

Automatisierte Probennahme- und Verarbeitungstechniken für metabolische Stoffwechseluntersuchungen von Mikroorganismen

Vom Promotionsausschuss der
Technischen Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von
Enrico Hans

aus
Rochlitz / Sa.

2022

Prüfungsausschuss:

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. An-Ping Zeng
 2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. Stefan Heinrich
- Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Hoc Khiem Trieu

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2021

DOI: <https://doi.org/10.15480/882.4274>
Handle: <http://hdl.handle.net/11420/12181>
Orchid: <https://orcid.org/0000-0002-6791-0717>

Creative Commons Lizenz:

Diese Arbeit steht unter der Creative-Commons-Lizenz Namensnennung 4.0 (CC BY 4.0). Das bedeutet, dass sie vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden darf, auch kommerziell, sofern dabei stets der Urheber, die Quelle des Textes und o.g. Lizenz genannt werden. Die genaue Formulierung der Lizenz kann unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.de> aufgerufen werden.

1 Abstrakt

Intrazelluläre Metaboliten im Stoffwechsel von Mikroorganismen zu bestimmen, ist nach wie vor wichtig, um Stoffwechselfvorgänge quantitativ besser beschreiben zu können. Nachdem im Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik der TUHH die Möglichkeit einer automatisierten Schnellfiltration geschaffen wurde, welche innerhalb von 6 Sekunden eine verlustfreie Probenahme inklusive Quenchen der Zellen ermöglicht, kann diese Technik für weitere Untersuchungen im Bereich der Stoffwechseluntersuchungen genutzt werden. Aus der Tatsache heraus, dass die meisten Stoffwechseluntersuchungen hinsichtlich intrazellulärer Metaboliten für *Corynebacterium glutamicum* Stämme nur mit Biomassekonzentrationen ≤ 10 g/L durchgeführt wurden, sollte und konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Untersuchungen bis Konzentrationen von 30 g/L möglich sind. Dabei wurde die bestehende Filtrationsroutine einer modifizierten Variante gegenüber gestellt, um Einflüsse aufgrund hoher Schaumaufkommen und steigender Biomassekonzentrationen im Rahmen der Kultivierungen zu charakterisieren, offen zu legen und zu quantifizieren. Die dabei entwickelte Modifikation weist den Weg zu einer zeitlich weiter verringerbaren automatisierten Schnellfiltration auf. Außerdem konnte mithilfe der Filtration der Einfluss einer genetischen Modifikation der Aspartokinase zur Unterdrückung der Feedback-Inhibierung im Aspartatstoffwechsel durch die Aminosäure Lysin quantifiziert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich im Verlauf einer Fermentation die Umgebung der Organismen hinsichtlich der Ionenstärke derart verändert, dass sich Veränderungen bezüglich intrazellulärer Synthesevorgänge beobachten lassen.

Neben der Optimierung der genannten diskontinuierlichen Probenahme aus einem Bioreaktor wurden die Möglichkeiten einer kontinuierlichen Probenentnahme untersucht. Die Mikrosystemtechnik eröffnet hierbei mit sogenannten Lab - on - Chip Systemen für die Biosystemtechnologie eine vielversprechende Anwendungsmöglichkeit im Hinblick auf Prozessoptimierungen und systematische Analysen von mikrobiellen Fermentationen. Bei der kontinuierlichen Probenahme ist es genau wie bei der diskontinuierlichen Probenahme essentiell, dass vor dem Quenchen des Metabolismus eine Trennung von Kultivierungsmedium und Organismen stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe eines spiralförmigen Separators eine Möglichkeit besteht, die Trennung kontinuierlich zu realisieren. Neben einer beispielhaften Fokussierung von Partikeln im Größenbereich von *C. glutamicum* konnte eine prädiktive Formel entwickelt werden, welche die Separierung von Medium und Partikeln in Korrelation zu entsprechenden Probenvolumenströmen ermöglicht.

2 Abstract

Determining intracellular metabolites in the metabolism of microorganisms is still important in order to be able to quantitatively describe metabolic processes better. After the possibility of automated rapid filtration was created in the Institute for Bioprocess and Biosystems Technology of the TUHH, which enables loss-free sampling including quenching of the cells within 6 seconds, this technology can be used for further investigations in the field of metabolic investigations. Based on the fact that most metabolic investigations regarding intracellular metabolites for *Corynebacterium glutamicum* strains were only carried out with biomass concentrations ≤ 10 g/L, it should and could be shown within the present work that investigations up to concentrations of 30 g/L are possible. The existing filtration routine was compared to a modified variant in order to characterize, disclose and quantify influences due to high levels of foam and increasing biomass concentrations during cultivation. The modification developed in the process points the way to automated rapid filtration that can be further reduced in time. In addition, the influence of a genetic modification of aspartokinase to suppress feedback inhibition in aspartate metabolism by the amino acid lysine could be quantified by means of filtration. Furthermore, it could be shown that in the course of fermentation the environment of the organisms changes in terms of ionic strength in such a way that changes in intracellular synthesis processes can be observed.

In addition to optimizing the mentioned discontinuous sampling from a bioreactor, the possibilities of continuous sampling were examined. With so-called lab-on-chip systems for biosystems technology, microsystems technology opens up a promising application with regard to process optimization and systematic analysis of microbial fermentations. With continuous sampling, just as with discontinuous sampling, it is essential that the cultivation medium and organisms are separated before the metabolism is quenched. It could be shown that with the help of a spiral separator there is a possibility to realize the separation continuously. In addition to an exemplary focusing of particles in the size range of *C. glutamicum*, a predictive formula was developed that enables the separation of medium and particles in correlation to the corresponding sample volume flows.

Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt	I
2	Abstract	II
3	Einleitung	1
4	Zielsetzung	3
5	Theoretische Grundlagen	4
5.1	Diskontinuierliche Probennahme bei höheren Zelldichten	4
5.1.1	Automatisierte Schnellfiltration	4
5.1.2	Filtration mikrobieller Suspensionen	5
5.1.3	Schaumbildung in Fermentationsprozessen	10
5.2	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	11
5.2.1	Lysinsynthese in <i>C. glutamicum</i>	12
5.2.2	Modifikation des Stoffwechselweges zur Lysinsynthese	14
5.3	Kontinuierliche Probennahme mit Hilfe der Mikrosystemtechnik	16
5.3.1	Warum Mikrosysteme?	16
5.3.2	Stand der Technik	16
5.3.3	Mikrofluidik in Spiralstrukturen	18
5.3.4	Partikelfokussierung in einer Spiralstruktur	21
5.3.5	Ausgangsdilemma	24
6	Material und Methoden	25
6.1	Chemikalien	25
6.2	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 und LC 298	25
6.3	Kultivierung	25
6.3.1	Medium	25
6.3.2	Bioreaktor	25
6.3.3	Fed - Batch Kultivierung	26
6.4	Schnellfiltration	27
6.5	Metabolitenextraktion	28
6.6	Analytik	28
6.6.1	Biomassekonzentration	28
6.6.2	Bestimmung des Zellvolumens	29
6.6.3	Bestimmung von Alkoholen, organischen Säuren, Zuckern und Glycerin mittels HPLC	29

6.6.4	Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC	30
6.6.5	Bestimmung von Glycerin mittels HPIC	30
6.6.6	Simulation des Gasverhalten im Entnahmesystem	32
6.7	Herstellung des Spiralseparators	33
6.7.1	Design	33
6.7.2	Photolithografische Masken und Mikrosystemfertigung	33
6.7.3	Anschluss des Spiralseparators	34
6.8	Charakterisierung der Strömungs- und Partikelbewegung	35
6.8.1	Fluorophor und Mikropartikel	35
6.8.2	Mikroskop	36
6.8.3	Bildauswertung	36
6.8.4	Simulation des Fluidverhalten im Spiralsystem	36
7	Ergebnisse und Auswertung	37
7.1	Schnellfiltration bei höheren Zelldichten	37
7.1.1	Charakteristika der automatisierten Schnellfiltration / Einflussfaktoren bei höheren Biomassekonzentrationen	37
7.1.2	Ansatz zur Quantifizierung der Einflussfaktoren	45
7.1.3	Modifikation des bestehenden set - up zur Schnellfiltration	49
7.1.4	Vergleich von Modifikation und bestehendem set - up	50
7.2	Vergleich der <i>C. glutamicum</i> Stämme ATCC 13032 und LC 298 bei Zelldichten größer 10 g/L hinsichtlich der Aminosäureproduktion	71
7.2.1	Fed-Batch Fermentationen	71
7.2.2	Vergleich intra-und extrazellulärer Aminosäuren	73
7.2.3	Allosterische Regulierung der Aspartokinase in <i>C. glutamicum</i> LC 298	80
7.3	Entwurf des Spiralseparators	83
7.3.1	Partikeldurchmesser zu hydraulischem Radius (a/D_h)	83
7.3.2	Kanalhöhe zu Kanalbreite (H/W)	83
7.3.3	Krümmung	87
7.3.4	Fazit	87
7.4	Charakterisierung der Fluidbewegung	91
7.5	Partikelfokussierung	99
8	Zusammenfassung und Ausblick	108
8.1	Diskontinuierliche Probennahme	108
8.2	Kontinuierliche Probennahme	110
	Literaturverzeichnis	VI

Tabellenverzeichnis	XIX
Abbildungsverzeichnis	XX
Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	XXII
Prüfungsarbeiten	XXV

3 Einleitung

Die quantitative Analyse intra- und extrazellulärer Metaboliten stellt den aktuellen Zustand des mikrobiellen oder zellulären Stoffwechsels dar. Auf dieser Basis werden Aussagen über Stoffwechselforgänge der Organismen möglich. Zusammen mit den Erkenntnissen aus Genom-, Proteom-, Transkriptom- und Fluxomdaten bilden sie als Metabolomdaten das Grundgerüst der Systembiologie. Darin werden grundlegende Abläufe innerhalb oder auch zwischen Organismen untersucht, genauso wie der Einfluss genetischer Modifikationen im Rahmen von biotechnologischen Prozess- und Stammentwicklungen zur industriellen Produktion relevanter Metaboliten wie zum Beispiel Aminosäuren.

Die technische Realisierung der Probenentnahme steht vor der Herausforderung, den aktuellen Zustand des Stoffwechsels festzuhalten und eine möglichst verlustfreie Quantifizierung aller intrazellulären Metaboliten zu ermöglichen. Bis dato hat sich dies auf zwei diskontinuierliche Verfahren reduziert, wobei beide in ähnlicher Art und Weise von einer manuellen Handhabung hin zu einer automatisierten Applikation weiterentwickelt wurden. Das Quenchen, welches in dieser Arbeit nicht diskutiert wird, besitzt den Vorteil einer sehr kurzen Transferzeit der Probe aus dem Reaktor in die dazugehörige kalte organische Lösung, die Quenchinglösung. Der dabei entstehende Verlust intrazellulärer Stoffe wurde nachweislich mit Hilfe der Filtration verringert [11, 30] und die Prozesszeiten durch eine Automatisierung auf eine respektable Zeit von 5 Sekunden reduziert [28], bei einer maximalen Biomassekonzentration von 10 g/L , welche den Ausgangspunkt dieser Arbeit darstellt.

Trotz dieser durchweg positiven Entwicklung bleibt eine Problematik weiterhin bestehen: der Aufwand bei der Aufbereitung der entnommenen Proben. Ausgehend vom mit Organismen belegten Filter muss eine Extraktion der Metaboliten bei gleichzeitiger Lyse der Zellen im und auf dem Filter erfolgen, um in anschließenden Prozessschritten die verwendete Extraktionslösung wieder aus der Lösung zu entfernen, bevor die Proben für eine Analyse per Flüssigkeitschromatografie aufbereitet werden können. All diese Schritte sind zeit- und arbeitsintensiv und bergen ein Potenzial an Verlusten innerhalb der einzelnen Vorgänge. Aufgrund dieses Probenentnahmeverganges ergibt sich ein diskontinuierliches Bild, im Gegensatz zu den weiteren kontinuierlich bestimmten Prozessparametern wie der Sauerstoffsättigung oder des pH – Wertes.

Auf der Suche nach einer Möglichkeit für eine kontinuierliche Probenentnahme rückt die Mikrosystemtechnik in den Fokus. Unter dem Schlagwort der Lab – on Chip Technologie wird diese bereits für biotechnologische Anwendungen wie zum Beispiel der Aufkonzentrierung von Blutzellen zur Blutreinigung [104, 128] oder tierischer Zellen angewendet [56]. Dabei werden hydrodynamische Effekte, wie Sekundärströmungen, in laminaren Strömun-

gen genutzt, um Partikel unterschiedlicher Größe auf unterschiedlichen Strömungsbahnen anzuordnen und so zu separieren oder verschiedene Medien zu vermischen [70]. Zur Stoffwechseluntersuchung bisher nur in Kultivierungen tierischer Säugerzellen getestet [121], ist eine Erweiterung des Anwendungsspektrums auf mikrobiologische Fermentationen eine denkbare Ergänzung der automatisierten Schnellfiltration. Vor dem Hintergrund der sich stetig weiterentwickelnden optischen Analysetools [55, 91] stellt dies sogar einen möglichen Ersatz für die aufwendige Prozesskette der etablierten Analytik dar.

4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die automatisierte Schnellfiltrationsanlage (RSU) einer Verifizierung für Biomassekonzentration über 10 g/L zu unterziehen, um damit der Anlage selbst ein breiteres Anwendungsfeld zu eröffnen, dabei mögliche Einflüsse von variierenden Prozessbedingungen und Prozessverläufen zu minimieren und weiterhin eine verlustfreie und exakte Bestimmung intrazellulärer Metaboliten zu ermöglichen. Weiterführend soll untersucht werden, inwiefern eine kontinuierliche Separation von Fermentationsmedium und Organismen im einstelligen Mikrometerbereich mit Hilfe der Lab - on - Chip Technologie möglich ist, sodass der Aufwand für eine nachgehende Probenaufbereitung aus den Probenahmen der Schnellfiltration erheblich reduziert wird und die Lücken der Datenaufnahme einer diskontinuierlichen Probenentnahme geschlossen werden.

5 Theoretische Grundlagen

5.1 Diskontinuierliche Probennahme bei höheren Zelldichten

5.1.1 Automatisierte Schnellfiltration

Metabolische Stoffwechseluntersuchungen von mikrobiellen Kultivierungen, also die quantitative Bestimmung intrazellulärer Stoffwechselprodukte, benötigen eine schnelle und verlustfreie Probenentnahme aus der Fermentationsbrühe. Dabei haben sich zwei Verfahren etabliert, das sogenannte Quenchen und die Filtration. Beide wurden separat als Verfahren für die Probenentnahme methodisch behandelt, modifiziert, verbessert [11, 46, 119], automatisiert und gegenübergestellt [19, 77, 114, 115].

Beim Quenchen wird die Probe direkt aus dem Bioreaktor in eine definierte Lösung gegeben, welche durch ihre Eigenschaften (hier die Temperatur) unmittelbar alle Stoffwechselvorgänge des mikrobiellen Metabolismus stoppt. Allgemein hat sich hier eine Lösung aus Methanol – Wasser (60/40 *v/v*) bei einer Temperatur von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ als Standard etabliert. Die minimalen Umsatzzeiten der Pools intrazellulärer Metaboliten liegen im Bereich weniger Sekunden, vor allem für Stoffwechselzwischenprodukte des Zitronensäurezyklus [107]. Der Vorteil dieser Methode ist daher die minimale Verzögerung zwischen der Entnahme aus dem Fermenter und dem Stoppen aller Stoffwechselvorgänge, sodass der aktuelle Ist – Zustand der Kultur intrazellulär festgehalten werden kann. Nachteilig wirkt sich hierbei allerdings das Verlustverhalten (*cell leakage*) der Organismen aus, bei dem Stoffwechselprodukte in undefinierter Menge aus dem Zellinneren in die Umgebung abgegeben werden [46, 119]. Erklärungen hierfür finden sich wahrscheinlich in strukturellen Veränderungen innerhalb der Membran [77, 109, 113], überexprimierten Proteinen [20], in diffusiven Effekten [53] und auch im Wachstumsstadium der Zellen [20]. Eine ausführliche Behandlung der Hintergründe ist bei Schädel et al. [97] zu finden. Hauptursachen für das *cell leakage* sind thermischer und osmotischer Stress oder die Verwendung von organischen Lösungen [69], wobei sich die physikalisch – chemischen Eigenschaften der Phospholipide innerhalb der Zellmembran und somit deren Stabilität ändern. Dies kann wiederum zu einer Schädigung oder Zerstörung der Membran führen, was das Gleichgewicht von intra- und extrazellulären Ionen stört und zu unspezifischem Diffusionsverhalten führen kann [119].

Um zu verhindern, dass der festgestellte Verlust an Metaboliten einen Einfluss auf die Bestimmung der Stoffkonzentrationen hat, tritt die Filtration in den Fokus [35, 58, 119]. Dabei werden Biomasse und Medium getrennt, der Filter gespült, um das noch vorhandene Restmedium zu entfernen und der Stoffwechsel im Anschluss durch Quenchen gestoppt.

Um einen Verlust an intrazellulären Stoffen während des Waschvorganges zu unterbinden, wird die Waschlösung angepasst. Der ausschlaggebende Parameter ist hier die Ionenstärke (I) und beschreibt ausgehend vom Grundgerüst des osmotischen Druckes zusätzlich den Einfluss der Dissoziation auf die Eigenschaften der Lösung [11, 125]. Für das Stoppen des Stoffwechsels, also den Schritt des Quenchens, hat sich flüssiger Stickstoff als Mittel der Wahl etabliert.

Der beschriebene Verfahrensablauf zeigt auf, dass diese Methode limitiert ist, wenn es darum geht die Dauer des Ablaufes größtmöglichst zu minimieren. Bisherige manuelle Handhabungen bedeuten eine deutlich verlängerte Prozesszeit im Vergleich zur Methode des Quenchens [115]. Mit Hilfe einer Automatisierung ist es da Luz et al. [30] aber dennoch gelungen die minimale Prozesszeit auf 6 Sekunden zu reduzieren. Die darin entwickelte Anlage (RSU) dient der vorliegenden Arbeit als Ausgangspunkt. In Abbildung 1 ist das Schema der Anlage dargestellt. Das Prinzip basiert auf einer zeitgleichen Entnahme der Probe aus dem Reaktor und der Waschflüssigkeit aus dem zugehörigen Behältnis. Mittels einer integrierten automatisierten Ventilschaltung werden Probe und Waschlösung zeitlich leicht versetzt auf den Filter aufgebracht und bei einer Gesamtdauer von 5 Sekunden die Filtration und die anschließende Waschung durchgeführt. Im weiteren Verlauf wird das Magazin in der Anlage um eine Position bewegt und die verwendeten Ventile und das Schlauchsystem werden mit einer entsprechenden Waschlösung gespült. So wird verhindert, dass sich verbleibende Reste der Proben auf die folgende Filtration auswirken. Zeitgleich zu diesem Schritt erfolgt die manuelle Zugabe von flüssigem Stickstoff auf den Filter, sodass der mikrobielle Stoffwechsel gestoppt wird.

Für eine detailliertere Übersicht und Zusammenfassung verschiedener Quenchinglösungen, Extraktionsprotokollen und Filtrationstechniken und deren Entwicklung hin zu einer automatisierten Anwendung soll hier auf die Arbeiten von da Luz et al. [28, 30] verwiesen werden.

5.1.2 Filtration mikrobieller Suspensionen

Bei der Filtration von Mikroorganismen wird ein Größenausschluss im Bereich einer mittleren Porengrößenverteilung von $0,1 \mu\text{m}$ bis $10 \mu\text{m}$ [71] vorgenommen, definiert als Mikrofiltration. Bei der Mikrofiltration handelt es sich um ein druckgetriebenes Membranverfahren, bei dem aufgrund eines angelegten Über- oder Unterdruckes über der Membran ein transmembraner Fluss initiiert wird.

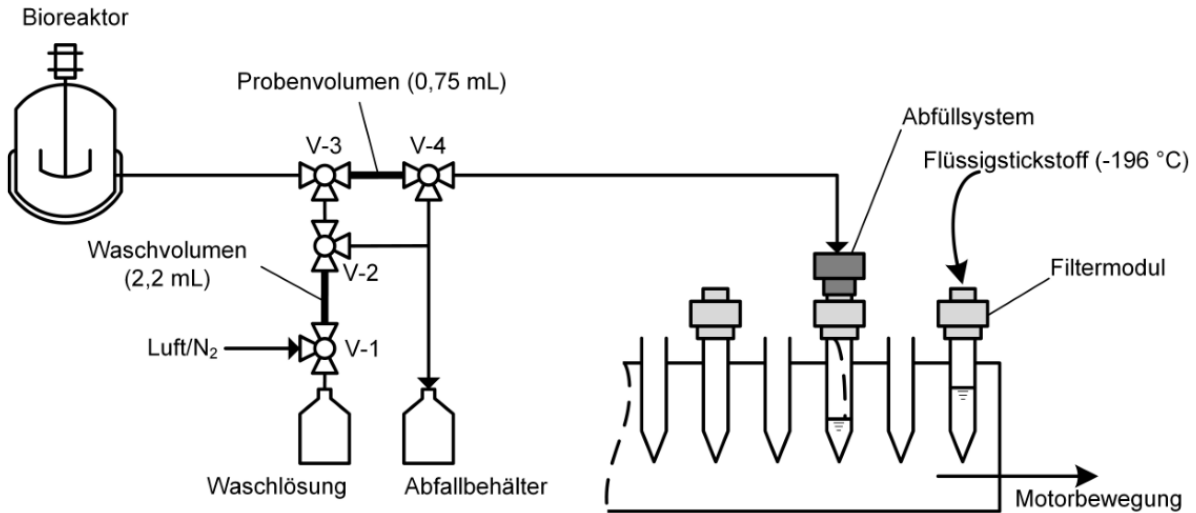


Abbildung 1: Schema der von da Luz et al. weiterentwickelten automatisierten Schnellfiltration mit einer Probennahmezeit von sechs Sekunden [28]

Bei der statischen Mikrofiltration (*dead - end* Mikrofiltration) erfolgt eine direkte Anströmung der Membran, wodurch die in der Suspension enthaltenen Partikel an der Trenngrenze des Filters zurückgehalten werden. Mit zeitlich fortschreitender Filtrationsdauer bildet sich aufgrund dessen an der Trenngrenze ein Filterkuchen. Dieser resultiert in einem höheren Filtrationswiderstand, sodass die transmembrane Strömung bei gleichbleibender Druckdifferenz abnimmt [40].

Eine Unterteilung der statischen Mikrofiltration kann in Oberflächen- und Tiefenfiltration erfolgen. Die Unterscheidung erfolgt anhand des Aufbaus, der Porenstruktur und der daraus resultierenden Trenngrenze und Filtrationskapazität. Bei der Oberflächenfiltration werden größtenteils Porenmembranen verwendet, deren relativ gut definierte Porenstruktur und enge Porengrößenverteilung eine vollständige Abtrennung von Partikeln oberhalb der mittleren Porengröße [66] und deren Ablagerung an der Oberfläche des Filters garantieren. Aufgrund des entstehenden Filterkuchens und des oben angesprochenen steigenden Widerstandes kommt es schlussendlich zu einem Erliegen des Flusses, sodass diese Form der Filtration nur bei Suspensionen mit geringeren Partikelbelastungen geeignet ist [71]. Synthetische Tiefenfilter bestehen aus mehreren Schichten übereinandergelegter Fasern, die in den meisten Fällen eine unstrukturiertere Form als Porenmembranen aufweisen und in Folge dessen eine größere Zufallsverteilung der Porengröße [66] besitzen. Der Rückhalt basiert auf Haftkräften zwischen den suspendierten Partikeln und der Oberfläche innerhalb der Filterstruktur, sodass eine Auftrennung der Partikel nach Größe erfolgt. Die Bildung eines Filterkuchens fällt im Vergleich zur Oberflächenfiltration geringer aus, was die notwendige Druckdifferenz für einen transmembranen Fluss über den Filter verringert

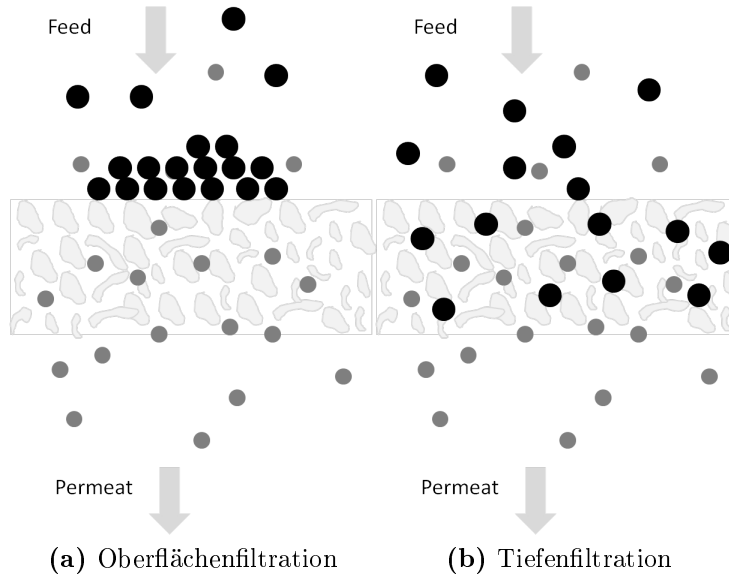


Abbildung 2: Oberflächen- und Tiefenfiltration im Vergleich

[96]. Neben dem geringeren Druck ist auch eine wesentlich höhere Beladung mit Partikeln möglich, was Tiefenfilter für eine Verwendung als Vorfilter prädestiniert [66]. Die Trenngrenze von Tiefenfiltern ist jedoch aufgrund der größeren Zufallsverteilung der Porengröße unschärfer, was sich nachteilig auf eine komplette Retention definierter Partikelgrößen auswirkt. Die Sättigung beschreibt den Zustand, bei dem jede weitere Beladung des Filters mit Partikeln zu einem Durchbruch der bereits zurückgehaltenen führt [71].

Den Ausgangspunkt für die mathematische Beschreibung des Filtrationsvorganges bildet das Gesetz von Hagen – Poiseuille für lange zylindrische gerade Kapillaren [118]. Hierbei wird der Volumenstrom des strömenden Fluides (\dot{V}) durch das Verhältnis von Druckdifferenz (Δp) und Radius der Kapillare (r) zur Länge der Kapillare (l) und den Eigenschaften des Fluides in Form der dynamischen Viskosität (η) beschrieben, siehe Gleichung 1.

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{r^4 \cdot \pi \cdot \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot l} \quad (1)$$

Das darauf aufsetzende Gesetz von Darcy für die Durchströmung von Haufwerken berücksichtigt den Filtrationswiderstand über die Fläche (A), hier in Form des Filterkuchenwiderstandes (α) und der Dicke der Schüttung (s) und ist das allgemein benutzte Modell bei der Betrachtung von mikrobiellen Filtrationen [40, 118], siehe Gleichung 2.

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p \cdot A}{\eta \cdot \alpha \cdot s} \quad (2)$$

In den erweiterten Modifikationen dieser Gleichung wird zudem der Membranwiderstand

(R_m) als minimierende Größe mit einbezogen. Die Dicke der Schüttung (s) wird durch die Masse des nassen Filterkuchens pro Einheit Filtrationsfläche (m) ersetzt und bei Kenntnis der Porosität des Filterkuchens die Kozeny – Konstante (K) mit eingebracht [86].

$$J = \frac{\dot{V}}{A} = \frac{\Delta p}{\eta \cdot (R_m + \alpha \cdot m)} \quad (3)$$

Der bei Darcy eingeführte Filterkuchenwiderstand (α) kann ebenfalls mathematisch nachgebildet werden. Dabei ergibt die Verwendung nichtlinearer Ansätze der Carman – Kozeny – Gleichung (4) die geeignetsten Korrelationen zwischen spezifischem Filterkuchenwiderstand und Druck [78]. Hier gilt zu beachten, dass mikrobielle Filterkuchen ein kompressibles Verhalten zeigen und somit die Porosität (ϵ) mit der Position im Filterkuchen variiert, was eine Einschränkung von Gleichung 4 bedeutet [40]. Weitere Einflussfaktoren in Gleichung 4 sind die Nasszellendichte (ρ_c) und die spezifische Oberfläche der Partikel (S_v) [86].

$$\alpha = \frac{K \cdot (1 - \epsilon) \cdot S_v^2}{\epsilon^3 \cdot \rho_c} \quad (4)$$

Zur nahezu vollständigen Entfernung von verbliebenem Medium, dem sogenannten Restmedium, auf dem Filter oder innerhalb des Filterkuchens wird beides mit einer Waschlösung gespült. In dieser Arbeit wird die Durchströmungswäsche verwendet, bei der Filter und Filterkuchen von der Waschlösung durchströmt werden.

Allgemein wird das zu entfernende Medium als Mutterflüssigkeit bezeichnet [71, 118]. Mit Hilfe der Waschkurve (Abbildung 3) werden drei Abschnitte beschrieben. Im Ersten verdrängt die Waschlösung die Mutterflüssigkeit, sodass das austretende Filtrat nur aus Mutterflüssigkeit besteht. Anschließend verlässt ein Gemisch aus beiden, Waschlösung und Mutterflüssigkeit, die Poren. Im dritten Schritt erfolgt die Diffusionswäsche. Dabei wird Restmedium aus den Bereichen entfernt, aus denen es in den vorangegangenen Schritten aufgrund zu hoher Kapillarkräfte nicht entfernt werden konnte. Diffusion bedeutet hierbei aber auch, dass das Entfernen von Mutterflüssigkeit von einer Funktion des Waschvolumens in eine Funktion der Zeit übergeht. Bei den minimalen Filtrationszeiten, welche für metabolische Stoffwechseluntersuchungen angestrebt werden, bedeutet dies daher immer eine Restmenge an Mutterflüssigkeit in Kuchen und Filter, deren Quantifizierung durch die Verwendung interner Standards innerhalb der Fermentationsbrühe erfolgen kann. Hierbei muss sichergestellt werden, dass dieser keinen Einfluss auf die Organismen hat. Gleichfalls sollte der Organismus den verwendeten Standard weder aufnehmen noch verstoffwechseln können. Es hat sich gezeigt, dass bei Verhältnissen von Probenvolumen zu Waschlösung von bis zu 1 : 3 zwischen 2 – 3 % Restmedium auf dem Filter verbleiben, also nicht ausgewaschen werden [28, 58].

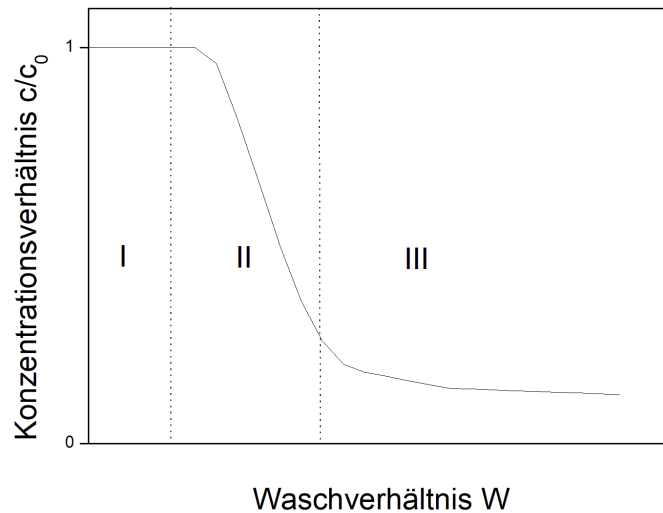


Abbildung 3: Waschkurve für die Durchströmungswäsche mit den drei Phasen der Waschung: Verdrängungswäsche (I), Übergangsbereich (II) und Diffusionswäsche (III) [94, 118]

Weitere Einschränkungen der Filterkuchenwaschung können sich aufgrund verschiedener Viskositäten von Kulturbrühe und Waschlösung ergeben. Dabei kommt es zu unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten während des Waschvorganges. Dieses als Fingerströmung bezeichnete Phänomen kann zur Physiosorption zwischen Partikeln und Mutterflüssigkeit führen und eine Entfernung des Mediums erschweren.

Ein großer Einflussfaktor beim Eindringen der Waschlösung in die Poren von Kuchen und Filter und die daraus resultierende Entfernung der Mutterflüssigkeit sind die Kapillarkräfte. Hauptsächlich bestimmt werden diese durch die Sättigung von Kuchen und Filter. Je ungesättigter die Pore, desto weniger Mutterflüssigkeit muss entfernt werden. Jedoch wird aufgrund des höheren Kapillardrucks ein Eindringen der Waschlösung in die Pore und ein Verdrängen der Mutterflüssigkeit erschwert.

Vor dem Hintergrund metabolischer Stoffwechseluntersuchungen, bei dem die Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten eine große Rolle spielt, tritt eine Eigenschaft der Waschlösung in den Vordergrund. Hierbei handelt es sich um die Ionenstärke (I) aus Gleichung 5, also die Erweiterung des osmotischen Druckes um die Aktivität in Form der Berücksichtigung der Dissoziation [63], beschrieben durch das Produkt der Molalität der Ionensorte (c) und der Ladungszahl der Ionensorte (z).

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum (c_i \cdot z_i^2) \quad (5)$$

Eine ausführliche Untersuchung zur Filterkuchenwaschung mit verschiedenen Ionenstärken findet sich bei Bolten et al. [11]. Vor allem gramnegative Bakterien (*E. coli*) können demzufolge bis zu 80% an intrazellulären Stoffen verlieren, was durch eine Anpassung der Waschlösung nahezu komplett unterbunden werden kann. Im Gegensatz dazu, scheinen grampositive Bakterien (z. Bsp. *Corynebacterium glutamicum*) davon unbeeinflusst zu sein, da diese eine anstelle von zwei Membranschichten besitzen [109].

Eine Anpassung von Waschlösung und Fermentationsmedium hinsichtlich der Ionenstärke erfolgt allgemein auf Basis der Zusammensetzung des Mediums vor Kultivierungsbeginn und wird im Laufe einer Fermentation nicht angepasst.

5.1.3 Schaumbildung in Fermentationsprozessen

Das Phänomen der Schaumentwicklung in Fermentationen stellt eines der Hauptprobleme dar, wenn es um Einschränkungen innerhalb des industriellen Produktionsprozesses geht [92]. Definiert wird Schaum dabei gleich dem Gasgehalt als eine Dispersion von Gas in einer flüssigen Phase. Eine Unterscheidung erfolgt hinsichtlich des Verhältnisses von Gas- zu Flüssigvolumen, welches bei Schaum oberhalb von 3 und beim Gasgehalt unterhalb von 1 definiert ist [13, 54, 92]. Weitere Definitionen unterscheiden bei einem Gasgehalt zwischen 60-90 % oder ≥ 90 % [54], und der Tatsache, dass sich bei Schaum die Luftblasen auf und beim Gasgehalt in der Fermentationsbrühe befinden [92].

Eine weitere Unterteilung in zwei Schaumtypen erfolgt anhand der Blasenform. [54].

1. *bubble bath*-Schaum: kurzweilig auftretender, unbeständiger Schaum mit einem weiten Spektrum an Blasengrößen. Diese sind polyhedral angeordnet und bilden sogenannte Honigwaben-Strukturen. Sie weisen einen hohen Gehalt an eingeschlossener Flüssigkeit auf, was zu einem niedrigen Gas-zu-Flüssigvolumenverhältnis führt.
2. *beer head*: dauerhafter, einheitlicher, steifer Schaum (stabil). Die gebildeten Blasen sind leicht ellipsoid mit Durchmessern von weniger als 2 – 3 mm. Sie weisen einen geringen Flüssigkeitsanteil auf, woraus ein hohes Gas-zu-Flüssigvolumenverhältnis resultiert.

Die Ursachen für die Bildung von Schaum während einer Fermentation sind vielfältig: Angefangen bei Bestandteilen des Mediums wie Salzen, Zuckern und Alkoholen über das Zellwachstum an sich und die dabei exprimierten grenzflächenaktiven Stoffe, Limitierungssituationen und sich dadurch verändernde Stoffwechsel sowie Zellyse, bis schließlich zum Lufteintrag bei der Begasung der Fermentationsbrühe [54, 111].

Eine weitere Ursache für die Schaumbildung ist die Konzentration von Proteinen im Medium. Diese adsorbieren bei einer Konzentration von 1 mg/L an der Gas-Flüssig-Grenzfläche und stabilisieren somit den Schaum, wobei die hydrophoben Teile der Proteine an der Grenzfläche binden und die hydrophilen Teile sich zur wässrigen Phase ausrichten [83]. Aufgrund hydrophober Zelloberflächen einiger Organismen (z. Bsp. *C. glutamicum*) wird die Schaumbildung noch befördert, was ebenfalls dazu führen kann, dass sich die Organismen innerhalb der Flüssigphase des Schaumes befinden können und somit die entstehenden Probleme aufzeigt, die eine Fermentation zur Exprimierung von Proteinen mit sich bringt [92]. Zudem kann es zur Bildung dünner flüssiger Schichten zwischen den Blasen kommen, wodurch eine Koaleszenz, also ein Ineinanderfließen einzelner Blasen, verhindert und die Stabilität des Schaumes erhöht wird. Unterstützt wird diese Stabilisierung des Schaumes durch eine abnehmende Oberflächenspannung der Gas-Flüssig-Dispersion.

Mit Hilfe mechanischer und chemischer Verfahren kann der Schaumbildung entgegen gewirkt werden. Bei mikrobiellen Kultivierungen haben sich chemische Verfahren in Form von Antischaummitteln durchgesetzt. Diese können neben der Einwirkung auf gebildeten Schaum auch präventiv eingesetzt werden. Bei diesen grenzflächenaktiven Stoffen handelt es sich hauptsächlich um Gemische hergestellt aus Ölen, Säuren, Estern, Polyglycolen, Alkoholen und Sulfiten [111]. Den Einfluss auf die Mikrofiltration haben Liew et al. untersucht und vor allem für silikonöhlhaltige Mittel eine signifikante Minderung des transmembranen Flusses feststellen können [67], wobei die Gründe vor allem in einem höheren Widerstand liegen, der aus dem Eindringen in die Membran resultiert.

5.2 *Corynebacterium glutamicum*

Das grampositive, nicht sporulierende *C. glutamicum* wurde erstmals 1957 während eines Screening Programms für Glutamat produzierende Mikroorganismen isoliert [59]. Es weist eine Stäbchenform auf, welche nach der Zellteilung oft v-förmig auftritt und in einer asymmetrisch ablaufenden Zellteilung begründet ist, der sogenannten schnappenden Zellteilung [64]. *C. glutamicum* gilt heute als eines der wichtigsten Mikroorganismen in der industriellen Herstellung biotechnologischer Produkte, allen voran der Herstellung von Aminosäuren. Unter diesen wiederum stehen L-Glutamat und L-Lysin an vorderster Stelle. L-Glutamat wird mit einem jährlichen Produktionsvolumen von mehr als zwei Millionen Tonnen hauptsächlich als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie eingesetzt [6]. L-Lysin wird mit 2,2 Millionen Tonnen vorwiegend als Futtermittel in der Tiermast eingesetzt [5, 36]. Weitere mit *C. glutamicum* produzierte Stoffe mit wirtschaftlicher Bedeutung sind die Aminosäuren L-Valin , L-Threonin L-Tryptophan und D,L-Methionin

[13, 36] sowie organische Säuren wie zum Beispiel Pyruvat und Bernsteinsäure [60, 117]. In der vorliegenden Arbeit soll der Fokus auf L- Lysin liegen.

