Messungen korrigiert wurden. Da es sich um eine lineare Korrektur handelt bleibt es zu untersuchen, ob nur mit einer einzigen Offline Messung zu Beginn des Experiments, die Korrektur vollzogen werden kann, damit die korrekten Messwerte auch online verfügbar sind.

Schüttelkolben

Zur Steigerung der Effizienz bei der Prozessentwicklung zur Ganzzellbiotransformation mit *L. kefir* wird der Prozess in vier parallele, pH-geregelte Schüttelkolben übertragen. Um im ersten Schritt die Reproduzierbarkeit zu testen, wurden gleiche Versuchs-

bedingungen in den parallelen Ansätzen eingestellt. Für die Vorkalibrierung wurde die Verdünnung des ursprünglichen Kulturmediums der *L. kefir* Fermentation durch Berücksichtigung aller Waschschriffe auf 1:10 abgeschätzt [Haberland 2000]. So wird die Online-Analytik mit Mischstandardlösungen von Glucose und Lactat mit 10 % des Kulturmediums kalibriert. Dieses Vorgehen lieferte nicht das gewünschte Ergebnis, so dass in diesem Fall anhand der offline bestimmten Werte eine Korrektur vorgenommen wurde, um die Zeitverläufe vergleichen zu können.

Abb. 6.5 gibt die zeitlich gleich verlaufenden Glucose und Lactatkonzentrationen online und offline in je vier parallelen Reaktionsgefäßen wieder. Auch in diesem Experiment zeigt sich, welchen Beitrag die entwickelte Probenahme- und Messtechnik zur effizienteren und definierteren Bioprozessentwicklung leisten kann. Substratakkumulation hätte in den Gefäßen verhindert werden können.

6.2. Parallele Substratregelung in Schüttelkolben

Nach der Funktionsprüfung im Substratmonitoring soll im nächsten Schritt die FDA mit geeigneten parallelen Regelalgorithmen gekoppelt werden. Soweit nicht anders beschrieben, gelten die Versuchsbedingungen für die FDA: $t_{stop}=3$ min, $\dot{V}=2,5$ mL/min, Peakmaximum zur Auswertung.

6.2.1. Parallele Substratregelung mit modifiziertem PID-Regler mit *Escherichia coli* K12 in parallelen Schüttelkolben

Mit *Escherichia coli* K12 wurde in 4 parallelen, pH-geregelten Schüttelkolben in einem Mineralsalzmedium (Pan-Medium) bei $T=37^{\circ}\text{C}$ und 200 Upm eine parallele Glucoseregelung durchgeführt. Entsprechend einer modifizierten, einseitigen PID-Regelstrategie wurde Glucoselösung parallel im geschlossenen Regelkreis nachdosiert. Der Proportionalanteil p und der Integralanteil T_i waren dabei während des Prozesses für eine Variation zugänglich. T_i wurde auf 1200 s eingestellt. Der Proportionalanteil betrug bis 2,5 h $p=0,01$ und wurde bis 4,5 h auf $p=0,03$ erhöht, da aus der Beobachtung deutlich wurde, dass der Regler träge reagierte. Im Anschluss wurde der Wert auf 0,01 wieder reduziert. In Abb. 6.6 ist zu erkennen, dass der Sollwert von $1\text{ g/L} \pm 0,5\text{ g/L}$ in parallelen Versuchsansätzen gehalten werden konnte. Der Prozess wurde nach Eintreten der stationären Wachstumsphase nach 6,5 h beendet. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase lag die Substratkonzentration über eine gewisse Zeitdauer in allen Gefäßen unterhalb der Sollwertkonzentration, daraufhin wurde der p-Anteil manuell verändert. Daraus wird deutlich, dass sich ein PID-Regler mit konstanten Reglerparametern für die Substratregelung in einem mikrobiellen Bioprozess nicht eignet. Die Parameter müssten an die über die Prozesszeit sich verändernde Dynamik² des Systems anzupassen sein (parameteradaptiv).

²Die Wachstumsgeschwindigkeit und damit der Substratbedarf nimmt in der exponentiellen Wachstumsphase einen maximalen Wert an und nimmt bei Erschöpfung von Nährstoffen oder Erreichen einer hohen Zelldichte wieder ab.

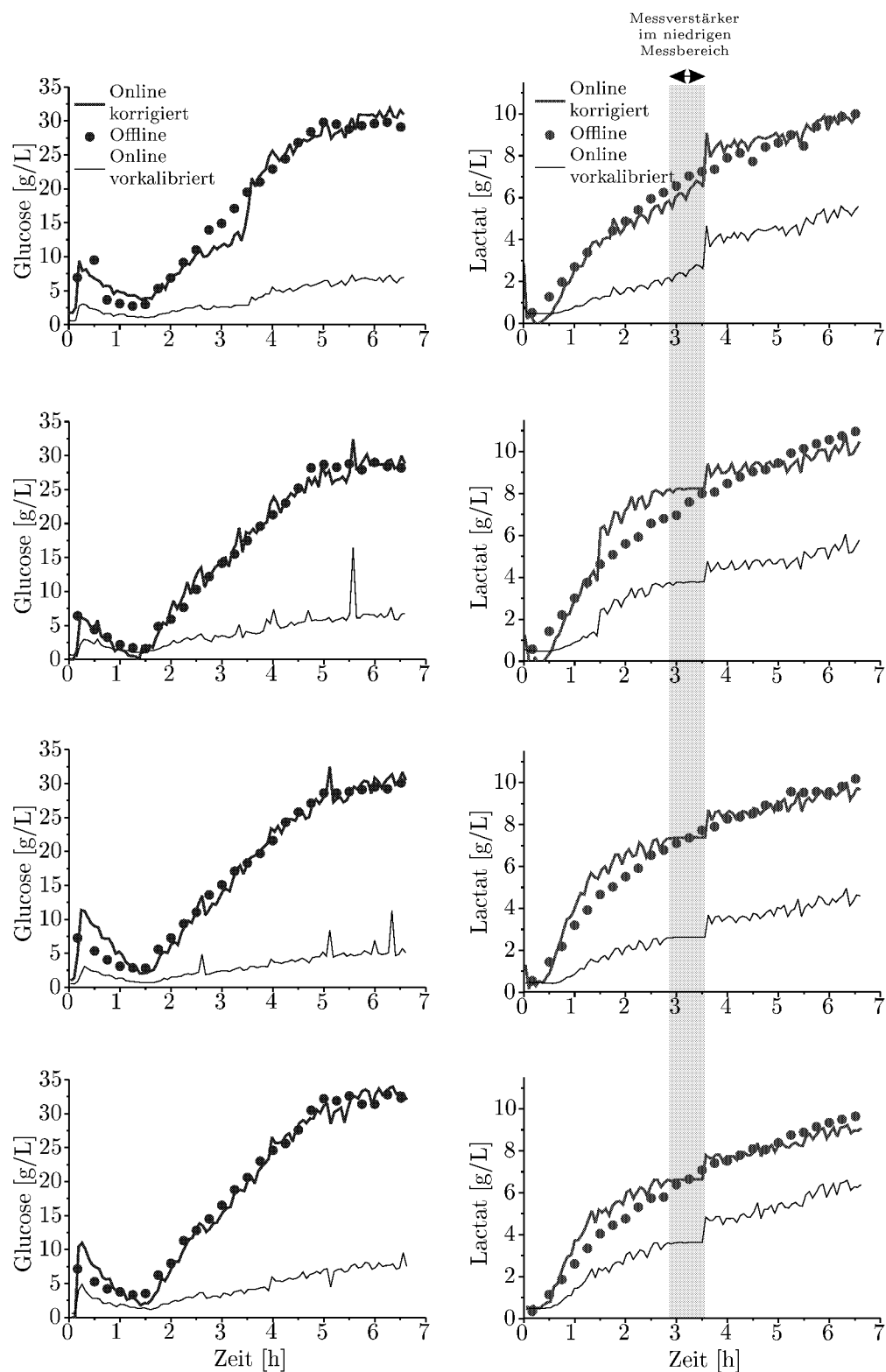
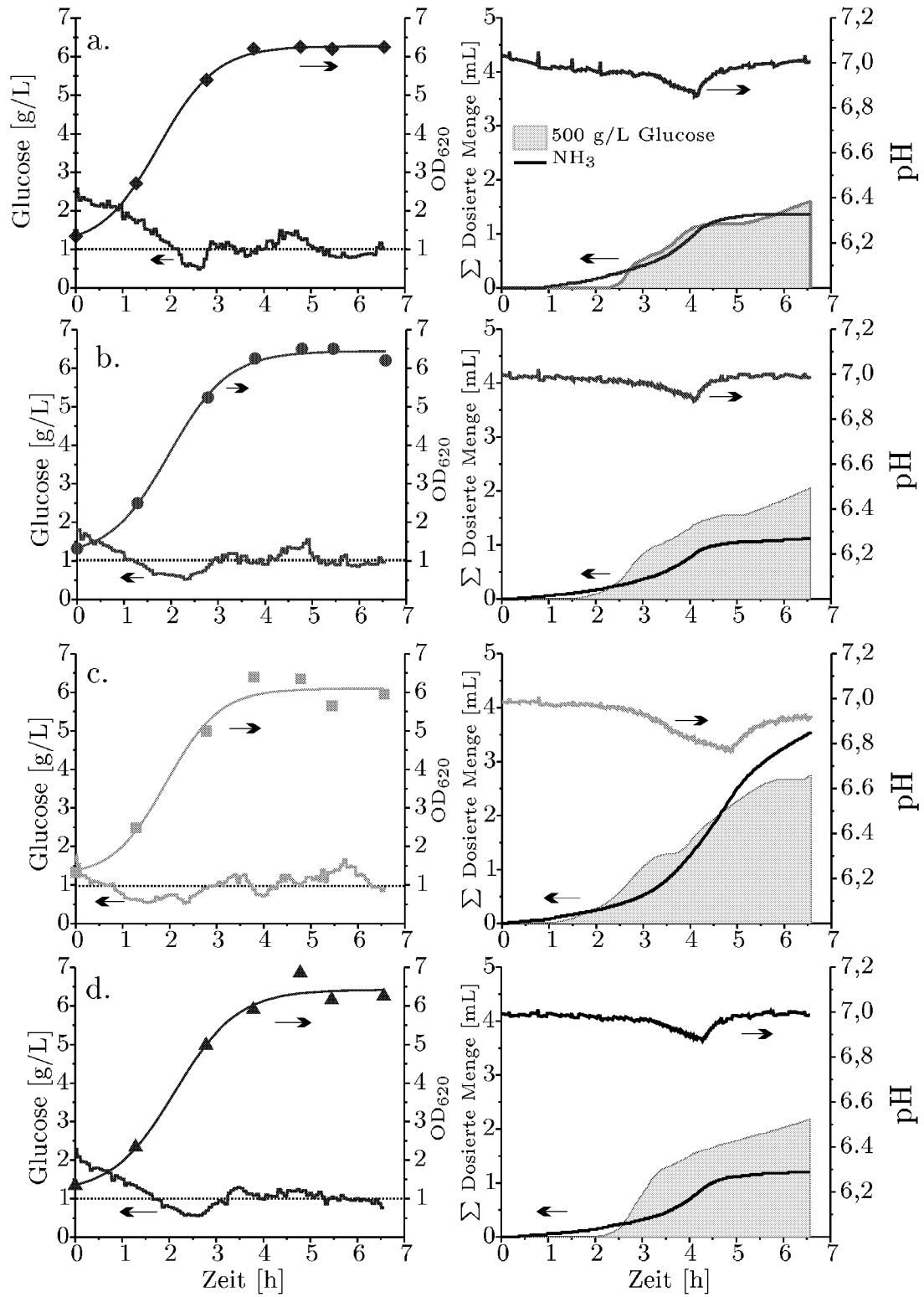


Abb. 6.5: Simultanes Substrat- und Nebenprodukt-Monitoring während einer parallelen Biotransformation im Schüttelkolben mit *L. kefir*: $t_{stop}=3$ min, $T=30^{\circ}\text{C}$



Kolben	a.	b.	c.	d.
$A_{\text{quadrat}} [\text{g}^2/\text{L}^2\text{s}^2]$	93	129	212	84

Abb. 6.6: Parallele Glucoseregulation (Sollwert 1 g/L) in 4 parallelen 50 mL/500 mL Schüttelkolben mit *E. coli* K12 bei $T=37^\circ\text{C}$, 200 Upm, 50 mL Startvolumen.

Die zeitbeschwerten Betragsregelflächen aus Abb. 6.6 wurden ab dem Zeitpunkt der Unterschreitung der Sollwertkonzentration für die parallelen Kolben nach folgender Gleichung berechnet (numerische Integration) [Altenbach-Rehm 2000]:

$$A_{\text{quadrat}} = \int_0^t (|x_i - c_{SP}|^2 \cdot t) dt \approx \sum_0^t (|x_i - c_{SP}|^2 \cdot t) \Delta t \quad (6.1)$$

wobei

A_{quadrat}	zeitbeschwerte Betragsregelfläche	$[\text{g}^2/\text{L}^2\text{s}^2]$
c_{SP}	Sollwert-Konzentration	$[\text{g}/\text{L}]$
x_i	Messwert	$[\text{g}/\text{L}]$
Δt	Abtastzeit	$[\text{s}]$

bedeutet.

Dieses Gütekriterium zur Beurteilung der Regelqualität gewichtet im Verlauf des Regelzeitraums später auftretende Abweichungen stärker. So können Verzögerungen, die durch die Verwendung paralleler Gefäße entstehen, besser dargestellt werden. [Altenbach-Rehm 2000]

Alle vier ermittelten Betragsregelflächen liegen in vergleichbarer Größenordnung (siehe Abb. 6.6). Mit diesen Ergebnissen ist es nun erstmals mit einem einfachen Regelalgorithmus gelungen, im 50 mL Maßstab die Glucosekonzentration in vier parallelen Bioprozessen zu regeln.

6.2.2. Parallele Substratregelung mit parameteradaptivem Regler mit *Escherichia coli* 4pF20

Der modifizierten PID-Regelstrategie sollte zum Vergleich ein parameteradaptiver Regler gegenübergestellt werden. Es wird ein für Fedbatch Prozesse entwickelter und erfolgreich erprobter Algorithmus [Kleman und Chalmers 1991] verwendet.

Simulation der Regelung vor dem Versuch

Mit empirisch ermittelten Werten für den Ausbeutekoeffizient Y_{XS} aus Schüttelkolbenkulturen mit *E. coli* 4pF20 [Kreutzer 2000] wurden Simulationen durchgeführt. Unter Annahme einer Monod-Wachstumskinetik ohne Inhibierung mit $Y_{XS}=0,1067 \text{ g/g}$ und $K_S=0,004 \text{ g/L}$ Glucose [Chmiel 1991] und unter Berücksichtigung von Messfehlern (Zufallsgenerator mit entsprechender Standardabweichung) wurden die Simulationsergebnisse in Abb. 6.7 und 6.8 erzeugt.

Aus den Regelabweichungen lassen sich zeitbeschwerte Betragsregelflächen berechnen. Es wird die Parameterkombination bevorzugt, bei der ihr Wert am geringsten ist. In Tab. 6.2 und 6.3 sind jeweils der größte und der kleinste Wert der Betragsregelflächen der getesteten Kombinationen markiert.

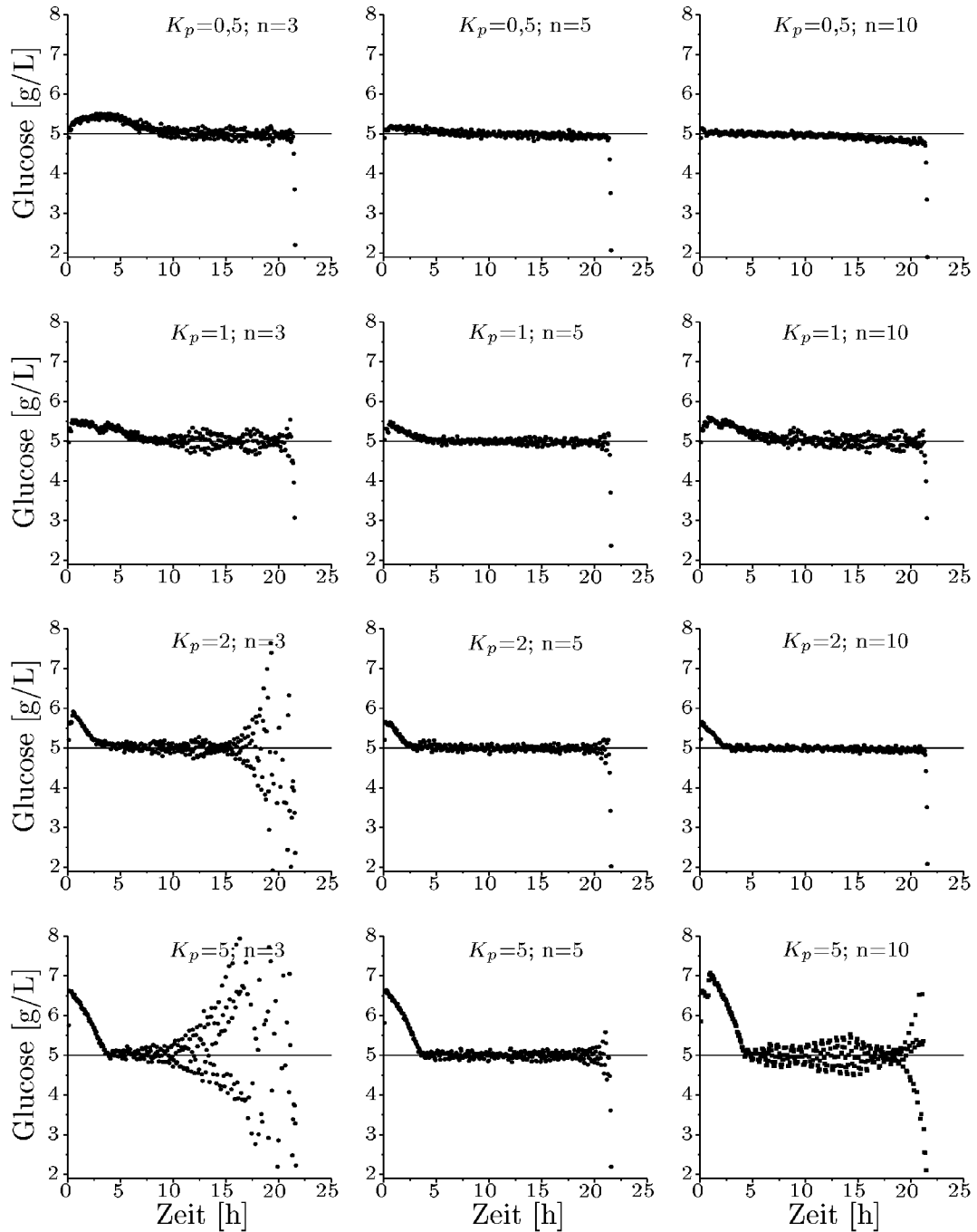


Abb. 6.7: Simulation des Substratkonzentration bei Substratregelung mit *E. coli* im Schüttelkolben: angenommener Messfehler $\pm 0,05$ g/L, Abtastzeit 4 min, Anfangsvolumen im Schüttelkolben $V_o=100$ mL, angenommene Anfangskonzentration der Biomasse nach Animpfen $c_{Xo}=0,1$ g/L, Sollwert der Substratkonzentration $c_S=5$ g/L, $Y_{XS}=0,1067$ g/g, $K_S=0,004$ g/L (Formalkinetiken aus repräsentativen Schüttelkolben Fedbatch Kulturen mit *E. coli* 4pF20 [Kreutzer 2000])

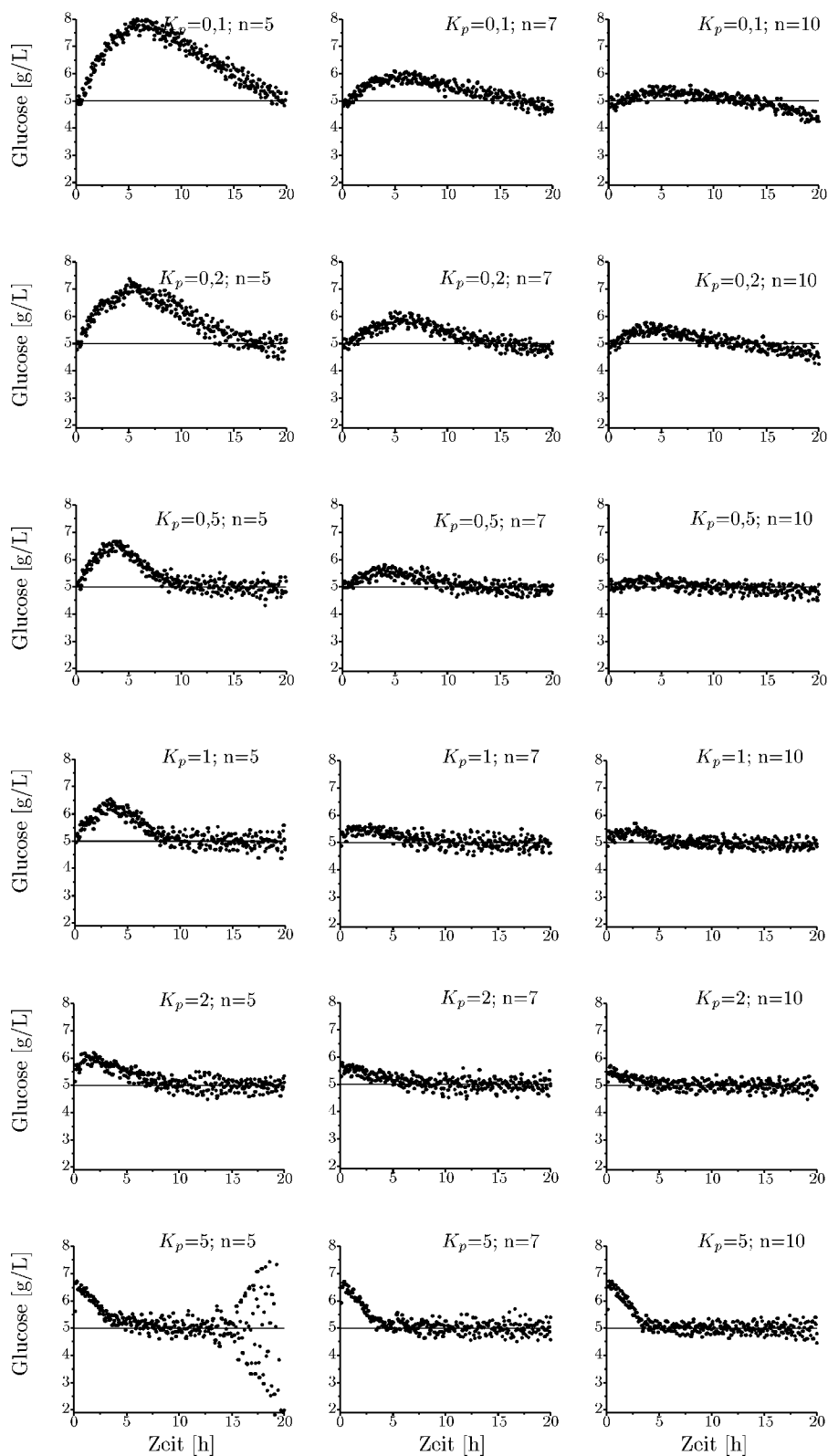


Abb. 6.8: Simulation des Substratkonzentration bei Substratregelung mit *E. coli* im Schüttelkolben: angenommener Messfehler $\pm 0,2$ g/L; weitere Randbedingungen wie in Abb. 6.7.

Tab. 6.2: Zeitbeschwerte Betragsregelflächen für Simulationen mit $\pm 0,05$ g/L Messfehler (Abb. 6.7). Hervorgehobene Werte sind der maximale und der minimale Wert.

n [-]	3	5	10
K_p [-]	$A_{\text{quadrat}} [\text{g}^2/\text{L}^2\text{s}^2]$		
0,2	582	129	1.144
0,5	299	47	132
1	333	54	281
2	14.884	48	36
5	63.070	320	1.384

Tab. 6.3: Zeitbeschwerte Betragsregelflächen für Simulation mit $\pm 0,2$ g/L Messfehler (Abb. 6.8). Hervorgehobene Werte sind der maximale und der minimale Wert.

n [-]	3	5	7	10
K_p [-]	$A_{\text{quadrat}} [\text{g}^2/\text{L}^2\text{s}^2]$			
0,1	237.224	28.522	2.407	1.144
0,2	68.112	10.170	1.879	939
0,5	23.404	2.355	638	326
1	7.572	1.793	450	209
2	42.159	913	913	212
5	74.660	26.776	682	558

Versuchsdurchführung

Mit dem aus den Simulationen ermittelten Parameter $K_p=2$ (vgl. Gleichung 3.41 auf S. 48) für einen Messfehler von 0,2 g/L und einer Regressionsbreite von $n=10$ wird ein dreifach paralleler Regelungsversuch durchgeführt³. Die Regressionsbreite wird nach dem aus der Simulation hervorgegangenen besten Wert $n=10$ eingestellt.

Abb. 6.9 zeigt den Verlauf der Glucosekonzentration über 15 h der exponentiellen Wachstumsphase. Gefäß a. und b. zeigen dabei geringe Regelabweichungen. Gefäß c. verhält sich zufriedenstellend. Zum Vergleich ist in Abb. 6.9 auch der Verlauf der Glucosekonzentration des *E. coli* 4pF20 aus einem 20 L Rührkesselreaktor aufgetragen, bei dem die Substratkonzentration mit einem kommerziellen Glucoseanalysegerät⁴ gemessen und mit einem Minimalvarianz-Regler (MV3) mit erweitertem Kalman-Filter geregelt wurde⁵.

Im Rahmen der Prozessentwicklung im Rührkessel muss der Konzentrationsverlauf weit über dem K_s -Wert nicht mit geringstmöglicher Schwankungsbreite um den Sollwert liegen. Folglich erfüllt die parallele Regelung die Anforderungen, die bei einer Glucose-Überschuss-Regelung gestellt werden.

³Eine defekte Dialysemembran verhinderte die Regelung eines vierten Gefäßes.

⁴OLGA - IBA, Göttingen

⁵unveröffentlichte Daten mit freundlicher Genehmigung von [Gerigk 2000]. Der Regler war nicht in optimaler Weise parametrisiert

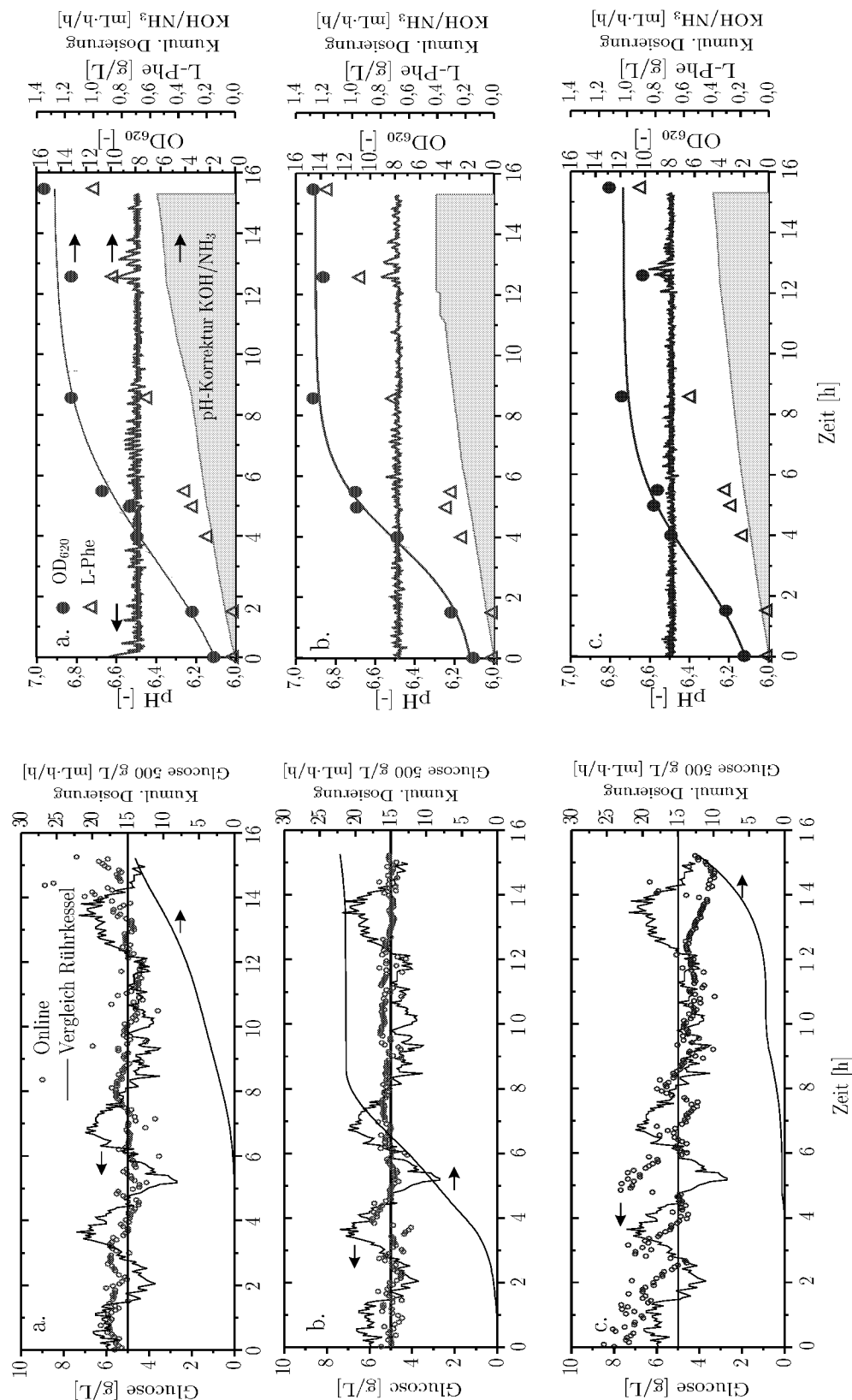


Abb. 6.9: Dreifach parallele Glucoseregulation auf 5 g/L in je 100 mL in 1 L Schüttelkolben mit *E. coli* 4pF20 zur L-Phe Produktion. Zum Vergleich sind Daten einer Substratregelung mit einem kommerziellen Online-Glucose-Analysator und einem MV3-Regler im 20 L Rührkessel mit *E. coli* 4pF20 aufgezeichnet. Daten stammen in etwa aus der gleichen Prozessphase.

7. Zusammenfassung

Am Anfang eines industriell genutzten Bioprozesses stehen zahlreiche Versuchreihen, die aus Kostengründen häufig im Klein- und Parallelmaßstab (z.B. Schüttelkolben) durchgeführt werden. In den letzten Jahren wurde der Stand der parallelen Kultivierungstechnik erweitert: Kleinreaktionsgefäße können mit einer parallelen Dosiertechnik im Zulaufverfahren betrieben werden, pH- und pO_2 -Monitoring sowie pH-Regelung sind parallel und miniaturisiert möglich [Weuster-Botz u. a. 2001]. Eine Vorrichtung zur parallelen Messung der Sauerstofftransferrate (OTR) wurde kürzlich vorgestellt [Anderlei und Büchs 2001].

Der Gewinn echtzeitnaher Informationen über weitere Zustandsgrößen von Bioprocessen im Parallelansatz, wie z.B. Substrat- oder Produktkonzentrationen und deren intelligente Nutzung für die Online-Prozesskontrolle stellt bisher noch eine Lücke in den technischen Möglichkeiten im parallelen Kleinmaßstab dar.

Ziel der Arbeit

Allgemeines Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer dem kleinen Reaktionsvolumen angepassten, automatisierten parallelen Probenahme- und Messtechnik, um online Substrat- und/oder Produktkonzentrationen zu überwachen und mit einer geeigneten parallelen Regelstrategie Substrat bedarfsgerecht nachzudosieren. Die entwickelte Technik ist in Abbildung 7.1 veranschaulicht. Eine Probenahme ist notwendig, da bisher kein Sensor entwickelt wurde, der die gewünschten Komponenten direkt in der Reaktionslösung unter Bioprozessbedingungen quantifizieren könnte.

1. Eine dem geringen Reaktionsvolumen angepasste Probenahmestrategie wurde entwickelt.

Um das Reaktionsvolumen nicht zu verringern, wurde eine **diffusive Probenahmestrategie** gewählt. Parallele Probenahmeverrichtungen aus **Hohlfaser-Dialysemembranen** (3 Fasern, 0,5 mm i.d., 10 cm Länge, 1 kD MWCO) wurden entwickelt, die die Anforderungen der Autoklavierbarkeit und Bioverträglichkeit erfüllen. Eine Vorrichtung zur **sterilen Integration** in die Kleinreaktionsgefäße Schüttelkolben und Mini-Blasensäulen wurde gestaltet.

Das Membranmodul ist im Gefäß mit Reaktionslösung bedeckt. Über Fluidleitungen sind die Hohlfasern mit einem Fließsystem verbunden, in dem sich eine analytfreie

Akzeptorflüssigkeit befindet. Im sogenannten „Stop-Flow-Verfahren“ wird der Volumenstrom der Akzeptorlösung für einen definierten Zeitraum unterbunden. In Abhängigkeit des Konzentrationsgradienten zwischen Reaktions- und Akzeptorlösung kommt es zu diffusivem Stoffaustausch. Das auf diese Weise mit Analytmolekülen angereicherte Probensegment im Inneren der Hohlfasern wird mit der Akzeptorlösung nach Ablauf der Diffusionszeit mit konstantem Volumenstrom einem geeigneten Analysesystem zugeführt. Dieses kombinierte Probenahme- und Messverfahren wird Fließdiffusionsanalyse (FDA) genannt.

2. Eine Substratspezifische Online-Messtechnik wurde ausgewählt

Enzymatische Biosensoren eignen sich für die spezifische Bestimmung von Substraten in komplex zusammengesetzten Lösungen. Glucose diente als Modellsubstrat, da es als eines der wichtigsten Substrate in der biotechnologischen Praxis gilt. Kostengünstige **amperometrische Dickschichtelektroden** mit immobilisierter **Glucose-Oxidase** mit Ansprechzeiten im Sekundenbereich wurden ausgewählt. Durch die kurze Ansprechzeit eignen sich die Sensoren für Analysen in einem Fließsystem.

3. Ein automatisiertes Funktionsmuster einer parallelen Probenahme- und Messtechnik wurde auf Grundlage von Voruntersuchungen erstellt.

Obwohl die gewählten Sensoren kostengünstig sind, ist die für jeden Sensor notwendige Potentiostatschaltung ein Kostenfaktor. So wurde versucht, die Zahl der für die Parallelmessung notwendigen Sensoren zu reduzieren. Unter den Anordnungsmöglichkeiten mehrerer Membranen in einem Fließanalysesystem zu einem Detektor wurde die **parallele Anordnung** gewählt. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen zeigten bei der alternativen seriellen Anordnung eine stärkere Dispersion der Probensegmente, die den größten Leitungsabstand zum Detektor hatten. Die unterschiedliche Dispersion bringt eine unterschiedliche Genauigkeit der Messung mit sich. Zudem kann es bei Durchfluss durch andere Membranmodule in der Modulserie zu einer Querbeeinflussung dadurch kommen, dass die Probe durch Stoffübergang an den Membranen in anderen Reaktionsgefäßen verändert wird.

Zur experimentellen Erprobung und verfahrenstechnischen Charakterisierung wurden die in der Vorprüfungsphase ausgewählten Komponenten zu einem **Funktionsmuster** in paralleler Anordnung zusammengeführt und die Probenahme und Datenerfassung mit einer Steuerungssoftware **automatisiert**.

Eine kontinuierlich fördernde Pumpe sorgt für den Transport der Akzeptorlösung im Fließsystem. Eine Multiventilanordnung ermöglicht es, den Volumenstrom in den parallelen Probenahmestrecken rechnergesteuert an- und abzuschalten, um das Fließdiffusionsverfahren durch exaktes Einhalten der Diffusionszeit durchführen zu können. Es hat sich dabei eine Diffusionszeit von 3 min und eine Zeitdauer für den Transport und die Analyse des Probensegments von 1 min bewährt.

Am Sensor wird bei jedem Probensegment ein „**peakförmiges**“ **Signal** gemessen, das auf einer erhöhten Basislinie (**Sattellinie**) nach Durchfluss verbleibt. Die auf diese

Weise nachgewiesene Analytkonzentration kommt durch diffusiven Übergang an der Membran bei kontinuierlicher Durchströmung zustande. Zur Auswertung des Signals kann das meist verwendete **Peakmaximum**, aber auch die Sattellinie oder die Fläche herangezogen werden.

Die kürzeste Abtastzeit ergibt sich bei diesem Aufbau, wenn die parallelen Probenahmestrecken sequentiell mit der Pumpe verbunden werden. Während ein Probensegment zum Detektor transportiert wird, findet in den anderen Membranmodulen noch Diffusion statt. Auf diese Weise wird bei 4 parallelen Probenahmestrecken bei oben genannten Zeiten eine **Abtastzeit von 4 Minuten pro Gefäß** erreicht. Da die diffusive Anreicherung im Minutenbereich nicht zum Konzentrationsausgleich führt, **muss die zeitabhängige Probenahme zusammen mit dem Detektor mit Standardlösungen kalibriert werden.**

4. Das Funktionsmuster wurde umfassend durch Variation der relevanten Einflussparameter charakterisiert und die Reproduzierbarkeit der Analyse festgestellt

Die wichtigsten Erkenntnisse der verfahrenstechnischen Charakterisierung sind:

- Die amperometrischen **Substratbiosensoren** zeigen eine **Chargenabhängigkeit** in Empfindlichkeit, Messbereich und Temperaturabhängigkeit des Signals. Eine Kalibrierung des Sensors ist daher stets bei Inbetriebnahme eines neuen Sensors durchzuführen.
- Der **Sensor** reagiert spezifisch auf Glucose und ist **nicht** messbar **von der Zusammensetzung des Reaktionsmediums**, in dem Glucose gelöst ist, beeinflusst.
- Die **Dialyseprobenahme** ist vom **Membranmaterial**, der **Temperatur**, der **Viskosität** und der **Zusammensetzung des Reaktionsmediums** deutlich beeinflusst. Im Bereich üblicher Schüttelgeschwindigkeiten von mehr als 200 Upm im Schüttelkolben und Begasungsraten von mehr als 150 NL/L/h ist ein Einfluss nicht ausgeprägt.
- Der von der Diffusionszeit im Hohlfasermodule abhängige **Stofftransport** zur Probenanreicherung kann mit guter statistischer Sicherheit mit einem einfachen und einem detaillierten **Modell** beschrieben werden, welches die geometrischen Verhältnisse der Membran einbezieht.
- Der **Volumenstrom des Akzeptormediums** hat einen deutlichen Einfluss auf das Signal. Einerseits ist die Dispersion des Probensegments abhängig vom Volumenstrom, andererseits ist die Diffusion des Analyten durch die Membran und des Sekundäranalyten H_2O_2 an der Arbeitselektrode des Sensors von der Anströmung abhängig.

- Bei einer Dialysezeit von 3 min werden mit dem in der Arbeit verwendeten Membranmodul **0,7 μ mol Glucose pro Probenahme** und 0,87 mmol/d bei einer Abtastzeit von 4 min entnommen. Diese **Stoffmenge ist nicht vernachlässigbar** und sollte möglichst im Zulaufverfahren ausgeglichen werden.
- Das Einbringen der Membranmodule in die Kleinreaktoren hatte **auf das Wachstum** einer *E. coli*-Kultur **keinen Einfluss**.
- **Sterilität** der in den monoseptischen Bereich integrierten Probenahmeverrichtung wurde wenigstens **21 d** nachgewiesen.
- Obwohl REM-Aufnahmen Anlagerungen von wenigen Bakterien bei verschiedenen Bakterienstämmen zeigten, gab der Vergleich von Kalibriergeraden vor und nach einer 30 h Kultivierung **keinen Hinweis** auf einen Einfluss von **Biofouling**.
- Die **Reproduzierbarkeit** des Probenahme- und Messsystems lag bei störungsfreiem Betrieb im Mittel bei **5 %** ($n=3-10$).

5. Die Funktionsfähigkeit der entwickelten Technik wurde durch Online-Überwachung von Glucose in relevanten Bioprozessen geprüft und

6. die Anwendbarkeit zur parallelen Substratregelung mit geeigneten parallelen Regelalgorithmen demonstriert.

Der Einsatz der entwickelten parallelen Probenahme- und Messtechnik zur parallelen **Online-Substratüberwachung** mit einer Abtastzeit von höchstens 4 Minuten in den verschiedenen Kleinreaktionsgefäßen mit **verschiedenen Biosystemen** zeigte die prinzipielle **Funktionsfähigkeit** des technischen Systems. Das Biosensorsignal konnte den Verlauf der Glucose in den parallelen Kulturen weitgehend im Rahmen der Messungenauigkeit wiedergeben.

Hinsichtlich der **Kalibrierung** zeigten sich bei solchen Experimenten **systematische Abweichungen**, die nicht im **Reaktionsmedium** kalibriert wurden. Als weitere Ursache für Kalibrierprobleme kommt außerdem die **Temperatur** der Standardlösungen in Frage, die eventuell nicht exakt Reaktionstemperatur betrug. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Kalibrierung den erfolgskontrollierenden Schritt der exakten Prozessüberwachung darstellt und auf sie größter Wert gelegt werden muss.

Mit 3 parallelen Membranen, die in denselben Rührkessel integriert waren, wurde die **Reproduzierbarkeit** der Probenahme **während eines Bioprozesses** mit *Lactobacillus kefir* auf **< 5 %** festgestellt.

Zusätzlich wurde die **Einsetzbarkeit** mehrerer Enzymelektroden (Glucose und Lactat) in einem **Sensorarray** zur simultanen Messung von Substrat und Nebenpro-

dukt in Kulturen mit *Lactobacillus kefir* gezeigt. Einer Erweiterung der analytischen Möglichkeiten im Dialysestrom sind prinzipiell keine Grenzen gesetzt, sofern die Messung im Durchfluss erfolgt und unter den Sensoren keine Querempfindlichkeit besteht.