5.2.1 Lysinsynthese in *C. glutamicum*

Der zentrale Stoffwechsel von *C. glutamicum* (Abb. 4) umfasst die Synthesewege der Glykolyse, des Pentosephosphatweges (PPW), des Zitronensäure-Zyklus (TCA-Zyklus) und des sogenannten Glyoxylat Shunts. [44] Glukose wird dabei zunächst über das Glukose-Phosphotransferase-System aufgenommen und anschließend durch Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat als Acetyl - CoA in den TCA - Zyklus eingebracht [89]. Zudem können die Zwischenprodukte PEP und Pyruvat, wie in Abbildung 4 zu erkennen, über die jeweiligen Carboxylasen auch in Oxalacetat als Metabolit des Zitronensäurezyklus umgewandelt werden. Oxalacetat wird durch die Aspartat - Aminotransferase (aspC) in Aspartat katalysiert. Im weiteren Syntheseweg sorgt das Enzym Aspartokinase (lysC) für eine Phosphorylierung der β -Carboxyl-Gruppe des Aspartats, um über den Zwischenschritt von L - Aspartylphosphat neben weiteren auch die Aminosäure Lysin zu synthetisieren. Dies geschieht über das Zwischenprodukt des meso - Diaminopimelat (D,L - Diaminopimelat). Der standardmäßig benutzte und für die meisten Bakterien beschriebene Stoffwechselweg ist dabei der Succinylaseweg über das Zwischenprodukt L,L - Diaminopimelat. Neben weiteren Stoffwechselzweigen hin zum meso - Diaminopimelat, gibt es für einige grampositive Organismen, zu denen auch *C. glutamicum* gehört, einen weiteren, den Dehydrogenaseweg [79]. Der Dehydrogenaseweg erlaubt es dem Organismus auf wechselnde Ammoniumlevel in der Umgebung zu reagieren, da Ammonium nur für den Succinylaseweg benötigt wird [12, 95]. Abschließend wird das so intrazellulär synthetisierte Lysin über Lysinefflux Transporter in das umgebende Medium sekretiert [15]. Neben Lysin werden über den Stoffwechselweg ausgehend von L - Aspartat noch die Aminosäuren L - Asparagin, L - Methionin, L - Homoserin, L - Threonin, L - Glycin und L - Isoleucin synthetisiert, wie in Abbildung 4 dargestellt. Wie weiter oben schon angesprochen, werden mittels mikrobieller Kultivierung eine Reihe wichtiger Aminosäuren industriell hergestellt. Da liegt es auf der Hand, die vorab beschriebenen Stoffwechselwege zu optimieren und gezielt auf einzelne Stoffe auszurichten. Auf dem klassischen Weg funktioniert dies über initiierte zufällige Mutationen (Random Mutations), welche im Hinblick auf eine erhöhte Lysinproduktion mit weitestgehend guten Resultaten bezüglich der Lysinkonzentration blicken können, gleichzeitig aber mit einer niedrigeren Substrataufnahme, geringerem Wachstum und ungewollten und sich akkumulierenden Nebenmutationen im Hintergrund [88] sowie einer geringeren Robustheit des modifizierten Stammes einhergehen [49].

An diesem Punkt setzt das sogenannte System metabolic engineering an, dessen Strategie

5.2.2 Modifikation des Stoffwechselweges zur Lysinsynthese

Die Aspartokinase bewerkstelligt den Schritt der Phosphorylierung des Aspartats zu L- β -Aspartylphosphat, von welchem aus die Synthesewege über Di-aminopimelat zu Lysin und über Homoserin zu Threonin beginnen. Über den Zwischenschritt Homoserin werden auch Methionin, Glycin und Isoleucin synthetisiert. Aber nur Threonin und Lysin haben eine hemmende Wirkung auf das Enzym Aspartokinase [24]. Bei dieser Art von Hemmung liegt eine sogenannte Feedback – Inhibierung vor. Endprodukte eines Synthesweges reduzieren bei Anwesenheit ihre weitere Bildung. Ein Ansatz zur Modifikation für einen Lysin produzierenden Stamm ist somit die Aufhebung dieser Produktinhibierung der Aspartokinase. *C. glutamicum* hat den Vorteil, dass es nur eine Aspartokinase gibt (im Gegensatz zu anderen industriell genutzten Organismen wie zum Beispiel *E. coli*, welches 3 jener Enzyme besitzt) [87]. Die angesprochene Produkthemmung bei der Aminosäuresynthese ist eine allosterische Regulierung des Zellmetabolismus, welche als elementarer Mechanismus den zellularen Metabolismus und die Genregulierung kontrolliert [108]. Als Allosterie wird die Veränderung der Konformität von Proteinen mit Quartärstruktur (zum Beispiel Enzyme) durch Anlagerung niedermolekularer Verbindungen bezeichnet. Diese binden in den sogenannten ACT Regionen der β - Untereinheit, welche als regulatorische der beiden Untereinheiten bezeichnet wird, aus denen die Aspartokinase besteht.

Darin besitzt das Enzym Aspartokinase (AK) zwei regulatorische Bereiche für Lysin und Threonin, wobei Threonin einen geringeren inhibitorischen Einfluss besitzt als Lysin, wie Chen et al. [22] gezeigt haben. Lysin bewirkt hingegen bei einer maximalen Konzentration von 10 mM eine Reduzierung der relativen Aktivität um ca. 30 %, betrachtet man die Ergebnisse aufgereinigter Enzyme. Werden beide Inhibitoren äquimolar vorgelegt, liegt der Einfluss bei einer 90 -prozentigen Reduzierung der relativen Aktivität schon bei einer Konzentration von 2 mM. Aufgrund dieser allosterischen Interaktion von korrelierenden Positionen an der Aspartokinase mit den Effektoren Lysin und Threonin wird eine Überproduktion von Lysin verhindert [25].

An der TUHH im Institut Bioprozess- und Biosystemtechnik wurde im Rahmen einer *proof of concept* Studie für das Prinzip der *method based coevolutionary analysis* im Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 eine Reihe genetischer Mutationen am oben beschriebenen Enzym vorgenommen. Das Konzept sollte die Möglichkeit aufzeigen einen Lysin produzierenden Stamm mit minimalen Mutationen zu designen. Dabei wurde unter anderem der Stamm mit der Bezeichnung LC 298 entwickelt, bei dem das Ziel darin bestand, die allosterische Regulierung der Aspartokinase mittels Punktmutation zu modifizieren und die oben angesprochene Inhibierung zu unterbinden. Die Punktmutation mit der Bezeichnung Q298G erfolgte im für die Aspartokinase verantwortlichen Abschnitt des genetischen Co-

des (LysC) des Wildtyps ATCC 13032 und resultierte in dem oben genannten Mutant. Der Einbau der Punktmutation (Q298G) veränderte die quartäre Struktur hinsichtlich der Bindungsstellen für Lysin und Threonin, sodass eine Zunahme der Insensivität hinsichtlich der äquimolaren Zugabe der beiden Aminosäuren erzielt wurde [24].

Dieser Stamm zeigte ein ähnliches Wachstumsprofil wie der Wildstamm und hatte unter Fed-Batch Bedingungen eine Produktivität von $P = 1,9 \text{ g}/(\text{L h})$ Lysin und eine Ausbeute von $Y_{P/S} = 0,17 \text{ g}_{Lysin}/\text{g}_{Glukose}$.

5.3 Kontinuierliche Probennahme mit Hilfe der Mikrosystemtechnik

5.3.1 Warum Mikrosysteme?

Die Implementierung der Mikrosystemtechnik in biotechnologische und bioverfahrenstechnische Aufgabenstellungen erhält in den letzten Jahren verstärkt Aufmerksamkeit [14]. Dabei sind die eingesetzten Methoden [39] genauso vielfältig wie die Einsatzgebiete. Unter dem Begriff der Lab on Chip Technologie [7, 9, 70] rücken Anwendungsmöglichkeiten für metabolische Stoffwechseluntersuchungen [1, 121, 122] und optische Analysetools [91, 124] immer weiter in den Vordergrund. Somit könnte dieser Gegenentwurf zur Schnellfiltration aus dem vorangegangenen Abschnitt, ein mögliches weiterführendes Konzept der automatisierten schnellen Probennahme aus dem Bioreaktor darstellen.

Vor diesem Hintergrund folgt eine kurze Übersicht über den Stand der Technik zur Fluidmanipulation sowie zur Partikelfokussierung in Mikrostrukturen, allen voran Strukturen mit einem spiralförmigen Strömungsverlauf.

5.3.2 Stand der Technik

Mikrosystemtechnik bedeutet, wie der Name schon vermuten lässt, dass die angewendeten Geometrien im Mikrometerbereich zu finden sind. So auch die in solchen Systemen verwendeten Kanaldurchmesser, die sich im Allgemeinen unterhalb 500 μm bewegen. In allen durchströmten Rohren ist der Volumenstrom (\dot{V}) über den Radius (r) der Geometrie mit dem aufzubringenden Druck Δp über die Kanal- oder Rohrlänge (L) in der von Hagen-Poiseuille aufgestellten Gleichung verbunden, siehe Gleichung 6 [85].

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi \cdot r^4 \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot L} \quad (6)$$

In der Mikrosystemtechnik sind die horizontalen Kanäle aufgrund des verwendeten Ätzverfahrens größtenteils rechteckig. Dadurch verändert sich der hydraulische Widerstand, siehe Gleichung 7. Aus dem Parameter Radius werden die Einflussgrößen Höhe (H) und Breite (B) eines Rechteckes. Dabei hat die Höhe des Kanals mit der dritten Potenz einen anderen Einfluss als die Kanalbreite. Der Faktor K stellt zudem das Verhältnis der beiden Seitenlängen in Korrelation zum Volumenstrom durch den Kanal mit $K = 1 - 0,630 \cdot \frac{H}{B}$. Also je breiter der Kanal im Verhältnis zur Kanalhöhe ist, desto geringer der Widerstand des Kanals [16].

$$\dot{V} = \frac{K \cdot (H)^3 \cdot (B) \cdot \Delta p}{12 \cdot \eta \cdot L} \quad (7)$$

In der Fertigung von Mikrostrukturen werden die verschiedenen Materiallagen durch ein sogenanntes Bonden miteinander verbunden. Diese Verbindungsschichten und auch die meist verwendeten Materialien Polydimethylsiloxan (PDMS) und Glas begrenzen die Druckbelastbarkeit der Mikrostrukturen, wodurch die Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb von Mikrostrukturen im laminaren Strömungsbereich zu finden sind. Auf eine detailliertere Darstellung der Fertigungsprozesse und Stabilitäten von Mikrosystemstrukturen soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

Durch das erwähnte laminare Strömungsbild ergeben sich in Mikrokanälen im Vergleich zu Makrostrukturen Unterschiede bei strömungsdynamischen Anwendungen. So kann aufgrund der fehlenden Turbulenzen eine Vermischung zweier parallel laufender Fluide rein diffusiv erfolgen. Die weiter oben angesprochenen breiten Anwendungsgebiete innerhalb der Biotechnologie lassen vermuten, dass die Mischung von Flüssigkeiten innerhalb von Mikrostrukturen unabdingbar ist, weshalb ein großes Augenmerk auf eben dieser Aufgabenstellung lag [4, 39, 121]. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden geometrische Veränderungen untersucht, um diese Limitierung, die rein diffusive Vermischung, zu beeinflussen. Sei es durch die wiederholte Teilung und das Zusammenführen des Strömungsverlaufes [102] oder das Erzwingen von Wirbelstrukturen durch Hindernisse innerhalb des Kanals [121]. All diese Untersuchungen haben eins gemeinsam, sie erzeugen passiv Turbulenzen in der Strömung. Aktive Einflussnahme auf die Strömungsdynamik mit Hilfe von zum Beispiel angelegten elektrischen Feldern liegt nicht im Fokus dieser Arbeit und werden hier deshalb nicht weiter ausgeführt.

Untersuchungen zu einer weiteren passiven Möglichkeit, Flüssigkeiten in einer spiralförmigen Mikrostruktur zu vermischen, haben gezeigt, dass vor einer Vermischung der Fluide ein kompletter Seitenwechsel derselben provoziert werden kann [48, 103]. Dies bietet die Möglichkeit, Mikroorganismen aus ihrem Kultivierungsmedium in eine Trägerflüssigkeit zu überführen. Mit Hilfe der sich beständig weiterentwickelnden optischen Analysemöglichkeiten [55] - wie schon in Abschnitt 5.1 angesprochen - könnte somit eine Quantifizierung intrazellulärer oder auch extrazellulärer mikrobieller Metaboliten realisiert werden.

Um sicher zu gehen, dass sämtliche Mikroorganismen auch in die angesprochene Trägerflüssigkeit überführt werden, muss deren Strömungsverhalten bekannt und idealerweise kontrollierbar sein. Für sphärische Partikel, also größtenteils kreisrunde, wurden die Bewegungsmuster in laminaren Strömungen in Mikrokanälen mit verschiedenen Zielsetzungen vielfach untersucht [9, 56, 120, 123]. Dabei lagen die entsprechenden Durchmesser der Partikel im Bereich von Tumorzellen (HELA $13\ \mu\text{m}$), Lymphozyten ($7 - 10\ \mu\text{m}$) oder tierischen Zellen (CHO $15\ \mu\text{m}$). Also meist über dem dreifachen Durchmesser von Mi-

kroorganismen wie zum Beispiel *C. glutamicum*. Der Fokus war hierbei vor allem auf die medizinisch relevante Separation und Anreicherung der oben genannten Zellen gelegt [56]. Sollten grundlegende Gesetzmäßigkeiten des Strömungsverhaltens untersucht werden, wie die Bilanzierung der involvierten Kräfte, die verschiedenen Abhängigkeiten oder der Einfluss einzelner Geometrieparameter, kamen sphärische Partikel in gleicher Größenordnung wie die oben genannten Zellen zum Einsatz (vgl. 5.3.4). Gleiches galt für Untersuchungen zur Separation von Partikeln verschiedener Durchmesser in der gleichen Geometrie [62]. Untersucht wurden Geometrien von geraden Kanalstrukturen mit oder ohne eingebauten Hindernissen [26, 47] und Kanälen in serpentin ähnlicher Form [32, 127, 128]. Weiterhin wurde mit Hilfe externer Kräfte [65, 101, 123] oder Fluidströmen [72] versucht eine Fokussierung zu erreichen. Fokussierung ist hierbei die entsprechende Weiterführung einer Aufkonzentration mit dem Ziel einer gezielten Anordnung der Partikel auf einer Stromlinienbahn, bei der die Breite des Bandes der angeordneten Partikel unterhalb des vierfachen Partikeldurchmessers liegt. Das weitere Maximum liegt dann bei einem sogenannten *single stream focussing*, einer weiteren Verringerung auf den zweifachen Partikeldurchmesser.

Aufbauend auf den Ergebnissen der beschriebenen Untersuchungen wurde versucht eine Lösung für die Trennung von sphärischen Partikeln im Größenbereich von Bakterien, also unterhalb von $3\ \mu\text{m}$, zu entwickeln. Dabei konnte bis zu einer Partikelgröße von $2\ \mu\text{m}$ fokussiert werden, über eine Kanallänge von 82 mm, ohne Berücksichtigung des möglichen Transferierens in eine zweite Flüssigkeit [52].

Dass neben der Fokussierung ein Austausch des umgebenden Mediums technisch realisierbar ist, konnte im Größenbereich der Partikel- oder Zelldurchmesser von jeweils $10\ \mu\text{m}$ und $15\ \mu\text{m}$ in geraden Kanälen zu 50 % [3] und in spiralförmigen Kanälen zu 90 % [18, 84] gezeigt beziehungsweise simuliert [99] werden.

5.3.3 Mikrofluidik in Spiralstrukturen

Aus der Bandbreite der verschiedenen oben genannten Geometrien, zeigt die Spiralform das größte Potential für eine passive Fokussierung von Mikroorganismen bei gleichzeitigem Wechsel der Trägerflüssigkeit. Aus diesem Grund soll sie im Rahmen dieser Arbeit weiterführend für die kontinuierliche Probennahme aus mikrobieller Fermentation untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit ist der Abschnitt der theoretischen Grundlagen dementsprechend auf eben jene Geometrie zugeschnitten.

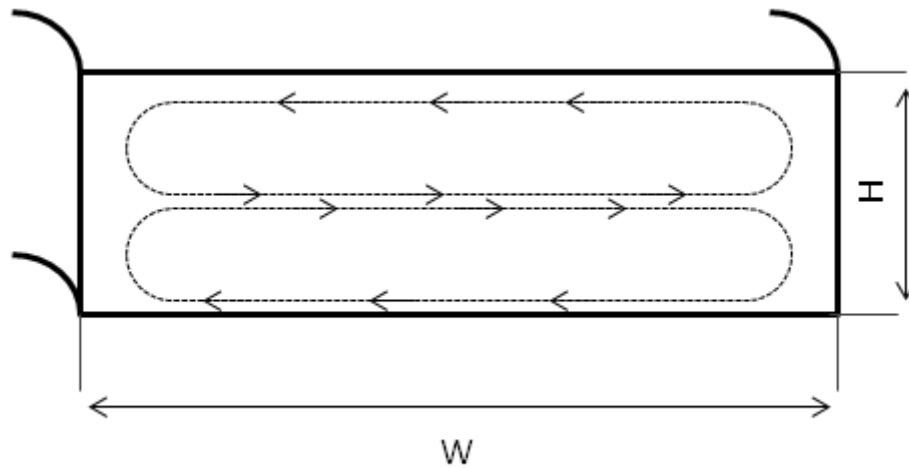


Abbildung 5: Prinzip der Sekundärströmung, Dean - Wirbel, hervorgerufen durch einer rechteckigen Kanalgeometrie hinzugefügten Krümmung

- Dean Wirbel

Wird einer laminaren Kanalströmung in axialer Richtung eine Krümmung hinzugefügt, wie das bei einer Spiralförmigkeit der Fall ist, entwickelt sich in radialer Richtung eine sogenannte Sekundärströmung. Basierend auf der höheren Strömungsgeschwindigkeit an der Innenseite des Kanals bewirkt die Zentrifugalkraft in der Strömung eine Flüssigkeitsbewegung zur Außenseite. Aus Erhaltungssicht muss die dabei verdrängte Flüssigkeit ebenfalls in einer Strömung zurück zur Innenseite des Kanals strömen. Die zentrifugale Bewegung findet dabei mittig des Kanalquerschnittes oder Rohrdurchmessers statt, die Rückströmung dementsprechend an Ober- und Unterseite, also in 2 Wirbelstrukturen an der Ober- und Unterseite des Kanals. Die Zentren der Wirbel befinden sich jeweils bei 0,27 und 0,72 der normierten z-Achse [126], dargestellt in Abbildung 5.

Diese Wirbelstrukturen werden auch als Sekundärströmung oder Dean Wirbel bezeichnet und entsprechend letzterem in der Dean - Zahl (De) zusammengefasst und formell beschrieben. Je größer der Wert, desto stärker die Wirbel.

$$De = Re \cdot \sqrt{\frac{D_h}{2 \cdot R}} \quad (8)$$

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot D_h}{\eta} \quad (9)$$

Anhand der Dean - Zahl (Gleichung 8) sind die hauptsächlichlichen Einflussfaktoren für die Sekundärströmungen erkennbar. Das sind zum einen die Strömungsgeschwindigkeit (v) und die Fluideigenschaften Dichte (ρ) und dynamische Viskosität (η), abgebildet durch die dimensionslose Reynoldskenzahl (Re) in Gleichung 9. Zum anderen sind das die geometrischen Eigenschaften des Kanals und der Spirale, zusammengefasst im Radius (R) und dem hydrodynamischen Radius. Der hydraulische Durchmesser des Kanals (D_h) beschreibt über die Höhe des Kanals (H) und die Breite (W) die Größe des Kanals und so die durchströmte Fläche. Mit größer werdendem Kanalquerschnitt steigt somit auch das Ausmaß der Wirbelstrukturen. Dem Verhältnis von Höhe zu Breite (H/W) kommt dabei noch eine besondere Aufmerksamkeit zu, denn je größer das Verhältnis H/W desto stärker die Ausprägung der Sekundärströmung [126]. Da sich dies sehr stark auf die Auslegung einer zu konstruierenden Kanalgeometrie für Fluidmanipulation und Partikelfokussierung auswirkt, werden auf diesen Einfluss und die damit verbundenen Herausforderungen bei der Auslegung gesondert eingegangen, siehe dazu Abschnitt 7.3.2.

Zusätzlich zu den erwähnten primären Dean Wirbeln über die gesamte Breite entwickeln sich an der Außenseite einer rechteckigen Kanalgeometrie lokale kleinere Wirbel [81], welche ebenfalls einen Einfluss auf die Bewegung des strömenden Fluids haben (vgl. Abb. 5). Das Ausmaß dieser weiteren Wirbel ist gleichfalls von der Kanalgeometrie abhängig.

- Fluidbewegung

Wie oben dargelegt, bewirken die Sekundärströmungen die Bewegung der Flüssigkeit von einer Seite des Kanals zur gegenüberliegend und zurück. Bei der Zielstellung eines Seitenwechsels zweier parallel laufender Flüssigkeiten ist für die Auslegung einer geeigneten Geometrie die notwendige Länge des Kanals ein wichtiger Parameter. Mit dem Definieren eines dreidimensionalen Fluidelements kann nach der von Sudarsan et al. [103] aufgestellten Gleichung (siehe Gleichung 10) die Bewegung der Flüssigkeiten in axialer und radialer Richtung der Kanalgeometrie beschrieben werden. Der axiale Transport wird dabei unter Benutzung der Maximalgeschwindigkeit entlang der Mittellinie des Kanals als laminare Poiseuille Strömung behandelt und der radiale Transport über die Breite des Kanals mit Hilfe der Dean Strömung, unter der Definition der Dean Geschwindigkeit als $u_D \approx Re \cdot (d/R) \cdot U_0$, mit d als hydraulischen Durchmesser [103].

$$\frac{\tau_a}{\tau_D} \approx \frac{\frac{L_a}{u_a}}{\frac{L_D}{u_D}} = \frac{L_a}{R} \cdot Re \quad (10)$$

Dabei stellen τ_a und τ_D jeweils die Zeitspanne für den Weg eines Fluidelements über die Kanallänge bzw. die Kanalbreite dar. Ein Quotient von eins bedeutet demnach, dass die Bewegung des Volumenelements entlang der gegebenen Kanallänge (L_a) über die geforderte Kanalbreite (L_D) abgeschlossen ist. Der sich daraus ergebende lineare Zusammenhang aus Reynoldszahl (Re) und dem Quotienten aus dem Radius Kurve (R) und der Länge (L_a) bedeutet, dass eine Änderung des Radius um den Faktor q eine Abnahme der sekundären Strömungsgeschwindigkeit um $1/q$ bewirkt und somit in einer Änderung der benötigten Kanallänge um den Faktor q resultiert [48]. Zusammenfassend heißt ein kleinerer Radius eine Verkürzung der benötigten Länge für den Seitenwechsel.

5.3.4 Partikelfokussierung in einer Spiralstruktur

Aufgrund des parabolischen Strömungsprofils einer laminaren Strömung entsteht ein Geschwindigkeitsgradient vom Kern der Strömung nach außen. Die daraus resultierende Kraft, die Scherkraft, vom Zentrum der Strömung zur Kanalwand, wirkt auf uniform verteilte Partikel innerhalb der Flüssigkeit und bewegt sie in Richtung Wand. In Wandnähe wirkt eine weitere Kraft auf die Partikel in entgegengesetzter Richtung, die Wandhubkraft, woraus ein Kräftegleichgewicht entsteht. Partikel ordnen sich also an diesen Gleichgewichtspositionen an, wie Segre und Silberberg [100] als erste für Rohrgeometrien festgestellt haben. Die Wandhubkraft resultiert hierbei aus der Rotation der Partikel und dem entstehenden Druck zwischen Partikel und Wand [76]. Mit zunehmender Geschwindigkeit und abnehmendem Partikeldurchmesser verlagert sich dieses Gleichgewicht in radialer Richtung nach außen [42]. Der Einfluss der Geschwindigkeit (u) resultiert aus der zunehmenden Scherkraft F_L (siehe Gleichung 11). Neben der quadratischen Berücksichtigung der Geschwindigkeit u hängt die Position der Partikel zudem vom dimensionslosen Liftkoeffizienten C_L ab, welcher selbst wiederum vom Partikelabstand zur Wand und der dimensionslosen Reynoldszahl des Kanalströmung beeinflusst wird [56]. Die Verlagerung der kleineren Partikel näher zur Wand resultiert aus der höheren Trägheit größerer Partikel, formell beschrieben durch die Stokes Zahl (St) [2] und der Eigenrotation der Partikel innerhalb der Strömung [3].

$$F_L = \frac{C_L \cdot \rho \cdot u^2 \cdot a^3}{R} \quad (11)$$

Einen ersten geometrischen Einfluss für die Positionierung der Partikel in Rohrströmungen fanden Tachibana et al. [105] mit dem Verhältnis von Partikeldurchmesser zu Rohrdurchmesser.

Während die Anzahl der Gleichgewichtspositionen bei der Betrachtung der Querschnittsfläche eines Rohres noch sehr groß ist, reduziert sie sich in den typischerweise quadratischen

Querschnitten mikrofluidischer Systeme auf 4 [32]. Wird die Geometrie zu einem Rechteck mit einem sehr kleinen Verhältnis von H/W (*low aspect ratio*), dann reduziert es sich auf 2 stabile Gleichgewichtspositionen [81]. Auch hier findet sich ein Verhältnis von Partikeldurchmesser zu hydraulischem Durchmesser des Kanals. Bei einem Wert $\geq 0,07$ [34] stellt dies ein entscheidendes Limit dar, um eine Fokussierung von Partikeln zu realisieren, sodass bei einer polydispersen Verteilung von Partikelgrößen der kleinste Durchmesser als Ausgangspunkt für eine Kanalgeometrie in Betracht gezogen werden muss. Die Kanallänge für die Fokussierung, die sogenannte *downstream Länge*, und der notwendige Volumenstrom lassen sich dann durch die Balance von Scherkräften und Reibungskräften (Stokes Reibung) abschätzen [34], siehe Gleichungen 12 und 13. Dabei hat sich als qualitative Fokussierung eine Bandbreite von 3,8 Partikeldurchmessern in der Literatur allgemein etabliert.

$$L_f = \frac{\pi \cdot \eta \cdot H^2}{\rho \cdot U_m \cdot a^2 \cdot f_L} \quad (12)$$

$$Q \approx \frac{2 \cdot \pi \cdot \eta \cdot W \cdot H^3}{3 \cdot \rho \cdot L \cdot a^2 \cdot f_L} \quad (13)$$

Erfährt die Kanalstruktur zusätzlich eine Krümmung in tangentialer Richtung, verringert sich die Anzahl nochmals auf nur eine Gleichgewichtsposition. Wie schon bei der oben dargestellten Bewegung von Flüssigkeiten in Spiralstrukturen, ergibt sich aufgrund der Krümmung eine Sekundärströmung über die Kanalbreite. Diese Strömung bringt eine weitere Kraft kongruent zu den Wirbeln, Dean Kraft (F_D) genannt, in das Kräftegleichgewicht mit ein, welches an den Partikeln angreift. Die Ausbildung der Wirbel ist von der Dean - Kraft (Gleichung 14) und genauso wie die Scherkraft auch von der Partikelgröße abhängig, in diesem Fall aber nur einfach und nicht wie bei der Scherkraft mit der dritten Potenz (Gleichung. 11), was den größeren Einfluss der Scherkraft auf die Partikel widerspiegelt. Beide Kräfte wirken an der Kanalinnenseite gegensätzlich zueinander. Dies führt für die dort befindlichen Partikel zu einer neuen Gleichgewichtsposition. Partikel an der äußeren Kanalwand erfahren eine Superposition beider Kräfte und werden durch die Sekundärströmung über die Ober- und Unterseite in Richtung Innenseite bewegt. Die Positionen an der Ober- und Unterseite sind aufgrund der Wirbelstrukturen instabil, was in einer Fokussierung der Partikel an der Innenseite resultiert 6. Mit steigender Strömungsgeschwindigkeit und daraus resultierenden höheren Reynoldszahlen und Dean - Zahlen ergibt sich für die Positionierung der Partikel eine Situation der Bewegung an die Kanalaußenseite, auf welche in Abschnitt 7.3.2 näher eingegangen werden soll.

$$F_{Dean} = 5,4 \cdot 10^{-4} \cdot \pi \cdot \mu \cdot De^{1,63} \cdot a_p \quad (14)$$

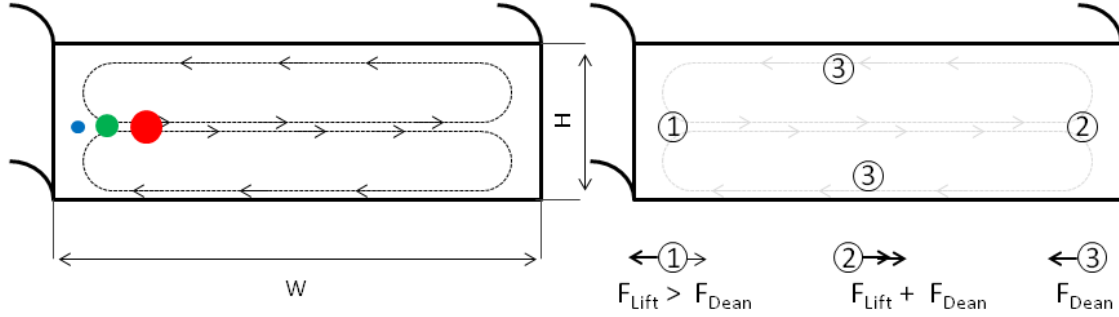


Abbildung 6: Kräfteverhältnisse von Scherkräften F_{Lift} und F_{Dean} Deankräften an Partikeln in der Sekundärströmung und die resultierende Gleichgewichtsposition

$$R_f = \frac{F_{SG}}{F_D} = \frac{C_{SGP} \cdot U_{max}^2 \cdot a^2}{6 \cdot \pi \cdot D_h \cdot U_{Dean}} \geq 1 \quad (15)$$

Die Gleichung 12 für die Längenbestimmung des Kanals ist hierbei nur noch für eine Abschätzung der Länge ausreichend [76], weshalb der Parameter R_f in Gleichung 15 für Kurven und Spiralgeometrien von Di Carlo [34] eingeführt und im Folgenden auf das Verhältnis von Scherkräften und der Dean - Kraft (Gleichung 15) erweitert wurde [42, 75] - unter der Einschränkung, dass sich eine Fokussierung mit Hilfe dieser Gleichung voraussagen lässt, aber hinsichtlich der genauen Position und der Fokussierungsqualität, also der Bandbreite, keine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Geometrien möglich ist [75].

Diesem Ansatz steht in der Literatur ein erweiterter Ansatz für rechteckige Kanäle gegenüber, bei dem eine nochmalige Unterscheidung des Scherkraftkoeffizienten SG_P in einen positiven und einen negativen Teil vorgenommen wird [81, 129]. Dabei wird neben den Einflüssen des Wandabstands der Partikel und der Reynoldszahl noch die unterschiedliche Ausprägung des Koeffizienten in den verschiedenen Achsen (horizontal und vertikal) betrachtet.

5.3.5 Ausgangsdilemma

Eine Herausforderung, welche sich bei der passiven hydrodynamischen Trennung von Partikeln oder Mikroorganismen und dem umgebenden Fluid stellt, ist, dass sowohl die Fluidmanipulation als auch die Partikelfokussierung durch die Strömungsverhältnisse und die Geometrie des Kanals beeinflusst werden. Das bedeutet, dass beide auch miteinander konkurrieren und eine präzise Auslegung des Prozesses einer genauen Vorbetrachtung bedarf, wie sich im nächsten Abschnitt zeigen wird (Abschnitt 7.3).

Eine weitere Herausforderung ergibt sich bei der praktischen Einbettung in mikrobielle Kultivierungen. Kanalparameter wie Breite und Höhe liegen in der Mikrosystemtechnik im Mikrometerbereich. Der erwähnte Zusammenhang von Rohrdurchmesser und Partikeldurchmesser, genauso wie der aufgezeigte Einfluss der Geschwindigkeit auf die Sekundärströmungen, führen zu einem weiteren Aspekt der passiven hydrodynamischen Trennung, dem Druckabfall über die Kanallänge. Trotz einer laminaren Strömung und der damit einhergehenden geringen Reynoldszahlen ist der aufzubringende Druck für einen benötigten Volumenstrom bei Rohrströmungen vom Radius und bei eckigen Kanalgeometrien von der Kanalhöhe abhängig, siehe Gleichung 7.

Somit sorgt schon eine kleine Änderung in der Geometrie für einen starken Druckanstieg. Dies kann nicht nur zur Zerstörung der Strukturen führen, sondern stellt auch für die Probennahme aus einer laufenden Kultivierung eine erhebliche Einschränkung dar. Auch wenn ein Großteil der Mikroorganismen einem höheren Druck im Bioreaktor unproblematisch gegenüber steht, stellt dies eine Veränderung der Fermentationsbedingungen dar, insbesondere im Bezug auf die Gassättigung im Medium. Das bedeutet, dass neben dem generellen Ziel einer kontinuierlichen Trennung von Organismen und Medium ein großes Augenmerk darauf liegen sollte, den Druckverlust über die Geometrie so gering wie möglich zu halten, sodass eine Integration in die mit Unterdruck betriebene Schnellprobennahmeanlage (RSU) realisierbar ist.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien

Soweit nicht anderweitig benannt, wurden alle verwendeten Chemikalien von Sigma - Aldrich (Deutschland), Carl Roth (Deutschland) oder Merck (Deutschland) bezogen. Die Reinheit der Chemikalien war stets von Analysegrad. Metabolitenstandards für die Analytik wurden ausschließlich von Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde ausschließlich Reinstwasser mit $18,2 \text{ M}\Omega(\text{cm})^{-1}$ verwendet.

6.2 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 und LC 298

Der Wildstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 stammt von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland). Durch die genetische Modifikation dieses Wildstammes wurde der Lysin produzierende Stamm mit der Bezeichnung *C. glutamicum* LC 298 erzeugt [23, 24]. Die Modifikation beruht auf einer Punktmutation des Enzyms Aspartatkinase, welches im Wildstamm für die katalytische Umsetzung von Aspartat zu Aspartyl-Phosphat verantwortlich ist. Als Folge der Mutation wird die allosterische Inhibierung des Enzyms durch Lysin und Threonin unterbunden und begünstigt eine erhöhte Lysinproduktion.

6.3 Kultivierung

6.3.1 Medium

Das verwendete Fermentationsmedium und das Vorkulturmedium wurden von Frau Doinita Frank am Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik (TU Hamburg-Harburg) entwickelt. Das für die Vorkulturen verwendete Medium unterschied sich von dem in Tabelle 1 dargestellten Fermentationsmedium bei den Konzentrationen folgender Komponenten: KH_2PO_4 3,0 g/L, K_2HPO_4 13,5 g/L, Glukose 50,0 g/L und den zusätzlich enthaltenen Urea 2,0 g/L und CaCO_3 0,5 g/L.

Das für die Fütterungsphase verwendete Medium unterschied sich von dem in Tabelle 1 dargestellten Medium in der Glukosekonzentration von 500 g/L, der fehlenden Salzlösung und der Zugabe von 45 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

6.3.2 Bioreaktor

In die Anlage zur automatisierten Schnellprobennahme ist ein Bioreaktor der Firma Bioengineering (Schweiz) integriert. Bei diesem Glasreaktor handelt es sich um den Typ KLF

Tabelle 1: Batch - Fermentationsmedium für *C. glutamicum* ATCC 13032 und LC 298, ¹Gelöst in 0,1 M HCl, ² sterilfiltriert

	Komponente	Stammlösung	Endkonzentration
		[g/L]	[g/L]
Salzlösung	(NH ₄) ₂ SO ₄		15.0
	NH ₄ Cl		15.0
	Zitronensäure · H ₂ O		1.1
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O		0.5
	NaCl		2.0
	KH ₂ PO ₄		2.0
	K ₂ HPO ₄		2.0
Glukoselösung	D-Glukose	500.0	30.0
Spurenelemente ¹	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0.2	2.0 · 10 ⁻³
	MnSO ₄ · H ₂ O	0.2	2.0 · 10 ⁻³
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	50.0 · 10 ⁻³	0.5 · 10 ⁻³
	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	20.0 · 10 ⁻³	0.2 · 10 ⁻³
	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	20.0 · 10 ⁻³	0.2 · 10 ⁻³
	(NH ₄) ₆ Mo ₃ 7O ₂₄ · 4 H ₂ O	10.0 · 10 ⁻³	0.1 · 10 ⁻³
Vitamine ²	Nikotinsäure	150.0 · 10 ⁻³	3.0 · 10 ⁻³
	Thiamin HCl	80.0 · 10 ⁻³	1.6 · 10 ⁻³
	Biotin	25.0 · 10 ⁻³	0.5 · 10 ⁻³

3700 mit einem Gesamtvolumen von 3,7 L und einem Arbeitsvolumen von 2,5 L. Der Bioreaktor ist ausgehend von der Bodenplatte steril mit der Schnellprobenahme verbunden. Die Peripherie der Mess-, Steuer-, und Regeltechnik besteht aus Einheiten für pH-Wert, pO₂, Temperatur, Rührerdrehzahl, Begasungsrate, Gasmessung für O₂ und CO₂ im Abgas, und Waagen zur Bestimmung des Lauge- und Säureverbrauchs. Die so erhobenen Messdaten wurden durch das Prozessleitsystem und die gekoppelte Visualisierungssoftware der Firma Phoenix Contact (Deutschland) ausgelesen und aufgezeichnet.

6.3.3 Fed - Batch Kultivierung

Die Vorkulturen wurden mit dem in Abschnitt 6.3.1 beschriebenen Vorkulturmedium in 300 mL Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen von 30 mL kultiviert. Ausgehend von einer Cryo -Kultur wurde bei 30 °C und 250 UPM für 16 Stunden auf einem Schüttler inkubiert, um nach einem Wechsel des Mediums für weitere 8 Stunden zu inkubieren. Die

Fed -Batch Fermentation startete als Batch - Verfahren mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 L und einem variablen Inokulationsvolumen, das variabel angepasst wurde, um eine optische Dichte von 0,3 beim Start der Fermentation vorzulegen. Die Salzlösung des in Tabelle 1 dargestellten Fermentationsmediums wurde im Bioreaktor autoklaviert, wohingegen die übrigen Lösungen separat sterilisiert und anschließend steril in den Reaktor gegeben wurden. Die Temperatur der Kultivierung betrug 30 °C. Die Anfangswerte der Rührerdrehzahl von 800 UPM und der Begasungsrate von 0,5 v/v wurden fortlaufend angepasst, um einen Sauerstoffpartialdruck (pO_2 - Wert) von mindestens 40 % zu gewährleisten. Während der Phase der Fütterung wurde das in Abschnitt 6.3.1 aufgeführte Medium eingesetzt. Durch regelmäßige Kontrolle der Glukosekonzentration im Verlauf der Fütterung wurde diese unter 20 g/L gehalten. Die externe Messung der Glukosekonzentration wurde durch das Glukoseanalysegerät YSI der Firma Xylem (USA) sichergestellt. Die Kontrolle des pH-Wertes von 7,2 erfolgte mittels Titration von 2 M Phosphorsäure und 25 % Ammoniakwasser. Zur Minderung des Schaumvorkommens im Bioreaktor wurde als oberflächenaktives Polymer Struktol[®] J673 A eingesetzt.

6.4 Schnellfiltration

Die Schnellfiltration in Abschnitt 7.1 wurde nach der von da Luz et al. [29] entwickelten automatisierten Schnellfiltration durchgeführt. Es wurde keine Veränderung der dabei verwendeten Filterkombination, des Ablaufs sowie der Berechnung der Ionenstärke der Waschlösung vorgenommen. Für die darauf aufbauende Filtration, beschrieben in Abschnitt 7.1, wurde der in der Mischlösung verwendete interne Standard L-Arabinose in einer Konzentration von 2 g/L bei der Berechnung der Ionenstärke berücksichtigt.