Die Verknüpfung des parallelen Online-Monitoring Systems mit einem parallelen **PID-Regler** ermöglichte die **vierfach parallele Regelung** von Glucose in **Schüttelkolben** (50 mL) auf **1 g/L Glucose $\pm 0,5$ g/L** über 4 h.

Da PID-Regler für nichtlineare System durch die meist zeitkonstanten Reglerparameter keine optimale Regelstrategie darstellen, wurde ein in der Literatur beschriebener, **parameteradaptiver Regelalgorithmus** alternativ dazu verwendet. Der Regler besteht aus einem „Feed-forward“-Element, mit dem über lineare Regression und Extrapolation der Substratbedarf bis zum nächsten Messwert geschätzt wird und einem „Feed-back“-Element, d.h. einem proportional zur Regelabweichung reagierenden Anteil. Bei einer **dreifach parallelen Glucoseregulation** in *E. coli* Schüttelkulturen (100 mL) zur Produktion von L-Phenylalanin konnte der Sollwert von **5 g/L $\pm$ 1 g/L** über 14 h erfolgreich geregelt werden. Ein Vergleich mit Daten einer Glucoseregulation mit dem gleichen Biosystem in einem 20 L Rührkessel, die mit einem kommerziellen Online-Analysegerät und einem Minimalvarianz-Regler durchgeführt wurde, zeigte, dass die entwickelte Technik der etablierten Technik im Labor nicht nachsteht.

Schlussbemerkung

Erstmals konnte eine parallele Online-Überwachung und Regelung von Glucose im Kleinmaßstab realisiert und erfolgreich getestet werden. Mit der vorliegenden Entwicklung können unerwünschte physiologische Zustände, wie beispielsweise Substratmangel oder Substratüberschuss-Inhibierung bzw. erhöhte Nebenproduktbildung in Bioprozessen im Parallelansatz und im Kleinmaßstab vermieden werden. In einem frühen Stadium der Bioprozessentwicklung können beispielsweise bereits Dosierprofile entwickelt werden, die an den Bedarf des Biokatalysators angepasst sind, was die Wirtschaftlichkeit des Prozesses vor allem bei der großtechnischen Realisierung verbessert. Die parallele Bioprozessentwicklung kann durch den Informationszuwachs mit diesem Werkzeug definierter und reproduzierbarer durchgeführt werden, was einen Beitrag zur Verkürzung von Entwicklungszeiten leisten kann.

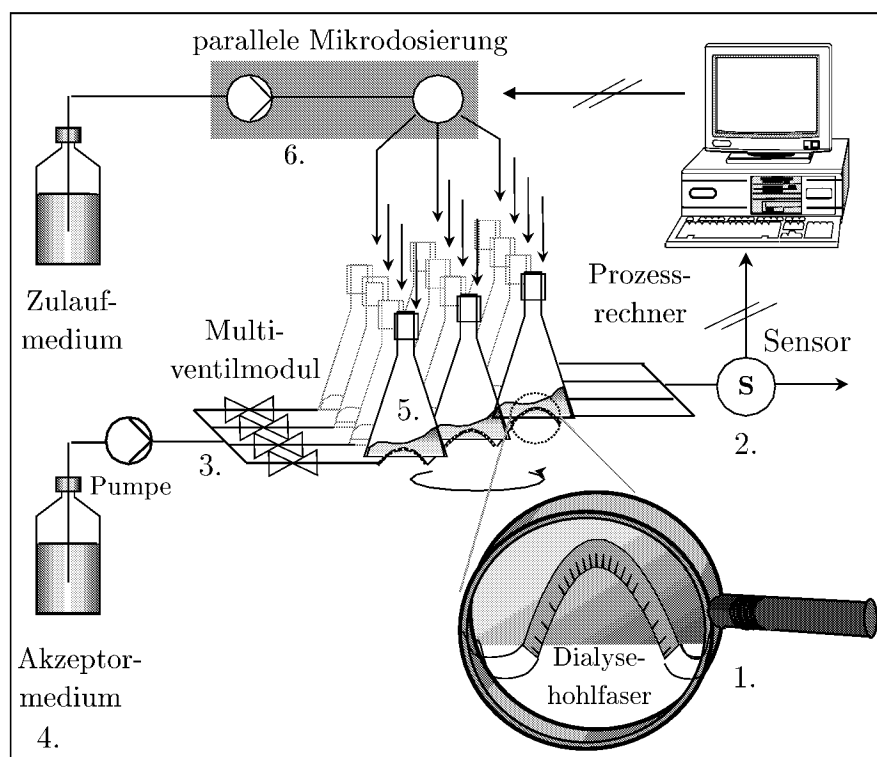


Abb. 7.1: Zusammenfassende, vereinfachte Darstellung der entwickelten parallelen Probenahme- und Messtechnik. Die Nummern beziehen sich auf die erreichten Teilziele: 1. dem kleinen Reaktionsvolumen angepasstes Probenahmeverfahren, 2. Auswahl eines spezifischen Sensors für Glucose als Modells substrat, 3. Anordnung der parallelen Probenahmestellen in einem Fließsystem, 4. Betrachtung des Gesamtsystems anhand einer verfahrenstechnischen Charakterisierung, 5. Einsatz der parallelen Probenahme- und Messtechnik zur Substratüberwachung, 6. Einsatz der Technik zur parallele Substratregelung

8. Ausblick: Grenzen und Möglichkeiten

Die gesetzten Ziele dieser Arbeit sind, wie dargelegt, erreicht worden. Die Grenzen der Entwicklung der Technik sind jedoch nicht erreicht. In diesem Ausblick sollen Vorschläge zu Verbesserungsmaßnahmen und kreative Überlegungen für mögliche neue Einsatzgebiete formuliert werden.

8.1. Ansätze zur Weiterentwicklung

8.1.1. Verbesserung der Kalibrierung

Die Grundlage der Online-Analytik und der damit verbundenen Parameter-Regelung ist eine hinreichend präzise Messung. In Abschnitt 5.4 wurde gezeigt, dass die Reproduzierbarkeit der FDA bei durchschnittlich 5 % liegt. Es wurde außerdem gezeigt, welchen Einflussparametern die Probenahme und Messung unterworfen sind. Dem muss bei der Verbesserung einer Kalibriermethode Rechnung getragen werden.

Vorkalibrierung

Eine Kalibrierung, die immer Dialysemembran und Fließanalysesystem gemeinsam umfassen muss, ist unter den Versuchsbedingungen des geplanten Experiments durchzuführen. Die Kalibrierung vor dem Experiment setzt das aus FDA in Standardlösung bei Versuchstemperatur gemessene Detektorsignal (z.B. Peakmaximum) mit der Konzentration im Reaktionsbehälter in Beziehung. Jedem Membranmodul wird durch die Kalibrierung ein Satz Messdaten für jeden Analyten (Sensorarray) zugeordnet. Bisher erfolgte die Kalibrierung in sterilen Standardlösungen, die nacheinander in der Reihenfolge aufsteigender Konzentration vermessen wurden. Hierzu mussten die Gefäße nach jedem gemessenen Konzentrationsniveau vom Fließsystem abgekoppelt werden und die Lösungen unter der sterilen Werkbank gewechselt werden. Dieses Vorgehen ist mit hohem Arbeitsaufwand verbunden und birgt die Gefahr einer Kontamination.

Eine Vorkalibrierung könnte über die sterile Mikrodosiertechnik in den Kleinreaktionsgefäßen automatisiert werden:

Die Gefäße werden zusammen mit den Membranen autoklaviert und steril mit Reaktionsmedium befüllt. Sequentiell werden anschließend verschiedene Konzentrationsstufen in den Gefäßen eingestellt und FDA unter den Reaktionsbedingungen des geplanten Versuchs und einer konstanten t_{stop} durchgeführt. Die Zyklen Dosierung und Messung

können so oft wiederholt werden, bis die vom Anwender gewünschte Höchstkonzentration des Analyten erreicht wird. So kann der zu erwartende Messbereich während des Versuchs abgedeckt werden. Bei Analyten, die sich während der Reaktion verbrauchen, muss das Medium unter Umständen vor dem Versuch nicht mehr gewechselt werden, da die Höchstkonzentration als Vorlagekonzentration dienen kann.

Zwischenkalibrierung

Zur Zwischenkalibrierung des Sensors während des laufenden Versuchs könnte in der Bypassleitung ein Injektionsventil für Standardlösungen vorgesehen werden. Alternativ kann im Bypass oder in einer weiteren parallelen Strecke ein Membranmodul während des Versuchs in Standardlösung tauchen. In diesem Referenzgefäß würde die FDA in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Dabei ist die Stoffmengenentnahme bei längeren Versuchszeiten zu berücksichtigen (Abschnitt 5.3.1).

Mit diesen Methoden könnte eine eventuelle Sensordrift korrigiert werden, Veränderungen des Stofftransports an den parallelen Probenahmeverrichtungen werden damit nicht erfasst. Zwei mögliche Ansätze konnten in dieser Arbeit nicht überprüft werden:

- Anstelle von analytfreier Akzeptorlösung könnte Standardlösung im Fließsystem zur Durchführung der FDA verwendet werden. Die Konzentration muss dabei wesentlich höher liegen, als die Konzentration der Reaktionslösung um die Richtung des Gradienten zu ändern. Auf diese Weise würde der Sensor den Analytverlust in Abhängigkeit von der Konzentration nachweisen.¹ Bei diesem Ansatz ist außerdem in Betracht zu ziehen, dass die Methode nicht notwendigerweise mit dem Analyten, sondern einer als „Tracer“ fungierenden Komponente mit eigenem Detektor durchgeführt werden könnte.
- Mit Platzierung von ionensensitiven Elektroden, z.B. einem Leitfähigkeitssensor im Fließsystem und jeweils einem Sensor im Reaktionsgefäß könnte eine Verhältnismessung bei jeder Probenahme eine Onlinekorrektur der Kalibrierung durchgeführt werden.

8.1.2. Minimierung von Messrauschen

Wie aus den Ergebnissen in Kapitel 6 deutlich wurde, zeigen die mit FDA gemessenen Konzentrationsverläufe in Schüttelkolben und Mini-Blasensäulen ein stärkeres Messrauschen als im Labor-Rührkessel. Dieser unterscheidet sich von den beiden anderen Kleinreaktionsgefäßen dadurch, dass ein konstanter Leistungseintrag vorherrscht und für eine konstante Temperierung der Reaktionslösung durch Zirkulation von temperiertem Wasser in einem Doppelmantel gesorgt ist. Die korrekte Temperaturregelung der Reaktionslösung in Schüttelkolben und Blasensäulen sowie der im Inkubator angeordneten

¹Diese Methode könnte vor allem in Fällen einer substratlimitierten Reaktionsführung verwendet werden. Sobald der Verlust an Substrat im dialysierten Probensegment sinkt, wäre das ein Hinweis auf Substratakkumulation.

Sensorzelle im Inkubator wird durch Öffnen der Haube bei Probenahme gestört. Die Temperatur ist für den korrekten Betrieb des Analysensystems ein entscheidender Parameter, denn sie wirkt auf die Diffusion sowohl an der Dialysemembran, als auch am Sensor. Der schnelleren Abkühlung des Sensors im Vergleich zur Reaktionslösung ist zu begegnen, wenn der Sensor mit einer isolierenden Ummantelung versehen wird.

8.1.3. Steriltechnik

Wie in Abschnitt 5.3.3 dargelegt wurde in Steriltests mindestens 21 d Sterilität ermittelt. Durch Verwendung steriler Akzeptorflüssigkeit könnte diese Zeitdauer vermutlich gesteigert werden. Das gesamte Schlauchsystem des apparativen Aufbaus kann bis ausschließlich der Durchflusszelle und dem enzymatischen Biosensor autoklaviert werden. Es ist zu prüfen, ob die kontinuierliche Strömung eine Kontamination entgegen der Strömungsrichtung verhindert. Die Verlängerung der Sterilitätsdauer hat große Bedeutung für die Einsatzfähigkeit der vorgestellten Technik in der Zellkulturtechnik, wo Experimente Wochen und Monate dauern können.

8.2. Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten

8.2.1. Erweiterung der Technik auf 16 parallele Kleinreaktionsgefäße

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sensor zur Analyse von vier parallelen Reaktionsgefäßen verwendet. Eine Erweiterung auf bis zu 16 Probenahmestellen ist angesichts des Stands der Technik paralleler Fed-batch Kultivierung wünschenswert. Die Erweiterung unter Verwendung nur eines zentralen Sensorelements ist nur auf Kosten der Abtastzeit oder der Dialysezeit t_{stop} möglich, wenn die effiziente Zeitsteuerung der Probenahme verwendet wird, denn die Dialysezeit eines Gefäßes ist dabei die Summe der Messzeiten der anderen parallelen Gefäße. Um kurze Abtastzeiten trotz der Erweiterung auf 16 Gefäße sicherzustellen, könnten vier Sensoren simultan verwendet werden, die jeweils vier Gefäße online analysieren. Beim Einsatz kostengünstiger amperometrischer Biosensoren beispielsweise, ist dieses Vorgehen durch Einsatz eines Mehrkanal-Potentiostaten² zu realisieren.

8.2.2. Miniaturisierung

In den letzten Jahren konnte ein Trend zur Miniaturisierung von Analysetechniken beobachtet werden: z.B. Analyse von Nanoliterproben [Backofen u. a. 1998], μ -TAS³ [Manz u. a. 1995] und Kopplung von Bio- mit Halbleitertechnologie [Fuhr 1996]. Die Mikrodialysetechnik könnte dann für eine Miniaturisierung des Gesamtsystems

²Der in dieser Arbeit verwendete Potentiostat hat 4 Kanäle zum Anschluss von amperometrischen Sensoren.

³Mikro-Total-Analysesysteme zur Bestimmung einer Vielzahl von Parametern simultan

verwendet werden, wenn Pumpe und Sensor ebenso in ihrer Größe reduziert werden könnten. Die Entwicklung miniaturisierter Biosensoren ist durch das Bestreben, transplantierbare Sensorelemente zur Patientenüberwachung zu erhalten, weit voran geschritten: ICB, Münster [ICB 1998] und CSEM⁴ in Neuchâtel [CSEM 1998] sind dabei Vorreiter. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dickschichtsensoren sind in ihren Ausmaßen schon stark gegenüber anderen Messfühlern verkleinert worden. Wären alle Komponenten für die Probenahme- und Messtechnik in miniaturisierter Form vorhanden, wäre eine „1 zu 1“ Anordnung Analysensystem-Reaktionsgefäß möglich.

Auf dem Gebiet von Mikropumpen gibt es auch einige Entwicklungen, die für den Anwendungsfall in Frage kommen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein piezo-elektrischer Pumpenkopf⁵ in Verbindung mit dem Glucose-Biosensor getestet werden (Abb. 8.1). Da der Sensor auf eine präzise, pulsarme Anströmung angewiesen ist, kam dieser Untersuchung zur Beurteilung der Einsetzbarkeit der Pumpe große Bedeutung zu. Abb. 8.1 zeigt, dass die Pumpe die Anforderungen des Sensors erfüllt.

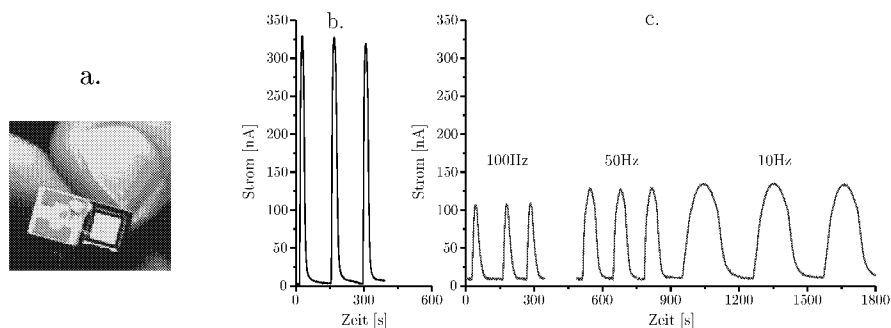


Abb. 8.1: **a.** Miniaturisierte Piezo-Pumpe (Bild mit freundlicher Genehmigung des IMS, München). Vergleich der Sensorrespons mit **b.** präziser Hubkolbenpumpe (Dosimat - 1,5 mL/min) und **c.** miniaturisierter Piezo-Pumpe mit verschiedenen Frequenzen (10 Hz - 0,072 mL/min, 100 Hz - 0,742 mL/min)

8.2.3. Erweiterung der Analysetechnik

[Scheper u. a. 1996] stellt an ein Analysensystem zum Bioprozessmonitoring die Forderung, dass es genügend Flexibilität bieten muss, um die Bedürfnisse verschiedener Problemstellungen erfüllen zu können. Im vorliegenden Fall kann der verwendete Sensor durch eine beliebige Durchflussanalytik ersetzt werden. Wie bereits in Kapitel 6 gezeigt können Biosensorarrays verwendet werden. Darüber hinaus könnten photometrische Methoden und neuere Analysetechniken, wie z.B. FTIR⁶-Sonden als Multianalysetechniken für die Bestimmung biochemischer Parameter eventuell Einsatz finden. Durch chemometrische Auswertungsverfahren wird bei diesen Analyseverfahren aus einer nicht-selektiven Sensorantwort auf die Konzentrationen der Einzelsubstanzen zurückgeschlossen. Voraussetzung für die Verwendung einer solchen Analysetechnik für die Verbindung mit der parallelen Probenahme ist, dass eine Messung im Durchfluss erfolgen kann.

⁴Centre Suisse d'électronique et de microtechnique

⁵Fraunhofer Institut IMS in München

⁶Fourier-Transform-Infrared

Die vorgestellte parallele Probenahmetechnik liefert dem verwendeten Detektor stets reproduzierbar und zellfrei eine repräsentative Probe, die nur niedermolekulare Substanzen enthält (MWCO der Dialysemembran). Durch Geräte, wie z.B. einen Fraktionssammler könnte das Dialysat im Abstrom des Sensors aufgefangen werden und weiteren Untersuchungen offline zugeführt werden. Voraussetzung ist, dass das Verhältnis der Konzentration im Dialysat zu der in der Prozesslösung stets bekannt oder bestimmbar ist.

8.2.4. Andere funktionale Zusammenhänge

Die Dialysetechnik zur Probenahme bietet aufgrund ihrer separativen Eigenschaft noch andere verfahrenstechnische Möglichkeiten:

Im Rahmen der Bioprozessentwicklung zur Produktion von L-Phe mit *Escherichia coli* wurde kürzlich am Institut für Biotechnologie eine in den Prozess (Maßstab von 20-300 L) integrierte Reaktivextraktion mit Hohlfasermodulen entwickelt [Maaß 2001]. Die parallele Membrantechnik könnte hier für parallele Untersuchungen zur integrierten Produktabtrennung benutzt werden, wenn Lösungsmittel statt Akzeptormedium verwendet würde.

Desweiteren eröffnet die Dialyse noch die Möglichkeit Spurenelemente und andere niedermolekularen Medienbestandteile sehr präzise „nachzudosieren“ ohne das Reaktionsvolumen zu reduzieren. Eine solche Perfusionskultur ist bereits aus der Zellkulturtechnik bekannt ([Lindl und Bauer 1994], [Knazek 1972]), aber noch nicht für bakterielle Systeme und parallel realisiert worden.

8.3. Schlussfolgerungen

Bevor die vorgestellte Technik einer verbreiteten Anwendung in Forschung und Industrie zugeführt werden kann, muss die Problematik der Kalibrierung gelöst, eine präzise Temperierung des Probenahme- und Messsystems sichergestellt und das System auf mehr als vier Parallelreaktoren erweitert werden.

Aus den Ausführungen zu den weiteren Anwendungsmöglichkeiten wird deutlich, welches Potential die in dieser Arbeit entwickelte parallele Probenahme- und Messtechnik in der Biotechnologie hat. Sie eröffnet dem Anwender den Versuchsaufbau flexibel an die Experimente anzupassen und vielfältige Möglichkeiten außer Substrat noch andere biochemisch relevante Parameter zu bestimmen, sofern eine entsprechende Messtechnik verwendet wird. Die Einsatzfähigkeit dieser Entwicklung in der chemischen Verfahrenstechnik und Umwelttechnologie ist prinzipiell gegeben.

In welchem Zusammenhang die parallele Probenahme- und Messtechnik auch eingesetzt wird, sie ermöglicht es, simultan und in großer Zeitnähe zum Prozess Informationen zu gewinnen, deren intelligente Nutzung zu einer zeit-, kosten- und personaleffizienten Prozessentwicklung im Kleinmaßstab beitragen kann.

A. Methoden

A.1. Fertigungsmethode der Hohlfasermembranmodule

Im Folgenden wird die Fertigungsmethode der entwickelten Hohlfasermembranmodule aus Abschnitt 4.1.2 im Detail beschrieben:

A.1.1. Kleber

Für die eigenentwickelten Membranmodule wurden zwei verschiedene Zwei-Komponentenkleber auf Epoxidharzbasis der Firma UHU GmbH, Bühl, getestet (siehe dazu auch [Franz 1999]):

UHU plus sofortfest hat nicht die vom Hersteller angegebene [UHU GmbH 1995b] Stabilität gegen Temperatur und Wasser. Nach dem Autoklavieren (121°C 20 min) sind die Klebeverbindungen gequollen, was sich bei der Lagerung oder Nutzung der Membranmodule in wässrigen Medien noch steigert. Dieses Quellen führt zu Undichtheiten und die entsprechenden Membranmodule können nicht mehr verwendet werden.

Der Kleber UHU endfest 300 wurde auf Anraten des Herstellers getestet. Der Kleber wird im Verhältnis 1:1 (Binder zu Härter) angemischt und hat bei Raumtemperatur eine Verarbeitungszeit von 1 bis 1,5 h. Die Härtezeit beträgt bei Raumtemperatur 12 h und bei 70°C ca. 45 min. Im Bereich zwischen 70°C und 180°C werden die besten Klebefestigungen erreicht. Der Kleber härtet ohne Volumenverlust aus. Der entstehende Duroplast ist resistent gegen Wasser, verdünnte Säuren und Laugen, Benzin und Mineralöle [UHU GmbH 1995a]. Nach dem Aushärten lässt sich der Kleber mechanisch bearbeiten, z.B. durch Feilen, Brechen, Sägen oder Bohren. Die Klebeverbindungen sind autoklavierbar und nach eigenen Erfahrungen über mindestens 2 Wochen wasserresistent.

A.1.2. Fertigung

In Abbildung 4.16 auf Seite 71 sind die Einzelteile abgebildet, die für eine Membranmodulfertigung benötigt werden:

- Hohlschrauben 1/4"28G UNF aus PP mit 2 mm i.d. (Originalschrauben von Fa. Bohlender nachgebohrt)
- Hohlfasermembran(en) geschnitten (Skallpell) auf gewünschte Länge + 5 cm

- 2 Schlauchstücke aus festem Kunststoff als Knickschutz an der Hohlschraube
- Drahtgestrick geschnitten (Saitenschneider) auf gewünschte Länge + 1 cm
- Kabelbinder

Die Fertigung erfolgt nach den folgenden Arbeitsschritten:

1. Die Hohlschrauben werden in Ethanol 70 % entfettet und mit Pressluft getrocknet.
2. Die geschnittenen Holfasern werden so markiert, dass rechts und links je 2,5 cm Membran zur Klebung zur Verfügung stehen. Eine weitere Markierung wird je 2 cm von den Enden angebracht.
3. Es werden ca. 3 ml Kleber angemischt und soviel wie möglich in einer kleinen Einmalspritze (2 mL) aufgezogen.
4. Die Spritze wird nun von der Membraninnenseite gegen die Bohrung gepresst und der Kleber in die Bohrung hineingedrückt, bis er an der Außenseite gerade austritt.
5. Die Membran(en) wird (werden) jetzt durch die mit Epoxid-Harz gefüllte Bohrung geschoben, bis die Holfasern gerade auf der anderen Seite herausgetreten. Membranseitig wird nochmal Kleber rings um die Fasern direkt an den Hohlschrauben aufgebracht und anschließend die Membranen bis zur 2 cm Markierung langsam durchgezogen.
6. Das 0,5 cm Knickschutz-Schlauchstück wird über die Membranen gezogen. Es passt genau in eine Vertiefung am Schaft der Hohlschrauben. Beim hineinpressen wird überschüssiger Kleber in das Schlauchstück gepresst, befestigt es und dichtet die Membranen zusätzlich ab.
7. Das teilfertige Modul wird bis zur Aushärtung des Klebers gelagert (6 bis 12 h).
8. Das Drahtgestrick als Knick- und Berührungsschutz wird über die Fasern gezogen und an dem Knickschutz-Schlauchstück mit einem Kabelbinder befestigt
9. Das zweite 0,5 cm Knickschutz-Schlauchstück wird über die Membranen gezogen.
10. Die Schritte 3 bis 5 werden mit der zweiten Hohlschraube am freien Membranende durchgeführt.
11. Das Knickschutz-Schlauchstück das jetzt mit dem Ende des Drahtgestricks überzogen, aber noch nicht daran befestigt ist, wird wie in Schritt 6 in die Vertiefung an der Hohlschraube gepresst.
12. Das teilfertige Modul wird bis zur Aushärtung des Klebers erneut gelagert (6-12 h).

13. Das Ende des Drahtgestricks wird mit Kabelbinder am Schlauchstück befestigt.
14. Die aus der Schraube herausragende Membranenden werden am Schraubenkopf mit einem Skalpell abgeschnitten.
15. Eventuell überschüssiger Kleber, welcher die Dichtfläche der Modulköpfe uneben macht, kann mit einer feinmechanischen Flachfeile entfernt werden. Das Feilen sollte bei von der Gegenseite angeströmter Membran erfolgen, da sich sonst der Grant in den Membranenden festsetzen kann.

Bei der Modulherstellung sind desweiteren folgende Punkte zu beachten:

- Bei den Arbeiten mit Klebern wurden immer Einmalhandschuhe getragen, um ein Einfetten der Membranen und ein Verkleben der Haut zu vermeiden.
- Es ist stets genau darauf zu achten, dass das Membranmaterial nicht knickt oder verwindet.
- Die Querschnitte der Membranen in den Hohlschrauben dürfen nicht eingedrückt sein.
- Bei Modulen mit mehreren Membranen müssen diese gleich lang gehalten werden.

A.2. Charakterisierungsmethoden

A.2.1. Einfluss der Viskosität

Zur Herstellung der Standardlösungen verschiedener Viskositäten wird eine Stammlösung (STL) von 100 g/L Glucose gelöst in Akzeptormedium (AL) vorbereitet. In Tabelle A.1 sind die Mischungsverhältnisse der Flüssigkeiten und die resultierende dynamische Viskosität (η) der Standardlösung dargestellt.

Tab. A.1: Viskosität von PEG-400 Gemischen

Anteil PEG-400[%]	Anteil STL [%]	Anteil AL [%]	η [mPas]
0	5	95	1
12,5	5	82,5	2
25	5	70	3
37,5	5	57,5	8
50	5	45	18,7

A.2.2. REM-Aufnahmen der Hohlfasermembranen

Die Membranen wurden im Anschluss an eine Fermentation dreimal mit Phosphatpuffer vorsichtig gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Zur Durchführung von Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden sie mit Gold besputtert und in einem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

A.3. Fermentationen

A.3.1. Überblick über Versuchsbedingungen

In Tabelle A.2 sind die Versuchsbedingungen übersichtlich zusammengefasst.

Tab. A.2: Übersicht über Versuchsbedingungen bei der Funktionsprüfung in Kapitel 6

Versuchsziel	Monitoring				Regelung	
Abschnitt	6.1.1	6.1.2	6.1.3.1	6.1.3.2	6.4.1	6.4.2
Fermentation						
<i>E. coli</i> 4pF20	X					X
<i>E. coli</i> YYC202		X				
<i>E. coli</i> K12						
<i>L. kefir</i>			X	X	X	
Reaktionsgefäß ^a	MB	SK	RK	SK	SK	SK
Dauer (gerundet) [h]	30	8	4	6,5	6,5	15,5
Medium	4pF20	M9	<i>L.kefir</i>	<i>L.kefir</i>	Pan	4pF20
Startvolumen [mL]	200	50	1000	50	50	100
pH-Regelung [Sollwert]	6,5	–	6,0	6,0	7,0	6,5
Titrationssmittel	NH ₃ /OH	–	4N NaOH	4N NaOH	KOH	NH ₃ /KOH
Temperatur [°C]	37	37	30	30	37	37
Probenahme- und Online-Messtechnik						
Temperatur der						
Biosensorzelle [°C]	37	37	RT	30	37	37
Abtastzeit [s]	240	240	135	240	240	240
Membranen	Modul: 3 PS-Hohlfasern (Ø0,5 mm, 1 kD)					
Akzeptormedium	Phosphatpuffer mit KCl (Abschnitt B.4.1)					
Volumenstrom [mL/min]	2,5					

^aGK=Schüttelkolben, MB=Mini-Blasensäule, RK=Rührkessel

A.3.2. Reaktionsgefäße

Schüttelkolben

Als Schüttelkolben werden Erlenmeyerkolben der Firma DASGIPmbH verwendet, die neben 4 Schikanen zwei zusätzliche Stützen besitzen. Der Größere mit GL25 Normgewinde dient der steriltechnisch dichten Einbringung einer sterilisierbaren pH-Elektrode. Der Kleinere mit GL14 Normgewinde zur sterilen Probenahme mit steril-verpackten Kanülen über ein Silikonseptum. Die Schüttelkolben wurden mit einer Metallkappe (Belco-Kappe, Belco Inc.) verschlossen, in die zentriert über der Öffnung des Erlenmeyerkolbens ein Silikonseptum eingebracht war. Das Septum dient dem sterilen Anschluss von Dosierleitungen für die Benutzung des Kolbens als Fed-batch Reaktionsgefäß. Geschüttelt und in lufttemperierter Atmosphäre inkubiert werden die Gefäße in einem GFL Schüttler. Die Hohlfasermembranmodule werden an einem Draht mit Kabelbinder fixiert, der am unteren Ende in einem Silikonschuh und am oberen Ende im Septum der Belco Kappe steckt. Der Silikonschuh haftet an der Glasoberfläche beim Schütteln und so fungiert der Draht als Säule, um die Membranen in Position zu halten. Diese Säule kann aber durch die einfache Befestigung am Boden des Kolbens sehr leicht durch abheben der Metallkappe vom Kolben aus dem Kolben genommen werden. Bis zur maximal möglichen Schüttelfrequenz von 250 Upm bewegen sich die Membranen durch diese Art der Befestigung relativ zum Glaskolben nicht. So wurden die Membranen von der durch die Schüttelbewegung im Kreis strömenden Flüssigkeit umspült.

Mini-Blasensäulen

Die von den Firmen DASGIPmbH und INFORS AG gemeinsam vertriebenen Mini-Blasensäulen, die am Institut für Biotechnologie am Forschungszentrum Jülich u.a. von [Altenbach-Rehm 2000] entwickelt wurden, sind alternative Gefäße zu Schüttelkolben zur Durchführung paralleler Fermentationen. Der Sauerstoff wird durch Einblasen von steriler Prozessluft in die Reaktionsflüssigkeit und so über die Phasengrenze der entstehenden Blasen eingetragen. Als Gasverteiler wurden im Fuß des Gefäßes Sinterglasfritten (Vitrapor 4) von 5 mm Dicke verwendet. Die Säulen gibt es nur in einer Größe für Arbeitsvolumen zwischen 100 und 300 mL

1 L Labor-Bioreaktor

Ein 1 L Bioreaktor aus Glas wird durch einen Motor mit einem Zweiblatt-Rührer durchmischt. Der Reaktor hat einen Doppelmantel durch den eine auf konstante Fermentationstemperatur geregelte Flüssigkeit strömt. Über Stützen sind pH-Elektrode und Temperaturfühler eingebracht.

Die Membranen sind über die Stützen im Kopf des Reaktors in die im Kreis strömende Flüssigkeit an der Drahtkonstruktion wie im Schüttelkolben eingebracht, zeigen relativ zum Gefäß keine Bewegung und werden von der Reaktionsflüssigkeit umströmt.

A.3.3. Kultivierung von *Escherichia coli* K12

Stamm

E. coli K12 wurde 1922 von H. Blair aus den Exkrementen eines Diphtheriepatienten isoliert und 1925 in die Stammsammlung an der Stanford-Universität mit der Bezeichnung K12 aufgenommen [Bachmann 1996]. K12 gilt als nicht pathogener Sicherheitsstamm, der sich durch hohe Wachstumsraten und Kultivierbarkeit auf definiertem Medium auszeichnet. Empfohlen wird die Verwendung des Stammes als biologisches Referenzsystem durch die Europäische Föderation für Biotechnologie [Altenbach-Rehm 2000].

Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgt in Glycerin-Gefrierkonserven (Feedstocks), die wie folgt hergestellt werden: In 1 L werden 100 mL LB-Medium (Rezept siehe Abschnitt B.3) 20 min bei 121°C autoklaviert. Das Medium wird mit 200 µL Zellsuspension aus einem Originalfeedstock beimpft und bei 160 Upm und 37°C geschüttelt. Nach ca. 3-5 h werden in der exponentiellen Wachstumsphase 30 mL 85 prozentige Glycerinlösung zugegeben. Nach kurzer Vermischung werden steril je 1,8 mL-Feedstockröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Vorkultur

Zur Vermehrung des Impfgutes wird Pan-Medium (Abschnitt B.3), pH 7,0 als synthetisches Medium verwendet. Je 100 mL steriles Medium werden in 1 L Schüttelkolben mit Schikanen mit 0,5 bis 1 mL aufgetauter Feedstock-Suspension angeimpft und bis OD₆₆₀ 0,5-1 kultiviert.

Hauptkultur

Aus der exponentiellen Wachstumsphase werden die Zellen mit 10 Vol% in die Hauptkultur steril in das Reaktionsgefäß überführt. In Schüttelkolben, befüllt mit 10 Vol% beimpftem Reaktionsmedium (Pan, pH7) wird die Kultur bei 200 Upm in einem GFL-Inkubator bei 37°C geschüttelt. Die Mini-Blasensäulen werden mit 200 mL Medium befüllt und bei 37°C in der Lag-Phase mit ca. 10 NL/h und später mit 30 und 60 NL/h begast.

Bei pH-geregelten Versuchen wird die Kultur auf pH 7,0 mit 4N KOH titriert. Bei einer Glucoseregulation wird 500 g/L Glucose-Lösung zudosiert. Die parallele Dosierung erfolgt mit fedbatch-pro (DASGIPmbH) über eine sterile Mikrodosiertechnik. Die Schläuche werden vor dem Experiment übernacht mit 70 Vol% Ethanol gespült.

A.3.4. Kultivierung von *Escherichia coli* 4pF20 zur L-Phenylalaninproduktion

Stamm

Die mikrobielle Herstellung von niedermolekularen Metaboliten kann bei chiralen Verbindung wie z.B. Aminosäuren eine Alternative zu chemischen Synthesen darstellen. *E. coli* kann zur enantioselektiven Produktion von natürlich vorkommenden Aminosäuren, wie die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin (L-Phe) verwendet werden. Eine Überproduktion von L-Phe ist in einem Wildstamm nicht möglich, da die intrazellulären Regulationsmechanismen für eine dem Bedarf der Zelle entsprechende Aminosäuremenge sorgen. Beispielsweise inhibiert eine hohe Phenylalanin-Konzentration die Bildung von Chorismat-Mutase/Prephenatdehydratase, die für die Bildung von Phenylpyruvat aus Chorismat verantwortlich ist. Gezielte Eingriffe in den Biosyntheseweg ermöglichen die Herstellung von Hochleistungsstämmen, was ein Schwerpunkt der gegenwärtigen Forschungsarbeiten an den Instituten für Biotechnologie am Forschungszentrum Jülich GmbH ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein am Institut für Biotechnologie entwickelter L-Phe-Produktionsstamm verwendet. Aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat wird Chorismat und schließlich Prephenat gebildet. Im letzten Schritt wird die Aminogruppe auf das Kohlenstoffgerüst von Phenylpyruvat übertragen.

Die Gene für das L-Tyr- und L-Phe-regulierte Enzym DAHP-Synthase (*aroF*) und das L-Phe-regulierte Enzym Chorismatmutase/Prephenatdehydratase (*pheA*) sind im Stamm 4pF20 chromosomal deletiert. Zusätzlich ist die L-Tyr-spezifische Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase (*tyrA*) entfernt worden. Der Stamm ist Tyrosin auxotroph und das Wachstum kann durch Tyrosin-Limitierung gesteuert werden.

Zur Deregulierung des Aromaten-Biosynthesewegs wurde ein Plasmid transformiert, welches einen glucoseresistenten, IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor, basierend auf dem Promotor des *lac*-Operons, enthält. Hinter diesen Promotor sind molekulargenetisch deregulierte Varianten von *aroF* (DAHP-Synthase) und *pheA* (Chorismatmutase/Prephenatdehydratase) kloniert, deren Enzyme weder durch L-Phe noch durch L-Tyr inhibiert werden. Eine Ampicillin-Resistenz wurde als Selektionsmarker verwendet. Dadurch wird die Stabilität des Plasmids erhöht und die monoseptische Kultivierung vereinfacht. Die Zugabe von IPTG in der Hauptwachstumsphase induziert die Überproduktion von L-Phe.

Eine Überwachung der Zugabe der Hauptkohlenstoffquelle Glucose bei aerober Prozessführung ist für die Produktion mit *E. coli* von zentraler Bedeutung. Eine Substratlimitierung würde zu einer verringerten Produktbildungsrate führen, eine hohe Glucosekonzentration zu einer verstärkten Nebenproduktbildung, insbesondere Acetat. Daraus resultiert eine unerwünschte, geringere Kohlenstoffselektivität. Aus diesen Gründen wird derzeit eine Glucoseregulation im geschlossenen Regelkreis für den Rührkesselreaktor im Zulaufbetrieb entwickelt [Gerigk 2000].

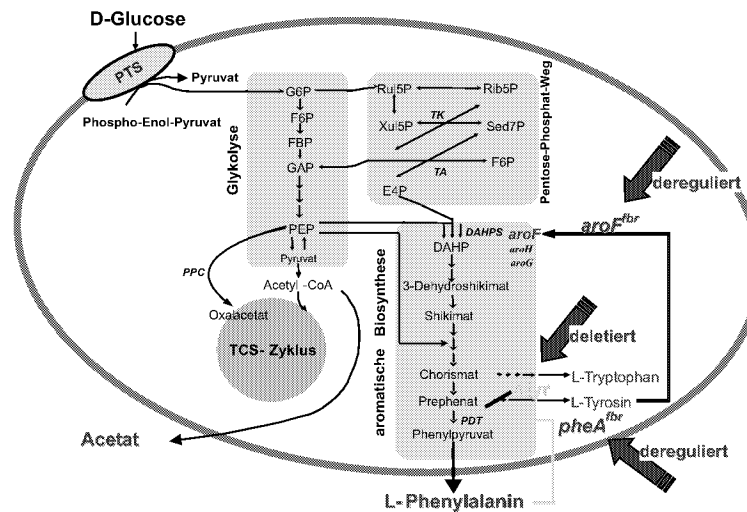


Abb. A.1: Stoffwechsel des L-Phenylalanin Überproduzenten *E. coli* 4pF20

Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgt in Glycerin-Gefrierkonserven (Feedstocks), die wie folgt hergestellt werden: In 1 L Schüttelkolben werden 100 mL LB-Medium (Rezept siehe Abschnitt B.3) 20 min bei 121°C autoklaviert. Das Medium wird mit 500 μ L Zellsuspension aus einem Originalfeedstock beimpft und bei 200 Upm und 37°C geschüttelt. Bei Erreichen einer OD von 3,5 wird die Kultur mit 100 mL Glycerin gemischt, in 1,8 mL-Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Vorkultur

Zur Vermehrung des Impfgutes wird das in Abschnitt B.3 beschriebene Vorkulturmedium verwendet. Je 100 mL steriles Medium werden in 1 L Schüttelkolben mit Schikanen mit 0,5 mL aufgetauter Feedstock-Suspension angeimpft und bis OD₆₆₀ 3,0 (ca. 15 h) kultiviert.

Hauptkultur

Das Medium der Hauptkultur (Abschnitt B.3) wird mit 10 Vol% Vorkultur angeimpft und bei 37°C kultiviert. Schüttelkolbenkulturen werden bei 200 Upm in einem GFL-Inkubator geschüttelt und auf pH 6,5 mit einem Gemisch aus NH₃ und KOH titriert. Bei Glucoseregulation wird aus einer 500 g/L Glucose-Lösung nachdosiert.

A.3.5. Kultivierung von *Escherichia coli* YYC202 zur Pyruvatproduktion

Stamm

Pyruvat ist wie oben bereits gezeigt ein zentrales Intermediat des Zellstoffwechsels, das zur Herstellung von Zwischenprodukten für die Synthese von Pharmazeutika, Agrochemikalien und Kosmetika von der Industrie nachgefragt wird (Schätzung 1999:

1000 t/a [Institut für Biotechnologie 1 und 2 und Rhein Biotech GmbH 1999]).

Von [Neveling u. a. 1997] und [Neveling u. a. 1998] wurde eine Pyruvat-überproduzierende *Escherichia coli* YYC202 Mutante hergestellt. Die Gene, welche die Enzyme für den Pyruvatabbau zu Acetat und AcetylCoA codieren, wurden deletiert. Derzeit wird u.a. mit diesem Stamm eine Verfahrensentwicklung am Institut für Biotechnologie in Kooperation mit der Rhein Biotech AG durchgeführt, die die Etablierung eines umweltfreundlichen Herstellungsprozesses für Brenztraubensäure mit rekombinanten *E. coli* zum Ziel hat [Institut für Biotechnologie 1 und 2 und Rhein Biotech GmbH 1999].

Stammhaltung

Escherichia coli YYC202 wird auf einer M9-Agarplatte bei 4°C aufbewahrt [Gerhartz 2000].

Vorkultur

Mit einer Impföse wird eine Einzelkolonie des Stamms berührt und diese in 100 mL steriles M9-Medium (Abschnitt B.3, pH 7,0) in einem Schüttelkolben getaucht. Die Kultur wird bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0-2,0 geschüttelt.

Hauptkultur

Mit 10 Vol% wird die Vorkultur in steriles M9-Medium in die Hauptkultur überimpft und in Schüttelkolben wie in der Vorkultur kultiviert. Zur pH-Kontrolle wird sterile 2N NaOH verwendet.