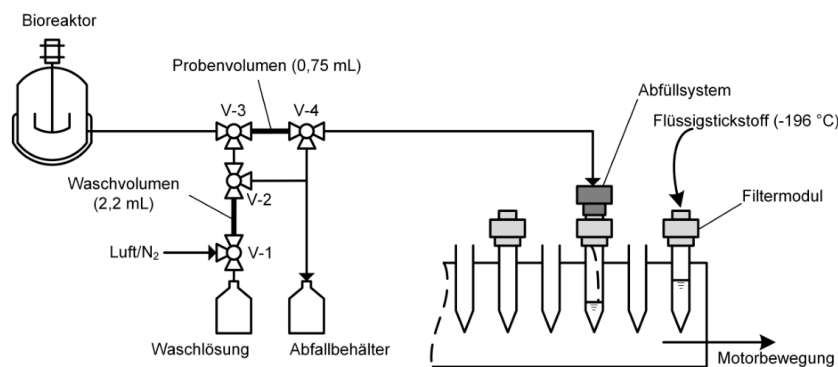


Abbildung 7: Schema der automatisierten Schnellfiltration (zur Verfügung gestellt von Julian da Luz [29])

Bei der automatisierten Schnellfiltration wird mittels Unterdruck Fermentationsbrühe aus einem Bioreaktor entnommen. Diese wird durch ein Schlauchsystem in Richtung Abfall-

behälter transportiert, wobei ein Teil des Schlauchsystems als Probenvolumen definiert ist. Zeitgleich wird in einem weiteren Schlauchsystem ein als Waschvolumen definierter Abschnitt mit der Waschlösung gefüllt. Ist das Probenvolumen mit einer aktuellen Probe aus der Kultivierung gefüllt, werden per Ventilumschaltung die Probe und die Waschlösung hintereinander mit Druckluft in Richtung des Abfüllsystems transportiert. Im dort befindlichen Filtermodul findet die Filtration statt und in einem Folgeschritt die Inaktivierung des Metabolismus der auf dem Filter befindlichen Mikroorganismen mit flüssigem Stickstoff. Diese gesamte Sequenz wird wiederholt bis alle Proben filtriert und gequench wurden. Im Anschluss werden die mit Mikroorganismen belegten Filterkombinationen bei -20 °C bis zur Analytik gelagert.

6.5 Metabolitenextraktion

Für die Extraktion intrazellulärer Metabolite wurde die von Luz et al. [30] entwickelte Methode mit geringen Anpassungen als Protokoll benutzt. Als Extraktionsmittel wurde eine Ethanollösung (75 % v/v) verwendet. Die nach der Schnellfiltration bereits in 5 mL Extraktionslösung vorgelagerten Filter wurden demzufolge nach 30 Sekunden Vortexen in einem Wasserbad bei 90 °C zum Sieden gebracht und im Anschluss 3 Minuten inkubiert. Nach anschließender Kühlung auf Eis für mindestens 3 Minuten erfolgte eine Zentrifugation bei -19 °C und 10.000 g für 10 Minuten. Die Überstände wurden filtriert ($0,22\text{ }\mu\text{m}$ PVDF Filter, Carl Roth, Deutschland) und das Protokoll durch erneute Zugabe von Extraktionsmittel noch 2 - mal wiederholt. Sämtliche Extraktionsüberstände wurden im Anschluss mittels Vakuumkonzentration (Speed-Vac RVC 2 – 25 CD, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Deutschland) bei 25 °C für 15 Stunden getrocknet. Nach der Resuspendierung der getrockneten Extrakte in 3 mL wurden diese bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

6.6 Analytik

6.6.1 Biomassekonzentration

Die Biomassekonzentrationen wurden durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 660 nm mit dem Spektrophotometer V -1200 der Firma VWR (Deutschland) bestimmt. Dabei war die Korrelation von Biomassenkonzentration und Lichtabsorption bis zu optischen Dichten von 0,6 linear. Bei höheren Zelldichten wurden die Proben mit $0,1\text{ M HCL}$ bis in den linearen Bereich verdünnt. Es wurde weiterhin eine Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse ermittelt. Dafür wurden 2 mL der Fermentationsbrühe in vorab getrockneten und gewogenen Reaktionsgefäßen der Firma

Eppendorf (Volumen 2 mL) bei 13.000 UPM 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes wurde die Probe in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Im Gesamten wurde so 3 - mal zentrifugiert und 2 - mal resuspendiert. Nach abschließender Entnahme des Überstandes lagerten die Reaktionsgefäße für mindestens 48 h bei 60 °C im Trockenschrank. Aus der anschließenden Differenz der Gewichte der Reaktionsgefäße mit und ohne Biomasse konnte die Biotrockenmasse ermittelt werden und die Korrelation zwischen optischer Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) aufgestellt werden.

Für *C. glutamicum* ATTC 13032

$$BTM = 0,343 \cdot OD \cdot g/L \quad (16)$$

Für *C. glutamicum* LC 298

$$BTM = 0,361 \cdot OD \cdot g/L \quad (17)$$

6.6.2 Bestimmung des Zellvolumens

Für die Volumenbestimmung wurden die Zellen von *C. glutamicum* LC 298 in der exponentiellen Wachstumsphase unter dem Mikroskop mit 50 -facher Vergrößerung fotografiert. 100 Zellen wurden in Länge und Durchmesser mit der Software NIS – Elements AR der Firma Nikon (USA) anschließend vermessen, wodurch sich ein mittleres Volumen von 1,29 μm^3 pro Zelle ergab.

Durch die per Zellzählung ermittelte Korrelation von Zellzahl (N_Z) zu Biotrockenmasse (BTM),

$$N_Z = 8,9 \cdot 10^{11} \cdot BTM \quad (18)$$

ergab sich ein intrazelluläres Zellvolumen von 1,15 μL pro mg Biotrockenmasse, was etwas geringer ist als die anderswo bestimmten 1,4 – 1,44 μL pro mg Biotrockenmasse [29, 93].

6.6.3 Bestimmung von Alkoholen, organischen Säuren, Zuckern und Glycerin mittels HPLC

Die Bestimmung und Quantifizierung von Alkoholen, organischen Säuren, Zuckern und Glycerin wurde mit einer HPLC Analyse durchgeführt. Diese erfolgte mit einer HPLC (Kontron, Deutschland) und einer Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland) bei 60 °C. Die Detektion erfolgte durch UV-Detektion bei 210 nm und Refraktionsindexdetektion. Als mobile Phase wurde 0,005 M H_2SO_4 bei

einer Flussrate von $600 \mu\text{L min}^{-1}$ verwendet. Das Injektionsvolumen betrug $20 \mu\text{L}$, aus einer zuvor steril filtrierten Probe. Waren Konzentrationen einzelner Bestandteile größer als 5 g/L in der Probe zu erwarten, wurde eine Verdünnung mit Reinstwasser durchgeführt. Die Elution der oben genannten Stoffe benötigte 30 Minuten.

6.6.4 Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC

Zur Bestimmung von intrazellulären Aminosäuren der Filterextrakte mittels HPLC wurde eine Derivatisierung der Aminogruppen mit der AccQ-Tag Methode der Firma Waters (USA) durchgeführt. Das Handling der Proben zur Derivatisierung erfolgte dabei nach den Vorgaben des Herstellers. Als HPLC System diente eine Dionex Ultimate-3000 der Firma Thermo Scientific (Deutschland). Im Autosampler des Systems wurden die derivatisierten Proben 4 C bis zur Analyse gelagert, wobei das Injektionsvolumen pro Analysedurchgang $10 \mu\text{L}$ betrug. Die derivatisierten Proben wurden mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert, bei Konzentrationen über $50 \mu\text{M}$. Eine Detektion im Konzentrationsbereich von $0,01 \mu\text{M}$ - $50 \mu\text{M}$ erfolgte mittels Fluoreszenz (Ex: 250 nm , Em: 395 nm). Als interner Standard zur Kontrolle der Effizienz der Derivatisierung diente α -Aminobutyrat. Bei der Trennung wurde eine Kinetex RP Säule ($2,6 \mu\text{m}$, C18, $100 \times 4,6 \text{ mm}$) der Firma Phenomenex (USA) verwendet. Die Temperatur und die Gesamtflussrate des binären Gradienten betragen $45 \text{ }^\circ\text{C}$ und $1000 \mu\text{L min}^{-1}$. Die Änderung des Gradienten verlief linear und ist in Tabelle 2 dargestellt. Als Eluent A wurden 140 mM Natriumacetat mit $0,1 \text{ } \%$ v/v Acetonitril und als Eluent B $60 \text{ } \%$ v/v Acetonitril verwendet. Für die Analyse der Aminosäuren im Fermentationsüberstand wurde, im Gegensatz zu den Filterextrakten, vor der Derivatisierung eine Proteinfällung durchgeführt. Dadurch sollte verhindert werden, dass die darin enthaltenen Proteine derivatisiert werden und zu fehlerhaften Ergebnissen bei der Messung der freien Aminosäuren führen. Für die Proteinfällung wurden die Proben im Verhältnis $1 : 1$ mit $20 \text{ } \%$ Trichloressigsäure vermischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 UPM und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zur Abtrennung des Proteinpräzipitats, erfolgte die Anpassung des pH-Wertes im Überstand mit Natronlauge auf $\text{pH } 7 - 8$, sowie eine Filtration ($0,2 \mu\text{m}$, Zelluloseacetat, Carl Roth, Deutschland) zur Abtrennung verbliebener Partikel. Die Proben wurden nach der Proteinfällung ebenfalls derivatisiert.

6.6.5 Bestimmung von Glycerin mittels HPIC

Zur Messung von Glycerin im Konzentrationsbereich von $0,01 \text{ g/L}$ - $0,1 \text{ g/L}$, also unterhalb der Sensitivität der HPLC - Methode in Abschnitt 6.6.3, wurde eine amperometrische Detektion mittels Ionenchromatographie herangezogen. Als HPIC - System diente ein ICS-

Tabelle 2: Gradient für die Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC

Zeit [min]	Eluent B [%]
0.0	0.0
1.0	5.0
40.0	6.6
40.5	9.2
46.0	12.0
47.0	17.0
54.0	27.0
57.5	29.4
62.0	31.5
65.0	100.0
80.0	100.0
82.0	0.0
90.0	0.0

3000 Ionenchromatographie System (Dionex, Thermo Scientific, Deutschland) mit einer CarboPac PA 100 Säule (Dionex, Thermo Scientific, Deutschland). Die Trennung erfolgte über einen binären Gradienten bei einer Flussrate von $250 \mu\text{L min}^{-1}$, einer Temperatur von $30 \text{ }^\circ\text{C}$ bei einem Injektionsvolumen von $10 \mu\text{L}$. Die Änderungen des Gradienten verlief linear und ist in Tabelle 3 dargestellt. Als Eluent A wurden 75 mM Natronlauge und als Eluent B 75 mM Natronlauge mit 500 mM Natriumacetat verwendet.

Tabelle 3: Gradient für die Bestimmung von Glycerin mittels HPIC

Zeit [min]	Eluent B [%]
0.0	0.0
23.0	7.0
28.0	100.0
33.0	100.0
35.0	0.0
40.0	0.0

6.6.6 Simulation des Gasverhalten im Entnahmesystem

Die Simulationen zum Verhalten der Fluide Luft und Wasser im Verbindungsstück des Schlauchsystems der Anlage zur Schnellprobennahme wurden mit der Toolbox Mehrphasenströmung der Software Comsol Multiphysics durchgeführt.

6.7 Herstellung des Spiralseparators

6.7.1 Design

Den Designüberlegungen lagen strömungsdynamische Simulationen zur Fluidbewegung und in der Literatur etablierte Parameter zur Partikelbewegung zugrunde. Diese mündeten in einem Spiralseparator basierend auf einer archimedischen Spirale mit einem Innenradius von $440\ \mu\text{m}$, einer Kanalhöhe von $20\ \mu\text{m}$ und einer Kanalbreite von $60\ \mu\text{m}$, bei den Kanallängen von 3,14 und 7,14 mm. Bei der Dimensionierung wurden Druckunterschiede zwischen den Eingängen vermieden.

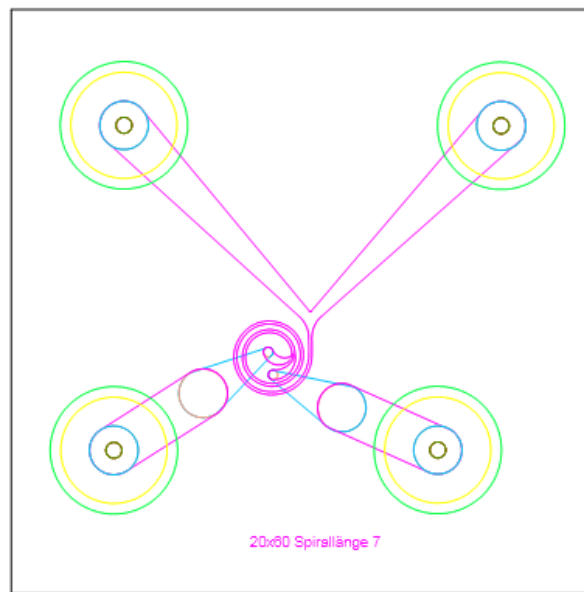


Abbildung 8: Komplettes Design der Spirale für eine Kanallänge von 7,14 mm. Dargestellt sind neben der Spirale auch die vertikal durch das Silizium und das Borosilikatglas verlaufenden Zu- und Abgänge (in blau) mit den entsprechenden Vertiefungsstrukturen (gelb und grün) für die Fixierung der Aderendhülsen zum Anschluss der PEEK - Schläuche. (zur Verfügung gestellt von Sven Bohne, Institut für Mikrosystemtechnik der TUHH)

6.7.2 Photolithografische Masken und Mikrosystemfertigung

Das Layout der photolithographischen Masken wurde mit Hilfe der Autodesk AutoCAD Software Version 2011 entworfen. Nach dem Entwurf der kompletten Geometrie wurden die einzelnen Komponenten separat in ein Masterlayout übertragen. Ausrichtungsmarken innerhalb des Masterlayouts dienten zur exakten Ausrichtung der einzelnen Ebenen bei Ätz- und Bondingverfahren während der Herstellung des Spiralseparators. Die Filmmasken wurden von der Firma JD Phototools (UK) hergestellt.

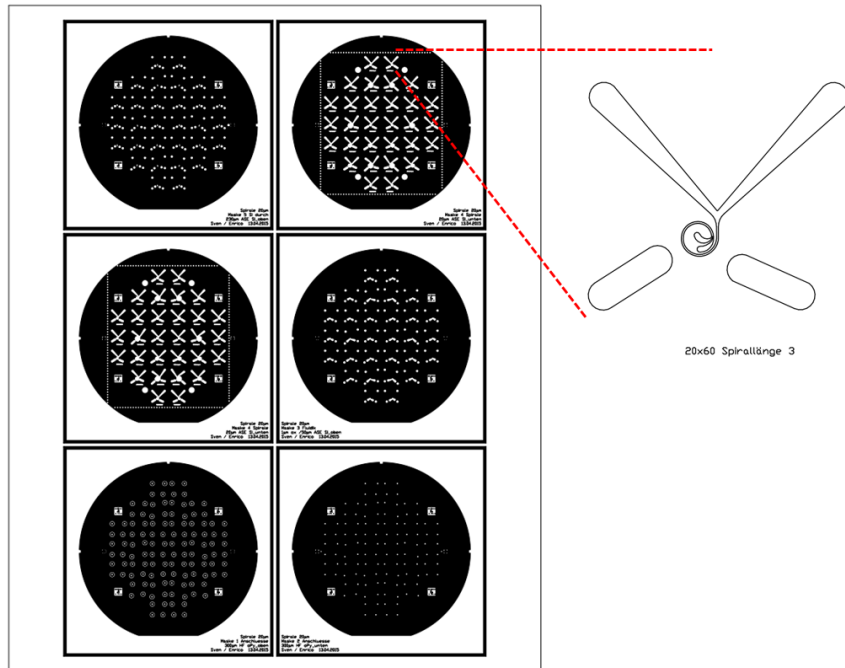


Abbildung 9: Masken checkplot mit einer Detaildarstellung der 3 mm Spirale. Die 6 Einzelmasken stellen die verschiedenen Layer der geätzten Geometrie dar, also neben der im Detailausschnitt herausgestellten Spirale auch die vertikalen und horizontalen Kanäle der Zu- und Abgänge. (zur Verfügung gestellt von Sven Bohne, Institut für Mikrosystemtechnik der TUHH)

Die Herstellung der Separatoren erfolgte durch Mitarbeiter im Institut für Mikrosystemtechnik der TU Hamburg - Harburg. Dabei wurden die Strukturen in Borosilikatglas und Silizium mittels Nassätzverfahren eingearbeitet. Die Verbindung (Waferbonding) der beiden Materialien erfolgte über das Prinzip des anionischen Bondings.

6.7.3 Anschluss des Spiralseparators

An den Ein- und Ausgängen wurden an den vorgesehenen Vertiefungen Aderendhülsen (AEH) aufgesetzt und mit 2 Komponenten Epoxidleim befestigt. In den AEH der Eingänge wurden PEEK Schläuche ebenfalls mit Epoxidleim befestigt und mit 3 mL Spritzen verbunden. Die Volumenströme von $10 \mu\text{L}/\text{min}$ bis $200 \mu\text{L}/\text{min}$ wurden mit den Spritzenpumpen ALLADIN Z 220 der Firma WPI Systems ermöglicht.

Während der Vorbereitung des Systems auf die folgenden Versuche wurde das System für jeweils 5 Minuten mit einer Acetonlösung, Wasser mit Tween[®] 80 (0,01 %v/v) und anschließend mit Wasser gespült. So wurden Einflüsse durch eventuelle Verunreinigungen innerhalb der Mikrostruktur minimiert.



Abbildung 10: Spiralstruktur nach dem Ätzen und Bonden (zur Verfügung gestellt von Sven Bohne, Institut für Mikrosystemtechnik der TUHH)

6.8 Charakterisierung der Strömungs- und Partikelbewegung

6.8.1 Fluorophor und Mikropartikel

Zur Visualisierung der Fluidbewegung wurde eine Calceinlösung $50 \mu\text{M}$ benutzt. Das Absorptionsmaximum von Calcein liegt bei 494 nm und das Emissionsmaximum bei 517 nm . Der Diffusionskoeffizient von Calcein bei 20°C beträgt $3,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$. Bei einer minimalen Geschwindigkeit innerhalb des Spiralseparators von $0,3 \text{ m/s}$ war somit sichergestellt, dass diffusive Vorgänge während der Kontaktzeit im Kanal keinerlei Einfluss hatten. Aufgrund der maximalen Reynoldszahl von 125 war jederzeit von einer laminaren Strömung auszugehen. Die eingesetzten fluoreszierenden Mikropartikel der Größen $1 \mu\text{m}$ (blau), $2 \mu\text{m}$ (grün) und $3,2 \mu\text{m}$ (rot) wurden als 10 mL Suspensionen mit 1% Feststoff von Distrilab (Niederlande) bezogen und gemäß den Vorgaben des Herstellers auf die jeweils verwendeten Partikelkonzentrationen mit Wasser verdünnt. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung des λ - Parameters von Di Carlo et al. [33] (Gleichung 19) hergestellt.

$$\lambda = \frac{6 \cdot W \cdot H \cdot V_f}{\pi \cdot a^2} \quad (19)$$

Die verwendeten λ von $0,1$, $0,5$ und 1 und den äquivalenten Partikelkonzentrationen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Zur Unterbindung von Agglomeration der Partikel aufgrund der Verdünnung wurde das Polysorbat Tween[®] 80 zugegeben ($0,01 \%$ v/v).

Tabelle 4: Partikelkonzentrationen

Partikeldurchmesser [μm]	λ [-]	Konzentration [Partikel/mL]
3,2	0.1	$2.6 \cdot 10^7$
	0.5	$1.3 \cdot 10^8$
	1.0	$2.6 \cdot 10^8$
2	0.1	$1.1 \cdot 10^8$
	0.5	$5.3 \cdot 10^8$
	1.0	$1.1 \cdot 10^9$

6.8.2 Mikroskop

Das verwendete Nikon C1 Konfokal Fluoreszenz Mikroskop besitzt eine motorisierte und dreidimensional bewegliche Tischplatte, an welcher der Spiralseparator befestigt wurde.

Tabelle 5: Filterblöcke und Wellenlängen für die Fluoreszenzmessungen

Filterblock	Absorption [nm]	Emission [nm]
DAPI	340-380	435-485
B-2A	450-490	520
G-2A	510-560	590

Das für die Konfokalmikroskopie genutzte Lasersystem emittierte Wellenlängen von 405 nm (violett), 488 nm (blau) und 543 nm (grün).

6.8.3 Bildauswertung

Vor der Auswertung der Fluoreszenzspektren der verschiedenen Versuchsreihen mit der Software MATLAB der Firma MathWorks (USA) wurden die fotografischen Aufnahmen mit Hilfe von Matlabs Computer Vision System Toolbox aneinander ausgerichtet und anschließend die Intensitätsprofile an verschiedenen Punkten ausgewertet.

6.8.4 Simulation des Fluidverhalten im Spiralsystem

Die Simulationen zum Verhalten der Fluide in einer Spirale wurden mit der Software Comsol Multiphysics durchgeführt. Die dafür benötigten dreidimensionalen Geometrien einer Spiralförmigkeit wurden mit der CAD Software AutoCAD der Firma Autodesk konstruiert.

7 Ergebnisse und Auswertung

7.1 Schnellfiltration bei höheren Zelldichten

7.1.1 Charakteristika der automatisierten Schnellfiltration / Einflussfaktoren bei höheren Biomassekonzentrationen

Diese Arbeit stellt eine Fortführung der Etablierung der Schnellfiltration dar, welche von Julian da Luz in mikrobiellen Kultivierungen bis zu Biomassekonzentrationen von 10 g/L initiiert wurde [28, 29, 30].

In diesem Abschnitt wird die Anlage zur automatisierten Schnellfiltration im Institut für Bioprocess- und Biosystemtechnik für die Probennahme bei zunehmenden Biomassekonzentrationen über 10 g/L untersucht. Aus den zu erreichenden Biomassekonzentrationen ergeben sich Unterschiede zu den bisher abgebildeten Kultivierungsszenarien innerhalb der Anlage, welche ihrerseits wiederum Einfluss auf den Filtrationsvorgang darstellen können. So kann eine konstante pH - Regelung und die Zugabe an hochkonzentriertem Medium im Rahmen einer Fütterungsstrategie in einer veränderten Ionenstärke des Fermentationsmediums resultieren und eine fortwährende Anpassung der Waschlösung zur Filterkuchenwaschung erfordern. Des Weiteren führen unterschiedliche Wachstumsraten und Stresssituationen möglicherweise zu einer veränderten Morphologie der Mikroorganismen. Außerdem kann durch das Exprimieren von Proteinen, entweder aufgrund der gewollten Produktion oder durch Zellyse während der verlängerten Kultivierungsdauer, die Schaumbildung verstärkt und stabilisiert werden, was ebenfalls einen Einfluss auf die Filtration und die Filterkuchenwaschung darstellen kann.

Im Folgenden werden daher die aufgezählten Einflüsse und Veränderungen in verschiedenen Kultivierungen charakterisiert.

- Ionenstärke

Mikroorganismen befinden sich wie alle Organismen in einer ständigen Anpassung an ihre direkte Umgebung. Sie reagieren dabei mit ihrer Oberflächenstruktur, also der Membran, und ihrem Metabolismus, sprich ihren Stoffwechselfvorgängen, auf die sich ergebenden Veränderung. Im Falle einer Fermentation ist diese Umgebung das Kultivierungsmedium. Die möglichen veränderlichen Parameter sind Temperatur, Ionenstärke, der pH - Wert, die Versorgung mit Nährstoffen und im Falle einer aeroben Kultivierung die Sauerstoffsättigung. Wie in Abschnitt 5.1.1 bereits dargelegt, sind die Temperatur und die Ionenstärke die veränderlichen Parameter, die den größten Einfluss auf die Schnellprobennahme haben, wenn der Fokus auf der Quantifizierung der intrazellulären Metaboliten liegt, wie in dieser Arbeit

geschehen. Sowohl eine Temperaturänderung als auch eine Veränderung der Ionenstärke der Umgebung führen aufgrund der Leckage durch die Membran (*cell leakage*) zu einem Verlust an Metaboliten. Bei der Filtration wird das Medium während des Waschvorganges mit einer Waschflüssigkeit ersetzt. Die Anpassung der Waschflüssigkeit an genau diese beiden Parameter ist erforderlich, um das *cell leakage* größtmöglich zu minimieren. Die konstante Fermentationstemperatur ist bei der Waschlösung relativ einfach anzupassen. Die Ionenstärke wird bei allen bisherigen Untersuchungen lediglich am Ausgangsmedium orientiert angepasst und über den Fermentationszeitraum nicht wiederholt überprüft, siehe Abschnitt 5.1.2.

Während einer Fermentation mit dem Ziel höhere Zelldichten oder in hohem Maße exprimierte Produkte zu erreichen, wie zum Beispiel Aminosäuren, ergeben sich zwangsläufig Unterschiede zu den in der Literatur durchgeführten Schnellfiltrationen für metabolische Stoffwechseluntersuchungen. Die Kultivierungen wurden hierbei hauptsächlich in Schüttelkolben bis zu einem maximalen Volumen von 500 mL [11] und die Satzfermentationen bis zu einer Biomassekonzentration von 10 g/L [28] durchgeführt. Die Waschlösung, wie schon angesprochen, wird dabei konstant beibehalten. Die beständige pH-Regelung ist neben der Zugabe von hochkonzentriertem Nährmedium der wichtigste äußere Einfluss, der die Ionenkonzentration im Reaktor verändert, während die Bildung und Exkretion von Produkten eine Veränderung der Lösung aus der Fermentation heraus bedeutet. Inwiefern sich dies auf die Auslegung der Waschlösung auswirkt, soll im folgenden Abschnitt geklärt werden.

Messbar ist die Ionenstärke einer Flüssigkeit nur indirekt über eine Korrelation zur elektrischen Leitfähigkeit. Diese Korrelation kann anhand eines linearen (DIN 38404-C10R3 (1995)) oder eines pseudo – linearen Ansatzes [73] erfolgen. Die Übereinstimmung der vorab berechneten Ionenstärke des Fermentationsmediums mit den gemessenen Leitfähigkeiten und korrelierten Werten ist über den linearen Ansatz größer als über den pseudo – linearen Ansatz, weshalb dieser Ansatz im Folgenden verwendet werden soll, siehe Gleichung 20. Die Einheit der Ionenstärke I ist in mol/L und die elektrische Leitfähigkeit LF in $\mu S/cm$ angegeben.

$$I = 1,6 \cdot 10^{-5} \cdot LF \quad (20)$$

Die elektrische Leitfähigkeit ist temperaturabhängig. Um eine Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Temperaturen zu ermöglichen, wird daher eine Standardisierung auf den Wert bei 25 Grad Celsius [116] mit den folgenden Parametern vorgenommen:

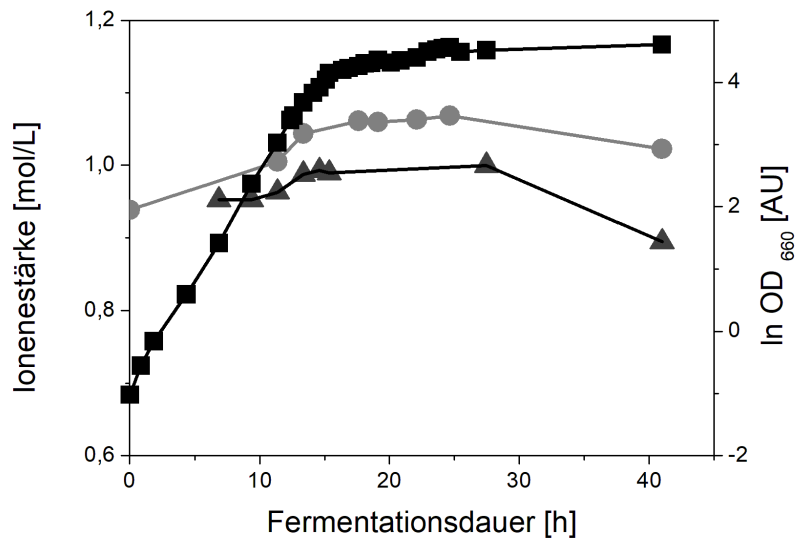


Abbildung 11: Verlauf der Ionenstärke während einer Batch - Fermentation von *C. glutamicum* (ATCC 13032) für das Fermentationsmedium inklusive der Organismen ▲ und für das Fermentationsmedium ohne Organismen (nach der Zentrifugation) ●. Das mikrobielle Wachstum während der Kultivierung ist als Logarithmus der optischen Dichte dargestellt ■.

$LF_{25} = 1,125 \cdot 10^{\frac{-A}{B}} \cdot LF$, $A = 1,37023 \cdot (T - 20) + 8,36 \cdot 10^{-4} \cdot (T - 20)^2$ und $B = 109 + T$. Die verwendete Einheit der Temperatur T ist in diesem Zusammenhang Grad Celsius.

Zu sehen ist in Abbildung 11 der Verlauf der Ionenstärke, respektive der elektrischen Leitfähigkeit für eine Kultivierung im Satzmodus. Die Ergebnisse stellen die Messung einer Lösung direkt aus dem Fermenter dar, also Medium und Bakterien gemeinsam, sowie die Messung des Mediums nach der Abtrennung der Mikroorganismen durch Zentrifugation. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur über 10 min bei 10000 Umdrehungen. Trotz gleicher Tendenzen beim Verlauf sind die Messwerte nach der Abtrennung der Organismen höher. Die Ursache dafür findet sich bei der Leitfähigkeit der Organismen. Die mikrobielle Zellwand besitzt eine effektive Oberflächenleitfähigkeit, deren Wert, zum Beispiel beim gramnegativen *E. coli*, auch unter dem des umgebenden Mediums liegen kann [21]. Betrachtet man die Organismen als Ionen, kann für die Diskrepanz in oben gezeigten Daten die Ionenäquivalentleitfähigkeit herangezogen werden. Die äquivalente Leitfähigkeit nimmt mit steigendem Radius und zunehmender Konzentration der Ionen ab [116]. Aufgrund des Größenunterschiedes zwischen Ionen des Mediums und Mikroorganismen besitzen letztere eine geringere Leitfähigkeit und reduzieren somit die Leitfähigkeit der Lösung, was sich aufgrund der oben dargelegten Korrelation in einer verringerten Ionenstärke darstellt, siehe Abbildung 11.

Der Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit des Mediums und somit der Ionenstärke während der exponentiellen Wachstumsphase im Bereich von 10 bis 20 Stunden um ca. 14 %, bedeutet eine Zunahme der leitfähigen Ionen. Die zur pH - Wert Regelung zugegebenen Ammoniumionen in Form des als Base verwendeten Ammoniumwassers haben einen eher geringeren Einfluss auf die Leitfähigkeit [116], sodass die Zunahme auf die Sekretion von gebildeten Produkten [90] in Form von extrazellulären Aminosäuren zurückgeführt werden kann. Eine Zuführung von Nährmedium erfolgt im Satzbetrieb nicht, wodurch dieser Einfluss hier nicht berücksichtigt werden muss. Dass die Leitfähigkeit der Lösung inklusive der Bakterien ebenfalls ansteigt, kann darauf zurückgeführt werden, dass bei ansteigender Leitfähigkeit der Umgebung ebenfalls die Leitfähigkeit der Zellwand erhöht wird [21].

Gegen Ende der Kultivierung zeichnet sich eine Abnahme der Leitfähigkeit ab, bei der Fermentationsbrühe inklusive der Bakterien in einem stärkeren Maße als bei der Fermentationsbrühe ohne Bakterien. Dieser Unterschied kann vor allem auf die Veränderung der elektrischen Eigenschaften der Zellwand zurückzuführen sein, welche stark durch die Kultivierungsparameter und die Dauer der Fermentation beeinflusst werden [74]. Die geringere Abnahme Leitfähigkeit des Mediums lässt darauf schließen, dass aufgrund von Zellyse Stoffe sekretiert werden und für eine höhere Leitfähigkeit verantwortlich sind. Im Allgemeinen ist nicht auszuschließen, dass die Messwerte der Proben nach der Zentrifugation ebenfalls durch den Verlust an intrazellulären Stoffen (*cell leakage*) fehlerbehaftet sind [21]. Dennoch nimmt auch hier die Leitfähigkeit ab, was vermuten lässt, dass eine Aufnahme der in der Fermentationsbrühe gelösten Ionen durch die Mikroorganismen stattfindet.

Hat die Zellkonzentration auch keinen direkten Einfluss auf die elektrische Leitfähigkeit [90], führt der verringerte Abstand der Ionen und deren Hydrathüllen zu einer stärkeren elektrostatischen Anziehung und einer stärkeren Stokesschen Reibung zwischen den Ionen [116], was die Leitfähigkeit der Lösung schließlich wiederum reduziert.

Abbildung 12 zeigt, dass sich die Dauer einer Kultivierung auf die Ionenstärke des umgebenden Mediums auswirkt und die Biomasse nur indirekt einen Einfluss darauf hat. Bei einer Fermentationsdauer von 11,5 h und einer maximalen Biomassekonzentration von 10 g/L ergibt sich lediglich eine Veränderung der Ionenstärke von 2,85 %. Somit kann eine Erhöhung der Ionenstärke, dargestellt anhand der elektrischen Leitfähigkeit, auf eine Produktanreicherung in der Kultivierungsbrühe zurückgeführt werden [27].

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass eine fortlaufende Anpassung der Ionenstärke der Waschlösung bei mikrobiellen Schnellfiltrationen für Fermentationen mit Biomassekonzentrationen oberhalb von 10 g/L und einer gleichzeitigen Exkretion von Metaboliten

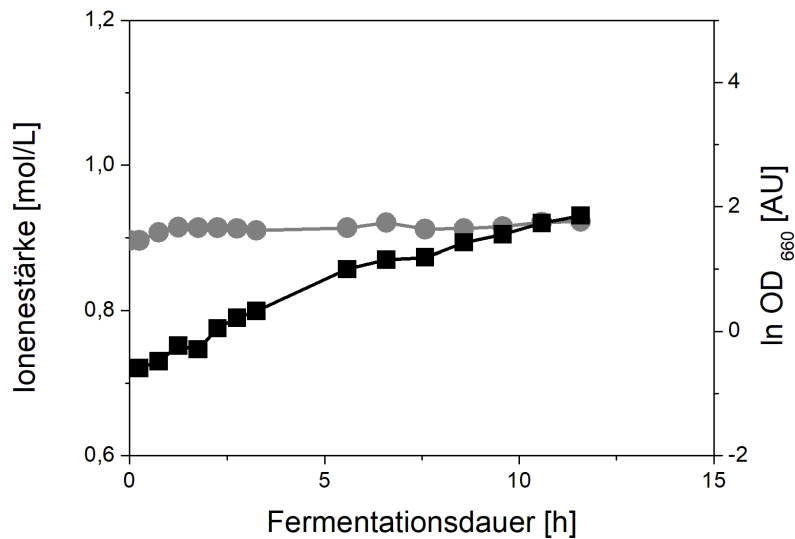


Abbildung 12: Verlauf der Ionenstärke während einer Batch - Fermentation von *C. glutamicum* (ATCC 13032) für das Fermentationsmedium ohne Organismen ●. Das mikrobielle Wachstum während der Kultivierung ist als Logarithmus der optischen Dichte dargestellt ■.

in das umgebende Medium notwendig erscheint. Dies gilt insbesondere für Mikroorganismen, welche von aufgrund der Veränderung dieses Parameters einen signifikanten Verlust an intrazellulären Metaboliten aufweisen, allen voran gramnegative Mikroorganismen [11]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine technische Umsetzung für eine kontinuierliche Messung und Anpassung der Ionenstärke etabliert werden.

- Einfluss der Schaumbildung auf die Schnellfiltration

In Abschnitt 5.1.3 wurde bereits ausgeführt, wo die Ursachen für eine Schaumbildung während einer mikrobiellen Kultivierung im Bioreaktor liegen. Im folgenden Teil soll das beobachtete Vorkommen und Entstehen von Schaum bei einer Fed - Batch Fermentation von *C. glutamicum* diskutiert sowie die Beeinflussung der Filtration aufgrund einer chemischen Methode zur Schauminderung quantifiziert werden.

Die fotografischen Aufnahmen in Abbildung 14 zeigen eine erhöhte Schaumbildung während der Kultivierung von *C. glutamicum* ATCC 13032 im Laborfermenter der RSU. Die beiden Aufnahmen links und in der Mitte zeigen den Zustand bei eingeschaltetem Rührer während der Fermentation bzw. kurz nach dem Abschalten und die rechte Aufnahme den Zustand eine halbe Stunde später. Es ist erkennbar, dass durch die Ausbildung des Schaumes der gesamte Kopfraum des Reaktors gefüllt wird. Um ein Übersäumen zu verhindern wurde diskontinuierlich Kulturbrühe entnommen, sodass der Flüssigkeitsanteil gegen Ende

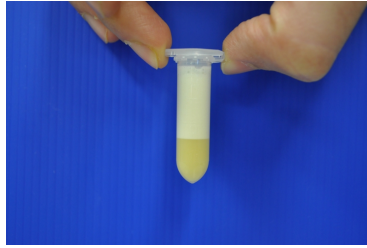


Abbildung 13: Schaumanteil in einer manuellen Probenentnahme aus der Kultivierung von *C. glutamicum* (ATCC 13032)

der Fermentation ca. 50 - 60 % des Anfangsvolumens betrug. Das Volumen des Schaumes stellte eine halbe Stunde nach Ende der Fermentation und dem damit verbundenen Abstellen des Rührers und des Sauerstoffeintrages immer noch ca. 70 % des Gesamtvolumens dar. Daraus ist abzuleiten, dass es sich hierbei um eine stabile Form der Schaumbildung handelt.

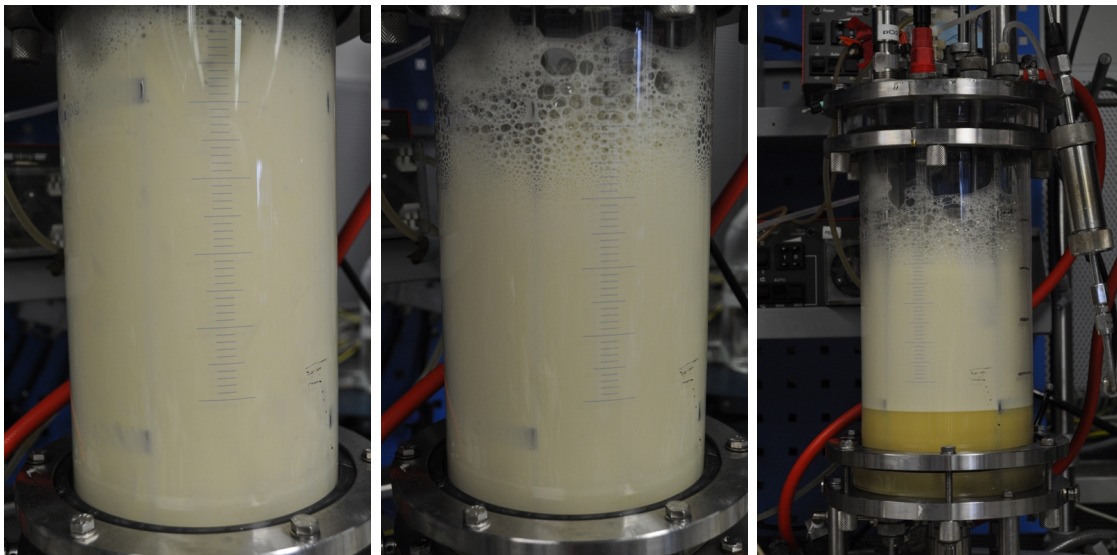


Abbildung 14: Schaumbildung während einer Hochzelldichtekultivierung von *C. glutamicum* (ATCC 13032), Links und in der Mitte während der Fermentation, Rechts 30 min nach Ende der Kultivierung und Ausstellen des Rührers

Zur Vermeidung des Übersäumens der Kulturbrühe werden zumeist chemische Antischaummittel eingesetzt, siehe Abschnitt 5.1.3. Jedoch entwickeln vor allem die allgemein angewandten chemischen Antischaumpolymere ihrerseits einen relevanten Einfluss auf die Filtration. Dies liegt vor allem an der hohen Viskosität, dem Kontaktwinkel zur Membran, der Tropfengrößenverteilung sowie der Adhäsion an das Membranmaterial. Kleinere Tropfen des Antischaummittels können in die Membran eindringen und zu einem höheren Membranwiderstand führen [67]. So ist in Abbildung 15 die Gesamtfiltrationsmenge für

verschiedene Konzentrationen des für die Fermentation verwendeten Antischaummittels Struktol J 673 A dargestellt. Die Konzentrationen wurden hierfür in 2 L Wasser im Reaktor vorgelegt und die Filtrationen im Anschluss durchgeführt. Die Ergebnisse beinhalten auf der Ordinate die summierten Volumina von Probe aus dem Reaktor und Waschlösung. Sie zeigen eine Abnahme des filtrierten Wassers um 5 bzw. 25 % bei einer Erhöhung der Konzentration von 0 auf 2,5 und anschließend auf 5 mL/L, wie sie ebenfalls von Liew et al. [67] für silikonhaltige Antischaummittel beobachtet werden konnte. Statistisch stellt sich die Veränderung zwischen 0 und 7,5 mL/L des eingesetzten Silikonöls aber nicht als stark signifikant dar ($p = 0,26$). Im Mittel werden zwischen einigen Tropfen bis zu 3 mL innerhalb einer kompletten Fermentation von ATCC 13032 und LC 298 in den Laborreaktor gegeben, je nach Schaumbildung. Bei einem Startvolumen der Fermentation von 2 Litern liegt die Konzentration unterhalb der angegebenen Werte aus Abbildung 15. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass durch die notwendige Volumenreduzierung während der Fermentation eine Aufkonzentrierung im Medium erfolgen kann.

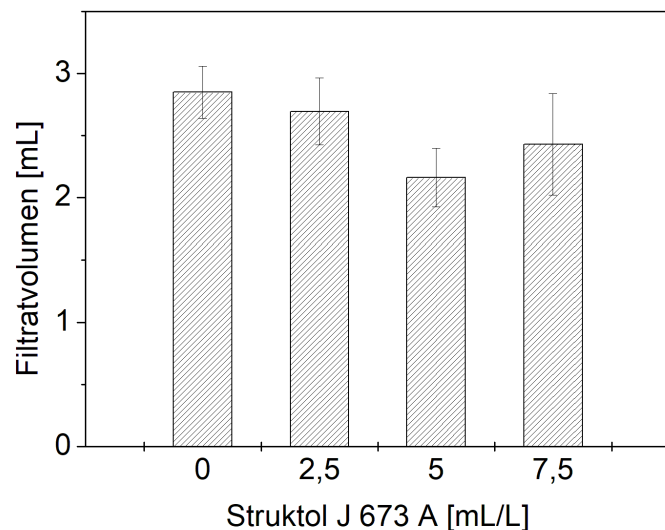


Abbildung 15: Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des silikonhaltigen Antischaummittels Struktol[®] J 673 A auf die automatisierte Schnellfiltration

Trotz Einsatz eines Antischaummittels zur Vermeidung eines Überschäumens, beeinträchtigt der stabile Schaum den Flüssigkeitsanteil innerhalb des Probenvolumens der Schnellfiltration, was sich leicht anhand einer manuellen Probennahme in Abbildung 13 darstellen lässt und durch die Daten in Abbildung 16 bestätigt wird. Dabei ist zu erkennen, dass das filtrierte Probenvolumen bei einer Kultivierung bis zu einer optischen Dichte von 100, was einer Biomassekonzentration von 35 g/L entspricht, signifikant abnimmt ($p = 0,02$).

Vergleicht man die Veränderung des Probenvolumens im Bereich optischer Dichten bis 30, zeigt sich ebenfalls eine signifikante Abnahme ($p = 0,03$). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Probenvolumen der Anlage (RSU) auch bei niedrigen Biomassekonzentrationen beeinflusst wird. Dieser Einfluss wurde jedoch nicht in den vorangegangenen Arbeiten über die Schnellfiltration der RSU betrachtet. Die gleichzeitige Zunahme der Biomasse und des damit einhergehenden Volumens innerhalb der Probe kann anhand des Zellvolumens bestimmt werden, siehe Abschnitt 6.6.2. Das Volumen der Biomasse einer Probe bewegt sich danach im Bereich von $9,17 \mu\text{L}$ ($OD_{660} 30$) bis $16,1 \mu\text{L}$ ($OD_{660} 100$) und kann somit als Grund für die Abnahme des bestimmten Probenvolumens ausgeschlossen werden.

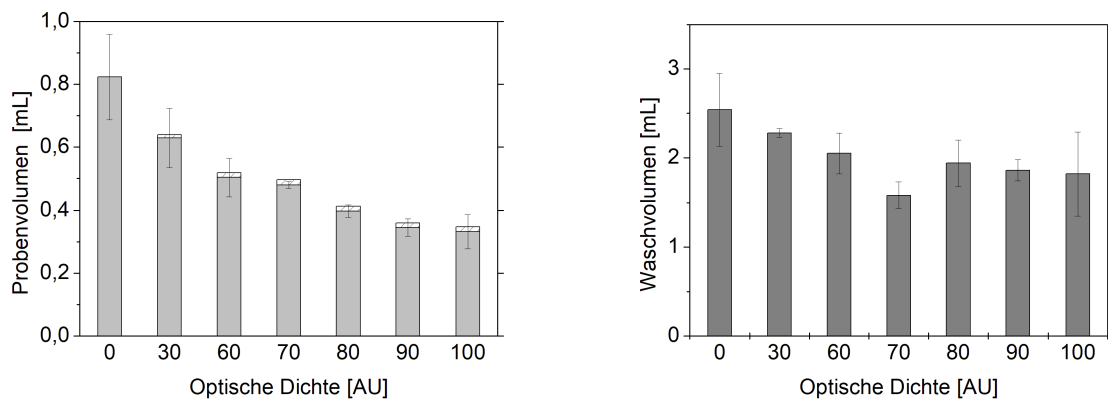


Abbildung 16: Verlauf des filtrierten Probenvolumens \blacksquare , des Volumens der zugehörigen filtrierten Biomasse \square sowie das Volumen der filtrierten Waschlösung \blacksquare einer Batch - Kultivierung von *C. glutamicum* (ATCC 13032)

Weiterhin zeigt sich über den gesamten Fermentationszeitraum eine Abnahme der Waschlösung um fast 30 % im Filtrat, siehe Abbildung 16. Dabei ist die Abnahme im Bereich bis zur optischen Dichte von 30 nicht signifikant ($p = 0,34$), was mit den Daten von da Luz et al. [29] übereinstimmt (*ATCC 13032*, $OD_{660} = 38$, $p = 0,46$). Jedoch ändert sich dies im weiteren Verlauf bis zur $OD_{660} = 90$ zu einer signifikanten Abnahme ($p = 0,008$). Im nachfolgenden Reinigungsschritt für das Leitungssystem, dem sogenannten Flush, ist keine Volumenzunahme erkennbar. Die Differenz der Waschlösung befindet sich somit nicht im Leitungssystem und muss daher auf dem Filter oder im Filtergehäuse zu finden sein. Daraus lässt sich schließen, dass der höhere Luftanteil aufgrund des Schaumes Bereiche provoziert, in denen ein Kapillardruck verhindert, dass die Waschlösung den Filterkuchen oder auch die Poren der Porenmembran durchströmt.

Ein weiterer Grund für die Abnahme der Waschlösung könnte in der Kombination aus zunehmender Biomasse und Konstruktion des Filtergehäuses zu vermuten sein. Der Ein-

tritt der zu filtrierenden Flüssigkeiten wird aufgrund des geringen Austrittsquerschnitts des Schlauches im Filtergehäuse und des geringen Abstandes von Austritt und Filteroberfläche nur auf einen kleinen Abschnitt der Filteroberfläche gegeben. Es erfolgt keine großflächige Verteilung der Probe auf der gesamten Filteroberfläche, sodass eine Zunahme des Filterkuchens eine Erhöhung des Strömungswiderstandes bedeutet, auch wenn sich das Volumen der Biomasse durch die Abnahme des Probenvolumens ab einer optischen Dichte von 30 nahezu konstant verhält, siehe Abbildung 16.

Das Waschverhältnis, das Verhältnis von Waschlösung zu Probe, wird durch das ebenfalls verringerte Probenvolumen nicht geringer, sondern erhöht sich von 3 auf 5. Die Qualität der Filterkuchenwaschung würde somit zunehmen, die Restmenge an Medium auf dem Filter abnehmen. Die Überprüfung dieser Vermutung erfolgt in Abschnitt 7.1.4.

7.1.2 Ansatz zur Quantifizierung der Einflussfaktoren

- Zweiphasenströmungen

Per Definition ist Schaum eine Dispersion von Gas in einer flüssigen Phase, siehe Abschnitt 5.1.3. Dieses Volumen an eingeschlossener Luft stellt eine Beeinträchtigung der Filtration dar, da Fluid und Luft wechselseitig die Poren der Filterstruktur oder des Filterkuchens durchströmen. Die daraus entstehende Kapillarspannung bedingt, dass Wasser den Filter nicht passieren kann und somit die Qualität der Filtration gemindert wird. Damit kann ein größerer Anteil an Restmedium auf und in dem Filter oder dem Filterkuchen verbleiben und die anschließende Bestimmung intrazellulärer Metaboliten wird verfälscht.

Anhand von Simulationen soll nun versucht werden, zu identifizieren wie sich der Luftanteil im bestehenden Entnahmesystem verhält und wie mittels Modifikation des Aufbaus innerhalb der RSU darauf Einfluss genommen werden kann.

Gelöste Stoffe werden bei der Betrachtung vernachlässigt. Organismen in Form von Partikeln werden nicht in die Simulation eingeschlossen, deren möglicher Einfluss und Verhalten aber diskutiert. Bei der Simulation wurde der letzte Abschnitt des Schlauchsystems vor dem Eintritt in den Probenloop betrachtet. Dieser stellt den Übergang vom Entnahmesystem in den Probennahmeloop der RSU dar und somit den entscheidenden Abschnitt für die Definition des Probenvolumens vor der stattfindenden Filtration.

Die Probenentnahme aus dem Laborreaktor erfolgte mittels Vakuumpumpe. Anhand der Kenndaten der Vakuumpumpe wurden Verluste über die Schlauchleitung berücksichtigt (Annahme nur Luft im Schlauchsystem bis zum Ventil) und schließlich mit einem Druck von 0,5 bar am Ausgang des Schlauchsystems gerechnet. Die Austrittswerte des Reak-

tors wurden angenähert. Die Austrittsgeschwindigkeit aus dem Reaktor beträgt demnach $2,4 \text{ m/s}$, was eine turbulente Strömung innerhalb des Systems bedeutet. Die Austrittsgeschwindigkeit verändert sich natürlich mit dem sinkenden oder steigenden Füllstand des Reaktors. Außerdem wurden 50 % Gasgehalt für die Simulation festgelegt, was per Definition keinen reinen Schaumzustand bedeutet. Der exakte Wert bei Eintritt in das Schlauchsystem konnte aber nicht näher bestimmt werden, sodass dieser Wert eine verlässliche Approximation des Zustands im Reaktor widerspiegelt, siehe Abbildung 14. Eine Fermentation mit Probennahme ist ein dynamischer Prozess, sodass sich die Parameter, welche für die Simulation verwendet wurden, stetig ändern und die Ergebnisse nur als Ansatzpunkt für eine Erklärung dienen können und sollen.

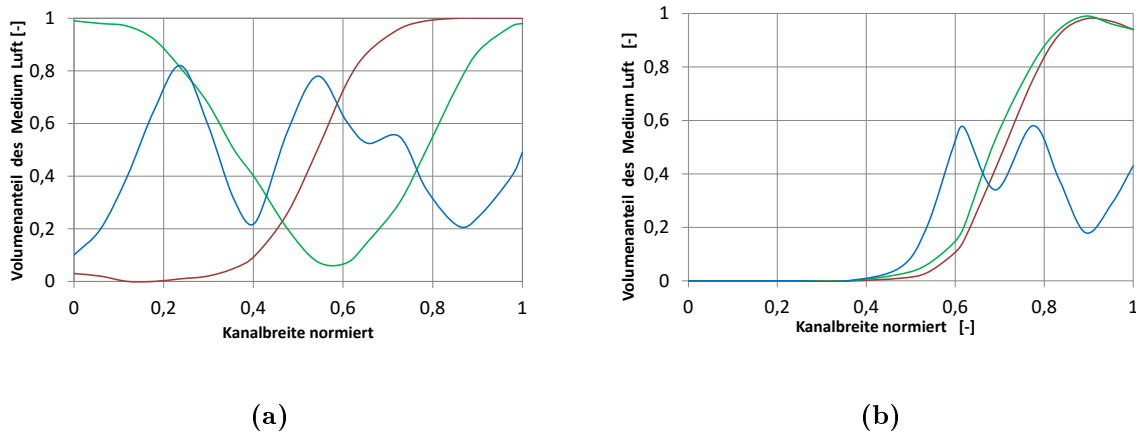


Abbildung 17: Darstellung der örtlichen Gaskonzentration der 2D - Simulationen aus Abbildung 18 für den etablierten Aufbau (a) und die Modifikation (b). Die Linien repräsentieren den Volumenanteil der Luft in Wasser für je einen der gewählten Punkte in Abbildung 18, 1 (blau), 2 (grün) und 3 (rot).

Die Abbildungen 17 a (etabliertes set - up) und b (Modifikation) zeigen die örtliche Gaskonzentration (definiert als Umgebungsluft) an drei Punkten im System an. Den Eingang in das Schlauchsystem (blau), den Punkt vor dem Beginn der Kurve (grün) und den Eintritt in den Probenloop der Anlage nach der Kurve (rot). Die Kurve kann bauseitig im Schlauchsystem der RSU so realisiert werden, jedoch ohne vorbestimmte Relevanz für das Verfahren der Schnellprobenentnahme. In den weiteren Abbildungen 18 a und b ist zur besseren Veranschaulichung des Aufbaus eine zweidimensionale Darstellung der Simulation zu sehen. Hierbei ist die farbliche Darstellung eine rote für das Fluid Wasser und eine blaue für das Fluid Luft.

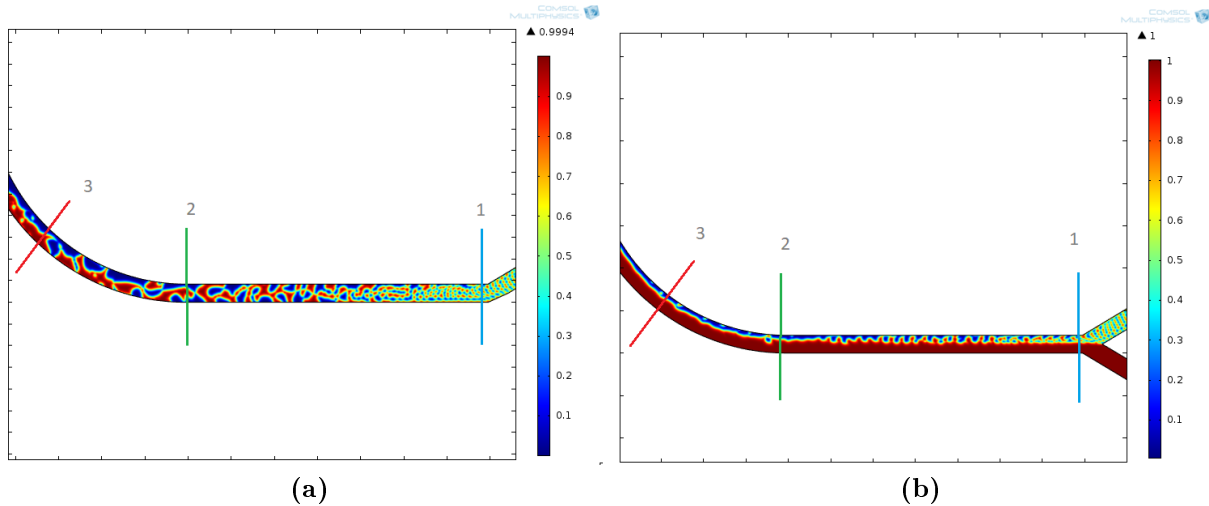


Abbildung 18: 2-D Comsol Multiphysics Simulationen einer Mehrphasenströmung für das Entnahmesystem vor dem Eintritt in den Probenloop für den etablierten Aufbau (a) und die Modifikation (b). Die farbliche Skala repräsentiert den Volumenanteil der Luft in Wasser von rot (0) zu blau (1, Luftblasen). Die Markierungen dienen als Orientierung für die Darstellungen in Abbildung 17 und sind auch dementsprechend farblich gewählt.

Bei Eintritt in das etablierte set - up verlagert sich der vorgegebene Gasanteil von 50 % im geraden Teil an die Außenseiten des Rohres, während er sich im Verlauf der Kurve nach innen orientiert. Diese Verlagerung der flüssigen Phase zur Außenseite aufgrund einer kurvenförmigen Geometrie ist durch die Zentrifugalkrafteinwirkung auf die Phase mit einer höheren Dichte bedingt.

Die Bildung von größeren Blasen bis hin zu deren Vereinigung, schon im geraden Abschnitt des Systems, deutet auf eine dominierende Wasserphase innerhalb des Strömungsbildes hin, einen sogenannten *slug flow* [37]. Die Bewegung der Blasen ist ebenfalls vom Gasgehalt der Zweiphasenströmung abhängig [51] und kann sich während des Fermentationsprozesses durchaus ändern, zum Beispiel durch die Veränderung der Oberflächenspannung der Flüssigkeit [38] aufgrund von oberflächenaktiven Polymeren. Umgekehrt ist von Blasen-säulenwendungen bekannt, dass das Vorhandensein von Blasen die Strömungssituation beeinflusst. Dabei induzieren die den Blasen anhängigen Blasenschleppen eine Turbulenz, deren Größe wiederum von Form und Größe der Blasen und auch vom Feststoffgehalt in der Lösung abhängt. Aufgrund dieser Vielzahl an Einwirkungen ist es schwierig, eine exakte Aussage zum Verhalten der Blasen im vorhandenen Schlauchsystem über den gesamten Zeitraum einer mikrobiellen Kultivierung zu treffen.

Durch den Eintritt einer zweiten gasfreien Flüssigkeit wird eine veränderte Strömungssituation hervorgerufen. Diese Flüssigkeit, im weiteren Verlauf als Mischflüssigkeit definiert,

begrenzt die Blasenbildung zu Beginn des Rohres auf die Hälfte der Kanalbreite. Zudem wird die Bildung größerer zusammenhängender Lufteinschlüsse innerhalb der Flüssigkeitsphase unterbunden, also eine Bildung größerer Blasen wie bei dem Vergleichssystem verhindert. Dadurch findet die Aufteilung in einen Luftstrom und einen Flüssigkeitsstrom örtlich frühzeitiger statt als im Vergleichssystem ohne Mischflüssigkeit.

Im Vergleich stellt sich die Wasserphase bei beiden Systemen als dominierend dar. Aufgrund des höheren Gasvolumens provoziert sie aber im etablierten System größere zusammenhängende Blasenstrukturen, die ihrerseits durch ihr turbulentes Verhalten wiederum die Strömung beeinflussen. Durch das Einbringen einer weiteren gasfreien Flüssigkeit wird dieser Einfluss der Gasphase minimiert und die Vorhersage über die örtliche Verteilung einer zusammenhängenden Gasphase verbessert. Das heißt, die Situation von abwechselndem Eindringen von flüssiger und gasförmiger Phase in den gleichen Bereich des Filters oder Filterkuchens wird durch die vorterminierte Trennung unterbunden. Somit kann das örtliche Auftreten der problematischen Kapillarspannung verhindert werden. Zudem wird das Volumen der Gasphase um 50 % im Probenloop verringert, was das Verhalten der Mikroorganismen während der Probenentnahme beeinflussen kann. Die Einwirkung der Mikroorganismen auf die Strömung wurde bei der bisherigen Diskussion vernachlässigt und soll nun vor dem Hintergrund einer exakten Bestimmung der im Probenvolumen enthaltenen Biomasse geschehen.

Aufgrund des weiter oben beschriebenen Phänomens des stabilen Schaumes ist das Vorhandensein von Mikroorganismen an Luftblasen schon im Fermenter möglich. Dies führt in erster Instanz zu möglicherweise falschen Ergebnissen, da die der Probe zugrunde liegende Biomasse anhand der Flüssigphase im Filtrat bestimmt wird. Eine weitere Konzentrierung der Biomasse an Luftblasen aufgrund der Strömung im Entnahmesystem könnte dies somit noch unterstützen. So kann durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der flüssigen Phase eine Relativgeschwindigkeit gegenüber der Gasphase entstehen und zu einer höheren Biomassekonzentration in der Probe führen [51]. Die Mikroorganismen können an den Blasen anheften und dadurch die Blasengeschwindigkeit beeinflussen. Durch das Eindringen in die Flüssigkeit-Gas-Grenzfläche der Blasen haben die Organismen auch einen Einfluss auf die An- und Umströmung der Blasen und dadurch auch auf die sogenannten Blasenschleppen. Hier können sich ebenfalls Partikel ansammeln. Eine mögliche Aufkonzentrierung im Schleppengebiet der Blasen kann derzeit nur mit Hilfe der Stokes - Zahl für Blasensäulen bei Gasgehalten bis 4,8 % bestimmt werden. Dabei bedeutet für eine Stokes - Zahl kleiner 1, dass sich Feststoffpartikel in den Blasenschleppen akkumulieren [51]. Innerhalb der Anwendung bedeutet dies, dass sich die Blasengeschwindigkeit nur minimal unterhalb der

Geschwindigkeit der flüssigen Phase befindet (unter Annahmen zu Partikelgeschwindigkeit, Gasgehalt und Blasendurchmesser). Für eine fundierte Aussage diesbezüglich ist es notwendig, die Blasengeschwindigkeit zu bestimmen, was bei der vorhandenen Strömungsgeschwindigkeit nicht ohne weitere Messmittel möglich ist.

Es zeigt sich also, dass ein höherer Schaumanteil innerhalb der entnommenen Probe einen Einfluss auf die Exaktheit der zu bestimmenden Biomasse auf dem Filter haben kann. Inwiefern die Modifikation des Entnahmesystems eine Veränderung und eine mögliche Verbesserung der Exaktheit der Probenentnahme darstellt, vor allem für höhere Biomassekonzentrationen, soll im Anschluss experimentell untersucht und evaluiert werden.

7.1.3 Modifikation des bestehenden set - up zur Schnellfiltration

Für eine detaillierte Beschreibung der Anlage (RSU) und ihrer grundlegenden Funktionsweise sei hier auf die Arbeiten von da Luz et al. [28, 29, 30] verwiesen. Um eine Umsetzung des oben diskutierten Ansatzes zur Schaumreduzierung innerhalb der Probennahme in der RSU zu realisieren wurde die Anlage modifiziert, siehe Abbildung 19 a. Der Eintritt einer zweiten nahezu gasfreien Mischflüssigkeit wurde über einen Y-Verteiler realisiert. Die Zusammenführung und das Vermischen der beiden Fluide erfolgte vor dem Eintritt in das Probenvolumen, wobei der Leitungsweg der Mischflüssigkeit über das Magnetventil V-5 aktiv zugeschaltet wurde, um einen direkten Kontakt zwischen Fermentationsbrühe und Mischflüssigkeit außerhalb der Probennahme zu unterbinden. Zur größtmöglichen Vermeidung von Strömungsbehinderungen am Punkt des Zusammentreffens von Reaktorprobe und Mischflüssigkeit wurden die Entnahmesysteme beider Behälter identisch ausgelegt. Zudem wurde über den Zeitraum der Kultivierung versucht, durch wiederholte Anpassung der Höhe des Vorlagebehälters mögliche statische Druckunterschiede zwischen Fermenter und Vorlagebehälter für die Mischlösung zu minimieren. Weitere Veränderungen des bestehenden Aufbaus der Schnellfiltration wurden nicht vorgenommen. Somit ist eine Ausgangssituation gegeben, welche eine grundlegende Füllung des Probenvolumens von je 50 % der beiden Lösungen ermöglicht, siehe Abbildung 19b.

Die Probennahme erfolgte wie auch beim etablierten set - up über das Anlegen eines Unterdruckes im Abfallbehälter, was eine gleichmäßige Strömung aus dem Reaktor und dem Behälter der Mischlösung sicherstellt. Aufgrund der simultanen Öffnung der Ventile V-3, V-4 und V-5 wird das Probenvolumen zeitgleich von einer Fermentationsprobe und der Mischflüssigkeit in Richtung Abfallbehälter durchströmt. Diese Durchströmung erfolgt für ein Zeitintervall von 1 Sekunde, um eventuelle Restvolumina im Entnahmesystem zwischen Probenvolumen und Bioreaktor auszuspülen. Das Waschvolumen wird während

dieses Vorgangs durch entsprechende Schaltung von V-1 und V-2 ebenfalls in Richtung Abfallbehälter durchströmt. Im anschließenden Filtrationsintervall von 5 Sekunden wird das Waschvolumen mittels Druckluft über das Probenvolumen in Richtung Abfüllsystem transportiert wird, was zu einer Filtration des Probenvolumens mit anschließender Filterkuchenwaschung führt. Dafür werden die Ventile zeitgleich so geschaltet, dass die Druckluft an V-1 das Waschvolumen und das Probenvolumen in Richtung Abfüllsystem transportiert. Ventil V-5 wird ebenfalls geschlossen um den weiter oben angesprochenen dauerhaften Kontakt zwischen Mischflüssigkeit und Fermentationsbrühe zu unterbinden.

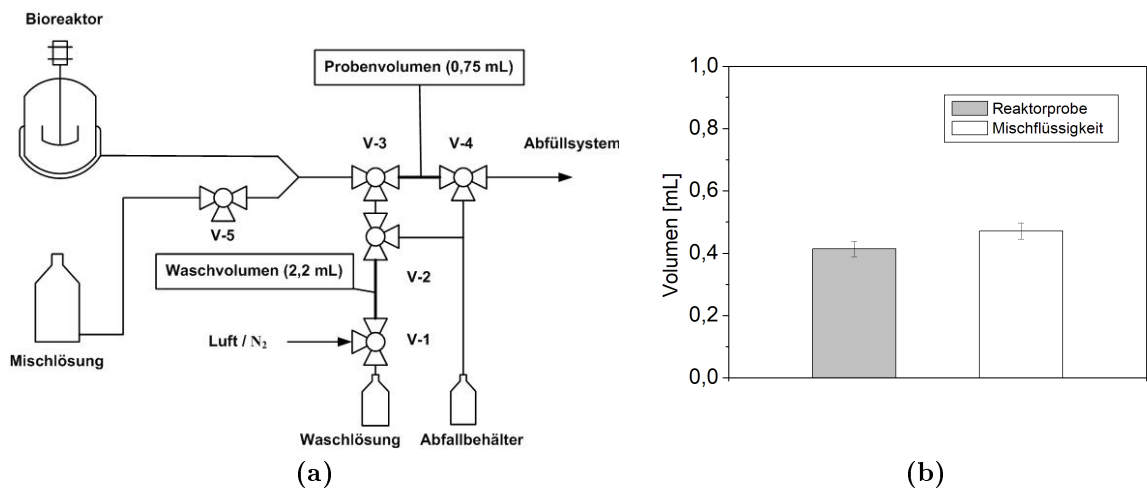


Abbildung 19: Modifikation der von da Luz et al. [28] etablierten automatisierten Schnellfiltration. Originalzeichnung in Bild (a) wurde entnommen aus [28] und modifiziert. Die Bestimmung der Volumina von Reaktorprobe und Mischflüssigkeit erfolgte mit destilliertem Wasser bei Umgebungstemperatur und einer Rührerdrehzahl von 1000 upm im Reaktor unter Zugabe interner Standards durch Glukose im Reaktor und Glycerin in der Mischflüssigkeit.

7.1.4 Vergleich von Modifikation und bestehendem set - up

- Fed - Batch Kultivierungen

Für den Vergleich der Modifikation mit dem etablierten set – up wurden Fed – Batch Kultivierungen zweier grampositiver *C. glutamicum* Stämme durchgeführt, dem Wildstamm ATCC 13032 sowie dem daraus generierten Stamm mit der Bezeichnung LC 298. Für eine detaillierte Beschreibung der vorgenommenen Veränderungen und deren Auswirkungen sei auf Abschnitt 5.2.2 und Abschnitt 7.2 verwiesen. Die Wahl der Organismen stellt die Referenz zu vorangegangenen Untersuchungen im Rahmen des RSU Projektes mit dem

Wildtyp ATCC 13032 dar. Die in Abbildung 20 dargestellten Wachstumskurven zeigen die Unterschiede beider Organismen bezüglich ihrer maximal erreichten Biomassekonzentration während der Kultivierungen, hier in Form der optischen Dichte (OD_{660}) aufgezeigt. Der genetisch unveränderte Stamm ATCC 13032 erreichte dabei eine höhere Zelldichte von ca. 90 vor dem Übergang in die stationäre Phase, wohingegen LC 298 bei einer optischen Dichte von ca. 60 in die stationäre Phase eintrat. Die Wachstumsraten während der exponentiellen Phase betragen jeweils $\mu_m = 0,328 h^{-1}$ und $\mu_m = 0,300 h^{-1}$.

Die Prozessparameter waren bei beiden Kultivierung zum Zeitpunkt des Batches identisch. Während im weiteren Verlauf der Fermentation die Rührerdrehzahl und die Zugabe von Antischaummittel mit Blick auf die aktuelle Sauerstoffsättigung und Schaumsituation im Reaktor in unterschiedlichem Maße angepasst wurden. Ein Einfluss veränderter Rührerdrehzahlen auf die Probennahme konnte bis dato in keiner vorangegangenen Untersuchung beobachtet werden, wohingegen die Folgen ansteigender Konzentrationen von Antischaummitteln in der Kulturbrühe weiter oben dargelegt wurden. Die Aspekte, nach

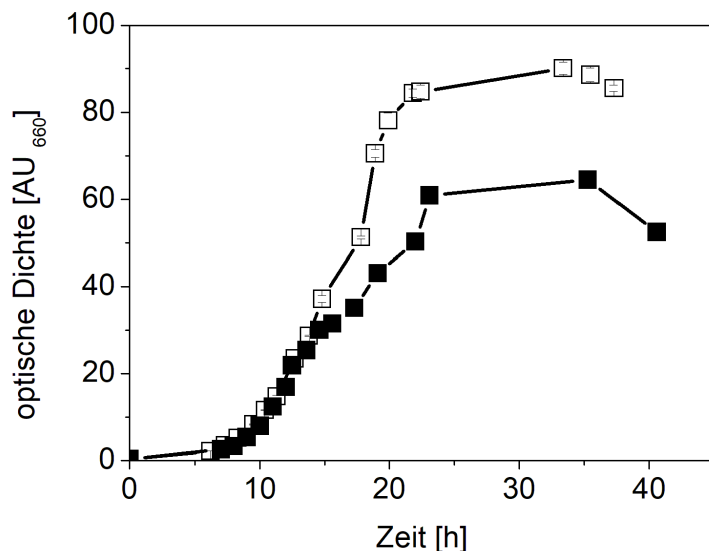


Abbildung 20: Darstellung des Wachstums über die Kultivierungszeit einer Fed-Batch Kultivierung des Wildstammes *C. glutamicum* ATCC 13032 □ sowie des daraus generierten Mutanten LC 298 ■, Diagramm entnommen aus [45]

denen beide Verfahren im Folgenden ausgewertet und verglichen werden sollen, sind, die technische Realisierung eines vollständig mit Kulturbrühe gefüllten Probenvolumens und die verbleibende Menge an Fermentationsmedium auf dem Filter (Restmedium) nach dem Waschvorgang, also die Qualität der Filterkuchenwaschung und die Auswirkungen auf die Bestimmung extra- und intrazellulärer Metaboliten.

- Probenvolumina

Wie bereits oben in Abbildung 16 dargestellt, zeigen das Filtratvolumen, also das Volumen der Waschlösung und das Probenvolumen aus dem Reaktor eine signifikante Veränderung der Volumina, während der Kultivierung von *C. glutamicum* ATCC 13032 mit zunehmender Biomasse im Reaktor. Als mögliche Hauptursache wurde bisher neben geringen Einflüssen der Biomasse vor allem der entstehende Schaum herausgearbeitet. Die Abbildungen 21 und 22 zu den gemessenen Volumina von Waschlösung und Reaktorprobe im Filtrat beinhalten jeweils zwei Unterabbildungen (a-d). Die Abbildungen a und c zeigen jeweils die verschiedenen Volumina für das etablierte set-up, die Abbildungen b und d jeweils die Ergebnisse für die Modifikation unter Verwendung einer Mischlösung. Die Mischlösung wurde hier, wie auch die Waschlösung, hinsichtlich des Parameters der Ionenstärke an das Ausgangsmedium angeglichen.

Da die Modifizierung auf eine Reduzierung möglicher Einflüsse der Kulturbrühe ausgerichtet ist, sollen hier auch als Erstes die Ergebnisse der Probenvolumina aus dem Reaktor für das etablierte set-up und die Modifikation dargestellt und diskutiert werden.

Für das etablierte set-up zeigt sich bei beiden Kultivierungen bis zum Eintritt in die stationäre Phase eine Veränderung des Probenvolumens.

Beträgt der Füllgrad des Probenloops der Anlage bei der ersten Probe 61 %, verringert sich das Volumen der Reaktorprobe im Filtrat für den Wildtyp während der Wachstumsphase weiterhin um ca. 56 %, was einen Füllgrad von 28 % darstellt, siehe Abbildung 22. Während der Wachstumsphase lässt sich keine Aussage über eine signifikante Abweichung des Probenvolumens treffen. Zwischen letzter Probennahme im Wachstum und Filtration in der Stagnationsphase ist eine Veränderung aber signifikant ($p = 0,03$).

Bei den Volumen der Reaktorprobe im Filtrat für den Stamm LC 298 ist ebenfalls eine Abnahme bis auf 41 % der ersten Probe in der Batch-Phase zu beobachten, was wiederum einen Füllgrad von 78 % zu Beginn und 46 % gegen Ende darstellt. Für die Probennahme in der stationären Phase ist mit 55 % des Gesamtvolumens des Probenloops wieder ein leichter Anstiegs des Füllgrads zu verzeichnen.

Beim Vergleich der Probenvolumina beider Kultivierungen zeigen sich für den Bereich der Fütterung Unterschiede im Volumen bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen im einstelligen Prozentbereich zu Gunsten des modifizierten Stammes. Lediglich die erste Probe ist für LC 298 um 25 % höher. Über alle Probennahmen hinweg ist aber kein signifikanter Unterschied der beiden Kultivierungen hinsichtlich ihrer Probenvolumina erkennbar ($p = 0,76$).

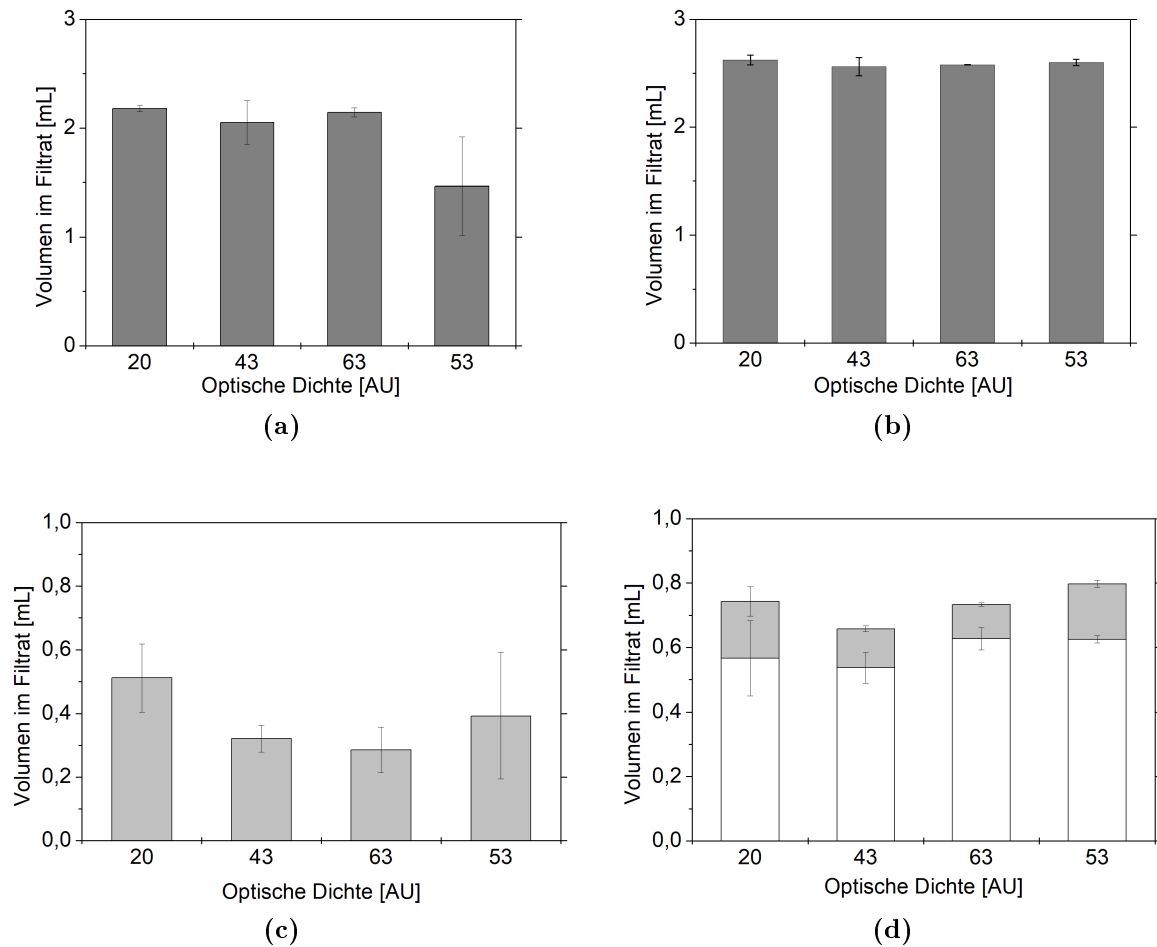


Abbildung 21: Volumina von Probe \blacksquare , Wasch- \blacksquare und Mischlösung \square für eine automatisierte Schnellfiltration von *C. glutamicum* LC 298 für das etablierte set - up (a,c) und die modifizierte Variante (b,d)

Für die folgende Betrachtung bezüglich der Volumen im Filtrat werden die Reaktorprobe sowie die Mischlösung betrachtet, da beide gemeinsam das Probenvolumen der Anlage während der Entnahme füllen, siehe Abbildung 21 d und 22 d.

Für die Filtration des Wildtyps wird der Probenloop mit Probe und Mischlösung zu $95 \pm 4\%$ im Mittel gefüllt, wobei der Probenanteil $17 \pm 4\%$ beträgt. Auch hier lässt sich keine eindeutige Signifikanz über die Wachstumsphase ($p = 0,1$) und beim Vergleich zwischen Wachstum und Stagnationsphase ($p = 0,06$) erkennen. Minimal abweichend stehen dem ein Gesamtvolumen von $91 \pm 10\%$ im Mittel und ein Probenanteil von $18 \pm 6\%$ für den Stamm LC 298 gegenüber, wobei auch hier kein eindeutig signifikanter Unterschied zwischen den Probenvolumina festzustellen ist, siehe Wachstumsphase ($p = 0,57$) und Stagnation ($p = 0,07$).