A.3.6. Kultivierung von *Lactobacillus kefir* zur Ganzzellbiotransformation

Stamm

Hummel [Hummel 1990] identifizierte Alkohol-Dehydrogenasen in *Lactobacillus kefir* (DSM 20587), die eine hohe Aktivität bei der enantioselektiven Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoholen zeigen. Die Nutzung dieser Enzyme als Biokatalysatoren erfordert eine Cofaktoregenerierung (NADPH), welche auf einfache Weise durch die Verwendung ganzer Zellen gegeben ist. Dies hat den Vorteil, dass die Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung agieren können. Von Nachteil ist der höhere Produktaufarbeitungsaufwand in verdünnter, biomassehaltiger Lösung gegenüber anderen Synthesemethoden [Kriegesmann 1999].

Ein Beispiel für eine solche Ganzzell-Biotransformation ist die Herstellung enantiomerenreinen 2,5-Hexandiols aus 2,5-Hexandion mit *L. kefir*, deren Reaktionsschema in Abbildung A.2 aufgezeichnet ist. Dazu werden aktuell am Institut für Biotechnologie Forschungsarbeiten zur Prozessentwicklung durchgeführt [Haberland 2000].

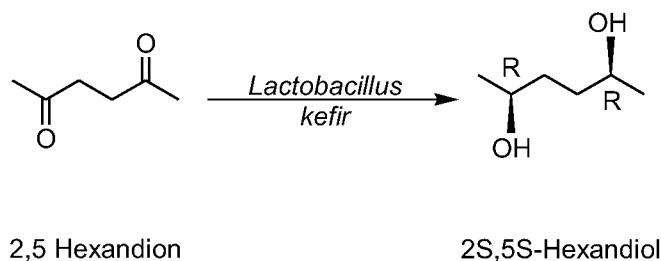


Abb. A.2: Reaktionsschema der Ganzzellbiotransformation zur enantiomerenreinen Darstellung von 2S,5S-Hexandiol aus 2,5 Hexandion mit *Lactobacillus kefir*

Stammhaltung, Vor- und Hauptkultur

In den vorliegenden Arbeiten wurden mit dem in Abschnitt B.3 genannten Medium bei 30°C vorfermentierte Zellen des Stamms DSM 20587 verwendet, die unter Ausschluss von Licht und in geschlossenen Beuteln bei -20°C gelagert werden. Stammhaltung, Vor- und Hauptkultur siehe [Hummel 1990]. Die Zellen werden nach der Fermentation geerntet, auf 15°C gekühlt und abzentrifugiert.

Biotransformation

Die Zellen werden am Tag eines jeden Experiments aus -20°C aufgetaut, in 0,9 Vol% NaCl Lösung resuspendiert und damit dreimal gewaschen.[Haberland 2000] Die Biotransformation erfolgt anschließend auf pH 6,0 geregelt¹ bei T=30°C. In Schüttelkolben wird mit 120 Upm geschüttelt, da *L.kefir* keinen Sauerstoff benötigt. Im Rührkessel wird mit 500 Upm gerührt.

A.3.7. Kultivierung von *Staphylococcus carnosus*

Zur Stammhaltung und Kultivierung siehe [Dilsen 2000].

A.3.8. Kultivierung von *Bacillus subtilis*

Stammhaltung, Vor- und Hauptkulturmethoden unterliegen einer Geheimhaltungsvereinbarung und können hier nicht genannt werden.

A.4. Analytik

A.4.1. Optische Dichte

Die optische Dichte (OD_λ) wird mit Hilfe eines UV/Vis-Zweistrahls-Photometers (Shimadzu UV-160) gegen H₂O (bidest.) als Referenzlösung gemessen. Sie ist ein Maß für die relative Extinktion des Lichts (Lambert-Beer-Gesetz), das durch die Messlösung geleitet wird. Das Licht wird an suspendierten Partikeln, z.B. Zellen gestreut und so gelangt weniger Lichtenergie zum Detektor. Je nach Photometer muss die Probe so verdünnt

¹4N NaOH

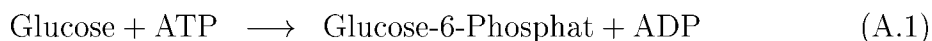
werden, dass die Extinktion in ihrem linearen Messbereich liegt. In dieser Arbeit wurden Proben mit einer $OD_{600} > 0,5$ mit H_2O (bidest.) verdünnt.

A.4.2. Biotrockenmasse (BTM)

Es werden Reaktionsröhrchen (2,5 mL) beschriftet und 24 h im Trockenschrank (80°C) getrocknet. Anschließend werden die Gefäße ausgewogen und nur noch mit trockenen Einmalhandschuhen berührt. Je 1 mL Fermentationslösung werden in die vorbereiteten Reaktionsröhrchen pipettiert und bis zur Gewichtskonstanz bei 80°C getrocknet und bis zur erneuten Auswaage im Exsikkator gelagert. Aus der Differenz der Masse des Reaktionsröhrchens ohne und mit Probe wird die Biotrockenmasse (BTM) bestimmt.

A.4.3. Glucose

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration in Fermentations-Proben wurde ein gekoppelter enzymatischer Glucosetest verwendet, welcher über die Extinktionsänderung eines Reaktionsproduktes durch ein automatisiertes Verfahren Glucosekonzentrationen zwischen 0,05 g/L und 0,50 g/L bestimmen kann. Es wird die Extinktionsänderung bei der Umsetzung von NAD^+ zu NADH gemessen. Die Messung erfolgt bei der Wellenlänge für das Extinktionsmaximum von NADH $\lambda = 365$ nm. Die NADH Zunahme ist proportional zur Glucosekonzentration der Messlösung, wie aus den enzymatischen Reaktionsgleichungen ersichtlich ist:



Gleichung A.1 wird katalysiert durch Hexokinase (HK), Gleichung A.2 durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH).

Die enzymatischen Reaktionen werden in Mikrotiterplatten der Firma Beckmann, München, mit 96 Kavitäten durchgeführt und die Extinktionsänderung wird über einen softwaregesteuerten Plattenleser (Softmax Platten-Photometer) gemessen. Die Kalibrierung erfolgt über eine Standardreihe mit 0,05 g/L, 0,10 g/L, 0,20 g/L, 0,25 g/L, 0,30 g/L, 0,35 g/L, 0,40 g/L und 0,50 g/L Glucose, gelöst in H_2O (bidest.). Zur besseren Reproduzierbarkeit der Messungen werden alle Proben und Standards in einer Doppelbestimmung vermessen. Die folgenden Lösungen werden zur Herstellung des NAD/ATP-Mix benötigt:

1. Tris-Maleat-Puffer (Abschnitt B.4.2)
2. $MgCl_2$ -Lösung 100 mM gelöst in Tris-Maleat-Puffer

Der Mix wird gemäß folgender Tabelle zubereitet:

Der Test wird wie folgt durchgeführt:

Tab. A.3: Zubereitung NAD/ATP-Mix

Substanz	Zugabe	Einheit
NAD	95,40	mg
Na ₂ ATP	73,50	mg
MgCl ₂ -Lösung	5,00	mL
Tris-Maleat-Puffer	ad 120,00	mL

1. Die Glucosestandards und die Proben werden in die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit je 40 μ L pipettiert. Je nach Konzentration der Glucoseproben, welche sich mit einem Kurztest (Accutrend Typ 1544 der Firma Boehringer, Mannheim) grob abschätzen lässt, muss diese auf den Messbereich der Analytik (0,05-0,50 g/L) verdünnt werden.
2. G-6-P-DH (1000 U) und HK (15.000 U) werden je 1:40 verdünnt
3. Es werden je 20 μ L G-6-P-DH- und 20 μ L HK-Lösung zugegeben.
4. Die Mikrotiterplatte wird 90 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.
5. Die Platte wird im Plattenlesegerät analysiert. Die Glucosekonzentrationen und die Kalibriergerade können angezeigt und als Datei gespeichert werden.

A.4.4. Acetat

Acetat wird im zellfreien Überstand mittels Ionenausschluss-HPLC (Gerät1) bestimmt (Säule: Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, BIO-RAD). Der lineare Messbereich liegt zwischen 0,001 und 2,000 mM.

Säulentemperatur	40°C
Eluent	0,1 M H ₂ SO ₄
Injektion	100 μ L
Flussrate	isokratisch bei 0,5 mL/min
Detektion	DAD - λ =215 nm
Retentionszeit	ca. 16,3 min

A.4.5. L-Phenylalanin

L-Phenylalanin wird im zellfreien Überstand zusammen mit anderen Aminosäuren mittels Reversed-Phase HPLC (Gerät2) bestimmt (Säule: Lichrospher 100 RP 18-5 Ec, 125 x 4 mm). Es wird eine Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) und Mercaptoethanol vorgenommen. Primäre Amine reagieren im alkalischen zu stark fluoreszierenden Isoindolen, die durch einen Fluoreszenzdetektor nachgewiesen werden können.

Säulentemperatur	40°C
EluentA	10 mM Phosphat-Puffer pH 7,2 mit 0,5 %(v/v) Tetrahydrofuran
EluentB	50 Vol% 10 mM Phosphat-Puffer pH 7,2, 35 %(v/v) Methanol, 15 Vol% Acetonitril
Injektion	5µL
Flussrate	Gradientenelution von 100 % A zu Beginn bis 100% B bei 0,9 mL/min
Gradient	0 min: 75 % B 7 min: 90 % B 8.5 min: 100 % B 13.5 min: 100 % B 14.5 min: 75 % B
Detektion	Fluoreszenz: EX 330 nm, EM 450 nm
Retentionszeit	ca. 9,6 min

A.4.6. Lactat

Mit einer HPLC (Gerät3) mit einer Aminex[®]-Säule wurde Lactat bei den Ganzzellbiotransformationen quantifiziert. Bedingungen nach [Kriegesmann 1999]:

Säulentemperatur	25°C
Eluent	6mM H ₂ SO ₄
Flussrate	isokratisch bei 0,5 mL/min
Detektion	UV-λ=195nm
Retentionszeit	15,4 min

A.4.7. 2,5-Hexandion, 2,5-Hexandiol und 5-Hydroxyhexan-2-on

2,5-Hexandion, 2,5-Hexandiol und 5-Hydroxyhexan-2-on werden gaschromatographisch mit einer Fused Silica Kapillarsäule und einem FID-Detektor (250°C) gemessen. Bedingungen nach [Kriegesmann 1999]:

Säulentemperatur	140°C
Trärgas	Helium 1,5bar
Injektor	250°C s/sl
Retentionszeit	
2,5-Hexandion	4,29 min
2,5-Hexandiol	4,79 min
5-Hydroxyhexan-2-on	5,68 min

A.5. Datenauswertung

A.5.1. Statistik

Mittelwert $\bar{x}$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

wobei x_i für Messwerte steht.

Standardabweichung σ

$$\sigma = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})$$

Relative Standardabweichung s in [%]

$$s = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

Lineare Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate

Hauptsächlich wurde dieses Vorgehen bei der Berechnung von Regressionsgeraden von Standardkurven gewählt. Die Steigung m und Achsenabschnitt b der Regressionsgeraden werden wie folgt berechnet (Excel, Microsoft Inc.):

$$m = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^n (x_i y_i) - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)}{n \cdot \sum_{i=1}^n (x_i^2) - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}$$

$$b = \frac{\left(\sum_{i=1}^n y_i \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^n (x_i)^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \cdot \left(\sum_{i=1}^n (x_i y_i) \right)}{n \cdot \sum_{i=1}^n (x_i^2) - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}$$

A.5.2. Methode der kleinsten Quadrate für nichtlineare Anpassung

Eine nichtlineare Parameteranpassung, wie in Kapitel 5 verwendet, erfordert die Verwendung eines rechnergestützten Optimierungsalgorithmus (Levenberg-Marquardt). Es wird damit auf Grundlage der Messdaten eine Anpassungsfunktion ermittelt, für die die Summe der quadratischen Abweichungen minimal ist. Dazu wurde das Programm Matlab (Mathworks Inc.) verwendet.

A.5.3. Ausreißertest nach Nalimov

Der Ausreißertest nach Nalimov wurde gemäß [Kaiser und Gottschalk 1976] durchgeführt:

Es wird ein Stichprobenumfang von $n=3$ benötigt und man berechnet κ :

$$\kappa = \frac{|x_i - \bar{x}|}{\sigma} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

Ist $\kappa < \kappa(95)$ aus der zugehörigen Tabelle, so ist kein Ausreißer feststellbar.

Ist $\kappa(95) \leq \kappa < \kappa(99)$ so liegt wahrscheinlich ein Ausreißer vor.

Ist $\kappa(99) \leq \kappa < \kappa(99,9)$ so liegt signifikant ein Ausreißer vor.

Ist $\kappa(99,9) \leq \kappa$, so liegt hochsignifikant ein Ausreißer vor.

Tab. A.4: κ -Wert-Tabelle für den Ausreißertest: κ (statistische Sicherheit in %) in Abhängigkeit vom Freiheitsgrad f

f	$\kappa(95)$	$\kappa(99)$	$\kappa(99,9)$
1	1,409	1,414	1,414
2	1,645	1,715	1,730
3	1,757	1,918	1,982
4	1,814	2,051	2,178
5	1,848	2,142	2,329
6	1,870	2,208	2,447
7	1,885	2,256	2,540
8	1,895	2,294	2,616
9	1,903	2,324	2,678
10	1,910	2,348	2,730

B. Materialien

B.1. Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autosampler	851-AS	Jasko, Groß-Zimmern
Analogthermometer		Merck Eurolab
Autoklav (groß)	4507 E	Fedegari Autoclavi Spa
Differential Refractometer		Knauer, Berlin
Dosimat	präzise Hubkolbenpumpe	Metrohm, Filderstadt
Drucksensor		
Fluoreszenzdetektor	RF-535	Shimadzu
Gaschromatograph	GC-System 6890 mit MSD5973, CEM-Station	Hewlett-Packard, Wald- bronn
Glucose-Handmessgerät	Accutrend Sensor	Böhringer, Mannheim
HPLC-1 (Acetat)	Solvent-Delivery- SystemS1000, Säulenofen S4110, UV-DetektorS3300	Sykam, Gilching
HPLC-2 (L-Phe)		
HPLC-3 (Lactat)	HPLC-Controller S2000, Solvent-Delivery-System S1100, Gradient-Mixer S8110, Säulenofen GAT- CH-150	Sykam, Gilching
Integrator HPLC-1	C-R6A	Shimadzu
Laborroboter	Biomek 2000	Beckmann, München
Magnetrührer	Variomag compact HP1	H+P Labortechnik, München
Mikropumpe		Fraunhofer Institut IMS, München
Mikrotiterplatten- Photometer	Thermomax	Molecular Devices, USA
Mikrotiterplatten-Schüttler	Titramax 100	Heidolph
Multiventilmodul- Membranventile	VT16M	DASGIP mbH, Jülich
Multiventilmodul- Quetschventile	VT16Q	DASGIP mbH, Jülich
Online-Glucose-Analysator	OLGA - Sequentielle Injek- tionsanalyse	IBAGmbH, Göttingen
Peristaltik Pumpe	Minipuls 3 Abimed	Gilson, Villiers, France

pH-Elektroden (Fermentation)	combination pH, 405-DPAS-SC-K8s/120	Mettler-Toledo
pH-Meßverstärker	pH-Meter 632	Metrohm, Filderstadt
pH-Meßverstärker	16fach parallel	DASGIP mbH
Photometer	UV-160A	Shimadzu, Duisburg
Pipetten	0,01 ml - 5,0 ml	Eppendorf, Hamburg
pO ₂ -Elektrode	Oxyrebuild	Ingold/Mettler-Toledo
pO ₂ -Meßverstärker	Typ 170	Ingold/Mettler-Toledo
Potentiostat	PS4b - vier Kanäle	DASGIP mbH, Jülich
Profors	Inkubator für Mini-Blasensäulen	INFORS AG, Bottmingen, CH
PT-100	Temperaturfühler	RS Components
Schüttler	GFL 3033	GFL mbH, Burgwedel
Standautoklav	2540 ELY	Tutnauer GmbH
Temperaturbad	C6	LAUDA
Tennverstärker	Regel-Trenn-Transformator	Lübcke-Vario
Vortex		IKA Labortechnik Janke&Kunkel
Waage (elektronisch)	R160/P	Sartorius GmbH, Göttingen
Zentrifuge	Avanti 30	Beckmann, München
Zentrifuge	CS-15R	Beckmann, München

B.2. Verwendete Labormaterialien

Material	Art	Hersteller
Drahtgestrick	V4A Stahl	Rhodium
Einwegküvetten	1,5 mL 12,5x12,5x45 mm	Brand, Wertheim
Einwegspritzen	2 mL	AMEFA, Kriftel
Epoxidharz-Kleber	UHU endfest 300 2 Komponenten bis 200 °C	UHU
Filter		Nalgene
Fingertight-Fittings	PE	YMC
GC-Säule	Permabond CW20M (50m·0,32mm·0,5µm)	Macherey & Nagel, Düren
Glasgeräte	DURAN	SCHOTT, Mainz
Hohlfaser-Membranen	1 und 5kD 0,5mm i.d. (ULF 1-C-4-10)	AT Technology, Needham, MA, USA (Vertrieb Schleicher&Schuell, Dassel)
Hohlfasermembranmodule		Spectrum, Los Angeles, CA, USA
Hohlschrauben	PP	Bohlender GmbH, Lauda-Königshofen
HPLC-Säule	Aminex [®] HRX-87-H (300·7,8mm)	BIO-RAD, München
HPLC-Säule	Lichrospher 100 RP 18-5 Ec, 125 x 4 mm	Merck, Darmstadt
Kabelbinder	T18R Natur, Polyamid 6.6	HellermannTyton
Kanülen	Sterican 0,9 x 70 mm	B. Braun, Melsungen

Kryoröhrchen	1,8 mL	Nalgene
Kupplungen	PTFE	Bohlender GmbH
Manuelle 3/2 Wege Ventile		Bohlender GmbH
Metallkappen für Schüttelkolben	Bellco Kappen	Bellco Inc., Canada
Mikrodialysenadeln	CMA/11	CMA, Schweden
Mikrotiterplatten	Flachboden, 300 μ l	Beckmann, München
Miniblasensäulen		DASGIPmbH, Jülich
Normverschlüsse	Thermoplastischer Polyester (PBTP)	SCHOTT, Mainz
O-Ringe	Viton	Seybold, Düren
Peristaltik Pumpe (Mikrodialysenadeln)	MAB0	Metalant
Pipettenspitzen	100 μ L, 1 mL	Greiner Labortechnik
Probengefäße	1,5 mL	Brand, Wertheim
PTFE-Schlauch	$\varnothing$ 0,8 mm	Bohlender GmbH, Lauda-Königshofen
Pumpenschläuche für Gilson Minipuls 3	Tygon R3607 1,02 mm i.d., 0,86mm Wand	Ismatec, Glattbrugg, CH
PVC-Schlauch	Weich-PVC 2,5 mm glasklar	Guttasyn
Rückschlagventil	Inline Check Valve low pressure	Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA
Schüttelkolben	mit Schikanen und 2 Stützen (GL14 und GL25) 0,5 und 1L	DASGIPmbH, Jülich
Schweißdraht	V4A-Stahl 1.4576, DIN 8556-1 1,6 mm	Lagernummer 280.03.023 xx
Silikonstopfen	DIN 12871, Normalschliffstopfen aus Silikon	Deutch & Neumann
Zentrifugenröhrchen	50ml	Corning

B.3. Verwendete Medien

Medium		LB	Pan	M9	4pF20 ¹ nach [Kreutzer 2000]	<i>L. kefir</i> ²
					VK ³ HK ⁴	
Komplexe Bestandteile						
Pepton	[g/L]	10	–	–	–	10,0 ⁵
Hefeextrakt	[g/L]	5	–	–	–	5,0
Fleischextrakt	[g/L]	–	–	–	–	10,0
Kohlenstoffquelle						
Glucose·H ₂ O	[g/L]	–	var. ⁶	var.	5,0	20,0
Na-Acetat	[g/L]	–	–	–	–	5,0
Nährsalze und andere Zusätze						
K ₂ HPO ₄	[g/L]	–	10,0	–	12,0	2,0
KH ₂ PO ₄	[g/L]	–	13,0	3,0	3,0	–
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	[g/L]	–	6,0	–	–	–
Na ₂ HPO ₄	[g/L]	–	–	6,0	–	–
NH ₄ Cl	[g/L]	–	0,2	1,0	5,0	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	[g/L]	–	2,0	–	–	–
(NH ₄) ₂ H-Citrat	[g/L]	–	–	–	–	2,0
NaCl	[g/L]	5	–	0,5	1,0	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	1,0 ⁶	246,4	0,3	0,2
Thiamin	[10 ^{−3} g/L]	–	–	–	7,5	–
Tyrosin	[g/L]	–	–	–	0,2	–
Spurenelemente						
AlCl ₃ ·6H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	10,0	–	0,75	–
CaCl ₂	[10 ^{−3} g/L]	–	40,0	11,1	11,3	–
Citrat/FeSO ₄ ·7H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	–	–	112,5	–
CoCl ₂ ·6H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	7,0	–	0,6	–
CuCl ₂ ·H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	1,0	–	–	–
CuSO ₄ ·5H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	–	–	2,5	–
FeSO ₄ ·7H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	40,0	–	–	–
H ₃ BO ₄	[10 ^{−3} g/L]	–	0,5	–	0,5	–
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	2,0	–	3,0	–
MnSO ₄ ·H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	10,0	–	17,1	50,0
NiSO ₄ ·6H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	–	–	1,7	–
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	[10 ^{−3} g/L]	–	2,0	–	15,0	–
Antibiotika						
Ampicillin	[10 ^{−3} g/L]	–	–	–	100,0	–
Chloramphenicol ⁷	[10 ^{−3} g/L]	–	–	–	25,0	–
Sonstiges						
Tween 80	[g/L]	–	–	–	–	1,0

¹Medium für *Escherichia coli* 4pF20²Medium für *Lactobacillus kefir* nach [Haberland 2000]³Vorkultur⁴Hauptkultur⁵Casein Pepton⁶getrennt in 50 mL bidest. Wasser lösen⁷gelöst in Ethanol

B.4. Verwendete Pufferlösungen

B.4.1. Akzeptormedium

nach [Gründig 2000]

Substanz	Konzentration [M]
KCl	0,1
K ₂ HPO ₄	0,05
KH ₂ PO ₄	0,05

B.4.2. Tris-Maleat-Puffer

Substanz	Konzentration [g/L]
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	12,10
Maleinsäure	11,60
NaOH(konz.)	pH 6,8 einstellen

B.5. Verwendete Chemikalien und Enzyme

Substanz	Bemerkungen	Hersteller
Adenosin-5-triphosphat		Böhringer Mannheim
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	1.000 U (1 mL) von <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Nr. 165875	Roche Molecular Biochemicals
Hexokinase	15.000 U (5 mL) von Hefe, Nr. 1426389	Roche Molecular Biochemicals
Glucose		Roquette GmbH, Frankfurt
2,5 Hexandion		FLUKA, Taufkirchen
ortho-Phthaldialdehyd (OPA)		FLUKA, Taufkirchen
pH-Puffer	pH4 und 7	Mettler Toledo
Alle Anderen Chemikalien		Merck, Darmstadt

B.6. Verwendete Software zur Datenaufnahme und -auswertung

Programm	Quelle
Datenaufnahme- und Steuerung	
Flowchart®	DASGIPmbH, Jülich
fedbatch-pro	DASGIPmbH, Jülich
Auswertung	
Excel	Microsoft Inc.
Maple 6.0	Waterloo Maple Inc.
Matlab	Mathworks Inc.
Origin 5.0	Microcal Software Inc.
Peakauswertung (offline)	[Franz 1999]
Textverarbeitung	
L ^A T _E X	Freeware
WinteX2000-Editor	

C. Herleitung wichtiger Gleichungen

C.1. Herleitung Gleichung der stationären Diffusion

Im folgenden sollen die Gleichungen für das Konzentrationsprofil und den Diffusionsstrom über eine dünne homogene Membran im stationären Fall hergeleitet werden. Symbole sind im Abkürzungsverzeichnis enthalten.

Es wird zunächst angenommen, dass die Membran zwei gut durchmischte Flüssigkeiten voneinander trennt. Die Massenbilanz ohne chemische Reaktion über eine dünne Schicht Δz ergibt:

$$\left(\begin{array}{c} \text{Akkumulation} \\ \text{des Analyten in} \\ \text{Membran} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Diffusions-} \\ \text{geschwindigkeit} \\ \text{in die Schicht an} \\ \text{der Stelle } z \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Diffusions-} \\ \text{geschwindigkeit} \\ \text{aus der Schicht} \\ \text{an der Stelle} \\ z + \Delta z \end{array} \right)$$

Unter der Annahme, der Vorgang ist im Fließgleichgewicht und damit die Akkumulation gleich Null, läßt sich schreiben:

$$0 = A(j_a|_z - j_a|_{z+\Delta z}) \quad (\text{C.1})$$

Wird Gleichung C.1 durch das Volumen der Schicht ($A\Delta z$) geteilt, und wird Δz sehr klein erhalten wir:

$$0 = -\frac{d}{dz} j_a \quad (\text{C.2})$$

Die Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit ist nicht von der Ortskoordinate abhängig. Wird Gleichung C.2 mit dem Fickschen Gesetz $-j_a = D \frac{dc_a}{dz}$ verbunden, ergibt sich:

$$0 = D \frac{d^2 c_a}{dz^2} \quad (\text{C.3})$$

Die Randbedingungen ergeben sich aus der Kenntnis der Konzentration an den Grenzen der Membranoberflächen und der Annahme, dass sich das Molekül in der Membran löst. Zur Beschreibung bis zu welchem Grad sich der Analyt in der Membran löst wird ein Verteilungskoeffizient H eingeführt:

$$\begin{aligned} z = 0, \quad c_a^m &= H c_{a0} \\ z = \delta, \quad c_a^m &= H c_{a\delta} \end{aligned}$$

Durch Lösen der Differentialgleichung ergibt sich ein Konzentrationsprofil wie folgt:

$$c_a(z) = H c_{a0} + H(c_{a\delta} - c_{a0}) \frac{z}{\delta} \quad (\text{C.4})$$

Durch Kombination der Gleichung C.4 mit dem Fickschen Gesetz kann der Diffusionsstrom über die dünne Membran bei konstantem Konzentrationsgefälle im Fließgleichgewicht berechnet werden:

$$j_a = \frac{DH}{\delta_m}(c_{a0} - c_{a\delta}) \quad (\text{C.5})$$

Aufgrund eines häufig bestehenden Mangels an exakten Angaben über Porosität und Porenverteilung des Membranmaterials, wird anstelle einer exakten Lösung des Problems, anstelle des Diffusionskoeffizienten¹ ein sog. effektiver Diffusionskoeffizient D_{eff} verwendet. Er hängt zusätzlich von den geometrischen Verhältnissen ab und ist im zu betrachtenden Fall zu bestimmen. Die Gleichung C.5 lautet daraufhin für mikroporöse Membranen:

$$j_a = \frac{D_{eff}H}{\delta_m}(c_{a0} - c_{a\delta}) \quad (\text{C.6})$$

C.2. Herleitung Gleichung der quasistationären Diffusion

Zunächst wird das Fick'sche Gesetz für Membrandiffusion verwendet.

$$j = \left[\frac{D \cdot H}{\delta_m} \right] (c_a'' - c_a') \quad (\text{C.7})$$

wobei H wie oben beschrieben den Anteil der Membranfläche beziffert, der der Diffusion zur Verfügung steht. Aus den Massenbilanzen für beide Kompartimente ergibt sich Gleichung C.8.

$$V'' \frac{dc_a''}{dt} = -A j_a = -V' \frac{dc_a'}{dt} \quad (\text{C.8})$$

wobei A die Fläche der Membran ist. Division durch jeweils V'' und V' , Subtraktion der rechten und linken Seite von Gleichung C.8 und Kombination mit der Massenflux Gleichung C.7 ergibt

$$\frac{d}{dt}(c_a'' - c_a') = D\phi(c_a'' - c_a') \quad (\text{C.9})$$

wobei $\phi = \frac{A}{\delta_m} H \left(\frac{1}{V'} + \frac{1}{V''} \right)$ eine geometrische Konstante der verwendeten Membran ist. Die Anfangsbedingungen gestalten sich wie folgt:

$$t=0, \quad c_a'' - c_a' = c_a''^0 - c_a'^0 \quad (\text{C.10})$$

Die Integration von Gleichung C.9 ergibt

$$\frac{c_a'' - c_a'}{c_a''^0 - c_a'^0} = \exp^{-\phi D t} \quad (\text{C.11})$$

Unter der Annahme, die anfängliche Konzentration in V'' sei Null gilt

$$c_a'' = c_a'(1 - \exp^{-\phi D t}) \quad (\text{C.12})$$

¹gemeint ist der Diffusionskoeffizient der Komponente der in freier Lösung ermittelt wurde

C.3. Herleitung Gleichung der instationären Diffusion

Ein Modell wurde auf der Grundlage der Abhandlungen von Cussler [Cussler 1997] zur Beschreibung der instationären Diffusion in einen porösen zylinderförmigen Körper, den eine Hohlfasermembran darstellt, verwendet. Im ersten Schritt wurde eine Massenbilanz formuliert:

$$\left(\begin{array}{c} \text{Akkumulation in} \\ \text{zylinderförmige} \\ \text{Schale} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Diffusion in} \\ \text{Schale} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Diffusion} \\ \text{aus Schale} \end{array} \right) \quad (\text{C.13})$$

Unter Berücksichtigung der geometrischen Verhältnisse eines Zylinders mit r_m , dem Radius der zu betrachtenden Schale und deren Fläche ($A = 2\pi L r_m$) und Volumen ($V = 2\pi L r_m \Delta r_m$).

$$\frac{\partial}{\partial t} (2\pi L r_m \Delta r_m c_a^m) = (2\pi L r_m j_a)_{r_m} - (2\pi L r_m j_a)_{r_m + \Delta r_m} \quad (\text{C.14})$$

Durch Division mit dem Volumen und Grenzwertbildung wird Δr_m zu ∂r_m . Durch Kombination mit dem Fick'schen Gesetz ergibt sich:

$$\frac{\partial c_a^m}{\partial t} = \frac{D_{eff}}{r_m} \frac{\partial}{\partial r_m} r_m \frac{\partial c_a^m}{\partial r_m} \quad (\text{C.15})$$

D_{eff} ist der effektive Diffusionskoeffizient der Membran und ist das Produkt aus dem Diffusionskoeffizient des Analyten in wässrigem Medium und einem Faktor H, der den Anteil der Fläche beziffert, die der Diffusion durch die Membran zur Verfügung steht. Zur mathematischen Vereinfachung des Problems werden dimensionslose Variablen eingeführt:

$$\text{Konzentration} \quad \theta = 1 - \frac{c_a^m}{c_{a0}} \quad (\text{C.16})$$

$$\text{Position} \quad \xi = \frac{r_m}{\delta_m} \quad (\text{C.17})$$

$$\text{Zeit} \quad \tau = \frac{D_{eff} \cdot t}{\delta_m^2} \quad (\text{C.18})$$

Es ergibt sich unter Kombination mit Gleichung C.15:

$$\frac{\partial \theta}{\partial \tau} = \frac{1}{\xi} \frac{\partial}{\partial \xi} \xi \frac{\partial \theta}{\partial \xi} \quad (\text{C.19})$$

mit den Randbedingungen:

$$\tau \leq 0, \quad \text{alle } \xi, \quad \theta = 0 \quad (\text{C.20})$$

$$\tau > 0, \quad \xi = 1, \quad \theta = 0 \quad (\text{C.21})$$

$$\xi = 0, \quad \frac{\partial \theta}{\partial \xi} = 0 \quad (\text{C.22})$$

Die Lösung der Differentialgleichung wird durch Trennung der Variablen erreicht:

$$\theta(\tau, \xi) = g(\tau) f(\xi) \quad (\text{C.23})$$

Die Kombination von Gleichung C.19 und C.23 und Trennung durch Division mit $g(\tau) f(\xi)$ führt zu Gleichung C.24.

$$\frac{1}{g(\tau)} \frac{dg(\tau)}{d\tau} = \frac{1}{\xi f(\xi)} \frac{d}{d\xi} \xi \frac{df(\xi)}{d\xi} \quad (\text{C.24})$$

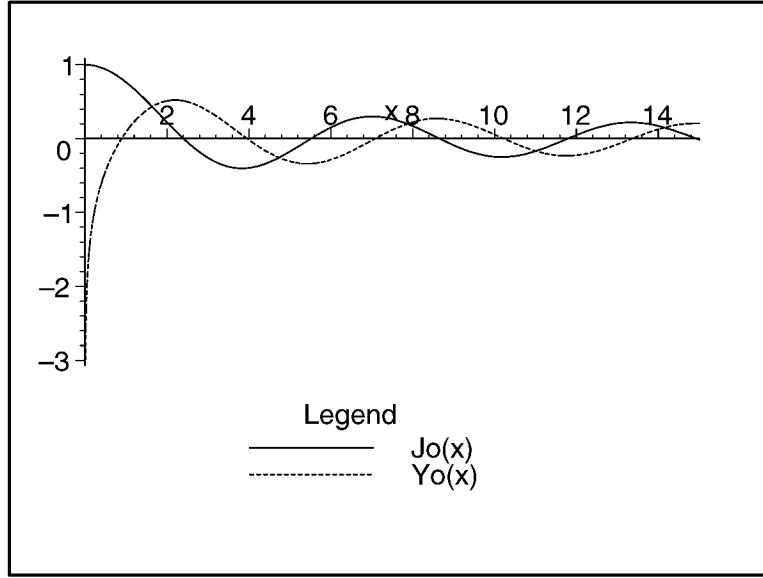


Abb. C.1: Verlauf der Besselfunktionen J_0 und Y_0

Bei Konstanthalten von jeweils Position ξ und Zeit τ ergeben sich die Gleichungen C.25 und C.26.

$$\frac{1}{g(\tau)} \frac{dg(\tau)}{d\tau} = -\alpha^2 \quad (\text{C.25})$$

$$\frac{1}{\xi f(\xi)} \frac{d}{d\xi} \xi \frac{df(\xi)}{d\xi} = -\alpha^2 \quad (\text{C.26})$$

Der Grund für die Wahl einer Konstante der Form $-\alpha^2$ wird im Folgenden deutlich. Die Lösung der zeitabhängigen Gleichung lautet:

$$g(\tau) = C \cdot \exp^{-\alpha^2 \tau} \quad (\text{C.27})$$

Durch Umformen von Gleichung C.26 erhält man die Besselsche Differentialgleichung der Form $x^2 y'' + xy' + (x^2 - n^2)y$ [Bronstein und Semendjajew 1991] wobei $n=0$ und daher ihre allgemeine Lösung der Form ²

$$f(\xi) = aJ_0(\alpha\xi) + bY_0(\alpha\xi) \quad (\text{C.28})$$

a und b sind die Integrationskonstanten. Durch die Randbedingung C.22 und da $Y_0(0) \neq 0$ (Abb. C.1) ergibt sich $b = 0$ und durch Gleichung C.21 gilt $0 = aJ_0(\alpha)$. Da die Integrationskonstante a nicht 0 werden kann, gibt es für alle Nullstellen der Besselfunktion J_0 eine Vielzahl von Lösungen $J_0(\alpha_n) = 0$. Die Lösung von Gleichung C.23 ergibt sich zu

$$\theta(\tau, \xi) = \sum_{n=0}^{\infty} (aC)_n J_0(\alpha_n \xi) \exp^{-\alpha_n^2 \tau} \quad (\text{C.29})$$

² $J_0(x)$ ist die Besselfunktion erster Gattung nullter Ordnung und $Y_0(x)$ ist die Besselfunktion zweiter Gattung auch Webersche Funktion genannt.

Durch Einsetzen von C.20, Multiplikation beider Seiten mit $\xi J_0(\alpha_n \xi)$ und Integration mit den Grenzen $\xi = 0$ und $\xi = 1$ ergibt sich

$$\theta(\tau, \xi) = \sum_{n=0}^{\infty} (aC)_n J_0(\alpha_n \xi) \exp^{-\alpha_n^2 \tau} \quad (\text{C.30})$$

Nach Einsetzen der Variablen erhält man nun die Gleichung für die Konzentrationsverteilung in der porösen Membranwand $c_a^m(r_m, t)$:

$$\frac{c_a^m(r_m, t)}{c_{a0}} = 1 - 2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp \frac{-D_{eff} \alpha_n^2 t}{\delta_m^2} J_0(\alpha_n \frac{r_m}{\delta_m})}{\alpha_n J_1(\alpha_n)} \quad (\text{C.31})$$

Die Diffusion des Analyten aus der porösen Membranwand in die im Inneren der Hohlfaser ruhende Akzeptorflüssigkeit kann nun entweder als Diffusion in einen zylinderförmigen Körper analog zu dem eben Behandelten unter Verwendung des Diffusionskoeffizienten in freier Lösung beschrieben werden. Dabei muß das Konzentrationsprofil über den Radius des zylinderförmigen Flüssigkeitssegments R integriert werden.

$$\int_{r=0}^R \frac{c_a''(r, t)}{c_a^m(R, t)} = \int_{r=0}^R 1 - 2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp \frac{-D \alpha_n^2 t}{\delta_m^2} J_0(\alpha_n \frac{r}{\delta_m})}{\alpha_n J_1(\alpha_n)} \quad (\text{C.32})$$

wobei $c_a^m(R, t)$ die aus Gleichung C.31 ermittelte Konzentration an der Membraninnenseite, d.h. an der Stelle $r = R = (d_i - \delta_m)$ darstellt. Die zeitabhängige Konzentration im Probensegment berechnet sich in Abhängigkeit vom Radius des Flüssigkeitszylinders r folglich zu:

$$c_a''(t) = \int_{r=0}^R \frac{c_a''(r, t)}{c_a^m(R, t)} \cdot c_a^m(R, t) \quad (\text{C.33})$$



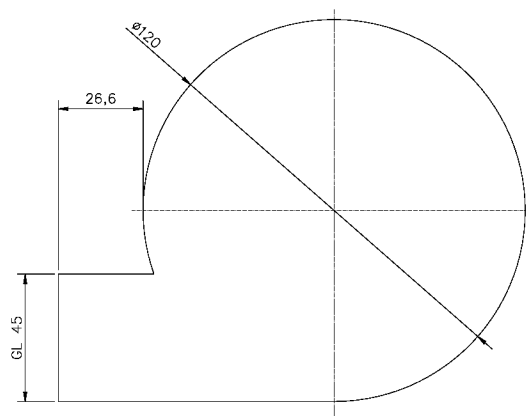


Abb. D.3: Modifizierter Schüttelkolben für einen Membranmodulhalter (Maße in Millimeter) [Franz 1999]

E. Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

PARAMETER SYMBOLE

[...]	Konzentrationen	[M]
α	Verteilungskoeffizient von Sauerstoff zwischen Wasser und Luft	[-]
$-\alpha^2$	Konstante zur Lösung einer DGL	[-]
α_n	Nullstellen der Funktion $J_0(x)$	
β	Stofftransportkoeffizient	[m/s]
δ	Dicke der Diffusionsschicht	[m]
δ_m	Dicke der Membran	[m]
Δ	Laplace-Operator $\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \cdot \frac{\partial}{\partial r}$	
Δz	Schichtdicke einer dünnen Schicht	[m]
ϵ	Radius des diffundierenden Moleküls	[m]
ϕ	$\frac{A}{\delta} H \left(\frac{1}{\sqrt{v}} + \frac{1}{\sqrt{v'}} \right)$ geometrische Konstante einer Diaphragmazelle	[1/m ²]
κ	statistische Sicherheit als Beurteilungskriterium für den Ausreistest nach Nalimov	[%]
λ	Wellenlänge	[m]
μ	spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
μ	dynamische Viskosität	[Pas]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate	[h ⁻¹]
∇	$i \frac{\partial}{\partial x} + j \frac{\partial}{\partial r}$ Nabla-Operator	
ν	kinematische Viskosität	[m ² /s]
π	3,14159	[-]
θ	$1 - \frac{c_a^m}{c_{a0}}$ dimensionslose Konzentration in einer Membranwand	[-]
ρ	Dichte	[kg/m ³]
σ	Standardabweichung	variable Einheit
τ	$\frac{D_{eff} \cdot t}{\delta^2}$ dimensionslose Zeit	[-]
ξ	$\frac{r_m}{\delta}$ dimensionslose Position in einer Membranwand	[-]
a	Integrationskonstante	[-]
A	Fläche	[m ²]
A_E	Elektrodenfläche	[m ²]
$A_{quadrat}$	quadratisch zeitbeschwerte Betragsregelfläche	[s ²]
b	Integrationskonstante	[-]
b	Achsenabschnitt einer Regressionsgeraden	[-]
Bo	Bodensteinzahl	[-]
c	Konzentration	[g/L]
$\bar{c}_a$	über Rohrquerschnitt gemittelte Analytkonzentration	[mol/m ³]
c_a'	Konzentration der Komponente „a“ in Donorlösung	[M]
c_a''	Konzentration der Komponente „a“ in membranseitigem Volumen	[M]

c'_{a0}	Anfangskonzentration der Komponente „a“ in Donorlösung	[M]
c''_{a0}	Anfangskonzentration der Komponente „a“ in membranseitigem Volumen	[M]
c_a	Konzentration der Komponente „a“	[M]
$c_a(r, t)$	Konzentration der Komponente „a“ abhängig von Zylinderradius und Zeit	[M]
$c_a^m(r, t)$	Konzentration der Komponente „a“ in Membran, abhängig von Zylinderradius und Zeit	[M]
c_{a0}	Konzentration der Komponente „a“ in freier Lösung	[M]
$c_{a\delta}$	Konzentration der Komponente „a“ in der Diffusions-Grenzschicht	[M]
c_a^m	Konzentration der Komponente „a“ in einer Membranwand	[M]
$c_e(t)$	stufenförmige Zeitfunktion einer Konzentration	[M]
c_{e0}	Konzentration der Lösung zur stufenförmigen Konzentrationserhöhung	[M]
c_G	D-Glucosekonzentration	[g/L]; [M]
c_G^{bulk}	D-Glucosekonzentration in freier Lösung	[M]
c_H	Wasserstoffperoxidkonzentration	[M]
c_i	Konzentration der Komponente „i“	[M]
c_{iein}	Konzentration der zugeführten Komponente „i“	[M]
c_{iaus}	Konzentration der abgeführten Komponente „i“	[M]
c_O	Gelöst-Sauerstoffkonzentration	[M]
c_O^{bulk}	Gelöst-Sauerstoffkonzentration in freier Lösung	[M]
c_{ox}	Konzentration des Oxidanten	[M]
c_S	Konzentration des wachstumslimitierenden Substrats	[g/L]
$c_{S_{ein}}$	Substratkonzentration im Zulauf	[kg/m ³]
c_{SP}	Sollwert der Substratkonzentration	[g/L]
c_X	Biomassekonzentration	[g/L]
c_{X_0}	Anfangskonzentration der Biomasse	[g/L]
C	Integrationskonstante	[-]
d	Rohrdurchmesser	[m]
d_a	Außendurchmesser eines Rohrs	[m]
d_E	Dicke der Enzymschicht auf der Arbeitselektrode	[m]
d_i	Innendurchmesser eines Rohrs	[m]
D	Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
D_G	Diffusionskoeffizient der D-Glucose	[m ² /s]
D_H	Diffusionskoeffizient des Wasserstoffs	[m ² /s]
D_O	Diffusionskoeffizient des Sauerstoffs	[m ² /s]
D_{eff}	= $D \cdot H$ effektiver Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
$e(t)$	Einheitssprungfunktion	
E	= $\frac{(R \cdot \bar{u})^2}{48D}$ Dispersionskoeffizient	[m ² /s]
E	Enzym	
ES	Enzym-Substratkomplex	
f	externe Kraft	[N]
f	Freiheitsgrad im Ausreissertest nach Nalimov	
$f(\xi)$	Funktion zur Trennung von Variablen in einer DGL	[-]
F	Faradaykonstante = $9,6485 \cdot 10^7$	[C kmol ⁻¹]
F	normierte Stufenfunktion (F-Kurve)	[-]
$F(t)$	aktuelle Dosierrate (Stellgröße)	[L/h]
$g(\tau)$	Funktion zur Trennung von Variablen in einer DGL	[-]
$\text{grad}p$	= ∇p	