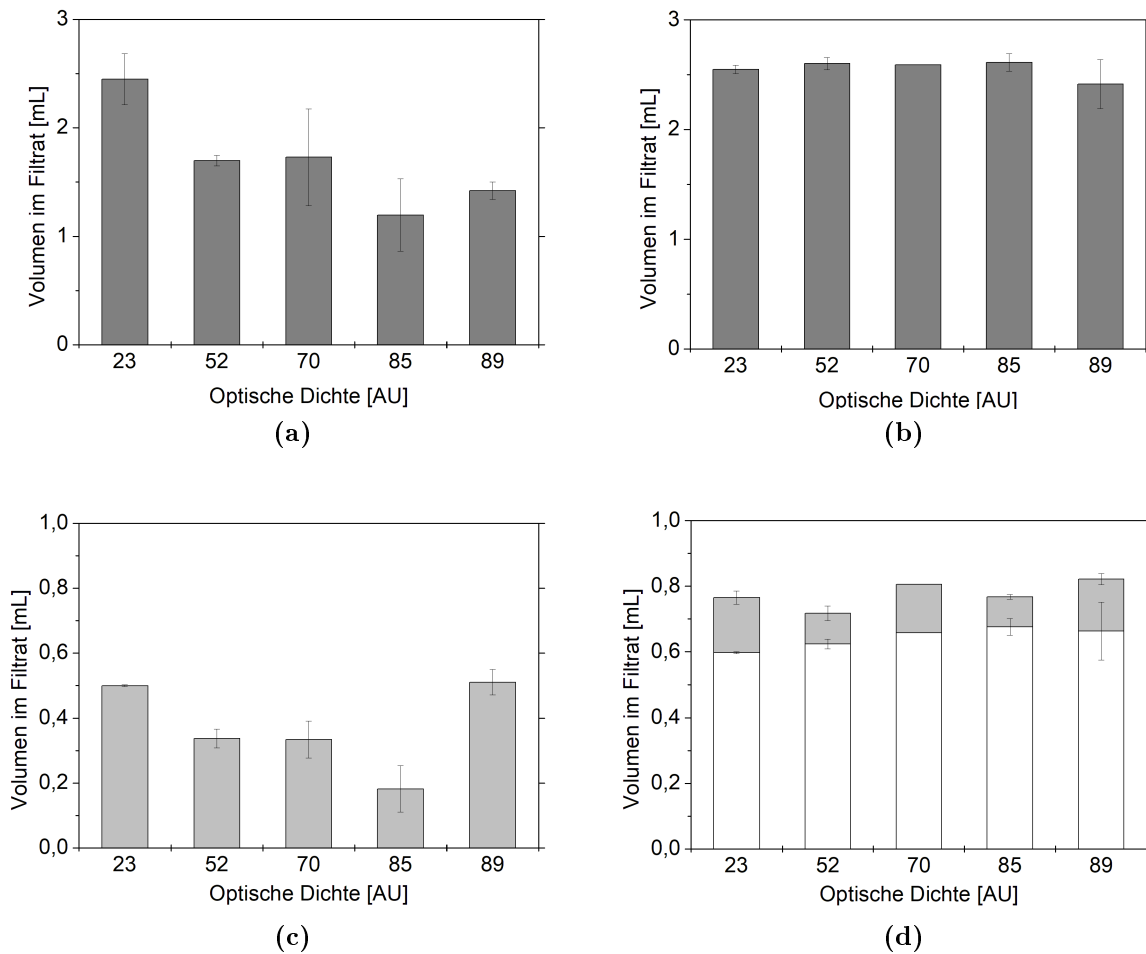


Abbildung 22: Volumina von Probe , Wasch- und Mischlösung für eine automatisierte Schnellfiltration von *C. glutamicum* ATCC 13032 für das etablierte set - up (a,c) und die modifizierte Variante (b,d)

Der Vergleich lässt nun zweierlei Diskussionen zu: Gibt es Unterschiede zwischen den Methoden? Gibt es Unterschiede zwischen den Kultivierungen bzw. den Stämmen, hinsichtlich der Probevolumen?

Die Betrachtung der Methoden lässt den Schluss zu, dass die modifizierte Variante eine gleichmäßigere Probenentnahme hinsichtlich gleichbleibender Volumina über sich ändernde Biomassekonzentrationen sicherstellt. Des Weiteren ist ein reproduzierbarer Füllgrad des Probenloops der Anlage größer 90 % gegeben. Es gibt zudem keine signifikante Änderung der Mischflüssigkeit bei Kultivierungen verschiedener Stämme ($p = 0,20$) in Wachstumsphasen oder auch über Stagnationsphasen hinweg ($p = 0,41 - 0,80$). Bezüglich der Ausgangsanstrengung zur Vermeidung von Schwankungen in der Probennahme und der Unterdrückung von Schaum oder Luft im Probenloop der Anlage ist somit dieser Variante

der Vorrang zu geben. Sollte das deutlich kleinere Probenvolumen aus dem Bioreaktor einen Einfluss auf die Bestimmung intrazellulärer Metaboliten haben, müsste sich dies anhand der Auswertungen im Folgenden deutlich zeigen.

Der zweite Gesichtspunkt, die möglichen Unterschiede zwischen den Kultivierungen sind marginal. Wie schon weiter oben erwähnt, weist das etablierte set - up ein leicht höheres Probenvolumen für den modifizierten Stamm LC 298 auf, was sich auch bei der modifizierten Variante bezüglich des Gesamtvolumens der Probe bestätigt.

Der möglicherweise auf die Aminosäureproduktion von LC 298 zurückzuführende höhere Schaumanteil innerhalb der Probe [92] ist ebenfalls zu beobachten, da sich trotz vergleichbarem Probenanteil und Probenmenge das Gesamtvolumen der Probe erhöht hat. Bei Bezugnahme auf den gleichen Probenloop wie beim Wildtyp hat die Probe ein größeres Volumen an Mischflüssigkeit, was auf einen höheren Luftanteil in der Reaktorprobe schließen lässt. Diese Volumenvergrößerung weist aber auch auf einen Nachteil der Anlage hinsichtlich des minimalen Probenvolumens hin. Ein Grund für die Abweichung könnte sich in der Steckverbindung des Loopschlauches in den Einlässen der Magnetventile finden. Wenn die Schlauchenden nicht in kompletter Tiefe in den Eingängen montiert sind, könnte sich ein minimal größeres Volumen ergeben. Gleiches lässt sich aus einem Vergleich zwischen Abbildung 16 und 22 deuten, welcher einen signifikanten Unterschied der Probenvolumina für die Schnellfiltration des gleichen Stammes wiedergibt ($p = 0,003$).

- Waschvolumina

Wie bei der Ausgangslage des etablierten set - up in Abbildung 16 festgestellt wurde, verringert sich das Volumen der Waschlösung im Filtrat mit zunehmender Kultivierungsdauer und Biomassenkonzentration im Reaktor, ohne das Waschverhältnis zu reduzieren. Im Verlaufe einer Batch - Kultivierung des Wildstammes ATCC 13032 ist für die Wachstumsphase sogar entgegengesetzt eine Erhöhung festzustellen (von 3 auf 5). Für die Fed - Batch Kultivierung dieses Organismus zeigte sich der gleiche Trend mit einer Erhöhung von 5 auf ein Verhältnis von ca. 6. Die Erhöhung des Waschverhältnisses ist ebenfalls mit einer Abnahme des Gesamtvolumens der Waschlösung im Filtrat verbunden, welche jedoch statistisch nicht eindeutig signifikant ist ($p = 0,12$). Stagniert das Wachstum deutet sich hingegen eine Umkehrung auf ein Waschverhältnis von 3 ($p = 0,07$) an.

Betrachtet man die Filtration des zweiten Organismus, kann man feststellen, dass eine Abnahme des filtrierten Waschvolumens bei vergleichbaren optischen Dichten nicht gegeben ist. Das heißt, das Volumen bleibt konstant bei ca. 2 mL ($p = 0,15$). In der anschließenden Stagnation ist jedoch eine Abnahme von ca. 25 % angedeutet, welche aber keine signifikante

Änderung darstellt ($p = 0,91$), das Waschverhältnis jedoch auf 3 reduziert. Im Gegensatz dazu erhöht sich das Verhältnis während des Wachstums von 4 auf über 6.

Das Volumen der Waschlösung im Filtrat zeigt für die modifizierte Probennahme beim Wildstamm über die Dauer der Fermentation keine Veränderung. Es liegt bei ca. 2,5 mL ($p = 0,21$) und nur geringfügig darunter für die Probenahme in der Stagnationsphase ($p = 0,87$), was bei der oben genannten Probengröße von 17 % des Probenloops ein Waschverhältnis von 20 bedeutet, inklusive der Mischlösung. Gleiches gilt für die Kultivierung des modifizierten Organismus ($p = 0,97$), wobei hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Waschkolumina in der Wachstumsphase und denen in der Stagnation ($p = 0,02$) besteht. Es ist festzustellen, dass mit dem modifizierten set - up der komplette Loop des Waschkolumens die Filterkombination durchströmt. Gegenüber der etablierten Methode bedeutet dies im Mittel über beide Kultivierungen eine Steigerung zwischen 20 und 40 % an Filtrationsvolumen. Zusammen mit der Mischlösung und dem geringeren Probenvolumen ergibt sich eine deutliche Anhebung des Waschverhältnisses. Als Resümee kann festgehalten werden, dass die vordefinierten Loops von Waschflüssigkeit und Probenvolumen durch die Modifikation vollständig filtriert werden. Es wird zudem mit Hilfe der Mischlösung eine deutliche Anhebung des Waschverhältnisses vorgenommen. Sollte sich im Weiteren zeigen, dass auch diese Anhebung des Waschverhältnisses in keiner verbesserten Filterkuchenwaschung resultiert [28, 80], wäre eine Möglichkeit gegeben, die Filtrationszeit zu reduzieren, und zwar durch eine deutliche Verringerung des Waschkolumens.

Zusätzliche Faktoren, die Unterschiede in den verschiedenen betrachteten Volumina hervorrufen können, sind die Wachstumsrate, das Zellvolumen und die Morphologie. Die einzelnen Faktoren können sich auch untereinander beeinflussen, wie z.B. die Wachstumsrate das Zellvolumen [17]. Die Wachstumsraten beider Organismen unterschieden sich mit $\mu_m = 0,328 \text{ h}^{-1}$ (ATCC 13032) und $\mu_m = 0,300 \text{ h}^{-1}$ (LC 298) nicht allzu stark, dennoch konnte für den modifizierten Stamm LC 298 mit $1,20 \mu\text{m}^3$ ein etwas geringeres Zellvolumen bestimmt werden. Daraus resultieren eine geringere Porosität des Filterkuchens und damit eine größere Dichte. Eine Verringerung des Waschkolumens beim Wildstamm kann auch auf das größere Volumen des Filterkuchens zurückgeführt werden. Da sich bei der modifizierten Methode beide Einflüsse mindestens halbieren, ist das Waschkolumen im Vergleich auch konstant höher. Ob sich daraus eine Verbesserung der Qualität des Waschvorganges ergibt, kann mit Hilfe der Bestimmung von Restmedium nach dem Waschen ermittelt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Kultivierungen ergeben sich für die beiden untersuchten Filtrationsmethoden hinsichtlich des Waschkolumens nicht, weder für das etablierte set - up ($p = 0,89$) noch für die modifizierte Variante ($p = 0,94$).

An dieser Stelle soll kurz noch eine Problematik dargestellt werden, welche sich bei der Probenentnahme aus einem verzweigten Schlauchsystem mit unterschiedlicher Betriebsweise der angeschlossenen Entnahmestellen ergibt. So kann durch den Rührvorgang im Reaktor und die schon angesprochene Schaumbildung eine gleiche Druckverteilung auf das Verbindungselement nicht zu jedem Zeitpunkt realisiert werden, was dazu führt, dass das Mischungsverhältnis mit der Kultivierungssituation im Reaktor wechselt, siehe Abbildung 21 d und 22 d. Die Entnahme aus dem ungerührten Vorlagebehälter der Mischlösung kann also mehr Volumen in das System einbringen als aus dem gerührten Reaktor. Das vorgegebene Probenvolumen von $800 \mu\text{L}$ wird dabei dennoch im Bereich von 80 % bis 100 % mit Flüssigkeit gefüllt, die Luft also nahezu vollständig verdrängt. Das Grundprinzip der Modifikation wird also trotz der Variationen realisiert. Zudem können durch nicht simultane Schaltvorgänge der Magnetventile Unterschiede in der Strömung beider Flüssigkeiten hervorgerufen werden.

- Qualität der Filterkuchenwaschung (Restmedium)

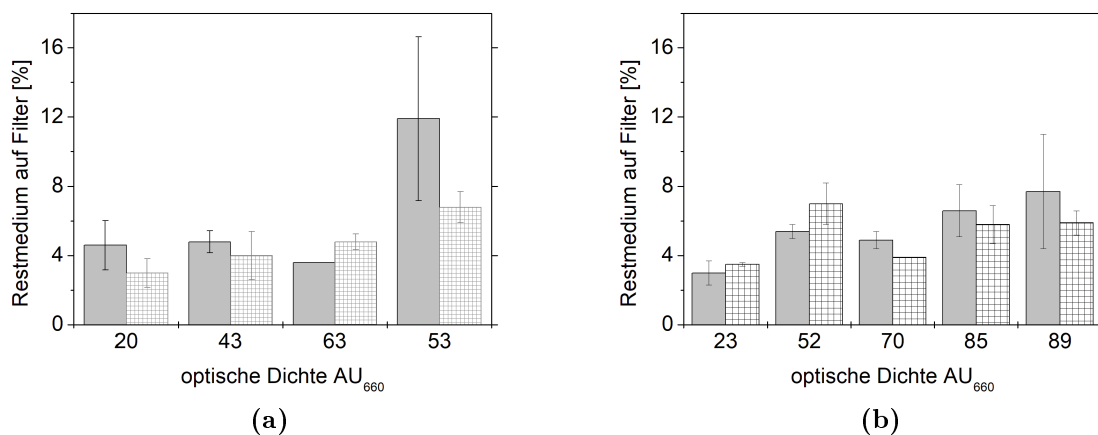


Abbildung 23: Verbleibendes Medium auf dem Filter nach dem Waschvorgang des etablierten set - up ■ und nach der Modifikation mit einer Mischlösung ▨, Fed-Batch Fermentationen von *C. glutamicum* LC 298 (a) und *C. glutamicum* ATCC 13032 (b)

Das Restmedium stellt indirekt die Güte oder auch die Qualität der Filterkuchenwaschung dar. Je weniger Kulturbrühe auf und in der Filterkombination verbleibt, umso verlässlicher sind die gewonnenen Daten bezüglich der intrazellulären Metaboliten, wie schon weiter oben beschrieben. Anhand der in Abschnitt 5.1.2 dargestellten Waschkurve (Abb. 3) für

Filterkuchen wurde bereits deutlich, dass eine vollständige Entfernung des Fermentationsmediums für die Schnellfiltration nahezu unmöglich ist. Bei der Entwicklung der Schnellfiltration wurde von da Luz et al. [30], bei einem Waschverhältnis von 1 : 3 und einer maximalen optischen Dichte von 40 (*C. glutamicum* ATCC 13032), ein Restmedium von 2,5 - 3,5 % nach der Extraktion der Probe vorgefunden. Dies trifft auch für die durchgeführte Fed - Batch - Kultivierung und das etablierte set - up zu, siehe Abbildung 23 b. Jedoch erhöht sich das verbleibende Medium mit Zunahme der Kultivierungsdauer bis auf das Doppelte bei einer optischen Dichte von 85 zu Ende der Wachstumsphase ($p = 0,06$). Eine leichte jedoch nicht signifikante Zunahme ist in der Stagnationsphase ebenfalls zu erkennen ($p = 0,23$). Diese Zunahme des Restmediums zeigt sich ebenfalls für die Kultivierung und Schnellfiltration des modifizierten Stammes LC 298 in der Stagnationsphase, siehe Abbildung 23 a. Die Zunahme ist hauptsächlich als Unterschied zwischen Wachstums- und Stagnationsphase erkennbar, für die etablierte und die modifizierte Filtration ($p = 0,06$ und $p = 0,02$). Grundsätzlich ist mit 5 % mehr Restmedium in und auf dem Filter zurückgeblieben als beim Wildstamm. In den angesprochenen Abbildungen 23 a und b ist ebenfalls die prozentuale Restmenge an Fermentationsmedium nach der Filterkuchenwaschung für das modifizierte set - up dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die Menge an Restmedium sowie der Trend zum Anstieg im Verlauf der Kultivierung von ATCC 13032 jenem der etablierten Methode gleicht ($p = 0,08$ und $p = 0,42$). Gleichfalls ist bei LC 298 mit einem stetigen Anstieg keine Aussage über einen signifikanten Unterschied möglich ($p = 0,09$). In der Stagnation ist das Restmedium um 43 % geringer als im Vergleich zur etablierten Methode.

Im Vergleich kann die Entfernung des Restmediums zu Gunsten der Modifikation ausgelegt werden, wobei es keine statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den beiden Methoden für den Wildstamm ($p = 0,78$) und den modifizierten Stamm ($p = 0,49$) gibt. Das gleiche gilt für den Vergleich zwischen den Organismen für die etablierte Filtration ($p = 0,59$) und die Modifikation ($p = 0,62$). Weiter in Betracht gezogen werden sollte, dass die geringen Unterschiede auch durch Messungenauigkeiten aufgrund der ebenfalls geringeren Menge des internen Standards Glycerin zu Stande kommen können.

Neben dem geringeren Restmedium zeigen sich die Vorteile zumeist bei erhöhtem Schaumanteil in der Fermentationsbrühe, höheren Biomassekonzentrationen und für Phasen mit stagnierendem Wachstum. Letzteres muss aufgrund der Datenlage noch weiter untersucht werden. Die Minimierung des Schaumeinflusses zeigt sich am deutlichsten bei LC 298 mit einer geringeren Restkonzentration während der hohen Schaumkonzentration im Wachstum.

Zum verbleibenden Restmedium auf und in der Filterkombination können resümierend folgende Aussagen getroffen werden: Das untere Limit für vorhandenes Restmedium liegt für die Anlage bei ca. 3 %, wie schon von da Luz et al. [29] gezeigt. Eine weitere Erhöhung der filterwaschenden Lösung hat keinen Einfluss auf dieses Limit, sodass von einer reinen Verdrängungswäsche auszugehen ist und eine weitere Verringerung hauptsächlich durch den Faktor Filtrationsdauer beeinflusst werden kann. Ein weiterer Ansatz wäre es, die reversible Kompressibilität des Filterkuchens zu nutzen [78], also den durch angelegten Druck größeren Filterkuchenwiderstand zu reduzieren und die daraus resultierende verringerte Porosität des Filterkuchens durch Druckänderungen zwischenzeitlich zu vergrößern, um eingeschlossenes Medium für die Waschlösung zugänglich zu machen [82, 40], siehe auch Abschnitt 5.1.2. Möglich wäre es auch, die Anströmung der Filter und die daraus resultierende Verteilung auf dem Filter zu optimieren, da sich trotz verringerter Biomasse das Medium nicht weiter herauswaschen lässt. Dies unterstützt die oben getätigte These, dass die Herabsetzung des Waschverhältnisses bei verringertem Probenvolumen auch mit einer verringerten Filtrationsdauer einhergehen kann und eine weitere Verringerung der Probenahmedauer ermöglicht werden könnte. Der Schritt hin zu verlässlichen Bestimmungen von Metabolitenpools mit einer Umsatzzeit im subsekundären Bereich für Filtrationsvorgänge rückt somit näher.

So zeigt sich abschließend, dass die technische Realisierung einer automatisierten Schnellfiltration für die beiden *C. glutamicum* Stämme ATCC 13032 und LC 298 für Biomassekonzentrationen von 30 g/L und 23 g/L umgesetzt werden konnte. Die Konzentration an Restmedium nach dem Waschvorgang beträgt im Mittel unter 7 % des Gesamtprobenvolumens und ist somit vergleichbar zu vorangegangenen Fermentationen bei niedrigeren Biomassekonzentrationen [28]. Bei auftretendem Schaum innerhalb der Fermentationsbrühe kann mit Hilfe einer Modifikation des Probenentnahmeverfahrens Einfluss auf das Füllvolumen des Probenloops genommen und so das Restmedium auf und in der Filterkombination verringert werden. Inwiefern sich diese technische Möglichkeit auf die Auswertung der intrazellulären Konzentrationen von Metaboliten, bezogen auf die Biomasse, auswirkt, soll im anschließenden Abschnitt evaluiert werden.

- extrazelluläre Aminosäuren

Nach der Feststellung einer technischen Realisierbarkeit einer Schnellfiltration für höhere Biomassekonzentrationen und der Diskussion hinsichtlich der Vor- und Nachteile des etablierten Filtrationsaufbaus sowie einer modifizierten Variante, sollen hier nun Aminosäuren, extrazellulär sowie intrazellulär, in die Betrachtung mit einbezogen werden. Dabei

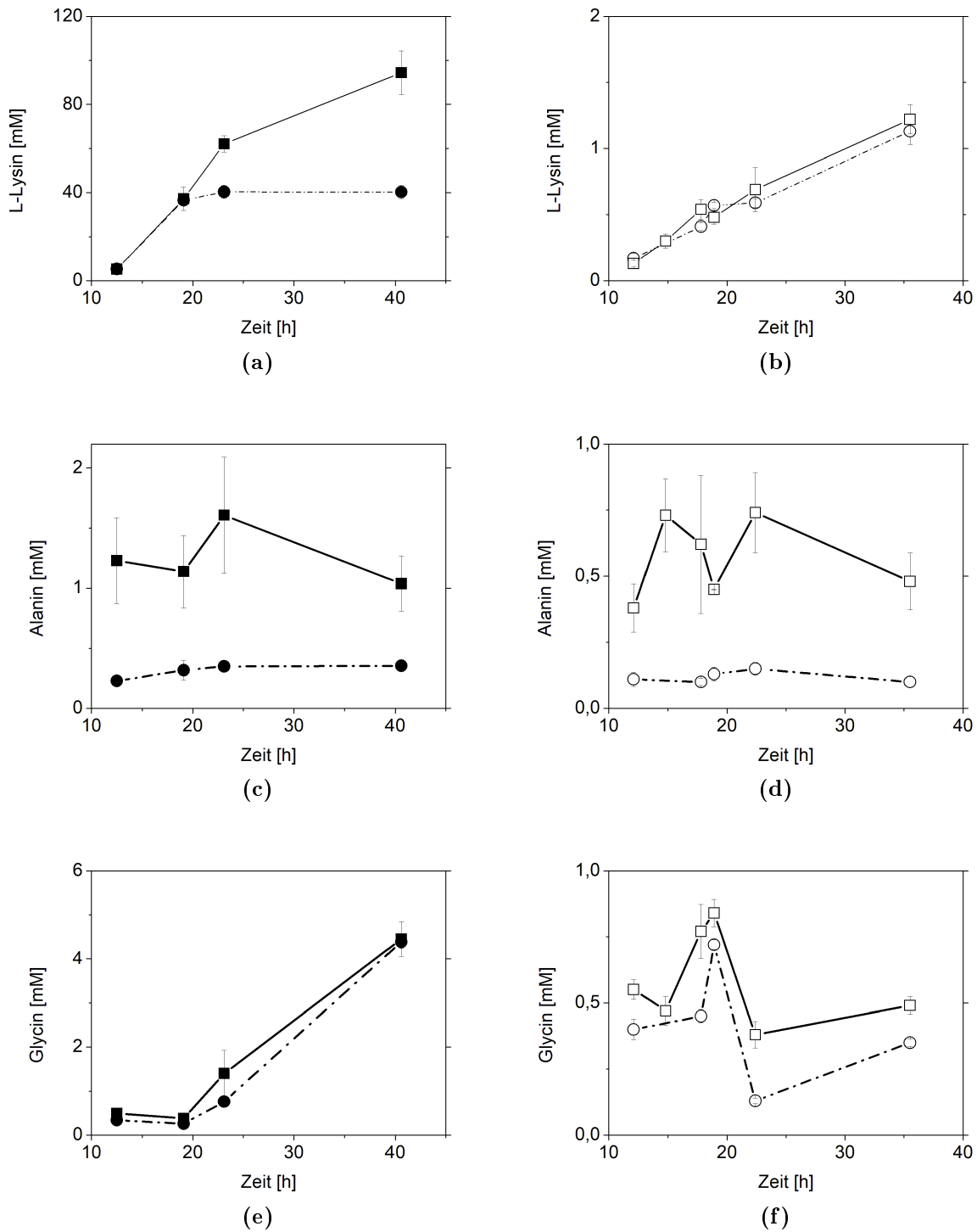


Abbildung 24: Vergleich extrazellulärer Aminosäuren (Teil 1) im Filtrat für Filtrationsroutinen des etablierten set - up \bullet und der modifizierten Variante \blacksquare bei einer Kultivierung des Stammes LC 298 und des Wildtyp ATCC 13032 \circ (etabliert) \square (modifiziert). Eine Einteilung der Aminosäuren erfolgt außerdem in polar positive (Lysin), unpolare (Alanin, Glycin, Valin und Prolin), sowie polar ungeladene (Cystein und Serin)

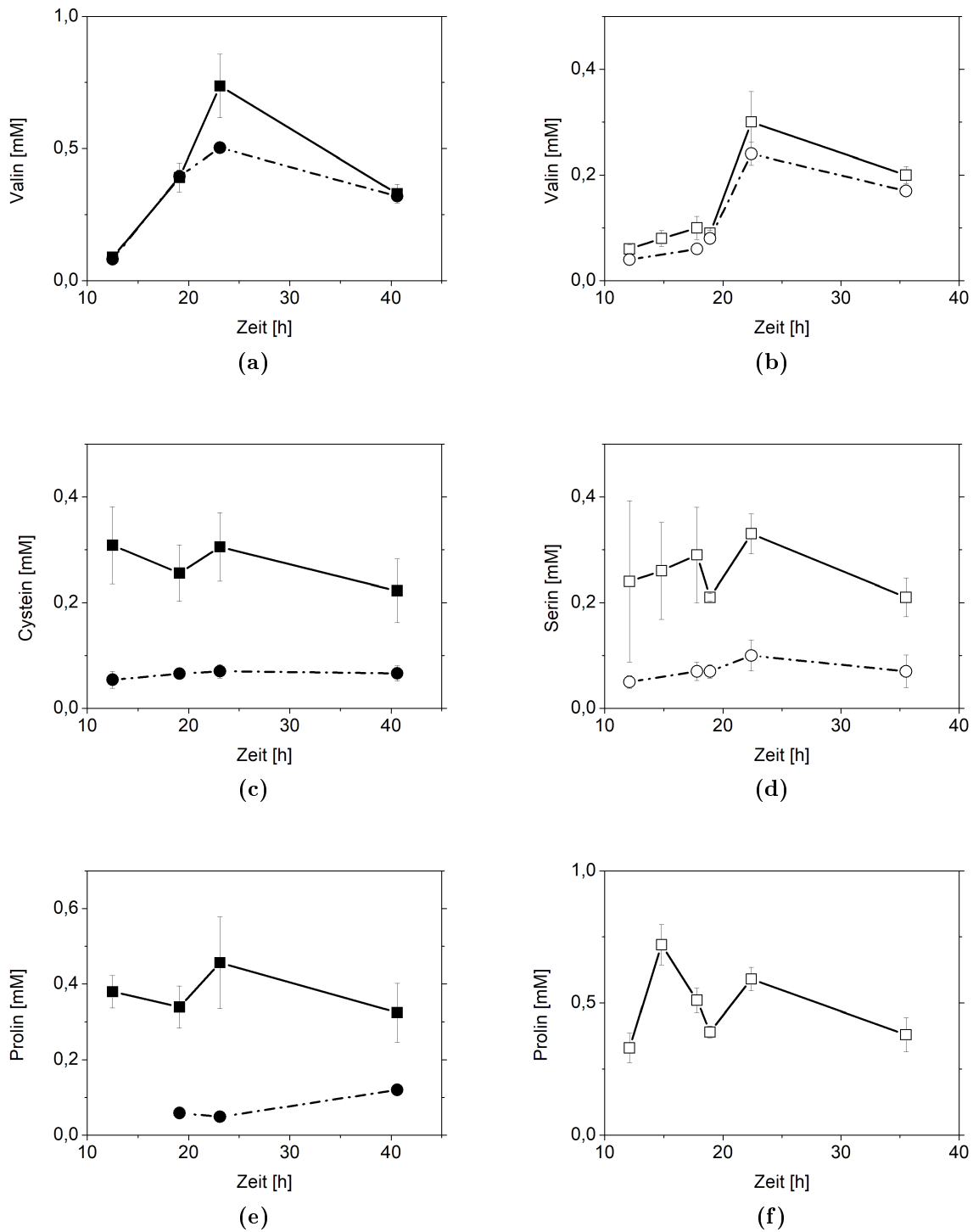


Abbildung 25: Vergleich extrazellulärer Aminosäuren (Teil 2) im Filtrat für Filtrationsroutinen des etablierten set - up \bullet und der modifizierten Variante \blacksquare bei einer Kultivierung des Stammes LC 298 und des Wildtyp ATCC 13032 \circ (etabliert) \square (modifiziert). Eine Einteilung der Aminosäuren erfolgt außerdem in polar positive (Lysin), unpolare (Alanin, Glycin, Valin und Prolin), sowie polar ungeladene (Cystein und Serin)

wird in diesem Abschnitt nur die Filtrationsqualität betrachtet. Eine ausführliche Diskussion der Daten hinsichtlich ihrer Aussagen zu Metabolismus und Kultivierungseinflüssen findet im darauf folgenden Abschnitt 7.2 statt. Um eventuelle Einflüsse der unterschiedlichen Ladungseigenschaften der Aminosäuren offenzulegen, wird diesbezüglich im Folgenden aufgeteilt. Wie schon in den vorangegangenen Abschnitten wird als erstes der Wildstamm ATCC 13032 betrachtet. Für die polar positive extrazelluläre Aminosäure L-Lysin ist bei beiden Filtrationsvorgehen der gleiche Trend zu erkennen, was auch für die Konzentrationen gilt. Das gleiche Bild ergibt sich für die unpolaren Glycin und Valin und eingeschränkt auch für Alanin, mit einer etwas höheren Konzentration im Filtrationsüberstand. Schließlich zeigt sich dann auch beim unpolar geladenen Serin kein Unterschied zwischen den beiden Methoden. Wie auch bei den weiteren Aminosäuren sticht hier eine größere Standardabweichung mit der modifizierten Filtrationsstrategie in den Ergebnissen hervor. Beim Stamm LC 298 lässt sich anstelle des Serin das unpolar geladene Cystein messtechnisch bestimmen, jedoch mit den gleichen Unterschieden wie bei Serin für den Wildstamm. Auch für Alanin, Glycin und Valin gilt, dass bei letzteren beiden die Konzentrationen und Trends der verschiedenen set - ups nahezu gleich sind und für Alanin lediglich die Konzentration der modifizierten Variante höher liegt. Im Gegensatz dazu zeigen sich deutliche Unterschiede beim Lysin. Gilt anfänglich noch ein identischer Konzentrationswert führt die Messung beim etablierten set - up im weiteren Verlauf der Kultivierung zu einer konstanten Konzentration, während die bestimmte Konzentration mit der modifizierten Filtrationsmethode zu Ende der Fermentation auf den doppelten Wert ansteigt. Statistisch gesehen, liegt kein eindeutig signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden hinsichtlich der bestimmten Lysinwerte vor ($p = 0,4$).

Vergleicht man nun die beiden Methoden für beide Organismen zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei ATCC 13032 über alle gemessenen extrazellulären Aminosäuren ($p = 0,03$). Dem stehen lediglich Lysin und Valin als nicht signifikant unterschiedlich entgegen. Für den Stamm LC 298 findet sich das Gegenteil, da über alle Aminosäuren kein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden besteht ($p = 0,48$). Hier sind es Alanin und Prolin, die einen gegensätzlichen Wert aufzeigen. Zudem fällt auf, dass Prolin bei der etablierten Methode für den Wildstamm nicht bestimmt werden konnte. Ein offensichtlicher Einfluss der Ladungseigenschaften der Aminosäuren bildet sich bis hierhin noch nicht heraus.

- intrazelluläre Aminosäuren

Wie schon bei den extrazellulären Aminosäuren zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden hinsichtlich der Aminosäure L-Lysin für den Wildstamm ATCC 13032. Im Gegensatz dazu zeigen die bestimmten Lysinkonzentrationen für den modifizierten LC 298 mit der etablierten Methode höhere Werte an. Einzig in der Stagnations-

oder auch Produktionsphase von LC 298 sticht hier gegen Ende der Fermentation die Konzentration von L-Lysin hervor, wie auch bei den extrazellulären Aminosäuren. Für die polar negativen Aminosäuren Aspartat und Glutamat zeigen sich weder für den Wildstamm noch für den modifizierten LC 298 Unterschiede in den Tendenzen und Konzentrationen. Für die polar ungeladenen Serin und Tyrosin zeigt sich zu Beginn der Kultivierung ein Unterschied zwischen den Filtrationsmethoden in den intrazellulären Konzentrationen. Dies gilt sowohl für den Wildstamm als auch für LC 298. Bei letzterem konnte zudem intrazellulär Cystein bestimmt werden, mit dem ebenfalls erkennbaren Unterschied einer höheren intrazellulären Konzentration für die modifizierte Filtrationsroutine gegenüber dem etablierten set-up. Betrachtet man die unpolare Aminosäure Prolin zeigt sich für den Wildstamm kein Unterschied zwischen den verschiedenen Filtrationsmethoden. Für Glycin ergibt sich eine höhere Konzentration der modifizierten Variante, für Alanin und Phenylalanin gilt dies hauptsächlich für den Anfangszeitraum der Kultivierung. Leucin und Valin hingegen zeigen kaum Unterschiede, wobei die Konzentrationen für Valin hier beim etablierten set-up höher liegen. Höhere Konzentrationen wurden beim modifizierten Stamm ausschließlich bei der modifizierten Filtrationsmethode bestimmt. Mit Ausnahme von Prolin, bei welchem die Ergebnisse für beide Methoden nahezu gleich sind. Es kann ausgesagt werden, dass sich zwischen den Methoden über alle intrazellulären Aminosäuren sowohl für den Wildstamm als auch für den modifizierten Stamm keine statistisch signifikanten Unterschiede finden ($p = 0,82$ und $p = 0,85$). Einzig für die bestimmten Werte von Alanin für den Stamm ATCC 13032 stehen dem entgegen ($p = 0,02$). Für das polar positive L-Lysin gilt für den Stamm LC 298 $p = 0,69$. Bei den extrazellulären Aminosäuren zeigen die Methoden signifikante Unterschiede über alle Aminosäuren beim Wildstamm ($p = 0,03$), für den Stamm LC 298 jedoch nicht ($p = 0,48$), obwohl es hier ebenfalls zu einzelnen signifikanten Unterschieden kommt (Prolin $p = 0,008$, Alanin $p = 0,004$ und Cystein $p = 0,002$). Die anfänglich aufgestellte Hypothese, Messergebnisse könnten aufgrund von Organismen in Lufteneinschlüssen signifikant verfälscht werden, kann somit nicht eindeutig geklärt werden.

Für eine Quantifizierung und Zusammenfassung der Unterschiede für die bei beiden Stämmen bestimmten Aminosäuren wurde der Quotient (Ratio) aus den Ergebnissen der verschiedenen Filtrationsmethoden gebildet (mod = modifizierte Methode, etabliert = etablierte Methode), siehe Gleichung 21. Hierbei stellt n die Anzahl der kultivierten Stämme dar. Dargestellte Werte in der daraus folgenden Abbildung 31 unterhalb des Wertes 1 bedeuten, dass mit der etablierten Filtrationsroutine eine höhere Konzentration bestimmt wurde als mit der modifizierten Methode. Und bei Werten oberhalb 1 hat dementsprechend die modifizierte Variante ein höheres Messergebnis. Dabei wurden die Mittelwerte der jeweiligen Konzentrationen in unmittelbar übereinstimmenden Biomassekonzentrationen

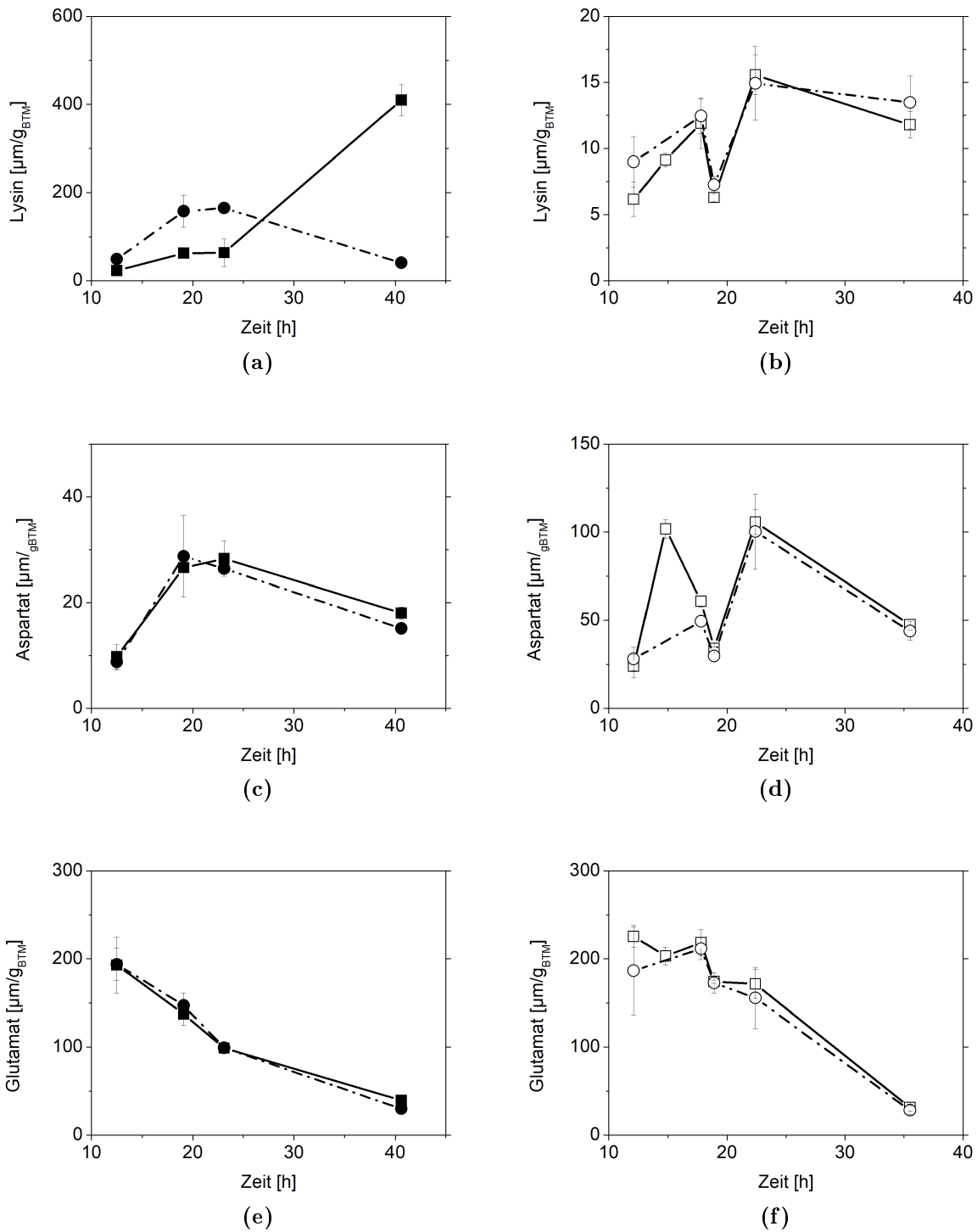


Abbildung 26: Vergleich intrazellulärer Aminosäuren für Filtrationsroutinen des etablierten set - up -●- und der modifizierten Variante -■- bei einer Kultivierung des Stammes LC 298 und des Wildtyp ATCC 13032 -○- (etabliert) -□- (modifiziert). Eine Einteilung der Aminosäuren erfolgt außerdem in polar positiv (Lysin) und polar negativ geladene (Aspartat, Glutamat)

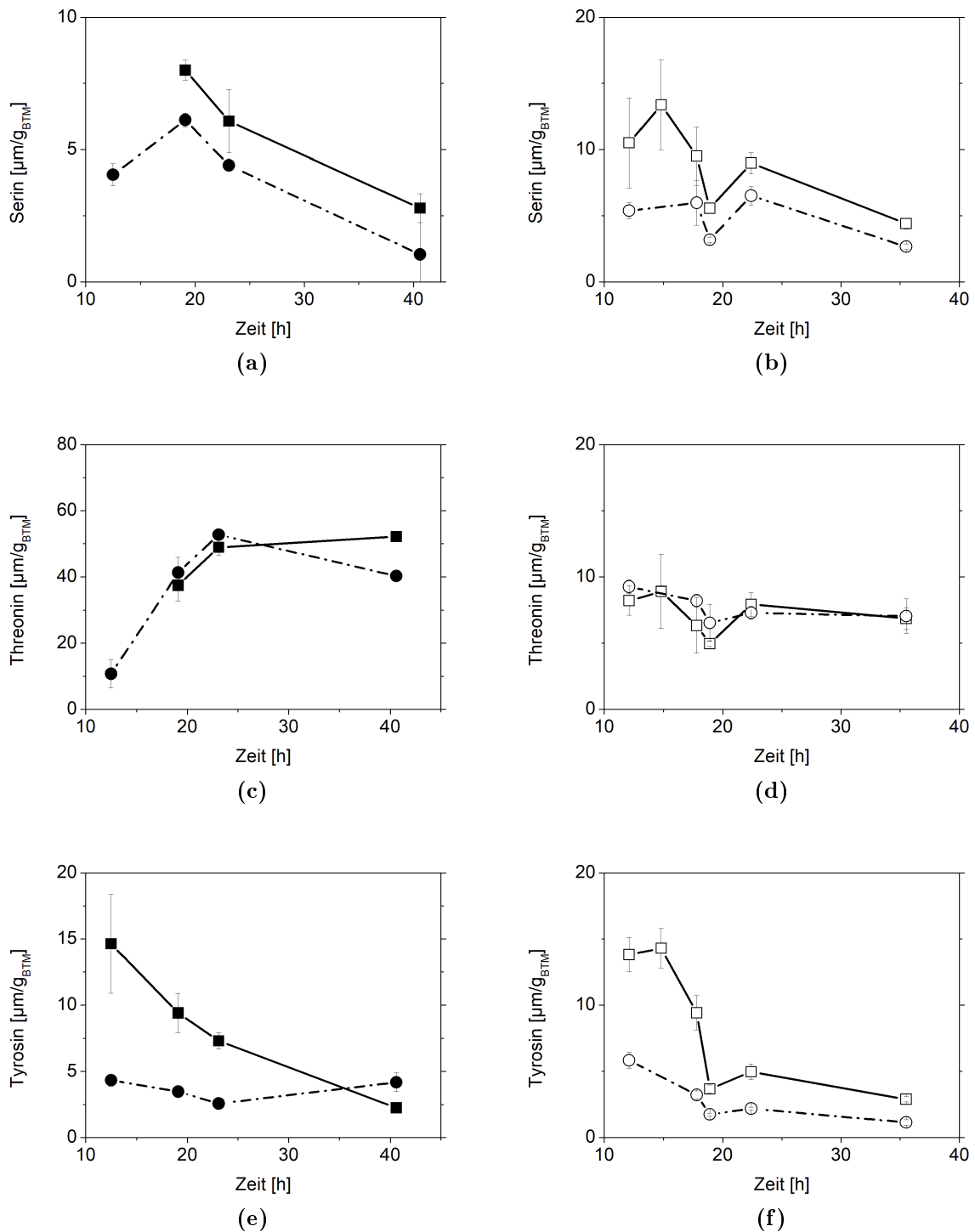


Abbildung 27: Vergleich intrazellulärer polar ungeladener Aminosäuren (Teil 1) für Filtrationsroutinen des etablierten set - up -●- und der modifizierten Variante -■- bei einer Kultivierung des Stammes LC 298 und des Wildtyp ATCC 13032 -○- (etabliert) -□- (modifiziert).

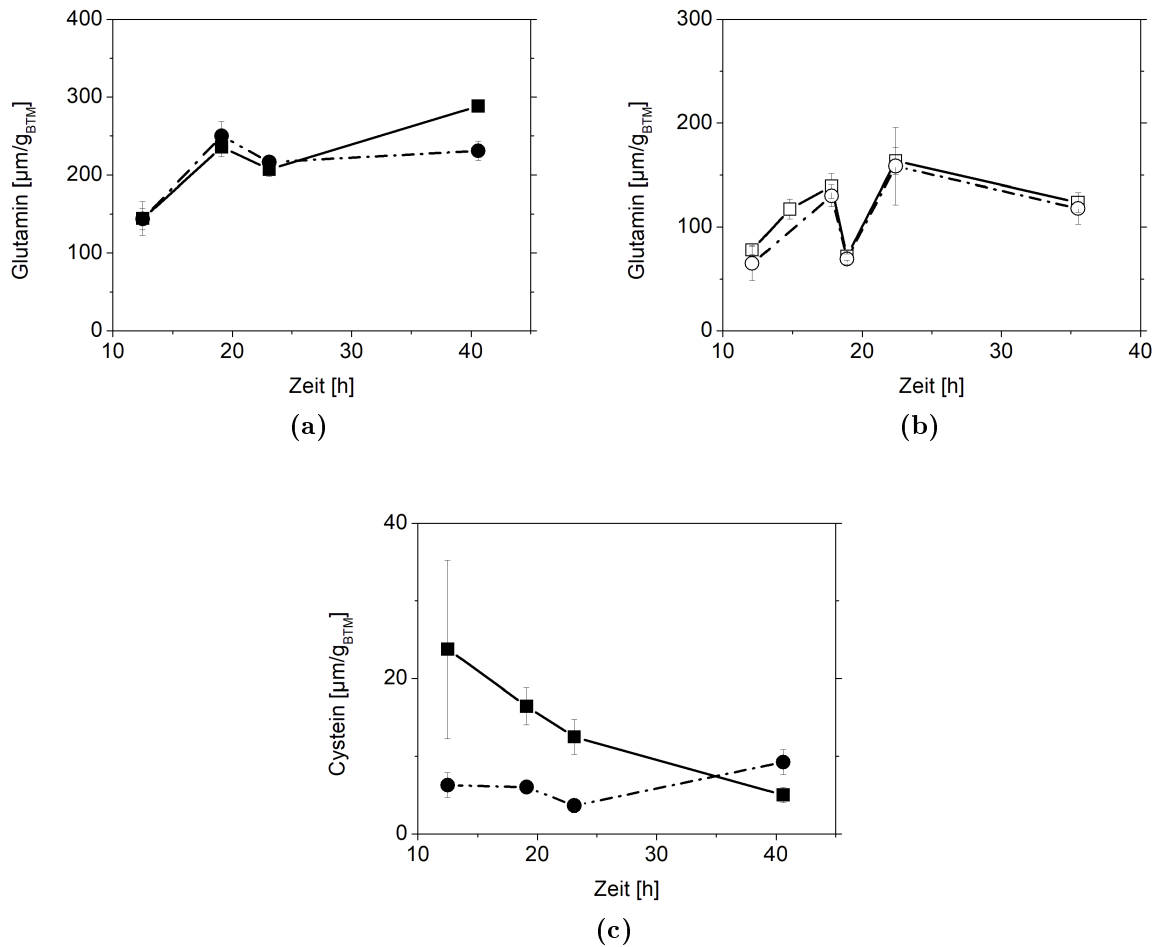


Abbildung 28: Vergleich intrazellulärer polar ungeladener Aminosäuren (Teil 2) für Filtrationsroutinen des etablierten set-up -●- und der modifizierten Variante -■- bei einer Kultivierung des Stammes LC 298 und des Wildtyp ATCC 13032 -○- (etabliert) -□- (modifiziert).

nen verwendet, um einen Vergleich zu ermöglichen und auf Unterschiede zwischen den Methoden zu verschiedenen Abschnitten der Kultivierung einzugehen. Bei der Darstellung wurde zudem, wie schon in den Diagrammen vorab, eine Unterteilung gemäß der Ladung der einzelnen Aminosäuren vorgenommen. Für den Großteil der Aminosäuren zeigt sich, dass die Messergebnisse der modifizierten Variante zu 80 bis 99 % mit denen der etablierten Methode übereinstimmen. Für Glycin und Aspartat ist bei 8 ein leichter Trend zu erkennen, wobei mit zunehmender Biomasse die modifizierte Variante geringere Konzentrationen wiedergibt. Dieser Trend spiegelt sich in ähnlicher Weise auch bei Tyrosin und Alanin wider, also ein höherer Wert bei niedrigeren Biomassen. Für die modifizierte Variante wurde eine zwischen 30 – 110 % höhere intrazelluläre Konzentrationen bestimmt. Höhere Konzentrationen konnten mit der modifizierten Variante bei beiden Stämmen auch für Valin

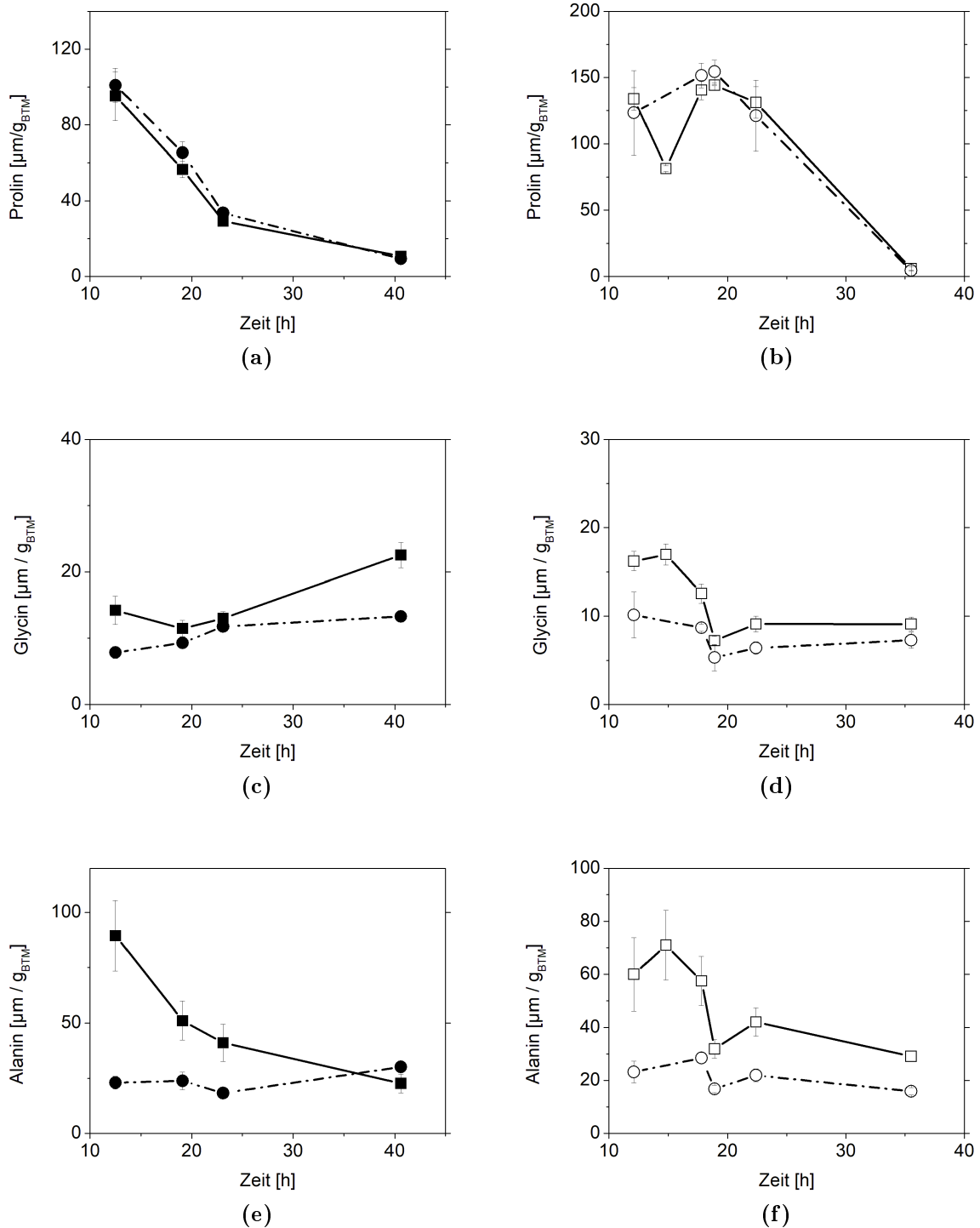


Abbildung 29: Vergleich intrazellulärer unpolare Aminosäuren (Teil 1) für Filtrationsroutinen des etablierten set - up -●- und der modifizierten Variante -■- bei einer Kultivierung des Stammes LC 298 und des Wildtyp ATCC 13032 -○- (etabliert) -□- (modifiziert).

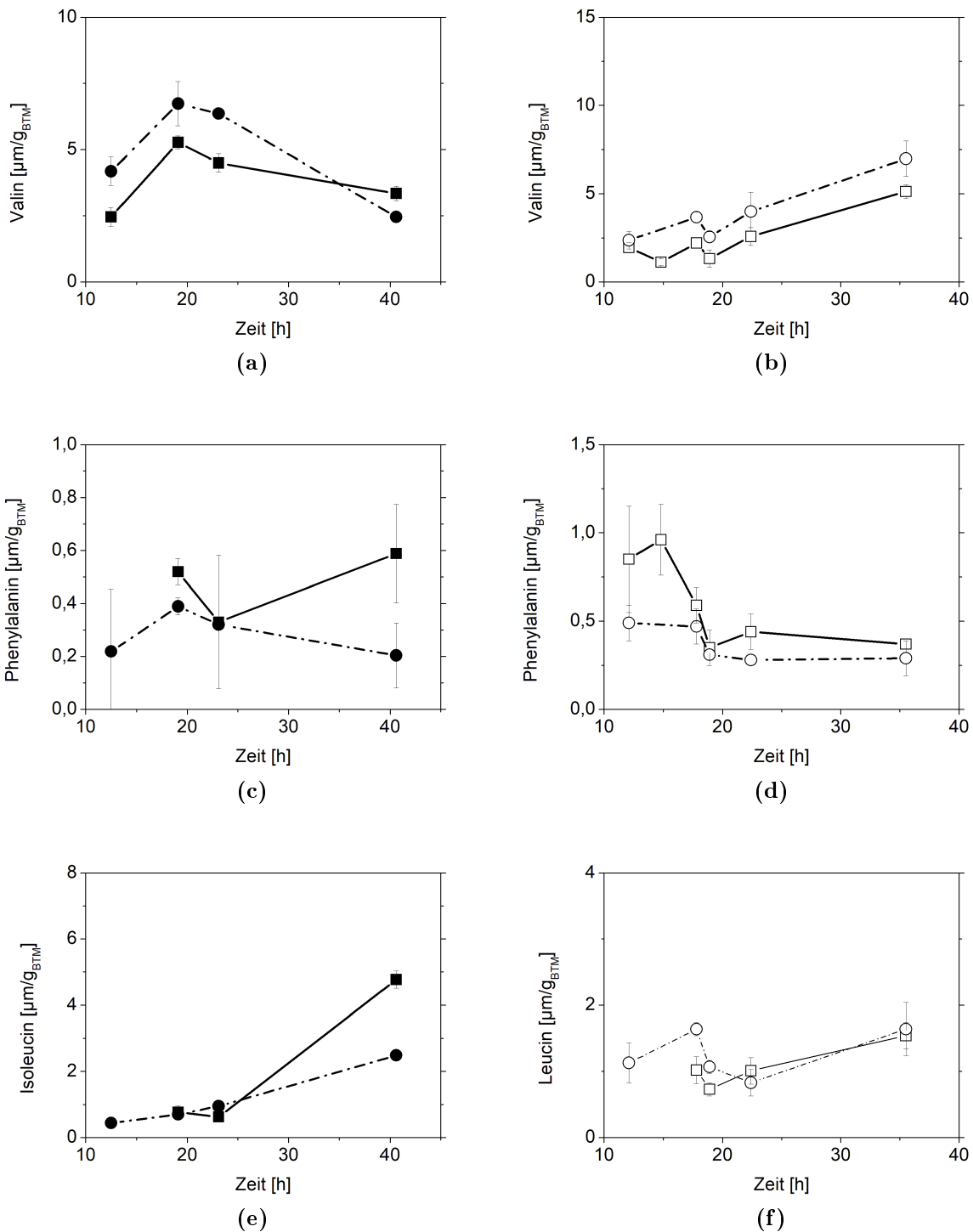


Abbildung 30: Vergleich intrazellulärer unpolare Aminosäuren (Teil 2) für Filtrationsroutinen des etablierten set - up -●- und der modifizierten Variante -■- bei einer Kultivierung des Stammes LC 298 und des Wildtyp ATCC 13032 -○- (etabliert) -□- (modifiziert).

und Phenylalanin bestimmt werden. Bei Valin scheint diese Diskrepanz im Verlauf der Fermentation noch zuzunehmen. Das nur beim Stamm LC 298 bestimmte Cystein ist in dem Vergleichsdiagramm nicht aufgeführt. Jedoch liegt die quantifizierte Differenz zwischen etablierter und modifizierter Methode bei einem 3 bis 4-fachen Wert für Biomassekonzentrationen zwischen 8 und 25 g/L. Daraus kann noch nicht eindeutig geschlossen werden, dass die Filtration mit der modifizierten Variante einen Einfluss auf die Bestimmung von unpolaren und polar ungeladene Aminosäuren hat. Jedoch zeigen die Ergebnisse, dass ein Einfluss vorhanden ist, welcher durchaus auch Ursachen im Extraktionsprozess der Metaboliten aus dem Filter haben kann. Wie in den Arbeiten von da Luz et al. [29, 30] bereits gezeigt, erfolgt nach dem dritten Extraktionsschritt mit der in Abschnitt 6.5 beschriebenen Methode keine weitere Extraktion von Aminosäuren aus dem Filter. Erste Tests deuten aber darauf hin, dass es Verluste bei der Extraktion verschiedener Aminosäuren (Lysin, Histidin, Homoserin und Prolin) gibt. Somit wäre eine Überprüfung des verwendeten Extraktionsprotokolls ein nächster Schritt zur Optimierung und Reduzierung möglicher Einflüsse auf die automatisierte Schnellfiltration.

$$Ratio_{Filtrationsmethode} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{\bar{c}_{mod,i}}{\bar{c}_{etabliert,i}} \quad (21)$$

Um ein Fazit ziehen zu können, müssen hier zwei Aspekte betrachtet werden. Zum Einen, wie stark sind die vermuteten Einflussfaktoren tatsächlich? Lassen sie sich quantifizieren, wie zu Beginn beabsichtigt? Wie vertrauenswürdig sind die bestimmten Konzentrationen von Metaboliten mit zunehmender Biomassekonzentration im Reaktor? Und zum Anderen, muss eine Umstellung der Anlage für Schnellfiltrationen auf die modifizierte Variante erfolgen?

Der vermutete Einfluss der Schaumbildung lässt sich bei der Füllung des Volumens des Probenloops beobachten und auch mit einer 30 - 60 prozentigen Verringerung gegenüber der modifizierten Variante quantifizieren. Es lässt sich eine Erhöhung des Restmediums für Filtrationen in Stagnationsphasen beobachten (LC 298), die im Rahmen der durchgeführten Probennahmen aber nicht eindeutig signifikant ist ($p = 0,12$). Bei den Unterschieden zwischen den bestimmten Aminosäuren anhand beider Methoden, lässt sich dennoch eine Beeinflussung der Messergebnisse feststellen. Wenn auch nicht hochsignifikant, kann es dabei in verschiedenen Phasen der Kultivierung zu Differenzen von über 100 % kommen, siehe Beispiel Alanin. Eine genaue Eingrenzung auf mögliche Ursachen, begründet beispielsweise in den Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren, ist leider nicht möglich. Der Einfluss der Extraktion sollte in weiterführenden Arbeiten überprüft werden. Messungenauigkeiten bei der Bestimmung der Biomasse können als Fehlerquelle oder Ursache weitestgehend ausge-

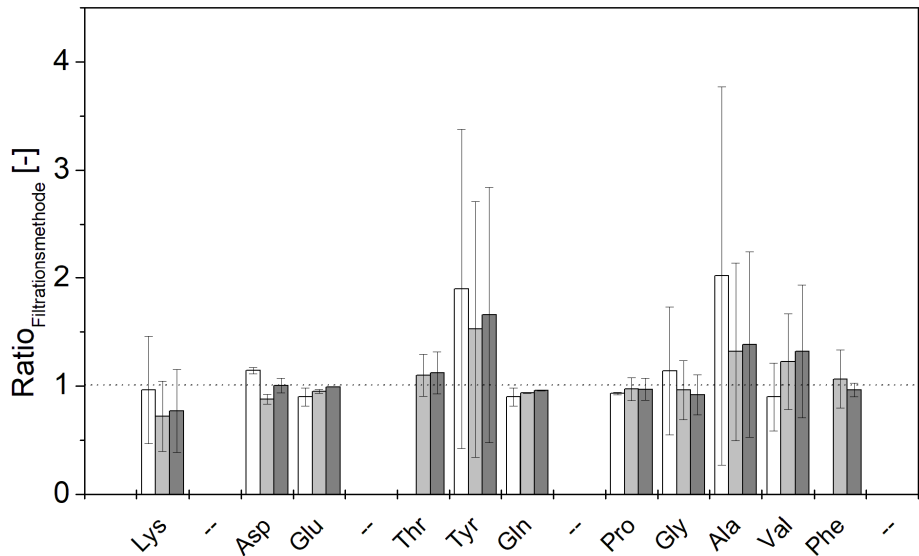


Abbildung 31: Vergleich beider Methoden zur automatischen Schnellfiltration anhand der in Gleichung 21 definierten Ratio, bezüglich der bestimmten intrazellulären Aminosäuren. Die Ratio beschreibt dabei das Verhältnis der bestimmten Konzentrationen mit der modifizierten Filtrationsmethode zu etablierter Filtration in der Anlage. Ein Verhältnis < 1 bedeutet eine höhere Konzentration bei der etablierten Methode, > 1 eine höhere Konzentration bei der modifizierten Methode. Dargestellt sind nur Aminosäuren, die bei beiden Stämmen mit beiden Methoden intrazellulär bestimmt werden konnten. Sie sind gruppiert anhand der weiter oben vorgenommen Unterteilung gemäß ihren Eigenschaften. Die Vergleiche erfolgten innerhalb der Wachstumsphase bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen der Organismen, siehe Tabelle 6. Probenahme 1 □, Probenahme 2 ■ und Probenahme 3 ■. Pro Probenahme wurden drei technische Replikate genommen.

geschlossen werden, da sich dies nicht nur auf einzelne Stoffe auswirken würde.

Die Frage nach einer notwendigen Umstellung der Anlage kann aufgrund der vorliegenden Datenlage nicht abschließend geklärt werden. Somit werden für die folgende Diskussion der metabolischen Untersuchungen im anschließenden Kapitel die Ergebnisse beider Varianten zusammengeführt.

7.2 Vergleich der *C. glutamicum* Stämme ATCC 13032 und LC 298 bei Zelldichten größer 10 g/L hinsichtlich der Aminosäureproduktion

Der von Chen et al. [24] beschriebene Stamm *C. glutamicum* LC 298 ist Bestandteil einer Reihe genetisch modifizierter Stämme zur Produktion von L – Lysin, ausgehend vom Wildstamm *C. glutamicum* ATCC 13032. Zur Charakterisierung der Veränderungen des mikrobiellen Metabolismus, insbesondere der Aminosäureproduktion wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben, wurden während einer Fed-Batch-Fermentation Proben zu verschiedenen Zeitpunkten der jeweiligen Kultivierung des Wildstammes sowie des modifizierten Stammes *C. glutamicum* LC 298 per automatisierter Schnellfiltration aus dem Reaktor entnommen. Die folgenden Daten dieses Abschnittes geben technische Replikate der Probennahmen wieder und keine biologischen Replikate der Kultivierungen, sodass deren Interpretation mit einer entsprechenden Unsicherheit verbunden ist.

7.2.1 Fed-Batch Fermentationen

Durchgeführt wurden beide Fermentationen wie in Abschnitt 6.3.3 detailliert beschrieben im Fermenter der Schnellprobennahmeeinheit (RSU). Dabei wurde im Satzbetrieb begonnen und nach einer Fermentationsdauer von ca. 15 Stunden eine Fütterung begonnen, ausgerichtet an einer begleitenden Messung der Glukosekonzentration. Bei dieser Fütterung wurde die Konzentration der Glukose bis zum Ende der Wachstumsphase unterhalb von 20 g/L gehalten. Wie in Abbildung 32 b erkennbar, zeigt sich dabei kein gleichmäßiger Konzentrationsverlauf zwischen den Kultivierungen beider Stämme, was die direkte Vergleichbarkeit beeinflussen kann, aber bei der folgenden Diskussion an betreffender Stelle berücksichtigt werden soll. In Abbildung 32 sind die Verläufe der Fermentationen dargestellt, ausgedrückt anhand der Messwerte für die Biomassekonzentration als optische Dichte AU_{660} (a) sowie der Glukosekonzentration (b) im Bioreaktor. Für den Zeitraum des Satzbetriebes waren die Wachstumskurven nahezu identisch. Für den Wildstamm ATCC 13032 betrug sie hierbei $\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$ und für den genetisch modifizierten Stamm LC 298 $\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$. Die anschließende Fütterungsphase zeigte Unterschiede in der Wachstumsrate und der maximal erreichbaren Biomassekonzentration beider Stämme. Der Wildstamm erreichte mit einer Wachstumsrate von $\mu = 0,28 \text{ h}^{-1}$ eine maximale Biomassekonzentration von 32 g/L (entspricht $OD_{660} = 90$). Demgegenüber steht der Stamm *C. glutamicum* LC 298 mit einer geringeren Wachstumsrate von $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$ und einer maximalen Biomassekonzentration 23 g/L. Der Verlauf der Glukosekonzentration in Abbildung 32 verdeutlicht, dass keine Substralimitierung über den Kultivierungszeitraum vorlag. Der Ausbeutekoeffizient für Biomasse des Wildstammes lag bei $Y_{X/S} = 0,49 \text{ g/g}$ in der Batchphase und mit

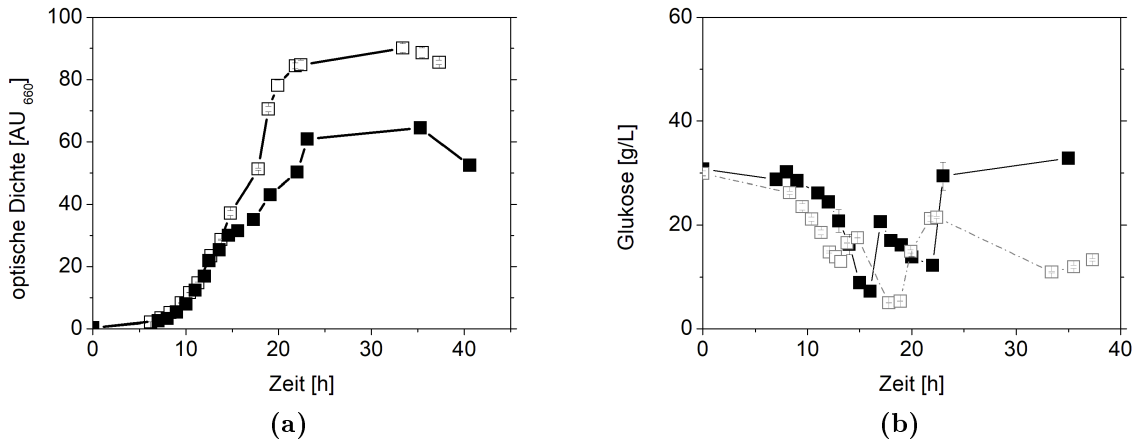


Abbildung 32: Fermentationsverläufe der Fed - Batchkultivierungen von *C. glutamicum* ATCC 13032 □ und LP 298. ■ Dargestellt sind die Biomassekonzentrationen anhand der optischen Dichten (OD_{660}) in Abbildung a (entnommen aus [45]), sowie die Glukosekonzentration im Bioreaktor in Abbildung b.

LC 298					ATCC 13032				
Zeit [h]	OD_{660} [-]	BTM [g/L]	c_{Glc} [g/L]	μ [h^{-1}]	Zeit [h]	OD_{660} [-]	BTM [g/L]	c_{Glc} [g/L]	μ [h^{-1}]
12,5	21	7,8	16	0,52	12,1	23	7,7	15	0,55
19,1	43	15,4	16	0,11	17,8	52	17,6	5	0,39
23,1	61	21,8	12	0,18	18,9	70	24,2	5	0,29
					22,4	85	29,1	21	0,01
40,6	53	18,8	32	-0,04	35,5	89	30,4	12	-0,01

Tabelle 6: Probenahme Fermentationen Wildstamm und Mutant

$Y_{X/S} = 0,23$ g/g während der folgenden Fütterung vergleichbar mit LC 298 bei $Y_{X/S} = 0,52$ g/g und $Y_{X/S} = 0,22$ g/g. Unterschiede zeigten sich bei den Werten für die Substrataufnahmerate. Einer Rate von $q_S = 0,79$ $g_{Glukose}/(g_{BTM}h)$ folgte eine Abnahme auf $q_S = 0,50$ $g_{Glukose}/(g_{BTM}h)$ in der Fütterungsphase und eine weitere Reduzierung in der stationären Phase auf $q_S = 0,13$ $g_{Glukose}/(g_{BTM}h)$ bei ATCC. Für LC 298 blieb nach der Batchphase die Aufnahmerate von $q_S = 0,57$ $g_{Glukose}/(g_{BTM}h)$ auf $q_S = 0,55$ $g_{Glukose}/(g_{BTM}h)$ und verringerte sich anschließend auf $q_S = 0,27$ $g_{Glukose}/(g_{BTM}h)$. Die Überführung in die stationäre Phase erfolgte durch die Vorgabe einer konstanten und niedrigen Zufütterung von Substrat, welcher eine Abnahme der Biomassekonzentration nach ca. 35 Stunden Kultivierungsdauer für beide Organismen folgte. Die Probenahme mittels Schnellfiltration erfolgte zu den in Tabelle 6 aufgelisteten Zeitpunkten beider Kultivierungen.

7.2.2 Vergleich intra-und extrazellulärer Aminosäuren

- Aspartat- und Lysinstoffwechsel

Wie in Abschnitt 5.2.1 anhand von Abbildung 4 gezeigt, gehören zu diesem Stoffwechselzweig die Aminosäuren Lysin, Homoserin, Methionin, Threonin, Isoleucin, Glycin und Aspartat sowie die Lysinvorstufe Diaminopimelat (DAP). In Abbildung 33 a - e sind Konzentrationsverläufe der per Schnellfiltration bestimmten Stoffe jenes Stoffwechselabschnittes dargestellt. In den Diagrammen sind die Messwerte für den Wildstamm ATCC 13032 gleichermaßen dargestellt wie die des genetisch modifizierten Stammes LC 298. Beginnend mit der Aminosäure Lysin (33 a), zeigt sich für den Wildtyp zum Zeitpunkt der Probenahme nach 12 Stunden im Satzbetrieb $7,9 \mu\text{m}/g_{BTM}$ ein Anstieg im weiteren Verlauf der Kultivierung auf maximal $14,7 \mu\text{m}/g_{BTM}$ (23 h) und eine Reduzierung auf $11,8 \mu\text{m}/g_{BTM}$ in der Stagnationsphase. Für LC 298 wurde ein anfänglicher Wert von $23,8 \mu\text{m}/g_{BTM}$ mit einer Steigerung im weiteren Verlauf auf $69 \mu\text{m}/g_{BTM}$ bestimmt. Gegen Ende der Stagnationsphase steigt dieser Wert noch einmal an auf $195 \mu\text{m}/g_{BTM}$, der aufgrund der stark unterschiedlichen Messergebnisse zwischen den beiden Filtrationsroutinen aber mit einer sehr hohen Abweichung behaftet ist. Einen Schritt zurück im Stoffwechselweg findet sich DAP (Di-aminopimelat). Für den Wildstamm ATCC 13032 folgt nach einem anfänglichen Anstieg auf $20,4 \mu\text{m}/g_{BTM}$ ein Rückgang der DAP - Konzentration während der Wachstumsphase. Ein ähnlicher Verlauf findet sich auch bei LC 298 mit anfänglich geringeren $1,2 \mu\text{m}/g_{BTM}$ und einem Anstieg auf maximal $10,1 \mu\text{m}/g_{BTM}$. Die intrazelluläre Konzentration von Glycin liegt zu Beginn bei beiden Stämmen bei ca. $12 \mu\text{m}/g_{BTM}$, fällt dann aber beim Wildstamm auf $7,8 \mu\text{m}/g_{BTM}$ ab, wohingegen die Mutation in einem stetigen Anstieg resultiert. Die Konzentration von Threonin liegt beim Wildstamm über den gesamten Kultivierungsbereich zwischen $9,0 \mu\text{m}/g_{BTM}$ und $7,5 \mu\text{m}/g_{BTM}$, mit einer leicht abnehmenden Tendenz. Gegensätzlich dazu verhält sich der Stamm LC 298, dessen Konzentration bei $10,7 \mu\text{m}/g_{BTM}$ im Satzbetrieb auf $50,8 \mu\text{m}/g_{BTM}$ während der fortlaufenden Wachstumsphase ansteigt und am Ende der Stagnation weder abfällt noch ansteigt. Isoleucin, Methionin und Homoserin konnten beim Wildstamm im Gegensatz zu den Arbeiten von da Luz nicht bestimmt werden. Bei LC 298 liegt der Bereich für Isoleucin zwischen $0,4 - 0,7 \mu\text{m}/g_{BTM}$ mit einem Anstieg in der Stagnation auf $2,9$. Die Konzentration von Homoserin erhöht sich im Laufe der Wachstumsphase von $3,1 \mu\text{m}/g_{BTM}$ auf $48,9 \mu\text{m}/g_{BTM}$. Als Ausgangspunkt dieser Aminosäuren steht Aspartat. Hier ist ein Anstieg während der Wachstumsphase für beide Stämme erkennbar. Haben beide nach 12 h noch ein Konzentrationsniveau von $27,8 \mu\text{m}/g_{BTM}$ (ATCC 13032) und $9,2 \mu\text{m}/g_{BTM}$ (LC 298) liegt dieses bei LC 298 mit maximal $27,3 \mu\text{m}/g_{BTM}$ deutlich niedriger als beim Wildstamm mit maximal $108,7 \mu\text{m}/g_{BTM}$.

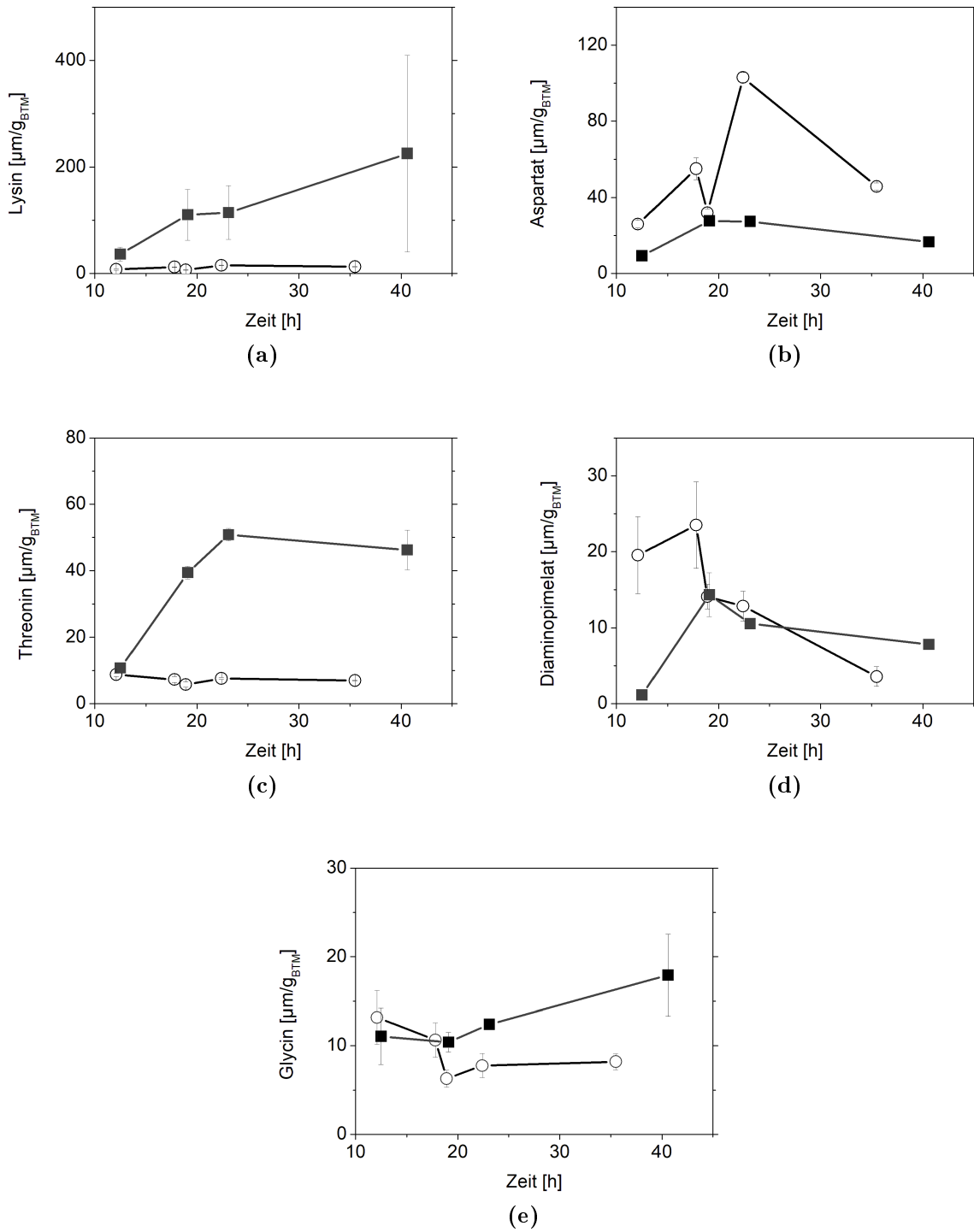


Abbildung 33: Vergleich intrazellulärer Aminosäuren des Aspartat- und Lysinstoffwechsels von Wildstamm \circ und modifiziertem Organismus \blacksquare

- Glutamatstoffwechsel

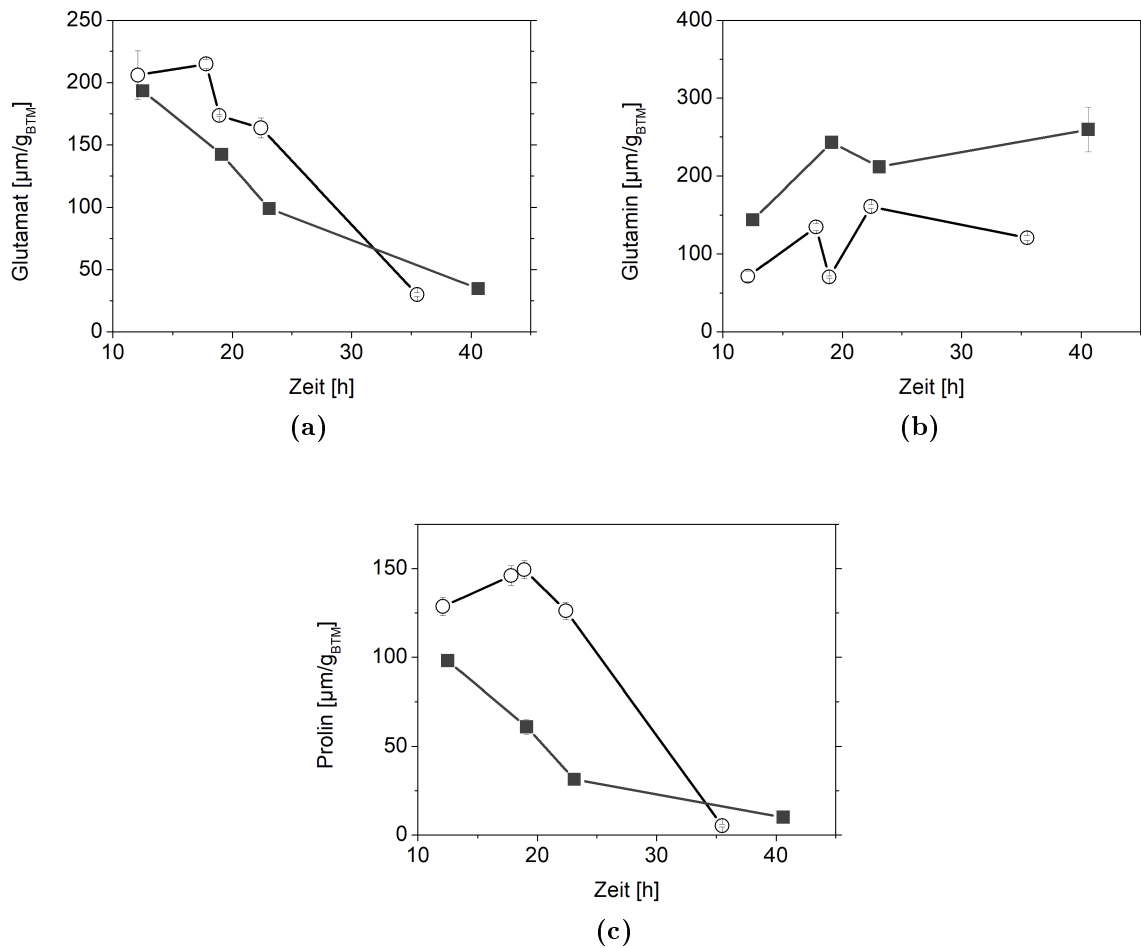


Abbildung 34: Vergleich intrazellulärer Aminosäuren des Glutamatstoffwechsels von Wildstamm ○ und modifiziertem Organismus ■

Die Glutamatkonzentration verläuft beim Wildstamm ausgehend von $215,8 \mu\text{m/g}_{BTM}$ stetig abnehmend, was auch für LC 298 gilt. Bei einem ähnlichen Initialwert liegt die intrazelluläre Konzentration bei ATCC 13032 während des Wachstums jedoch etwas höher. Für die Konzentration von Glutamin ist dies umgekehrt. Hier zeigt der modifizierte Stamm einen durchgehend höheren Wert, was zudem mit einem zweifach höheren Initialwert einhergeht. Im Gegensatz zu den vorherigen Tendenzen zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Organismen bei der Betrachtung der Prolinkonzentration. Vergleichbaren Anfangswerten von $133,1 \mu\text{m/g}_{BTM}$ und $97,3 \mu\text{m/g}_{BTM}$ folgen ein Anstieg für den Wildtyp und eine konstante Abnahme für den modifizierten Stamm über das Wachstum. Extrazellulär ist Prolin konstant in nur sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Arginin konnte bei beiden Stämmen nur in der Probe der Stagnationsphase festgestellt werden.