H	Membran- und modellabhängiger Faktor	[-]
i	Einheitsvektor der zugehörigen Raumkoordinate	
I	Strom der Arbeitselektrode	[nA]
$I(t)$	zeitabhängiger Strom an der Arbeitselektrode	[nA]
I_d	Diffusionsgrenzstrom an der Elektrode	[A]
I_{stat}	stationärer Elektrodenstrom	[A]
I_{max}	maximales Stromsignal	[A]
$\vec{j}$	Einheitsvektoren der zugehörigen Raumkoordinate	
$\dot{j}_a$	Stofffluss von Komponente „a“ pro Fläche	[kg/(s m ²)]
$J_0(x)$	Besselfunktion nullter Ordnung	
$J_1(x)$	Besselfunktion erster Ordnung	
J_a	Stofffluss von Komponente „a“	[kg/s]
k	Boltzmann-Konstante = $1,4 \cdot 10^{-23}$	[J/K]
k_{-1}	kinetische Konstante	[h ⁻¹]
k_1	kinetische Konstante	[h ⁻¹]
k_2	kinetische Konstante	[h ⁻¹]
k_G	kinetische Konstante bzgl. D-Glucose	[M]
k_H	kinetische Konstante bzgl. Wasserstoffperoxid	[M]
k_O	kinetische Konstante bzgl. Sauerstoff	[M]
K_1	Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung	[1/h]
K_2	Geschwindigkeitskonstante der Produktbildung	[-]
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	[M]
K_p	Proportionalfaktor	[h ⁻¹]
K_S	Monod-Konstante	[g/L]
l	Faktor bei der Berechnung des LOQ und LOD	[-]
L	Länge	[m]
L_m	Membranlänge	[m]
m	numerische ganzzahlige Laufzahl	[-]
m	Steigung einer Regressionsgeraden	[-]
m_S	zellspezifischer Erhaltungskoeffizient	[g _S /(g _X · h)]
M	Molekulargewicht	[g/mol]
$M_{Glucose}$	Molekulargewicht von Glucose	[g/mol]
n	numerische ganzzahlige Laufzahl	[-]
n	Anzahl der in elektrochemischer Reaktion ausgetauschten Ladungen (Faraday'sches Gesetz))	[-]
n	Anzahl durchgeführter Messungen	[-]
N	Stoffmenge	[mol]
p	Druck	[Pa]
pO_2	Gelöst-Sauerstoff-Konzentration	[%]
pH	negativ-dekadischer Logarithmus der Oxoniumionen-Konzentration	[-]
P	Produkt	
Pe	Pecletzahl	[-]
r	Abstand von Zylinder-/Rohrmitte (Radius)	[m]
r_m	Abstand von Zylindermitte zur Positionsbeschreibung in der Wand einer Hohlfasermembran	[m]
R	Zylinder oder Rohrradius	[m]
R^2	Korrelationskoeffizient	[-]
$\hat{R}_S$	geschätzter Substratverbrauch	[g/L/h]
R_S	Substrataufnahmerate	[g/L/h]

Re	Reynoldszahl	[-]
Rf	Recovery Factor (Wiederfindungsfaktor), Maß zur Charakterisierung von Dialysemembranen	[-]
s	relative Standardabweichung	[%]
S	Substrat	
t	Zeit	[s]
$\bar{t}_m$	mittlere Verweilzeit	[s]
t_{10}	Dauer nach Aufgabe eines Konzentrationssprungs bis Sensorsignal 10 % des stationären Signals	[s]
t_{90}	Dauer nach Aufgabe eines Konzentrationssprungs bis Sensorsignal 90 % des stationären Signals	[s]
t_{auf}	Dauer der Öffnung des Schüttelinkubators	[min]
t_{stop}	Diffusionszeit (Stop-Phase) bei der FDA	[min]
Δt	Abtastzeit, Dauer eines Probenahmeintervalls	[min]
T	Temperatur	[°C]
T_R	Raumtemperatur ($\cong 23$ °C)	[°C]
T_n	Nachstellzeit	[s]
T_v	Vorhaltezeit	[s]
u	$= \frac{D_G(2n+1)^2\pi^2}{(2d_E)^2}$	[s ⁻¹]
$\bar{u}$	mittlere Strömungsgeschwindigkeit	[m/s]
u_{max}	maximale Strömungsgeschwindigkeit	[m/s]
$u(r)$	Strömungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Rohrradius	[m/s]
U_{pol}	Polarisationsspannung	[mV]
v	Reaktionsgeschwindigkeit	[M/s]
v_i	spezifische Reaktionsgeschwindigkeit für Komponente „i“	[kg/m ³ /s]
v_2	Reaktionsgeschwindigkeit einer Pseudo-2-Substratkinetik bzgl. Sauerstoff und D-Glucose	[M/s]
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	[M/h]
v_P	spezifische Produktbildungsrate	[kg/m ³ /s]
v_S	spezifische Substratverbrauchsrate	[kg/m ³ /s]
v_X	spezifische Biomassebildungsrate	[kg/m ³ /s]
V	Volumen	[m ³]
V'	Volumen der freien Lösung, z.B. Reaktionslösung	[m ³]
V''	membranseitiges Volumen z.B. im Inneren einer Hohlfasermembran	[m ³]
V_o	Anfangsvolumen	m ³
$\dot{V}$	Volumenstrom	[m ³ /s]
$\dot{V}_{ein}$	Volumenstrom des Zulaufs	[m ³ /s]
$\dot{V}_{aus}$	Volumenstrom des Ablaufs	[m ³ /s]
V_o	Anfangsvolumen	m ³
w	$= D_H(m\pi/d_E)^2$	[s ⁻¹]
x	Variable	[-]
x	Ortskoordinate in Strömungsrichtung	[m]
x	Transportstrecke	[m]
$x(t)$	Regelgröße	
$\bar{x}$	Mittelwert	
x_E	Position in der Enzymschicht von der Elektrodenoberfläche ($x=0$)	[m]
x_i	Messwert	
x_s	Sollwert	variable Einheit

x_w	Regelabweichung	variable Einheit
y_i	Messwert	
$y(t)$	Stellgröße	
$y_{PID}(t)$	Stellgrößenverlauf eines PID-Reglers	variable Einheit
Y_{XS}	spezifischer Biomasse-Ausbeute-Koeffizient	[g/g(Substrat)]
Y_{PS}	spezifischer Produkt-Ausbeute-Koeffizient	[g/g(Substrat)]
z	Ortskoordinate senkrecht zur Austauschfläche	[m]
$z(t)$	Störgröße	

CHEMISCHE/BIOCHEMISCHE SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
AlCl ₃	Aluminiumtrichlorid
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfonsäure
bidest	bidestilliertes Wasser
CaCl ₂	Calciumdichlorid
Cl ⁻	Chloridion
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CoCl ₂	Cobaltdichlorid
CuCl ₂	Kupferdichlorid
CuSO ₄	Kupfersulfat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid
FBP	Fructose-1,6-bisphosphatweg
FeSO ₄	Eisen(II)sulfat
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wassertstoff
HK	Hexokinase
H ₃ BO ₄	Borsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₃ O ⁺	Oxoniumion
IPTG	1-Isopropyl-β-D-thiogalactosid
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kalium-di-hydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
L-Phe	L-Phenylalanin
L-Tyr	L-Tyrosin
MgCl	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MnSO ₄	Mangansulfat
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure

Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ MoO ₄	Di-Natriummolybdat
NAD	Nicotinadenindinucleotid
NADP	Nicotinadenindinucleotidphosphat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natrium-di-hydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₃	Ammoniumhydroxid (Ammoniak)
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
(NH ₄) ₂ H-Citrat	Di-Ammoniumhydrogencitrat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Di-Ammoniumsulfat
NiSO ₄	Nickelsulfat
O ₂	molekularer Sauerstoff
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PES	Polyethersulfon
PP	Polypropylen
PPW	Pentosephosphatweg
PS	Polysulfon
PTFE	Polytetrafluorethen (Teflon)
PTS	Phosphoenolpyruvat-Glucose-Phosphotransferase-System bei <i>E. coli</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
ZnSO ₄	Zinksulfat

EINHEITEN

A	Ampère
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	Tage
g	Gramm
h	Stunden
Hz	Hertz
K	GradKelvin
kD	Kilodalton
L	Liter
m	Meter
mbar	Millibar
mg	Stunden
min	Minute
mK	Millikelvin
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mPa	Millipascal
mV	Millivolt

μm	Mikrometer
μM	Mikromol
nA	Nano-Ampère
NL	Normliter
nm	Nanometer
s	Sekunde
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol%	Volumenprozent
W	Watt
μm	Mikrometer

ABKÜRZUNGEN

4pF20	interne Stammbezeichnung (<i>E. coli</i>)
Abb.	Abbildung
AL	Akzeptorlösung
<i>aroF</i>	Gen der DHAP-Synthase
BTM	Biotrockenmasse
ca.	circa
CAE	Computer Added Engineering
CMB	Crystal Microbalances
CSFA	Luftsegmentierte Fließ-Analyse („Continuous air segmented flow analyzer“)
CV	Variationskoeffizient (Coefficient of Variation)
DAD	Dioden-Array-Detektor
DGL	DGL
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DSM	Beginn einer Identifikationsnummer der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (DSMZ)
<i>E.</i>	Escherichia
Eq	Äquivalent
et al.	<i>et alii</i> - und andere
F-Kurve	normierte Stufenfunktion
Fa.	Firma
FDA	Fließdiffusions-Analyse
FIA	Fließinjektions-Analyse
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
Gl.	Gleichung
ggf.	gegebenenfalls
HK	Hauptkultur
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie („High-performance liquid chromatography“)
i.d.	innerer Durchmesser
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemists
K12	Bezeichnung für einen <i>Escherichia coli</i> Stamm
k.A.	keine Angabe
<i>L.</i>	Lactobacillus
lat.	lateinisch

LB	Luria Broth - Komplexmedium
LOD	Limit of Detection
LOL	Limit of Linearity
LOQ	Limit of Quantification
MB	Mini-Blasensäule
mind.	mindestens
MWCO	Molecular Weight Cut-off
N	Normal
n.b.	nicht bestimmt
OD	optische Dichte
OTR	Sauerstofftransferrate
<i>pheA</i>	Gen der Chorismatmutase/Prephenatdehydratase
rel. Stab.	relative Standardabweichung
REM	Raster-Elektronenmikroskop
RK	Rührkessel
RSA	relative Standardabweichung
S.	Seite
SIA	Sequentielle Injektions-Analyse
SK	Schüttelkolben
sog.	sogenannte(n)
Stab.	Standardabweichung
STL	Stammlösung
TCS-Zyklus	Tricarbonsäure-Zyklus
<i>tyrA</i>	Gen der Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
var.	variabel
vgl.	vergleiche
VK	Vorkultur
v.l.n.r.	von links nach rechts
UV	Ultraviolett
YYC202	interne Stammbezeichnung (<i>E. coli</i>)
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- [Altenbach-Rehm 2000] ALTENBACH-REHM, J: Entwicklung und Einsatz einer miniaturisierten Versuchstechnik für die Bioprozeßentwicklung / Forschungszentrum Jülich GmbH. Jülich, 2000 (JÜL-3782). – Berichte des Forschungszentrum Jülich: Dissertation Universität Karlsruhe (TH)
- [Altenbach-Rehm u. a. 1999] ALTENBACH-REHM, J ; NELL, C ; ARNOLD, M ; WEUSTER-BOTZ, D: Parallel Bubble Columns with Fed-Batch Technique for Microbial Process Development on a Small Scale. In: *Chemical Engineering Technology* 22 (1999), S. 12
- [Altenbach-Rehm und Weuster-Botz 1997] ALTENBACH-REHM, J ; WEUSTER-BOTZ, D. *Vorrichtung zur Serienkultivierung von Mikroorganismen bzw. Zellen in begasten Flüssigkeitssäulen*. Deutsche Patentanmeldung DE 195 29 099. 1997
- [Anderlei und Büchs 2001] ANDERLEI, T ; BÜCHS, J: Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. In: *Biochemical Engineering Journal* 7 (2001)
- [Arnold 2000] ARNOLD, M: *Unveröffentlichte Arbeiten*. 2000. – DASGIP mbH, Rudolf-Schulten-Str. 5, Jülich
- [Bachmann 1996] BACHMANN, BJ: Derivations and Genotypes of Some Mutant Derivatives of *Escherichia coli* K-12. In: NEIDHARDT, FC (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* Bd. Band 1. 2. Auflage. Washington : ASM Press, 1996, S. 2460
- [Backofen u. a. 1998] BACKOFEN, U ; HOFFMANN, W ; MATYSIK, F-M: Capillary Barch Injection Analysis: a novel approach for analyzing nanoliter samples. In: *Analytica Chimica Acta* 362 (1998), S. 213–220
- [Bartels u. a. 1960] BARTELS, J (Hrsg.) ; BRUGGENCATE, PT (Hrsg.) ; HAUSEN, H (Hrsg.) ; HELLWEGE, KH (Hrsg.) ; SCHÄFER, KL (Hrsg.) ; SCHMIDT, E (Hrsg.): *Landolt-Börnstein - Zahlenwert und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik*. Bd. II. Band. 2. Berlin : Springer Verlag, 1960
- [Büchs 2001] BÜCHS, J: Introduction to advantages and problems of shaken cultures. In: *Biochemical Engineering Journal* 7 (2001), S. 91–98
- [Büchs u. a. 2000a] BÜCHS, J ; MAIER ; MILBRADT, C ; ZOELS, B: Power Consumption in Shaking Flasks on Rotary Shaking Machines: II. Nondimensional Description of Specitic Power Consumption and Flow Regimes in Unbaffled Flasks at Elevated liquid Viscosity. In: *Biotechnology and Bioengineering* 68 (2000), S. 594–601

- [Büchs u. a. 2000b] BÜCHS, J ; MAIER, U ; MILBRADT, C ; ZOELS, B: Power Consumption in Shaking Flasks on Rotary Shaking Machines: I. Power Consumption Measurement in Unbaffled Flasks at Low Liquid Viscosity. In: *Biotechnology and Bioengineering* 68 (2000), S. 589–593
- [Bergter 1983] BERGTER, F: *Wachstum von Mikroorganismen*. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach (Florida). Basel, 1983
- [Beuse 1999] BEUSE. *Vortrag am Forschungszentrum Jülich*. TRACE Biotech AG, Braunschweig. 1999
- [Bilitewski u. a. 1993] BILITEWSKI, U ; DREWES, J ; NEERMANN, J ; SCHRADER, J ; R, R S. ; SCHMID, RD ; BRADLEY, J: Comparison of different biosensor systems suitable for bioprocess monitoring. In: *Journal of Bacteriology* 31 (1993), S. 257–266
- [Bilitewski u. a. 1995] BILITEWSKI, U ; ROHM, I ; KÜNNECKE, W: On-line Überwachung von Bioprozessen mit Fließinjektionsanalyse. In: *Bioscope* (1995), Nr. 5, S. 31–34
- [Bittner u. a. 1998] BITTNER, C ; WEHNERT, G ; SCHEPER, T: In situ microscopy for on-line determination of biomass. In: *Biotechnology and Bioengineering* 60 (1998), Nr. 1, S. 24–35
- [Blaß 1989] BLASS, E (Hrsg.): *Entwicklung verfahrenstechnischer Prozesse: Methode - Zielsuche - Lösungssuche - Lösungsauswahl*. Frankfurt a. M., Aarau : Otto Salle Verlag und Sauerländer AG, 1989
- [Bradley u. a. 1991] BRADLEY, J ; STÖCKLEIN, W ; SCHMID, RD: Biochemistry based analysis system for bioprocess monitoring and control. In: *Process Control and quality* 1 (1991), S. 157–183
- [Bronstein und Semendjajew 1991] BRONSTEIN, I ; SEMENDJAJEW, KA: *Taschenbuch der Mathematik*. 25. Auflage. Teubner Verlag, Stuttgart, 1991
- [Brooks u. a. 1987] BROOKS, SL ; ASHBY, RE ; TURNER, APF: Development of an Online-Sensor for Fermentation Monitoring. In: *Biosensors* 3 (1987), S. 45–56
- [Chmiel 1991] CHMIEL, H (Hrsg.): *Bioprozeßtechnik: Einführung in die Bioverfahrenstechnik*. Stuttgart, New York : G. Fischer Verlag, 1991
- [Christensen u. a. 1996] CHRISTENSEN, LH ; MARCHER, J ; SCHULZE, U ; CARLSEN, M ; MIN, RW ; NIELSEN, J ; VILLADSEN, J: Semi-on-line Analysis for Fast Precise Monitoring of Bioreaction Processes. In: *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996), S. 237–247
- [Chung und Chang 1990] CHUNG, BH ; CHANG, HN: Hollow Fiber Bioreactors with Internal Aeration Circuits. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 69 (1990), S. 175–177

- [Cleland und Enfors 1984] CLELAND, N ; ENFORS, S-O: Monitoring Glucose Consumption in an Escherichia Coli Cultivation with an Enzyme Electrode. In: *Analytica Chimica Acta* 163 (1984), S. 281–285
- [CSEM 1998] CSEM. *Informationsbroschüre*. Neuchâtel. 1998
- [Curvers u. a. 2000] CURVERS, S ; BRIXIUS, P ; KLAUSER, T ; THÖMMES, J ; WEUSTER-BOTZ, D ; TAKORS, R ; WANDREY, C: *Human chymotrypsinogen B production with Pichia pastoris by integrated development of fermentation and downstream processing. Part I: Fermentation*. 2000. – Zur Publikation eingereicht
- [Cussler 1997] CUSSLER, EL: *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. Camebridge : Camebridge University Press, 1997
- [Dahlgren u. a. 1993] DAHLGREN, ME ; POWELL, AL ; GREASHAM, RL ; GEORGE, HA: Development of Scale-Down Techniques for Investigation of Recombinant Escherichia coli Fermentations: Acid Metabolites in Shake Flasks and Stirred Bioreactors. In: *Biotechnological Processes* 9 (1993), S. 580–586
- [DASGIPmbH] DASGIPMBH. *Produktinformation fedbatch-pro*. Rudolf-Schulten-Str. 5, Jülich
- [Dilsen 2000] DILSEN, S: Reaktionstechnische Untersuchungen zur extrazellulären Produktion humaner Calcitonin-Precursor mit *Staphylococcus carnosus* / Forschungszentrum Jülich GmbH. Jülich, 2000 (JÜL-3765). – Berichte des Forschungszentrum Jülich: Dissertation RWTH Aachen. Dissertation, RWTH Aachen
- [Ding u. a. 1993] DING, T ; BILITEWSKI, U ; SCHMID, RD ; KORZ, DJ ; SANDERS, EA: Control of microbial activity by flow injection analysis during high cell density cultivation of Escherichia coli. In: *Journal of Biotechnology* 27 (1993), S. 143–157
- [Eggins 1996] EGGINS, BR: *An introduction to biosensors*. John Wiley & Sons Ltd. und BG Teubner Verlag, 1996
- [Ferrari u. a. 1965] FERRARI, A ; GERKE, JR ; WATSON, RW ; UMBREIT, WW: Application of automated analysis to the study of bacterial growth: Part I - the instrumental system. In: *Ann. N.Y. Acad. Science* 130 (1965), S. 704–721
- [Flemming u. a. 1997] FLEMMING, H-C ; SCHAULE, G ; GRIEBE, T ; SCHMITT, J ; TAMACHKIAROWA, A: Biofouling - the Achilles heel of membrane processes. In: *Desalination* 113 (1997), S. 215–225
- [Föllinger 1994] FÖLLINGER, O: *Regelungstechnik - Einführung in die Methoden und ihre Anwendung*. 8.überarbeitete Auflage. Heidelberg : Hüthig, 1994
- [Franz 1999] FRANZ, A: *Reaktionstechnische Untersuchungen zur Online-Substratmessung in kleinen Parallelreaktoren*, RWTH-Aachen, Diplomarbeit, 1999
- [Freytag u. a. 1992] FREYTAG, M ; HARTMANN, K ; HOTOP, R ; NICKLAUS, E ; NOERPEL, W ; POLKE, M: Die Leittechnische Anlage und ihre Elemente. In: POLKE (Hrsg.): *Prozeßleittechnik*. München, Wien : Oldenbourg, 1992, S. 213–293