- Pyruvatstoffwechsel

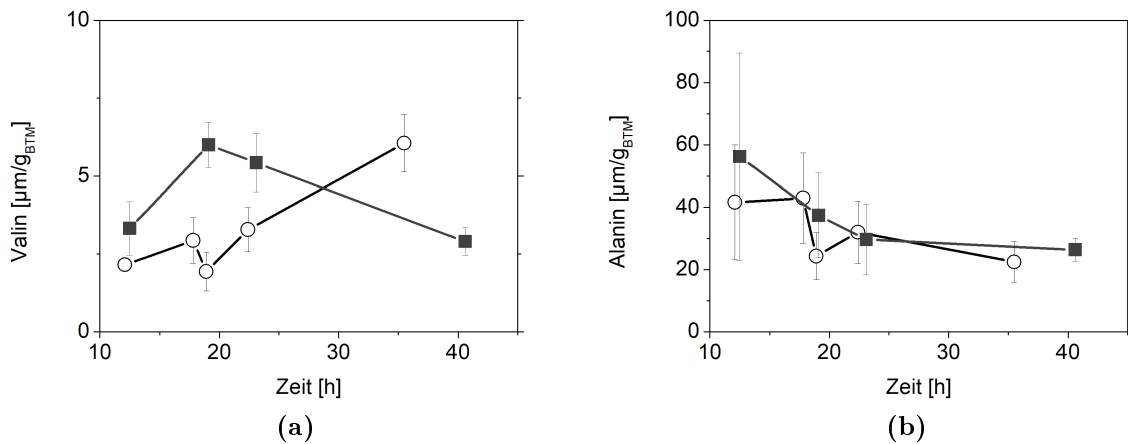


Abbildung 35: Vergleich intrazellulärer Aminosäuren des Pyruvatstoffwechsel von Wildstamm ○ und modifiziertem Organismus ■

Valin hat bei beiden Stämmen eine unterschiedliche Tendenz, zeigt aber wie schon bei den vorherigen Diagrammen, dass sich die Konzentrationen nach 12 h Kultivierung und einer Biomassekonzentration unterhalb von 10 g/L nicht wesentlich unterscheiden. Im weiteren Verlauf ist für den Wildtyp ein konstanter Anstieg zu erkennen, während der Anstieg für LC 298 nur für das Wachstum gilt und anschließend wieder eine Abnahme zu verzeichnen ist. Bei Betrachtung der bisherigen Ergebnisse zeigt die Aminosäure Alanin die geringste Differenz in Verlauf und Konzentration zwischen Wildstamm und modifiziertem Stamm. Lediglich bezüglich der extrazellulären Konzentration ist ein Unterschied feststellbar. Leucin bleibt beim Wildtyp konstant bei 1, während es beim Mutanten nicht bestimmt werden konnte.

- Phosphoenolpyruvatstoffwechsel

Neben Alanin sind auch bei Tyrosin nur geringe Unterschiede hinsichtlich der intrazellulären Konzentrationen und der Tendenz feststellbar. Bei beiden nimmt diese bei einem Initialwert von 10 stetig ab. Phenylalanin ist sehr gering vorhanden und zeigt für den Wildstamm eine abnehmende Tendenz. Für LC 298 verläuft Phenylalanin nahezu konstant bei $0,4 \mu\text{m}/g_{BTM}$. Tryptophan konnte wie auch bei da Luz nicht bestimmt werden.

Die bis hierhin beschriebenen Daten und Trends sollen nun diskutiert und bewertet werden. Neben einer Zusammenfassung soll - soweit möglich - auch eine Vergleichbarkeit mit der Literatur erfolgen. Eine Diskussion hinsichtlich der genetischen Modifikation des Stammes

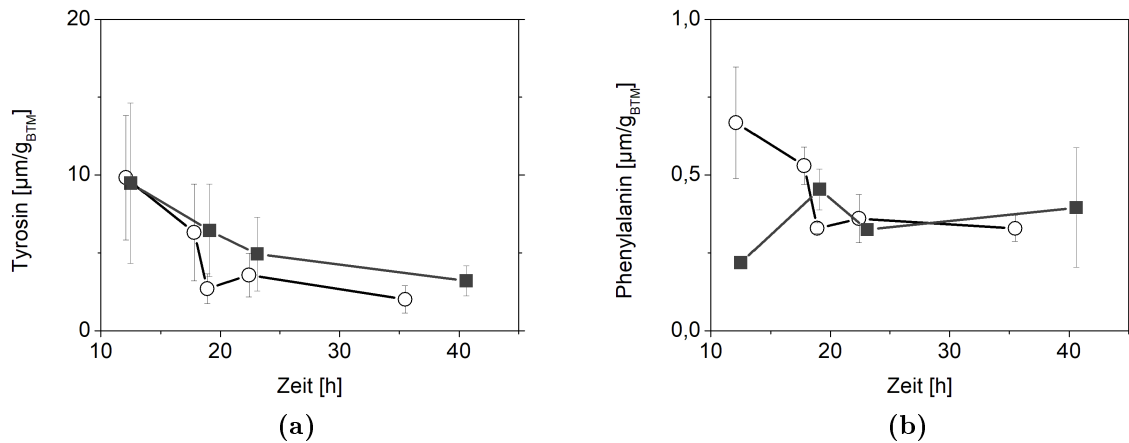


Abbildung 36: Vergleich intrazellulärer Aminosäuren des Phosphoenolpyruvatstoffwechsel von Wildstamm ○ und modifiziertem Organismus ■

LC 298 erfolgt erst im anschließenden Abschnitt. Wie bereits von da Luz dargelegt [29], ist eine direkte Vergleichbarkeit der bestimmten Konzentrationen nicht ganz unproblematisch, da sich die Kultivierungsbedingungen teilweise stark unterscheiden. So reicht die Bandbreite von Schüttelkolbenversuchen über Satzfermentationen bis hin zu der in dieser Arbeit beschriebenen Fed - Batch Kultivierung. Differenzen gibt es zudem auch bei den verwendeten Medien. So unterscheidet sich das von Chen et al. [24] verwendete Medium von jenem in dieser Arbeit bezüglich der eingesetzten Konzentrationen der Komponenten des Mediums. Der Stamm mit der Bezeichnung LP 917 aus den Arbeiten von da Luz [29, 28] gehört ebenfalls zur Reihe der von Chen et al. [24] beschriebenen Modifikationen. Dabei findet sich für LP 917 bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen ein nahezu konstanter Verlauf der Lysinkonzentration zwischen 43,8 - 55,9 $\mu\text{m/g}_{BTM}$. Ein Verweis innerhalb dieser Arbeit auf die Untersuchungen eines ebenfalls modifizierten Stammes zur höheren Lysinproduktion von Krömer et al. [61] zeigt, dass die jeweils beschriebenen Daten mit denen für LC 298 kongruent sind. Lediglich die erzielten Biomassekonzentrationen bezüglich der Fermentationsdauer unterscheiden sich leicht zwischen LP 917 und LC 298, sodass die korrelierenden optischen Dichten von 22 bei den Arbeiten von da Luz im Zeitraum von 17 - 19 h zu finden sind und in der vorliegenden Arbeit bei 12 - 13 h. Diese Verschiebung des Wachstums wurde schon von Chen et al. [23] als Unterschied beschrieben und auf eine erhöhte Nutzung des PEP zur Lysinsynthese anstelle des Zellwachstums zurückgeführt. Dies lässt sich anhand der extrazellulären Lysinkonzentration bestätigen, da LC 298 mit 5 μM weniger als die Hälfte der Konzentration von LP 917 ins Medium sekretiert. Außerdem weist der Mutant LC 298 eine geringere intrazelluläre Konzentration an Di-aminopimelat um Faktor 3 auf.

Der Vergleich zwischen den Kultivierungen des Wildstammes ATCC 13032 zeigt in den Arbeiten von da Luz größtenteils eine höhere Konzentration, mit Ausnahme von Alanin, Tyrosin, Threonin, Phenylalanin und Glycin. Da sich die Unterschiede teilweise bis zu Faktor 3 darstellen, ist hier die Frage zu stellen, woran diese festgemacht werden können. Neben ähnlichen Biotrockenmassen und Glukosekonzentrationen besteht eine deutliche Differenz der Wachstumsraten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich die geringeren intrazellulären Konzentrationen von Aminosäuren aufgrund des stärkeren Wachstums begründen lassen.

Auffällig ist der in Abbildung 33 zu erkennende Abfall zwischen den Probennahmen 2 und 3 für den Wildstamm, der mit Ausnahme von Prolin für alle bestimmten Stoffe gilt. Eine fehlerhafte Probennahme ist daher eher unwahrscheinlich als Ursache anzunehmen. Beide Probenahmen erfolgten bei nahezu gleichen Glukosekonzentrationen, aber in einem zeitlichen Abstand von einer Stunde im Verlauf einer bis dahin abnehmenden Substratkonzentration während der Zufütterung. Einen Einfluss von Glukoselimitierung auf die Lysin-konzentration konnte da Luz [29] im Satzbetrieb für ATCC 13032 im zeitlichen Verlauf einer halben Stunde nicht feststellen. Was also sonst kann dieses Phänomen beschreiben? Prolin dient als sogenanntes kompatibles Solut oder auch Osmoprotektant bei Stress, insbesondere bei osmotischem Stress, zum Ausgleichen des extrazellulären osmotischen Druckes innerhalb der Zelle [112]. Da in Abbildung 25 eine Veränderung der extrazellulären Konzentration von Prolin erkennbar ist, kann auf eine Aufnahme extrazellulären Prolins gedeutet werden. Ebenso legt ein ansteigender Bedarf an Ammonium eine verstärkte intrazelluläre Synthese von Prolin im Vorfeld der beiden Probennahmen nahe, wie die Zugabe an Base in Abbildung 37 (b) offenbart. Eine Anreicherung von Prolin wiederum weist auf eine hyperosmotische Umgebung hin. Weitere Anzeichen für eine Anpassung an eine sich verändernde Umgebung hinsichtlich Osmolalität, sind die gemessenen Abgaswerte von Sauerstoff und Kohlendioxid im Zeitraum beider Probennahmen [112]. So steigt auch der Sauerstoffverbrauch bei *C. glutamicum* unter hyperosmotischem Stress an [98], was sich im Vorfeld der Probenahme in Abbildung 37 (a) verfolgen lässt.

Zudem zeigt sich ein Anstieg der extrazellulären Konzentration von Glycin in Abbildung 25, der auf die von Fränzel et al. [41] beobachtete verstärkte Expression des Glycin Transporters in Situationen osmotischen Stresses bei höheren Salzkonzentrationen hinweist. Dabei stellt die Probe 2 einen Umkehrpunkt dar, nach welchem sich die allgemeinen Trends der Abgasmessungen umkehren, der Ammoniumbedarf kurzzeitig abflacht und die Prolin und Glycinkonzentrationen intrazellulär wieder in den globalen Trend zurückfinden. Somit bleibt noch zu klären, was die hyperosmotische Umgebung provoziert hat, um eine entsprechende Reaktion auszulösen - Salze oder Schaum? Betrachtet man nur die Probennahmen

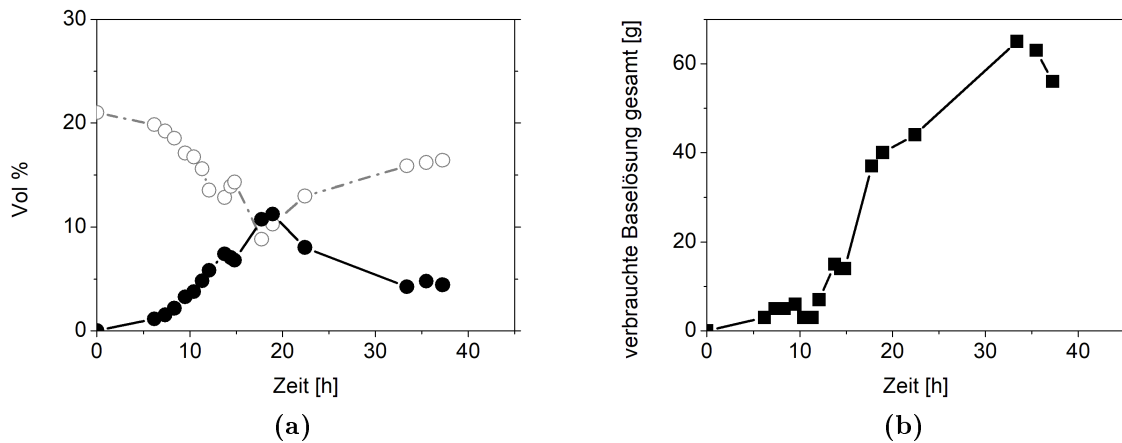


Abbildung 37: Abgasmessung von Sauerstoff \ominus und Kohlendioxid \bullet (a) und Verlauf der verbrauchten Basellösung \blacksquare für die Kultivierung von ATCC 13032

der Metaboliten könnte der Eindruck entstehen es handelte sich um eine kurzfristige Änderung der Umgebung, ausgelöst möglicherweise durch eine relativ schnelle Schaumbildung oder eventuell durch Eindringen einer Salzlösung in den Reaktor. Letzteres ist aufgrund einer fehlerhaften Anbindung der salzhaltigen Mischlösung an das Probennahmesystem der Filtration denkbar. Da sich an den Daten der Abgaswerte aber ein langfristiger Trend ablesen lässt, ist eine Anpassung an den fortwährenden Kultivierungsprozess mit zunehmender Biomasse plausibler, was sich zudem durch die vorangegangenen Beobachtungen zur Veränderung der Ionenstärke während einer Kultivierung mit höheren Zelldichten unterstützen lässt. Somit kann ausgesagt werden, dass sich mit zunehmender Biomasse im Verlauf einer Kultivierung die Umgebung des Organismus verändert. Die Veränderung betrifft die Ionenstärke bzw. die Leitfähigkeit und sorgt im Umkehrschluss für eine Beeinflussung der Osmolalität, was zu einer Anhäufung von Osmoprotektanten und einer Reduzierung sekundärer Metabolite, wie zum Beispiel Aminosäuren, führt.

Eine ähnliche Datenlage ist bei LC 298 nicht zu finden, sodass diesbezüglich nur Vermutungen über eine vergleichbare Veränderung innerhalb der Fermentationsbrühe und der daraus resultierenden intrazellulären Anpassungen aufgestellt werden können.

Festzustellen ist, dass sich die Prolinkonzentration nur mit der modifizierten Filtrationsmethode darstellen lässt. Dies bietet somit die Möglichkeit, den Grund für die oben festgestellte Abnahme der Messwerte zwischen Probe 2 und 3 zu erörtern. Damit lässt sich ein Vorteil bezüglich der Modifikation der Filtrationsroutine ableiten. Ein Grund könnte darin liegen, dass durch die Modifikation der Filtration der Einfluss der zunehmenden Viskosität in der Fermentationsbrühe aufgrund der Stressreaktion der Organismen [41] reduziert wird.

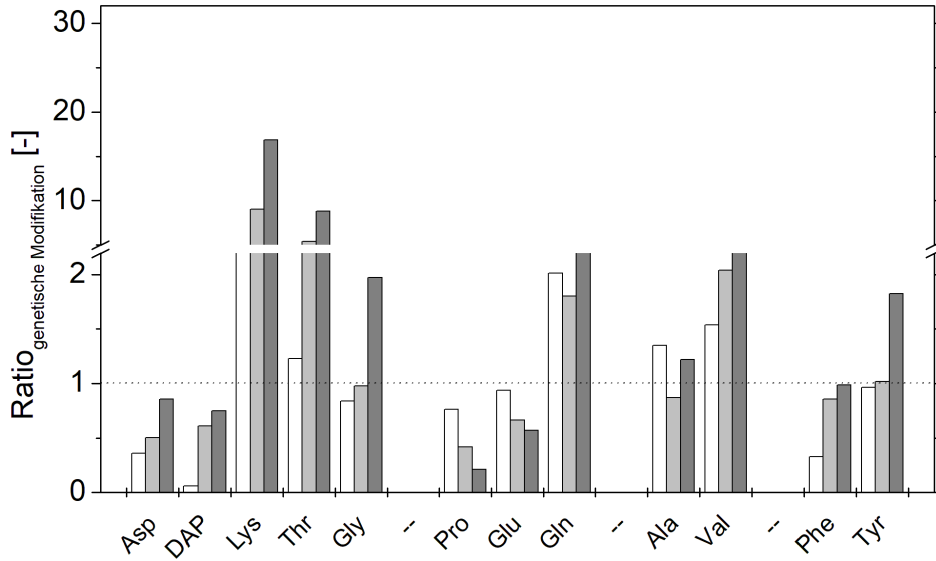


Abbildung 38: Vergleich beider Stämme (ATCC13032 und LC298) anhand der in Gleichung 22 definierten Ratio. Die Ratio beschreibt dabei das Verhältnis der bestimmten Konzentrationen des modifizierten Stamms zum Wildstamm. Ein Verhältnis < 1 bedeutet eine höhere Konzentration beim Wildstamm, > 1 eine höhere Konzentration beim genetisch modifizierten Stamm. Die Aminosäuren sind anhand ihrer Stoffwechselwege gruppiert und stellen die Messungen der Mittelwerte beider Methoden bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen der Organismen dar. Dargestellt sind nur Aminosäuren, die bei beiden Stämmen mit beiden Methoden intrazellulär bestimmt werden konnten. Für jede Aminosäure sind die Probenahmepunkte bei vergleichbaren Biotrockenmassen aus Tabelle 6 dargestellt. Probenahme 1 \square , Probenahme 2 \blacksquare und Probenahme 3 \blacksquare . Pro Probenahme wurden drei technische Replikate je Filtrationsmethode genommen. Diagramm entnommen aus [45].

$$Ratio_{genetischeModifikation} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{\bar{c}_{LC298,i}}{\bar{c}_{ATCC13032,i}} \quad (22)$$

7.2.3 Allosterische Regulierung der Aspartokinase in *C. glutamicum* LC 298

Der Vergleich in Abbildung 38 beruht auf dem gleichen Prinzip wie schon die Darstellung 31 im vorangegangenen Abschnitt. Einziger Unterschied ist, dass der Quotient nicht auf den gemittelten Konzentrationen der verschiedenen Filtrationsmethoden, sondern auf den gemittelten Konzentrationen der beiden *C. glutamicum* Stämme ATCC 13032 und LC 298 basiert. Auch hier wurden die Proben bei den übereinstimmenden Biomassekonzentrationen

nen gegenübergestellt, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen und Tendenzen im Verlauf der Zunahme von Biomasse darzustellen. Abweichend ist die Anordnung entsprechend der vorab festgelegten Unterteilung in die verschiedenen Stoffwechselzweige erfolgt, siehe Abbildung 4 in Abschnitt 5.2.1. Es sei hier darauf hingewiesen, dass die Abbildung auf dem Vergleich bei Biomassekonzentrationen erfolgt und nicht basierend auf der Fermentationsdauer. Beginnend beim Aspartat und Lysin-Stoffwechsel zeigt sich als erstes Merkmal ein zunehmender Trend bei allen dargestellten Stoffen dieses Zweiges. Das hat zwei verschiedene Bedeutungen. Für alle Ratio unter 1 bedeutet ein zunehmender Trend, dass sich die Konzentration des Stoffes im modifizierten Stamm der Konzentration des Stoffes im Wildstamm angleicht. Der Trend beschreibt also eine relative Annäherung der Werte zueinander. Dies trifft für die ersten beiden Stoffe in der Abbildung, Aspartat und Diaminopimelat, zu. Für Lysin ist dieser zunehmende Trend ebenfalls zu beobachten, mit dem Unterschied, dass er sich deutlich über dem Gleichgewichtswert von 1 befindet. Die zweite Bedeutung ist somit, dass sich die Konzentration im Verhältnis zur Konzentration im Wildstamm um weitere Vielfache erhöht. Im Fall von Lysin ist dies eine Steigerung vom 6-fachen auf das 23-fache der Aminosäure Lysin. Threonin zeigt eine ähnliche Steigerung für die intrazelluläre Konzentration, wobei sich bei einer Biomassekonzentration unterhalb von 10 g/L nur ein geringfügiger Unterschied zwischen den Stämmen darstellt und erst oberhalb davon eine deutlich höhere Threoninkonzentration bestimmt wurde. Bei Glycin ist erst über einer Biomassekonzentration von 20 g/L eine relative Steigerung erkennbar. Bei der Betrachtung des Glutamatstoffwechselzweiges stellt sich ein deutlich umgekehrter Sachverhalt dar. Zeigen sich für niedrigere Biomassen noch vergleichbare intrazelluläre Konzentrationen für Prolin und Glutamat, nimmt deren Synthese im modifizierten Stamm LC 298 deutlich ab. Bei Prolin entspricht das intrazelluläre Level am Ende noch 21 % des Wildstammes, bei Glutamat sind es noch 57 %. Glutamin liegt während der gesamten Wachstumsphase für den Mutanten bei einem mittleren Faktor von ca. 2,3 über der Konzentration des Wildstammes. Für den Abgang des Pyruvatweges konnten nur Alanin und Valin bei beiden Stämmen bestimmt werden, wobei beide durchgehend eine höhere Konzentration zu Gunsten des Mutanten wiedergeben. Die Produkte des Phosphoenolpyruvatweges Tyrosin und Phenylalanin zeigen, dass diese anfänglich beim Mutanten in einer ähnlichen Konzentration wie beim Wildstamm vorliegen. Im weiteren Verlauf werden diese aber verstärkt synthetisiert, sodass auch hier eine höhere Konzentration vorliegt.

Wie weiter oben dargelegt, erfolgen der Vergleich beider Stämme und die daraus resultierenden Rückschlüsse aufgrund der Einflüsse der Punktmutation der Aspartokinase zur allosterischen Regulierung bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen im Fermenter. Wie in Tabelle 6 zu erkennen ist, bedeutet dies aber, dass die Probenahmen (BTM 15 g/L und 22 g/L) bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen und Wachstumsraten erfolg-

ten und möglicherweise einen Einfluss darstellen, da das mikrobielle Wachstum und die Bildung von Sekundärmetaboliten unmittelbar zusammen hängen, wie schon weiter oben beschrieben.

Chen et al. [24] konnten mit ihrer Deregulierung der Aspartokinase eine Steigerung der Lysinproduktion provozieren, was sich auch in den vorliegenden Ergebnissen bestätigt. Neben Lysin zeigt sich der Einfluss der Mutation auch bei anderen Aminosäuren intrazellulär. An erster Stelle erkennbar an einer Steigerung der Threoninkonzentration, wie zu erwarten, da die Mutation auch die Insensitivität gegenüber Threonin reduziert. Für eine weitere Aminosäure des Aspartatstoffwechsels, Glycin, zeigt sich eine Erhöhung gegenüber dem Wildstamm erst im weiteren Verlauf der Fermentation, einhergehend mit einer größer werdenden Akkumulation von Aspartat und Di - aminopimelat, die sich als Zeichen einer Flaschenhalssituation interpretieren lässt. Diese Stoffe häufen sich an, weil die nachfolgende Synthese der vorangehenden Versorgung von Oxalacetat unterliegt. Ein Indiz, dass dies auf Kosten anderer Synthesewege erfolgt, lässt sich im abnehmenden Trend von Prolin und Glutamat vermuten, was sich wiederum als Reduktion der Aktivität des Zitronensäurezyklus interpretieren lässt und sich auch in der reduzierten Wachstumsrate widerspiegelt [110]. Dass sich die Konzentration von Glutamin im Gegensatz dazu auf einem höheren und gleichbleibenden Niveau befindet, lässt sich als erhöhter Bedarf von NADPH deuten, welches für die Synthese sowohl von Glutamat als auch von Prolin notwendig ist. Aufgrund der Nutzung von ATP [112] trifft dies nicht bei der Synthese von Glutamat zu Glutamin zu, sodass schlussendlich eine zu geringe Versorgung und Bereitstellung von NADPH als Ursache herausgearbeitet werden kann.

Neben der logischen Schlussfolgerung, dass die Mutation eine erhöhte Lysinproduktion provoziert, kann festgehalten werden, dass eine weitere Steigerung nur mit einer Erhöhung der NADPH Versorgung möglich ist. Dies konnte in den Arbeiten von Bommareddy et al. [12] mit einer Manipulation des Penthosephosphat Stoffwechselweges als hauptsächliche Quelle für NADPH gezeigt und innerhalb der Arbeiten von da Luz et al. [29] zusätzlich mit Untersuchungen zu intrazellulären Metaboliten bestätigt werden.

7.3 Entwurf des Spiralseparators

Wie schon in Abschnitt 5.3 dargelegt, sind außer strömungsdynamischen Parametern vor allem geometrische Überlegungen wichtig, um eine Fokussierung bei gleichzeitigem Wechsel des Mediums zu ermöglichen. Die folgenden Ausführungen sind darauf ausgerichtet, die maßgeblichen Punkte hierfür näher zu betrachten und mit den bisher in der Literatur gemachten Erkenntnissen zu einer optimalen Auslegung der Spiralgeometrie zu vereinen. Es werden die Parameter mit geometrischem Bezug, also Partikeldurchmesser zu hydraulischem Durchmesser a/D_h , Kanalhöhe zu -breite H/W und die Krümmung jeweils für Fluid und Partikel getrennt diskutiert.

7.3.1 Partikeldurchmesser zu hydraulischem Radius (a/D_h)

Der grundlegende Parameter für eine Fokussierung von Partikeln in mikrofluidischen Systemen wurde bereits in Abschnitt 5.3.4 erklärt. Somit können Partikel, welche den Grenzwert dieses Parameters von 0,07 überschreiten, unabhängig von ihrem Eintrittsort in den Kanal fokussiert werden. Die Breite des Partikelstromes kann also auf den $\leq 3,8$ -fachen Partikeldurchmesser reduziert werden. Dies stellt kein Limit dar, da bei einer Partikelkonzentration von 250000, respektive einem λ von 0,03, auch eine Reduzierung auf den 2-fachen Durchmesser möglich ist [75]. Das von Di Carlo [34] eingeführte λ definiert die Anzahl der Partikel pro Längeneinheit des Kanals, siehe Gleichung 23. Neben dem Durchmesser a der Partikel und den Kanalparametern W für die Breite und H für die Höhe ergibt sich das λ auch aus der Volumenfraktion der Partikel in der Lösung. Die maximale Partikelanzahl für eine Fokussierung wird bei einem $\lambda = 1$ angesetzt, da es oberhalb dieses Wertes zur sogenannten sterischen Hinderung zwischen den Partikeln kommt und keine weitere Reduzierung mehr möglich ist [34].

$$\lambda = \frac{6 \cdot W \cdot H \cdot V_f}{\pi \cdot a^2} \quad (23)$$

Das angestrebte Anwendungsfeld befindet sich in der Mikrobiologie, sodass sich der Größenbereich des Durchmessers der Organismen allgemein im Bereich von einem bis zu drei μm definiert.

7.3.2 Kanalhöhe zu Kanalbreite (H/W)

- Fluid

Der hydraulische Durchmesser D_h rechteckiger Kanäle stellt das Äquivalent zum einfachen

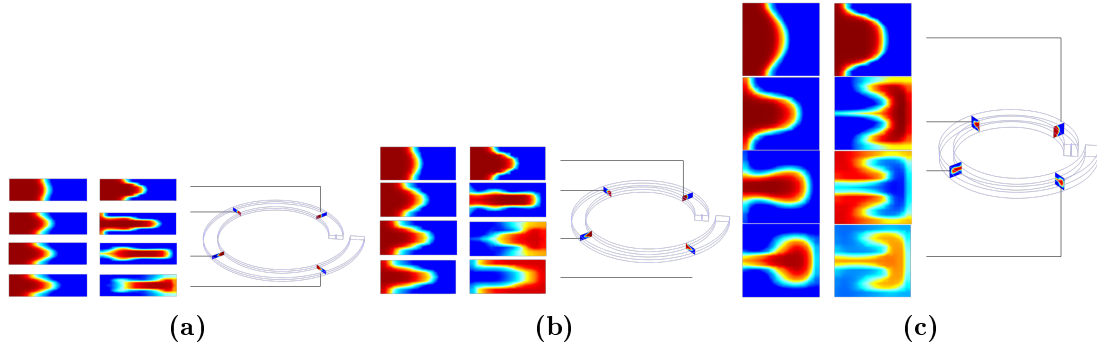


Abbildung 39: simuliertes Fluidverhalten für das Verhältnis Kanalhöhe zu Kanalbreite (H/W) von 0,3 (a), 0,5 (b) und 1 (c), die abgebildeten Verhalten entsprechen den Reynoldszahlen von 8 (jeweils linke Spalte) und 40 (jeweils rechte Spalte) bei einem hydraulischen Durchmesser gemäß Tabelle 7 für die Partikelgröße von $3,2 \mu\text{m}$, Kanallänge hierbei 7 mm

Durchmesser kreisrunder Rohrgeometrien dar und lässt sich im Allgemeinen anhand von Gleichung 24 ermitteln.

$$D_h = \frac{2 \cdot W \cdot H}{W + H} \quad (24)$$

Eine genauere Betrachtung des hydraulischen Durchmessers als Einflussgröße auf Fluidbewegung und Partikelfokussierung zeigt, dass das Verhältnis von Kanalhöhe zu Kanalbreite (H/W) einen großen Einfluss besitzt. Dabei wird in der Literatur allgemein bei einem Verhältnis von kleiner 1 von *low aspect ratios* und bei einem Verhältnis größer 1 von *high aspect ratios* gesprochen. Für das Verhalten der Flüssigkeit bedeutet dies mit zunehmendem H/W eine Zunahme der Wirbelstrukturen [43, 68, 106] sowie das Entstehen neuer Wirbelpaare oberhalb einer kritischen Deanzahl [31]. Dies geschieht in Abhängigkeit der Kanalbreite, welche zu einem stärkeren Vermischen zweier parallel verlaufender Ströme [48] in einer Spiralstruktur führt. In der Arbeit von Howell et al. [48] deutet sich diesbezüglich an, dass bei einem Verhältnis von 0,5 und einer Reynoldszahl von ca. 40 ein kompletter Seitenwechsel möglich ist, wohingegen bei einem Verhältnis von 1 ein derartiges Verhalten nicht beobachtet werden konnte. Sudarsan et al. [103] haben dies für das Verhältnis von 0,3 in einem Bereich der Reynoldszahl von 32 bis 45 gezeigt und bei einem Verhältnis von 0,145 für eine Reynoldszahl von 50. Somit erschließt es sich, dass in Bezug auf die Fluidmanipulation ein $H/W \leq 1$ notwendig ist, da mit zunehmender Breite aus dem parabolischen Strömungsprofil eine Propfenströmung wird und einer Vermischung entgegenwirkt [14]. Dies wiederum erzwingt eine höhere Strömungsgeschwindigkeit für einen Seitenwechsel.

- Partikel

Dieser Übergang zur Pfropfenströmung hat ebenfalls einen Einfluss auf die Fokussierung der Partikel. Wie schon in Abschnitt 5.3.4 in Gleichung 15 dargelegt, beruht die Fokussierung hauptsächlich auf dem Verhältnis der Scherkräfte zur Deankraft (F_{SG}/F_D), zusammengefasst in dem Faktor R_f , und der gleichzeitig geltenden Eingrenzung auf $R_f \approx 1$ (vgl. 15). Abbildung 40 zeigt das Verhältnis von Reynoldszahl zu R_f für die unterschiedlichen Partikelgrößen und damit eine mögliche Fokussierung, wobei der Parameter nur den hydraulischen Durchmesser D_h berücksichtigt und nicht das Verhältnis von Höhe zu Breite. Mit abnehmendem H/W verringern sich aber die Scherkräfte, wohingegen die Deankräft-

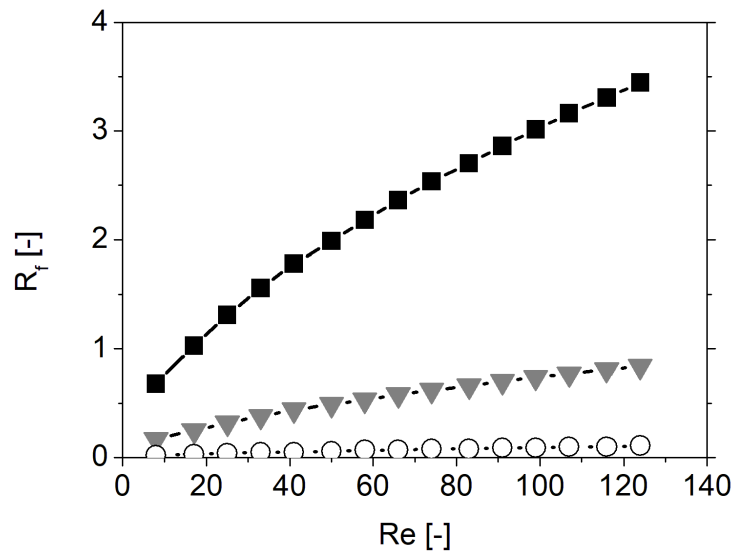


Abbildung 40: Fokussierungsparameter R_f nach Gleichung 15 für die mögliche Fokussierung sphärischer Partikeldurchmesser von $3,2 \mu\text{m}$ ■ , $2 \mu\text{m}$ ▼ und $1 \mu\text{m}$ ○

te eine größere Ausprägung erfahren [75]. Da die Fokussierung auf einer Dominanz der Scherkräfte beruht, erhöht sich damit wieder die minimal notwendige Strömungsgeschwindigkeit und die notwendige Kanallänge zur Fokussierung [75]. Im weiteren Verlauf kehrt sich das Verhältnis zum Vorteil der Deankräfte um und führt zu einer Defokussierung bei größer werdenden Geschwindigkeiten [2, 75]. Zudem verringert sich auch der Geschwindigkeitsbereich für eine stabile Fokussierung. Umgekehrt vergrößert sich die Bandbreite bei der Verringerung des Verhältnisses von Höhe zu Breite. Martel und Toner [76] haben für die Verhältnisse H/W von 0,6 und 0,5 eine Stabilität von 75 - 70 % bestimmt, für ein Verhältnis von 0,25 nur noch eine Stabilität von 40 %. Das maximale *Confinement*, also das Verhältnis von Kanalbreite zu Bandbreite, zeigt hingegen bei Verhältnissen von 0,5

und 0,25 mit Werten von 7 und 10, dass das Band im Verhältnis zur Kanalbreite, über die Kanallänge gemittelt, geringer wird. Bei einer Bandbreite des Fluides nach dem Seitenwechsel von größer 50 % ist demnach eine Separation realisierbar.

Die minimalen Längen für einen 2-fachen Partikeldurchmesser bei H/W Verhältnissen von 0,5 und 0,25 liegen bei einer mittleren Geschwindigkeit von $1m/s$ bei ca. 3 mm und ca. 15 mm, wobei die Abschätzung der Kanallänge von verschiedenen H/W dabei eine größer werdende Diskrepanz mit zunehmender Kanalbreite gegenüber experimentellen Ergebnissen zeigt [76]. Diese Diskrepanz kann durch eine nachträgliche Ermittlung des Auftriebskoeffizienten verringert werden, was für Partikel mit einem a/D_h von 0,15 bereits experimentell gezeigt wurde [129]

- Position

Mit Hilfe der oben genannten Verhältnisse und Kriterien lässt sich nun die Position der fokussierten Partikel diskutieren. Neben den Einflüssen der Kanalgeometrie auf das Kräfteverhältnis ist zu beachten, dass beide Kräfte mit dem Partikeldurchmesser verknüpft sind, siehe Gleichungen 25 und 26. Es entsteht eine Abhängigkeit von der dritten Potenz des Durchmessers und Partikel verschiedener Größen können separat fokussiert werden, wobei die Partikel zuerst von den Scherkräften in Richtung Innenwand bewegt werden, um anschließend aufgrund der Deankräfte unterschiedlich weit von der Wand wieder weg bewegt zu werden [52, 62]. Die Partikel mit abnehmendem Durchmesser erfahren hierbei einen größeren Einfluss der Deankräfte, folgen der Zirkulation in Richtung Außenwand [10] und werden somit stärker zur Kanalmitte fokussiert. Die Abstände sind aufgrund der Kanalbreite variierbar [126]. Steigt der Einfluss der Deankräfte weiter, durch Veränderung der Kanalhöhe (*high aspect ratio*) oder der Krümmung, ist eine Fokussierung näher zur Kanalmitte oder an der Außenseite möglich [43, 104, 126]. An der Außenseite spielen bei der Positionierung der Partikel dann wiederum die lokalen sekundären Dean Wirbel eine Rolle [81].

$$F_L = \rho \cdot G^2 \cdot C_L \cdot a_p^4 \quad (25)$$

$$F_D = 5,4 \cdot 10^{-4} \cdot \pi \cdot \eta \cdot De^{1,63} \cdot a_p \quad (26)$$

Bei der Anwendung von Gleichung 26 sollte beachtet werden, dass sich die in der Literatur zu findenden Versionen lediglich in der Bezugnahme auf die Geschwindigkeit unterscheiden,

z. Bsp. Flüssigkeit, Partikel oder Deangeschwindigkeit.