- [Fuhr 1996] FUHR, G: Biotechnologie und Halbleiterstrukturierung. In: *Spektrum der Wissenschaft* Dossier Mikrosystemtechnik (1996), S. 58–65
- [Gardiner und Briggs 1974] GARDINER, W ; BRIGGS, K: *Sampling Device*. U.S. Patent 3830106. 8 1974. – Glaxo Laboratories Ltd.
- [Gerhartz 2000] GERHARTZ, T. *Mündliche Mitteilung*. Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich GmbH. April 2000
- [Gerigk 2000] GERIGK, M. *Mündliche Mitteilung*. Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH. 2000
- [Gründig 2000] GRÜNDIG, B. *Mündliche Mitteilungen*. Senslab GmbH, Leipzig. 1998 und 2000
- [Guarna u. a. 1997] GUARNA, MM ; LESNICKI, GJ ; TAM, BM ; ROBINSON, J ; RADZIMINSKI, CZ ; HASENWINKLE, D ; BORASTON, A ; JERVIS, E ; MACGILLIVRAY, RTA ; TURNER, RFB ; KILBURN, DG: On-Line Monitoring and Control of Methanol Concentration in Shake-Flask Cultures of *Pichia pastoris*. In: *Biotechnology and Bioengineering* 56 (1997), Nr. 3, S. 279–286
- [Guthke u. a. 1998] GUTHKE, R ; SCHMIDT-HECK, W ; PFAFF, M: Knowledge acquisition and knowledge based control in bioprocess engineering. In: *Journal of Biotechnology* 65 (1998), S. 37–46
- [Haberland 2000] HABERLAND, J. *Mündliche Mitteilung*. Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH. 2000
- [Henzler und Schedel 1991] HENZLER, H-J ; SCHEDEL, M: Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. In: *Bioprocess Engineering* 7 (1991), S. 123–131
- [Henzler und Schäfer] HENZLER, HJ ; SCHÄFER, EE: Viskose und elastische Eigenschaften von Fermentations-Lösungen. In: *Chemie-Ingenieur-Technik* 59, Nr. 12, S. 940–944
- [Hilmer und Scheper 1995] HILMER, J-M ; SCHEPER, T: On-line Probenahmesysteme für die Bioprozeßanalytik. In: *Bioscope* (1995), Nr. 5, S. 24–27
- [Hilton 1999] HILTON, DH: Small-Scale Liquid Fermentations. In: DEMAINE, AL (Hrsg.) ; DAVIES, JE (Hrsg.): *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2. Auflage. Washington : ASM Press, 1999, S. 49–60
- [Hummel 1990] HUMMEL, W: Reduction of acetophenone to R(+)-phenylethanol by a new alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 34 (1990), S. 15–19
- [Hybbert 1993] HYBBERT, DB: Genetic algorithms in chemistry. In: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 19 (1993), S. 277–293
- [ICB 1998] ICB, Institut für Chemo- und Biosensorik. *Jahresbericht 1998*. Münster. 1998

- [Institut für Biotechnologie 1 und 2 und Rhein Biotech GmbH 1999] INSTITUT FÜR BIOTECHNOLOGIE 1 UND 2 ; RHEIN BIOTECH GMBH. *Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Produktion von Brenztraubensäure*. Projektantrag an die Bundesstiftung Umwelt. 1999
- [Kabsch-Korbutowicz 1992] KABSCH-KORBUTOWICZ, M: Membrane Biofouling. In: *Environment Protection Engineering* 18 (1992), Nr. 1-2, S. 125–144
- [Kaiser und Gottschalk 1976] KAISER, R ; GOTTSCHALK, G: *Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten*. Mannheim : BI Wissenschaftsverlag, 1976
- [Kandler und Kunath 1983] KANDLER, O ; KUNATH, P: *Lactobacillus kefir* sp.nov., a Component of the Microflora of Kefir. In: *System. Appl. Microbiol.* 4 (1983), S. 286–294
- [Karlberg und Pacey 1989] KARLBERG, B ; PACEY, GE: *Flow-Injection Analysis - A Practical Guide*,. Amsterdam : Elsevier, 1989
- [Keay u. a. 1992] KEAY, PJ ; WANG, Y ; SEDDON, C ; SEDDON, T: Development of a robust on-line Monitoring and Control System for Nutrients and Metabolites in Fermentations. Part II-System Calibration. In: *The Genetic Engineer and Biotechnologist* 15 (1992), Nr. 4, S. 225–233
- [Kleman und Chalmers 1991] KLEMAN, GL ; CHALMERS, JJ: A Predictive and Feedback Control Algorithm Maintains a Constant Glucose Concentration in Fed-Batch Fermentations. In: *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991), Nr. 4, S. 910–917
- [Knazek 1972] KNAZEK, RA: Cell culture on artificial capillaries. In: *Science* 178 (1972), S. 65–67
- [Künnecke und Bilitewski 1995] KÜNNECKE, W ; BILITEWSKI, U: A Novel Sampling Technique for Total Analysis Systems. (1995), S. 223–226
- [Kovárová-Kovar u. a. 2000] KOVÁROVÁ-KOVAR, K ; GEHLEN, S ; KUNZE, A ; KELLER, T ; DÄNIKEN, R von ; KOLB, M ; LOON, APGM van: Application of model-predictive control based on artificial neural networks to optimize the fed-batch process for riboflavin production. In: *Journal of Biotechnology* 79 (2000), S. 39–52
- [Kreutzer 2000] KREUTZER, A. *Mündliche Mitteilung*. Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH. Januar 2000
- [Kriegesmann 1999] KRIEGESMANN, A: *Ganzzellbiotransformation mit Saccharomyces cerevisiae und Lactobacillus kefir zur Darstellung enantiomerenreiner 2,5-Hexandiole*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Willhelms-Universität Bonn, Diplomarbeit, 1999
- [Kromidas 1999] KROMIDAS, S: *Validierung in der Analytik*. Weinheim : Wiley-VCH, 1999
- [Liese u. a. 2000] LIESE, A ; SEELBACH, K ; WANDREY, C: *Industrial Biotransformations*. Weinheim : WILEY-VCH, 2000

- [Lindl und Bauer 1994] LINDL, T ; BAUER, J: *Zell- und Gewebekultur*. 3. überarbeitete Auflage. Stuttgart : Gustav Fischer, 1994
- [Locher u. a. 1992] LOCHER, G ; SONNLEITNER, B ; FIECHTER, A: On-line measurement in biotechnology: Techniques. In: *Journal of Biotechnology* 25 (1992), S. 25–53
- [Lutz und Wendt 1998] LUTZ, H ; WENDT, W: *Taschenbuch der Regelungstechnik*. 2. überarbeitete Auflage. Verlag Harri Deutsch, 1998
- [Maaß 2001] MAASS, D: Prozeßentwicklung zur simultanen Produktabtrennung von L-Phenylalanin / Forschungszentrum Jülich GmbH. Jülich, 2001. – Berichte des Forschungszentrum Jülich: Dissertation Technische Universität Berlin(TU)
- [Mandenius u. a. 1984] MANDENIUS, CF ; DANIELSSON, B ; MATTIASSON, B: Evaluation of a Dialysis Probe for Continuous Sampling in Fermentors and in Complex Media. In: *Analytica Chimica Acta* 163 (1984), S. 135–141
- [Manz u. a. 1995] MANZ, A ; VERPOORTE, E ; RAYMOND, DE ; EFFENHAUSER, CS ; BURGGRAF, N ; WIDMER, HM: u-TAS: Miniaturized Total Chemical Analysis Systems. In: *Micro Total Analysis Systems - van den Berg (eds.)* (1995), S. 5–27
- [Marko-Varga u. a. 1993] MARKO-VARGA, G ; BUTTLER, T ; GORTON, L ; GRÖNSTERWALL, C: A Study of the Use of Microdialysis Probes as a Sampling Unit in On-Line Bioprocess Monitoring in Conjunction with Column Liquid Chromatography. In: *Chromatographia* 35 (1993), Nr. 5/6, S. 285–289
- [Marose u. a. 1998] MAROSE, S ; LINDEMANN, C ; SCHEPER, T: Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring. In: *Biotechnol. Prog.* 14 (1998), Nr. 1, S. 63–74
- [van de Merbel u. a. 1994] MERBEL, NC van d. ; LAGERWERF, FM ; LINGEMAN, H ; BRINKMAN, UAT: On-Line dialysis-column liquid chromatography for the determination of polar pesticides in water samples containing humic substances. In: *International Journal Environ. Anal. Chem.* 54 (1994), S. 105–118
- [van de Merbel u. a. 1996] MERBEL, NC van d. ; LINGEMAN, H ; BRINKMAN, UAT: Sampling an analytical strategies in on-line bioprocess monitoring and control. In: *Journal of Chromatography A* 725 (1996), S. 13–27
- [van de Merbel u. a. 1992] MERBEL, NC van d. ; TEULE, JM ; LINGEMANN, H ; BRINKMAN, UAT: Dialysis as an on-line sample pretreatment technique for column liquid chromatography: influence of experimental variables upon the determination of benzodiazepines in human plasma. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 10 (1992), Nr. 2/3, S. 225–233
- [Mohns und Künnecke 1995a] MOHNS, J ; KÜNNECKE, W: Flow analysis with membrane separation and time based sampling for ethanol determination in beer and wine. In: *Analytica Chimica Acta* 305 (1995), S. 241–247

- [Mohns und Künnecke 1995b] MOHNS, J ; KÜNNECKE, W: Flow analysis with membrane separation and time based sampling for ethanol determination in beer and wine. In: *Analytica Chimica Acta* 305 (1995), S. 241–247
- [Monod 1949] MONOD, J: The growth of bacterial cultures. In: *Annual Reviews of Microbiology* 3 (1949), S. 371–378
- [Muscat u. a. 1995] MUSCAT, A ; BEYERSDORF, J ; VORLOP, KD: Poly(carbamoylsulphonate)hydrogel, a new polymer material for cell entrapment. In: *Biosensors & Bioelectronics* 10 (1995), S. xi–xiv
- [Mutzall 1993] MUTZALL, K (Hrsg.): *Einführung in die Fermentationstechnik*. Hamburg : Behr's Verlag, 1993
- [Neveling u. a. 1997] NEVELING, U ; BRINGER-MEYER, S ; SAHM, H: Gene and subunit organization of bacterial pyruvate dehydrogenase complexes. In: *Biochimica Biophysica Acta* 1385 (1997), S. 367–372
- [Neveling u. a. 1998] NEVELING, U ; KLASSEN, R ; BRINGER-MEYER, S ; SAHM, H: Purification of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Zymomonas mobilis* and identification and sequence analysis of the corresponding genes. In: *Journal of Bacteriology* 180 (1998), S. 1540–1548
- [Olsson u. a. 1998] OLSSON, L ; SCHULZE, U ; NIELSEN, J: On-line bioprocess monitoring - an academic discipline or an industrial tool? In: *trends in analytic chemistry* 17 (1998), S. 88–95
- [Pahl und Flemming 1997] PAHL, G ; FLEMMING, M: Grundlagen der Konstruktionstechnik. In: GROTE KH, Beitz W. (Hrsg.): *Taschenbuch für den Maschinenbau/Dubbel*. 19. Auflage. Berlin : Springer, 1997, Kapitel F
- [Painton und Mottola 1983] PAINTON, CC ; MOTTOLA, A: Dispersion in continuous-Flow Processing. In: *Analytica Chimica Acta* 154 (1983), S. 1–16
- [Phelps u. a. 1995] PHELPS, MR ; HOBBS, JB ; KILBURN, DG ; TURNER, RFB: An Autoclavable Glucose Biosensor for Microbial Fermentation Monitoring and Control. In: *Biotechnology and Bioengineering* 46 (1995), S. 514–524
- [Ruzicka und Hansen 1975] RUZICKA, J ; HANSEN, EN: A new concept of fast continuous flow analysis. In: *Analytica Chimica Acta* 78 (1975), S. 145
- [Scheller 1992] SCHELLER, F: *Biosensoren*. Stuttgart, New York, 1992
- [Scheper 1991] SCHEPER, T: *Bioanalytik*. Braunschweig : Vieweg Verlag, 1991
- [Scheper u. a. 1996] SCHEPER, TH ; HILMER, F ; LAMMERS, C ; MÜLLER, M ; REINECKE, M: Biosensors in bioprocess monitoring. In: *Journal of Chromatography A* 725 (1996), S. 3–12
- [Schäfer u. a. 1999] SCHÄFER, U ; BOOS, W ; TAKORS, R ; WEUSTER-BOTZ, D: Automated Sampling Device for monitoring of intracellular metabolite dynamics. In: *Analytical Biochemistry* 270 (1999), S. 88–96

- [Schügerl u. a. 1987] SCHÜGERL, K ; LÜBBERT, A ; SCHEPER, T: Online-Prozeßanalyse in Bioreaktoren. In: *Chemie Ingenieur Technik* 59 (1987), Nr. 9, S. 701–714
- [Schlegel 1992] SCHLEGEL, HG: *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage. Stuttgart, New York : Thieme Verlag, 1992
- [Schlegel 1999] SCHLEGEL, HG: *Geschichte der Mikrobiologie*. Halle (Saale) : Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, 1999
- [Schuhmann u. a. 1995] SCHUHMAN, W ; WOHLSCHLÄGER, H ; HUBER, J ; SCHMIDT, H-L ; STADLER, H: Development of an extremely flexible automatic analyzer with integrated biosensors for on-line control of fermentation processes. In: *Analytica Chimica Acta* 315 (1995), S. 113–122
- [Schulmeister und Scheller 1985] SCHULMEISTER, T ; SCHELLER, F: Mathematical Treatment of Concentration Profiles and Anodic Current of Amperometric Enzyme Electrodes. In: *Analytica Chimica Acta* 170 (1985), S. 279–285
- [Schultz und Gerhardt 1969] SCHULTZ, JS ; GERHARDT, P: Dialysis culture of micro-organisms: design, theory, results. In: *Bacteriol. Rev.* 33 (1969), S. 1–47
- [Schulze 1994] SCHULZE, et al.: In: *Cytotechnology* 15 (1994), 259– S
- [Siro 1982] SIRO, et al.: In: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15 (1982), 258–264 S
- [Skeggs 1957] SKEGGS, LT: Automatic Method for Colorimetric Analysis. In: *Am.J.Clin.Path.* 28 (1957), S. 311–322
- [Skoog und Leary 1992] SKOOG, DA ; LEARY, JJ: *Principles of Instrumental Analysis*. 4. Auflage. Fort Worth : Saunders College Publishing, 1992
- [Sonnleitner 1999] SONNLEITNER, B: Instrumentation of Small-Scale Bioreactors. In: DEMAIN, AL (Hrsg.) ; JE, Davies (Hrsg.) ; et al. (Hrsg.): *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2. Auflage. Washington : ASM Press, 1999, S. 221–235
- [van Staden 1995] STADEN, JF van: Membrane Separation in flow injection systems - Part 1. Dialysis. In: *Analytical Chemistry* 352 (1995), S. 271–302
- [Staude 1992] STAUDE, E: *Membranen und Membranprozesse*. Weinheim : Wiley-VCH, 1992
- [Sternad 1991] Kap. 7. Bioreaktoren In: STERNAD, W: In: *[Chmiel 1991]*. 1991
- [Striegel 1993] STRIEGEL, B: *Entwurf und Implementierung von Regelungskonzepten für biotechnische Prozesse*, RWTH Aachen, Diss., 1993
- [Štulík und Pacáková 1987] ŠTULÍK, K ; PACÁKOVÁ, V: *Electroanalytical Measurements in Flowing Liquids*. Ellis Horwood Ltd., 1987

- [Tothill u. a. 1997] TOTHILL, IE ; NEWMAN, JD ; WHITE, SF ; TURNER, APF: Monitoring of the glucose concentration during microbial fermentation using a novel mass-producible biosensor suitable for on-line use. In: *Enzyme and Microbial Technology* 20 (1997), S. 590–596
- [Tran-Minh 1996] TRAN-MINH, C: Biosensors in Flow-injection Systems for Biomedical Analysis, Process and Environmental Monitoring. In: *Journal of Molecular Recognition* 9 (1996), S. 658–663
- [UHU GmbH 1995a] UHU GMBH. *Datenblatt zum Kleber „UHU plus endfest 300“*. 1995a
- [UHU GmbH 1995b] UHU GMBH. *Datenblatt zum Kleber „UHU plus sofortfest“*. 1995b
- [Umoh u. a. 1996] UMOH, EF ; PUTTEN, AB v ; SCHÜGERL, K: Simultaneous On-line Monitoring of Glucose and Total Malto Sugar in Fermentation Processes Using FIA System. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 67 (1996), S. 267–280
- [Ungerstedt] UNGERSTEDT, U: Microdialysis - A New Bioanalytical Sampling Technique. In: *Current Separations*
- [Valentini und Razzano 1982] VALENTINI, L ; RAZZANO, G: The Real-Time Analysis of Broth Constituents in the Fermentation Processes: On/Off-Line Fulfilments. In: *Modelling and Control of Biotechnical Processes* (1982), S. 253–258
- [Valero u. a. 1990] VALERO, F ; LAFUENTE, J ; POCH, M ; SOLA, C ; ARAUJO, AN ; LIMA, JLFC: On-Line Fermentation Monitoring Using Flow Injection Analysis. In: *Biotechnology and Bioengineering* 36 (1990), S. 647–651
- [Vanderslice u. a. 1981] VANDERSLICE, JT ; STEWART, KK ; ROSENFELD, G ; HIGGS, DJ: Laminar Dispersion in Flow Injection Analysis. In: *Talanta* 28 (1981), S. 11–18
- [Vasic-Racki 2000] Kap. 2. History of Industrial Biotransformations - Dreams and Realities In: VASIC-RACKI, D: In: [Liese u. a. 2000]. 2000, S. 3–29
- [Verette u. a. 1995] VERETTE, E ; QIAN, F ; MANGANI, F: On-Line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. In: *Journal of Chromatography* 705 (1995), S. 195–203
- [Weber 1996] WEBER, H: *Rechnergestützte Messverfahren*. Würzburg : Vogel, 1996
- [Weuster-Botz] WEUSTER-BOTZ, D. *Mündliche Mitteilung*. Technische Universität München
- [Weuster-Botz 1999] WEUSTER-BOTZ, D: *Schriften des Forschungszentrums Jülich, Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences*. Bd. 2: *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung*. Jülich : Forschungszentrum Jülich GmbH, 1999

- [Weuster-Botz u. a. 2001] WEUSTER-BOTZ, D ; ALTENBACH-REHM, J ; ARNOLD, M: Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. In: *Biochemical Engineering Journal* 7 (2001), S. 163–170
- [Weuster-Botz u. a. 1994] WEUSTER-BOTZ, D ; PASCHOLD, H ; STRIEGEL, B ; GIEREN, H ; KULA, MR ; WANDREY, C: Continuous Computer Controlled Production of Formate Dehydrogenase (FDH) and Isolation on a Pilot Scale. In: *Chem. Eng. Technology* 17 (1994), S. 131–137
- [White u. a. 1996] WHITE, SF ; TOTHILL, IE ; NEWMAN, JD ; TURNER, APF: Development of a mass-producible glucose biosensor and flow-injection analysis system suitable for on-line monitoring during fermentations. In: *Analytica Chimica Acta* 321 (1996), S. 165–172
- [Winzeler 1990] WINZELER, HB: Membran-Filtration mit hoher Trennleistung und minimalem Energiebedarf. In: *Chimia* 44 (1990), S. 288–291
- [YOUNG 2000] YOUNG, LLP ERNST : Convergence: The Biotechnology Industrie Report / ERNST & YOUNG Inc. <http://www.ey.com>, 2000. – Score Retrieval File No. O000254
- [Zabriskie und Humphrey 1978] ZABRISKIE, DW ; HUMPHREY, AE: Continuous Dialysis for the On-Line Analysis of Diffusible Components in Fermentation Broth. In: *Biotechnology and Bioengineering* 20 (1978), S. 1295–1301

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-3982
Mai 2002
ISSN 0944-2952