7.3.3 Krümmung

- Fluid

Auf die Position des Schwerpunktes bei der Bewegung der Fluidelemente über die Kanalbreite hat der Radius keinen Einfluß, jedoch auf die benötigte Länge [48]. Danach nimmt die benötigte Wegstrecke entlang des Kanals mit kleiner werdendem Radius ab, also mit größer werdender Krümmung [103], siehe Gleichung 10.

- Partikel

Bei der Partikelfokussierung beschreibt der Parameter $\frac{\lambda}{\delta^{0,5}} = 2$ den Übergang zwischen einer Orientierung der Partikel zur Innenseite (≥ 2) und der Außenseite (≤ 2) [75], wobei die allgemeine Aussage bei genauerer Betrachtung erst bei Reynoldszahlen im Bereich 200–400 richtig aussagekräftig wird. Trotzdem lohnt sich hier eine tiefer gehende Diskussion der gefundenen Ergebnisse von Martel und Toner [76], um Aussagen für das Spiraldesign zu tätigen. Der Parameter $\delta^{0,5}$ variiert zwischen 0 und 0,0166 und unterscheidet somit zwischen einem geraden Kanal und einem stark gekrümmten. Mit zunehmender Krümmung verringert sich die notwendige Reynoldszahl zur Fokussierung, wobei dies nahezu proportional verknüpft ist. Bei einer Krümmung von 0,0083 und einem a/D_h von 0,149 ist somit eine Fokussierung an der Innenseite bei einer Reynoldszahl von ca. 150 möglich. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass für ein a/D_h im Bereich von 0,07 eine Krümmung größer als 0,0034 dafür sorgt, dass sich die Partikel erst an der Kanalinnenseite sammeln, bevor sie ab einer Reynoldszahl größer als 120 in Richtung Außenseite tendieren. Gleiches gilt für ein a/D_h bis 0,149 und eine Krümmung von 0,0166.

7.3.4 Fazit

Anhand der vorangegangenen Ausführungen soll nun noch einmal kurz zusammengefasst werden, welche Designparameter schließlich für den Spiralseparator angewendet wurden, um die Fluid- und Partikelbewegung optimal beeinflussen zu können. Mit dem erwähnten Kriterium zu a/D_h ergeben sich die in Tabelle 7 angegebenen maximalen hydraulischen Durchmesser.

Johnston et al. [52] haben mit einem quadratischen Kanal und einem hydraulischen Durchmesser von 20 μm Partikel eines Durchmessers von 1 μm auf einer Kanallänge von 82 mm nicht fokussieren können, sodass eine Zielsetzung auf Partikel der Größe von 2 μm hier

Tabelle 7: maximale hydraulische Durchmesser für die Fokussierung von Partikeln der Durchmesser von 1 bis 3,2 μm unter Berücksichtigung des Kriteriums $a/D_h = 0,07$

Partikeldurchmesser [μm]	D_h [μm]
1	14,3
2	28,6
3,2	42,9

Tabelle 8: Seitenlängen der verschiedenen Verhältnisse von Kanalhöhe zu Kanalbreite (H/W) für die hydraulischen Durchmesser aus Tabelle 7 zur Fokussierung von sphärischen Partikeln der Durchmesser 1 μm , 2 μm und 3,2 μm

H/W	1		2		3,2	
1	14	14	29	29	43	43
0,5	11	21	21	43	32	64
0,3	9	31	19	62	28	93
0,1	8	75	15	150	23	225

sinnvoller erscheint. Zudem ergeben sich fertigungstechnische Rauheiten bei sehr geringen Kanalgeometrien, wie in Abbildung 41 zu sehen. Diese können für unkontrollierbare Turbulenzmuster sorgen und somit das laminare Strömungsbild erheblich stören.

Aufgrund des Verhaltens der Flüssigkeit beim Seitenwechsel fällt zudem noch das Verhältnis von 1 aus der Betrachtung heraus. Trotz einer etwas geringeren Stabilität der Fokussierung mit zunehmender Breite verspricht ein H/W von 0,3 gegenüber einem H/W von 0,5 ein besseres Verhältnis von Kanalbreite zu Bandbreite (*Confinement*), was bei einer Trennung von Medium und Partikeln eher im Fokus liegt. Je stärker die Krümmung, desto kürzer die Wegstrecke für den Seitenwechsel (Fluidswitch) und desto kleiner die Reynoldszahl für eine Trennung von Partikel und Medium. Mit steigender Krümmung nimmt die

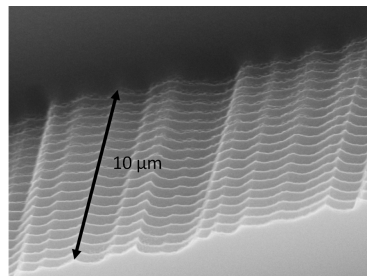


Abbildung 41: Oberflächenstruktur nach dem Ätzen einer Kanalgeometrie mit den Seitenlängen von 10 μm , Aufnahmen mittels REM Mikroskopie zur Verfügung gestellt von Sven Bohne, Institut für Mikrosystemtechnik der TUHH

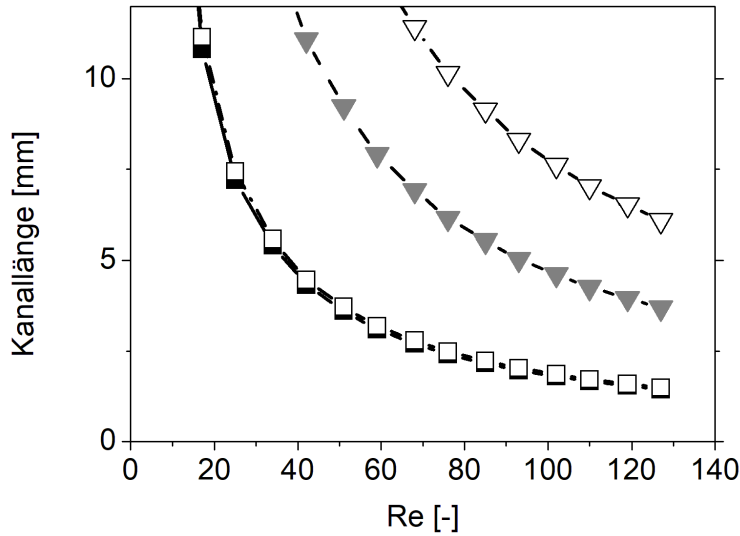


Abbildung 42: Kanallängen für die Fokussierung von sphärischen Partikeln der Durchmesser $3,2 \mu\text{m}$ ■ und $2 \mu\text{m}$ ▼ nach Martel und Toner (siehe Gleichung 27) und Bhagat et al. (Gleichung 28), $3,2 \mu\text{m}$ □ und $2 \mu\text{m}$ ▽

Wegstrecke zur Fokussierung von Partikeln ab [76]. Demnach sollte für eine Krümmung stärker als 0,0166 eine Fokussierung von Partikeln mit einem a/D_h von 0,07 unter einer Reynoldszahl von 100 realisierbar sein. Der Schwerpunkt der fokussierten Partikel sollte bei der Hälfte des Eintrittsschwerpunktes liegen, also bei ca. 12% der Kanalbreite. Durch die Verringerung der Strömungsgeschwindigkeit kann das Problem einer möglichen Defokussierung ebenfalls unterdrückt oder stark verringert werden. Unter den Bedingungen eines hydraulischen Durchmessers von $28,6 \mu\text{m}$ bei einem H/W von 0,3 und einer Krümmung von 0,0242 ergeben sich die in Abbildung 42 dargestellten Längen eines Kanals für die Fokussierung von Partikeln in den Größenordnungen von $2 - 3,2 \mu\text{m}$.

Die Seitenlängen der rechteckigen Geometrie sind dabei 19 mal $62 \mu\text{m}$ bei einem mittleren Radius der Spiralstruktur von $590 \mu\text{m}$. Dabei ist die Gleichung 27 eine leichte Abwandlung der Ausgangsgleichung von Di Carlo für gerade Kanäle (Gleichung 12). Diese Abwandlung bezieht sich auf die Änderung der kleinsten Dimension für die Partikelmigration (H) in den hydrodynamischen Radius (D_h). Die Gleichung gibt die Länge für das Erreichen einer Gleichgewichtsposition bei der Partikelfokussierung an.

$$L = \frac{\pi \cdot \mu \cdot D_h^2}{C_{SGp} \cdot U_{max} \cdot a^2} \quad (27)$$

$$L = \frac{3 \cdot \pi \cdot \mu \cdot D_h^2 \cdot Lm}{2 \cdot \rho \cdot C_L \cdot U_{max}^2 \cdot a^3} \quad (28)$$

Obwohl auch Bhagat et al. (Gleichung 28) von einem Gleichgewicht der Kräfte auf die Partikel ausgehen, bestehen doch Unterschiede in der formellen Berechnungsweise. Zum Beispiel wird die mittlere Strömungsgeschwindigkeit aus dem 1,5-fachen oder 2-fachen der maximalen Strömungsgeschwindigkeit U_{max} berechnet und eine unterschiedliche Abhängigkeit des Partikeldurchmessers hergestellt. Dies führt vor allem bei kleineren Partikeln zu verschiedenen Kanallängen, wie in Abbildung 42 zu sehen. Der Parameter C_L , abhängig von der Reynoldszahl, wird bei beiden mit einem mittleren Wert von 0,5 angenommen. Zhou et al. [129] haben eine Unterteilung in einen negativen sowie einen positiven Auftriebskoeffizienten (C_L) für $a/D_h \geq 0,15$ vorgenommen und experimentell bestimmt.

Anhand der bisherigen Ausführungen wird deutlich, dass der Wissensstand in der Literatur bezüglich der Partikelfokussierung innerhalb von mikrofluidischen Systemen größer ist als zu einem definierten Seitenwechsel der Flüssigkeiten. Daher wird sich auch die Auslegung der Spiralstruktur stärker daran orientieren. Dennoch kann ein Seitenwechsel bei Reynoldszahlen von 40 – 50 anhand der vorangegangenen Ausführungen mit großer Sicherheit realisiert werden.

7.4 Charakterisierung der Fluidbewegung

Sudarsan et al. haben mit Gleichung 10 gezeigt, dass sich die Bewegung eines Fluidelementes über die Kanalbreite bei einer bestimmten Kanallänge beschreiben lässt. Zusätzlich zu dem von ihnen dargestellten Fall bei $\frac{\tau_a}{\tau_D} = 1$, wird folgender Ansatz zur Darstellung der anschließenden Ergebnisse ausgearbeitet: Die radiale Bewegung des Fluidelementes im Kanal wird durch den Fall $\frac{\tau_a}{\tau_D} \neq 1$ beschrieben. Dargestellt wird diese anhand des normierten Schwerpunktes ($\frac{x}{B}$) und der normierten Breite ($\frac{b}{B}$). Die Normierung bezieht sich hierbei jeweils auf die Breite des Kanals. Durch die Definition eines Optimums aus dem Quotienten von Schwerpunkt und Breite ($\frac{x/b}{B/B}$) kann über den von Sudarsan beschriebenen linearen Zusammenhang die optimale Kanallänge für einen bestmöglichen Switch bestimmt werden. Die x - Achse ist bei den Abbildungen jeweils das Produkt aus der Kanallänge des betrachteten Punktes und der vorherrschenden Reynoldszahl. Anhand der Darstellung lassen sich die Einflüsse der beiden Parameter der Abszisse Länge und Geschwindigkeit diskutieren. Für die in Abschnitt 7.3 ausgearbeitete Geometrie bleibt der Radius in den Ausführungen und dargestellten Diagrammen unberücksichtigt. Erst beim Vergleich mit weiteren Radien wird dieser wieder in Betracht gezogen und dementsprechend diskutiert.

Die Bewegung der Flüssigkeit wird anhand des Schwerpunktes (x) und der Breite (b) betrachtet. Der Schwerpunkt stellt hierbei den geometrischen Schwerpunkt der Fläche dar, wie von Howell et al. [48] vorgeschlagen und gibt die radiale Bewegung über die Breite des Kanals wieder, siehe Abbildung 43. Als Breite ist die Ausdehnung des Fluides definiert, die Breite des sichtbaren Bandes (vgl. 44 a und 44 b).

Die verwendete fluoreszierende Flüssigkeit (siehe Abschnitt 6.8.1) wurde mittels Spritzenpumpe zeitgleich mit einer zweiten Flüssigkeit (Wasser) in eine Spiralgeometrie mit einer Kanallänge von 7 mm gepumpt. Die Strömungssituation wurde dabei beginnend bei einer Reynoldszahl von 8 sukzessive auf eine Reynoldszahl bis maximal 127 erhöht, wobei eine Auswertung der optischen Aufnahmen des Mikroskops alle 90 Grad umlaufend erfolgte.

Treten beide Flüssigkeiten mit der gleichen Volumenrate in den Kanal ein und die fluoreszierende der beiden am inneren Eingang in die Spiralstruktur, verlagert sich der Schwerpunkt der Flüssigkeit mit zunehmender Länge oder mit zunehmender Geschwindigkeit zur Kanalaußenseite und gegebenenfalls wieder zurück, siehe Abbildung 43. Das erreichbare Maximum befindet sich bei dreiviertel der Kanalbreite und wird bei einer erneuten Bewegung zur Außenseite ebenfalls wieder erreicht. Beim Minimum hingegen, welches die Bewegung zur Kanalinnenseite darstellt, erreicht der Schwerpunkt den Ausgangswert von einem Fünftel der Kanalbreite nicht wieder. Der Grund liegt in der Bewegung nach Außen in der Mitte der Kanalhöhe, bevor die Rückbewegung auf der Ober- und Unterseite von

der Außenseite vollständig abgeschlossen ist, was somit in einer Verbreiterung des Bandes resultiert. Die Betrachtung der Strömungsgeschwindigkeit zeigt den Einfluss auf den Schwerpunkt bei einer vorbestimmten Länge. Beispielhaft bedeutet das für die Kanallänge von 7 mm einen Seitenwechsel gegenüber des Eintrittsortes bei einer Reynoldszahl von 41 (290) oder 114 (800). Das gleiche Prinzip kann entgegengesetzt auch die Reynoldszahl als feste Ausgangsgröße bei einer variablen Kanallänge abbilden. Somit ergibt sich die Möglichkeit der beinahe beliebigen Bewegung des Fluides innerhalb der druckstabilen Grenzen der Materialbeständigkeit des mikrofluidischen Systems, wenn eine Vermischung aufgrund von Diffusionsvorgängen vernachlässigt wird.

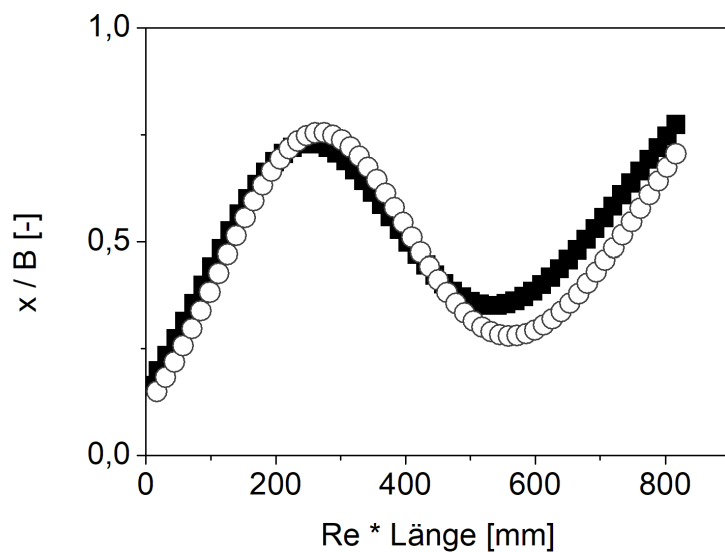


Abbildung 43: Position des Schwerpunktes (x) einer fluoreszierenden Flüssigkeit beim Eintritt am inneren Eingang in die Spiralstruktur einer Gesamtlänge von 7 mm. Der Schwerpunkt ist normiert auf die Kanalbreite (B). Verhältnisse der einlaufenden Volumenströme zueinander 1 : 1 ■ und 1 : 2 ○

In Abbildung 43 ist ebenfalls die Situation dargestellt, bei der die Volumenströme der Flüssigkeiten nicht in einem Verhältnis von eins zu eins stehen, sondern die fluoreszierende Flüssigkeit nur die Hälfte des Volumenstromes der zweiten Flüssigkeit liefert. Wie zu erkennen ist, hat dies keinen Einfluss auf die Bewegung der Ströme, jedoch auf die Position des Schwerpunktes bei der Rückwärtsbewegung. Dadurch liegt der Schwerpunkt der Flüssigkeit bei einem Viertel der Kanalbreite, was sich auf die geringere Bandbreite gegenüber gleichen Eingangsströmen zurückführen lässt.

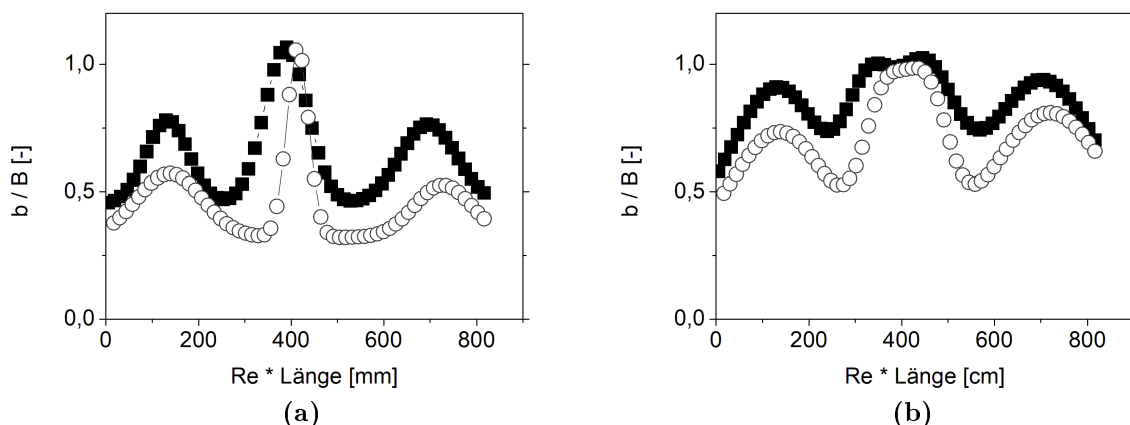


Abbildung 44: Breite (b) einer fluoreszierenden Flüssigkeit beim Eintritt am inneren Eingang in die Spiralstruktur einer Gesamtlänge von 7 mm. Die Breite ist normiert auf die Kanalbreite (B). Die Begrenzung der Bandbreite erfolgte bei 50 % (HdM), in (a), und bei 20 % (FdM), in (b), der Maximalintensität der Fluoreszenz, Verhältnisse der einlaufenden Volumenströme zueinander 1 : 1 ■ und 1 : 2 ○

Um eine bestmögliche Trennung von Medium und Partikeln zu ermöglichen, ist die exakte Darstellung der Bandbreite notwendig, da diese den Abstand zwischen Partikel und Medium definiert. Wie schon weiter oben angeführt (vgl. Abschnitt 5.3.2), ist im Gegensatz zu der hier behandelten Problematik das Vermischen zweier Ströme in mikrofluidischen Systemen in einer Vielzahl von Anwendungen von Interesse. Bei der Verteilung der Flüssigkeiten im Kanal werden sowohl die horizontale als auch die vertikale Komponente in Betracht gezogen [121], um die Quantifizierung zweier Flüssigkeiten innerhalb einer Kanalhälfte zu ermöglichen und daraus zum Beispiel eine gemittelte Vermischungseffizienz zu ermitteln [103]. Bei einem Transfer von Partikeln oder Mikroorganismen in eine Flüssigkeit ist hingegen lediglich die radiale Verteilung der beiden Fluide ausschlaggebend, weshalb auch nur diese im Folgenden betrachtet wird. Wichtig ist dabei, die Definition der Grenzen der Breite des Intensitätsspektrums ausgehend vom Maximum. Bei der Partikelfokussierung wird diese Grenze in den meisten Fällen bei der Hälfte des Maximalwertes (HdM) angesetzt. Diese Grenze soll hinsichtlich ihrer Aussagekraft anhand der Ergebnisse in Abbildung 44 a diskutiert und einer Definition der Begrenzung bei einem Wert von einem Fünftel (FdM) des Maximalwertes gegenübergestellt werden, Abbildung 44 b. Als erstes fällt auf, dass die Bewegung zur Kanalaußenseite im Zentrum des Kanals mit einer geringeren Bandbreite als die Bewegung zur Innenseite verläuft. Dies gilt für beide Quantifizierungen, wobei sich dieser Unterschied bei HdM etwas ausgeprägter darstellt als bei FdM. Somit würde die Bandbreite zur Außenseite entweder nur 75% oder 90% der entgegengesetzten Bewegung

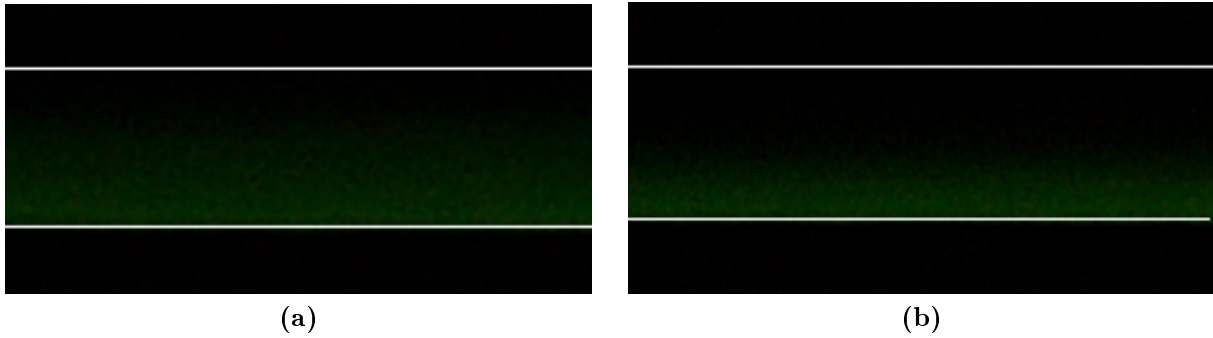


Abbildung 45: Breite des grün fluoreszierenden Bandes bei einer Kanallänge von 7 mm nach dem Seitenwechsel. Die Verhältnisse der Volumenströme von fluoreszierender Flüssigkeit zu Wasser betragen 1 : 1 (a) und 1 : 2 (b). Die Wände des Kanals sind mit weißen Linien nachgezeichnet.

betragen. Konfokale Aufnahmen von Kanalquerschnitten wie in Abbildung 46 bestätigen diese Tendenz. Die Breite nach dem Seitenwechsel ist in Abbildung 45 a bei gleichen Eingangsvolumenströmen und in Abbildung 45 b für unterschiedliche Volumina zu sehen. Bei gleichen Volumenströmen befinden sich die Minima bei Abszissenwerten von 239 und 253. Das entspricht bei einer Länge von 7 mm den daraus resultierenden Reynoldszahlen von 32 respektive 34 und ergibt Bandbreiten von 0,46 (HdM) und 0,73 (FdM). In Abbildung 45 a ist das Fluoreszenzband nach einer Länge von 7 mm bei einer Reynoldszahl von 34 dargestellt. Daran wird deutlich, dass die Bandbreite bei der Bemessung des Fünftels der maximalen Intensität mit 0,73 der Kanalbreite verlässlicher dargestellt wird. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Bandbreite bei HdM mit der Kanallänge respektive mit steigender Strömungsgeschwindigkeit abnimmt, wohingegen sie bei FdM leicht zunimmt. Auch die zweite Bewegung nach außen ist bei der Bestimmung mittels einem Fünftel des Maximums breiter als die vorangegangene. Weiterhin ist die Bewegung zur Innenseite schneller abgeschlossen und das Minimum auf der Innenseite deutlich länger stabil. Dadurch ließe sich vermuten, dass die stetige Bewegung der Flüssigkeit für einen längeren Weg oder größeren Geschwindigkeitsbereich nicht beeinflussbar ist. Anhand der gleichbleibenden Spiralstruktur und der in Abbildung 43 dargestellten Bewegung des Schwerpunktes kann dies aber ausgeschlossen werden.

Durch die Veränderung der Eingangsströme auf ein Verhältnis von eins zu zwei bezüglich der an der Kanalinnenseite eintretenden fluoreszierenden Flüssigkeit wird eine weitere Tatsache sichtbar. Die Breite ist mit 0,52 nahezu wieder auf dem Eingangswert von 0,48 bezogen auf die Kanalbreite. Damit kann der größtmögliche Abstand zwischen fokussierten Partikeln und Medium nach dem Seitenwechsel erreicht werden. Bei einem gleichen

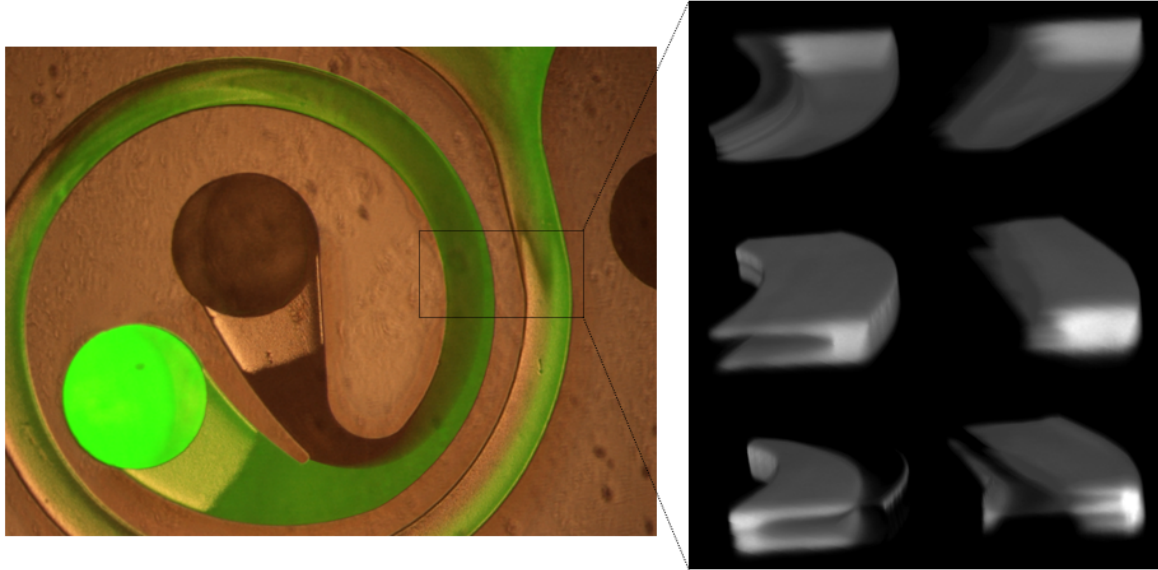


Abbildung 46: Konfokalaufnahmen des fluoreszierenden Calcein und Wasser in einer Spirale mit den Seitenlängen $60 \text{ mal } 200 \mu\text{m}$ ($a/D_h = 0,3$) bei den Reynoldszahlen von 13, 192 und 275, Kanalstruktur zur Verfügung gestellt von N. Rajabi [1]

Eingangsverhältnis sind es lediglich 0,75, was somit bei einer Kanalbreite von $60 \mu\text{m}$ einer Bandbreite von $45 \mu\text{m}$ entspricht. Bei einer Fokussierung der größten Partikel mit $3,2 \mu\text{m}$ Durchmesser auf den 3,8-fachen Durchmesser bedeutet dies einen minimalen Abstand.

Das Optimum für einen Austausch des Mediums wäre der Fall, wenn der Schwerpunkt nächstmöglich der Kanalausenseite liegt und die Breite so klein wie möglich ist. Durch die Bildung des Quotienten aus Schwerpunkt und Breite (Gleichung 29) bedeutet das, dass das Optimum beim Maximum dieses Quotienten zu finden ist, siehe Abbildung 47. Die Maxima von 234 und 256 liegen nah beieinander und beschreiben einen optimalen Seitenwechsel bei einer Kanallänge von 7 mm im Bereich von Reynoldszahlen zwischen 33 und 37. Der minimale Unterschied beider Verläufe ergibt sich aus den Werten der Bandbreite aus Abbildung 44 b. Die Maxima in Abbildung 47 sprechen dabei für das Verhältnis von 1 zu 2.

$$\frac{\text{Schwerpunkt}}{\text{Bandbreite}} = \frac{\frac{x}{B}}{\frac{b}{B}} \quad (29)$$

Neben diesem Maximum ist bei einem längeren Kanal oder einer größeren Kanalgeschwindigkeit auch die Tendenz zu einem weiteren Maximum zu erkennen. Dies bedeutet in den vorliegenden Ergebnissen aber das Maximum aus Kanallänge und Reynoldszahl und resultiert im höchsten Druckabfall über die Spirale, weshalb es aus Sicht der angedachten Anwendung mit einem Anschluss an den Bioreaktor keine sinnvolle Auslegung darstellt.

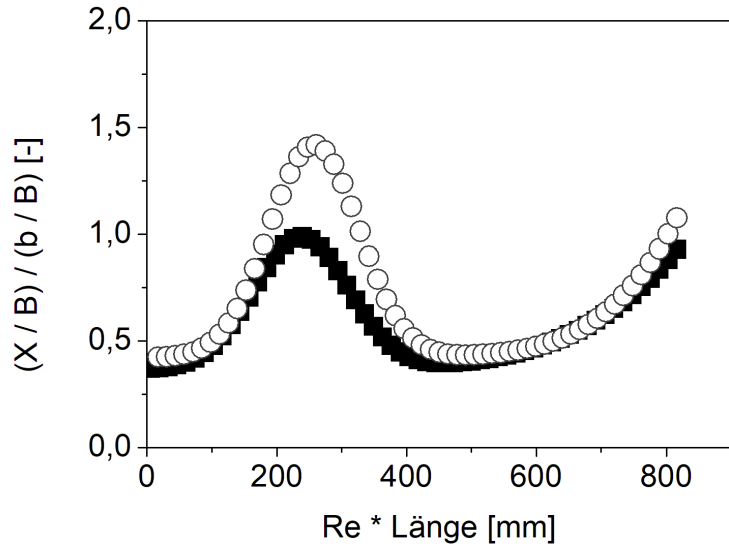


Abbildung 47: Darstellung des Optimums aus den Ergebnissen der Abbildungen 43 und 45 b zur Auslegung der Parameter von Kanallänge und Reynoldszahl für die Verhältnisse der eintretenden Volumenströme von 1 : 1 ■ und 1 : 2 ○

Anhand des gefundenen Optimums lässt sich nun der lineare Zusammenhang von Radius pro Länge gegen Reynoldszahl darstellen (Abbildung 48). Wie zu Beginn des Kapitels bereits aufgezeigt, wurden die bisherigen Ergebnisse unter der Berücksichtigung einer Ungleichung von Gleichung 10 gegen Länge mal Reynoldszahl aufgetragen. Damit konnte die Bewegung eines Volumenelementes über die Kanallänge und -breite entwickelt werden. Durch das Optimum kann die Ungleichung wieder in eine Gleichung überführt werden, $\frac{\tau_a}{\tau_D} = 1$. Und unter Einbeziehung des mittleren Radius der Spirale kann eine Linearisierung der Ergebnisse stattfinden. Die Berechnung der optimalen Reynoldszahl erfolgt dafür durch den Quotienten aus Optimum und Länge. Die Berechnung der optimalen Länge bei gegebener Reynoldszahl erfolgt dementsprechend.

$$\frac{R}{L_{opt}} = 0,0022 \cdot Re \quad [-] \quad (30)$$

Beim Vergleich mit einer Geometrie des gleichen Verhältnisses der Kanalhöhe zu Kanalbreite ($H/W = 0,3$), jedoch mit größerem mittleren Radius ($920 \mu\text{m}$) und größeren Seitenlängen von $60 \text{ mal } 200 \mu\text{m}$, bestätigen sich die gefundenen Ergebnisse. Der Vergleich mit den Ergebnissen von Sudarsan et al. zeigt, dass die Linearität für das Vermischen mittels einer Kurve mit einem Radius im Bereich der hier getesteten Geometrien ca. $0,0134$ beträgt während der Seitenwechsel mit $0,0022$ verläuft, siehe Gleichung 30. Das Verhältnis zwischen

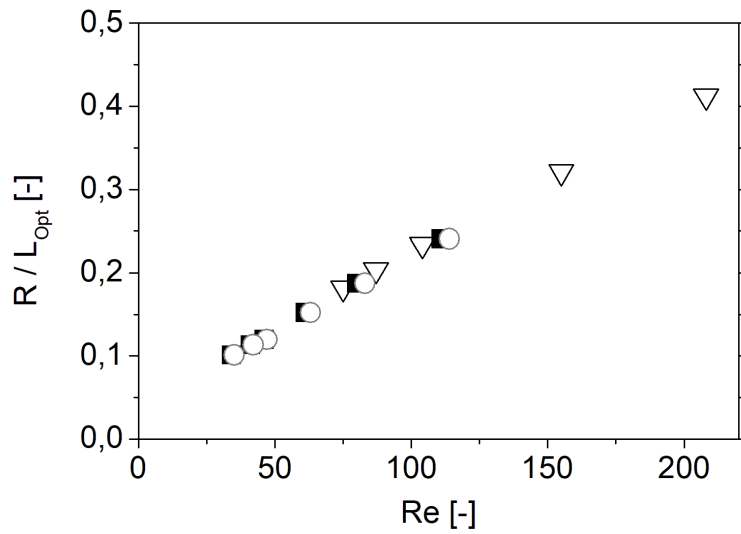


Abbildung 48: Linearisierung zwischen Reynoldszahl und optimaler Länge für einen Seitenwechsel der Flüssigkeit bei mittlerem Radius der Spiralstruktur, für mittlere Radien von $920 \mu\text{m}$ ▽ (siehe Abbildung 46), und $480 \mu\text{m}$ bei Verhältnissen der eintretenden Volumenströme 1 : 1 ■ und 1 : 2 ○

einem Seitenwechsel und einer möglichen Vermischung der beiden Fluide beträgt bezogen auf die notwendige Kanallänge bei gleichem Radius und gleicher Reynoldszahl ca. 6. Die Vermischung erfordert demzufolge eine sechsfache Länge. In Abbildung 49 ist die Länge für

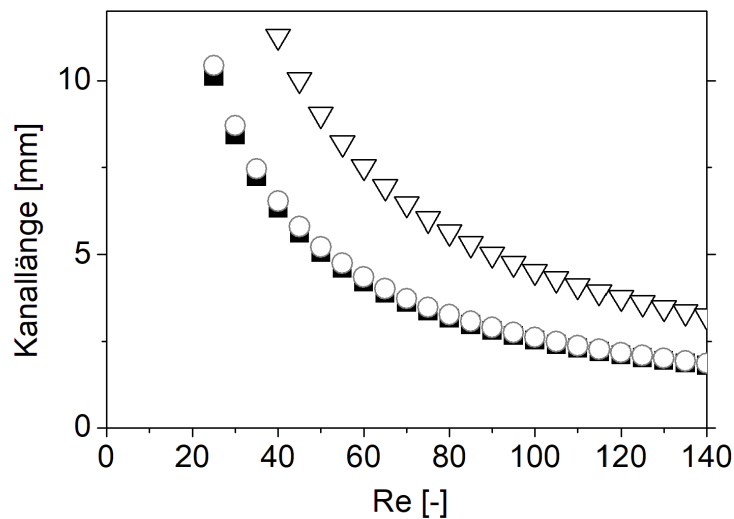


Abbildung 49: Verhältnis von Reynoldszahl und Kanallänge für einen Seitenwechsel bei mittleren Radien von $920 \mu\text{m}$ ▽ (siehe Abbildung 46), und $480 \mu\text{m}$ bei Verhältnissen der eintretenden Volumenströme 1 : 1 ■ und 1 : 2 ○

einen optimalen Seitenwechsel dargestellt, mit Hilfe des Optimums aus Abbildung 47. Wie Howell et al. [48] festgestellt haben, verhält sich das Optimum bezüglich der Kanallänge proportional zur Änderung des Radius (vgl. 5.3.3). Beim Vergleich der Geometrien aus Abbildung 48 liegt das Verhältnis bezüglich des mittleren Radius bei 1,55 und der Faktor der Ergebnisse bei 1,73, was mit den Ergebnissen von Howell et al. kongruent ist.

7.5 Partikelfokussierung

Nachdem die Bewegung der Fluide innerhalb der Spiralstruktur untersucht und in den vorangegangenen Ausführungen diskutiert wurde, wird in diesem Abschnitt das Verhalten der Partikel betrachtet. Dabei werden die Parameter Länge und Reynoldszahl für einen optimalen Seitenwechsel gemeinsam mit den theoretischen und experimentellen Ergebnissen zur Fokussierung von sphärischen Partikeln mit Durchmessern von $3,2 \mu\text{m}$ und $2 \mu\text{m}$ betrachtet. Des Weiteren soll die Qualität der Trennung von Medium und Partikeln diskutiert werden, wie auch der Einfluss der rotierenden Partikel auf die Fluidbewegung. Wie schon im vorangegangenen Abschnitt zur Flüssigkeitsbewegung soll auch hier die allgemein angewandte Auswertung bei 50 % der maximalen Intensität (HdM) des fluoreszierenden Partikelstromes überprüft und einer Begrenzung bei 20 % oder auch einem Fünftel der maximalen Intensität (FdM) gegenübergestellt werden. Vor dieser Gegenüberstellung werden die Intensitäten beim Seitenwechsel wie vorgeschlagen mit einer Begrenzung des Intensitätsprofils bei einem Fünftel der maximalen Intensität dargestellt, siehe Abbildung 50. Die dargestellten Ergebnisse gelten für eine Partikelkonzentration mit einem λ Wert von 0,1 (siehe Gleichung 19).

Die Längen zur Fokussierung der Partikel wurden anhand der Gleichung (27) von Martel und Toner bereits in Abschnitt 7.3.4 dargestellt und diskutiert. In Abbildung 50 sind die theoretischen Längen für eine Fokussierung den experimentellen Ergebnissen sowie dem optimalen Parametern für einen Seitenwechsel des Fluides gegenübergestellt. Dabei stellen die Punkte die Kanallänge für eine Bandbreite des 3,8 -fachen Partikeldurchmessers dar, also jeweils eine Bandbreite kleiner als $12,16 \mu\text{m}$ (3,2) und $7,6 \mu\text{m}$ (2). Bei der Betrachtung der theoretischen Längen zur Fokussierung in Abbildung 50 ist tendenziell der gleiche Verlauf erkennbar wie für den Seitenwechsel. Dabei fokussieren die größeren Partikel vor einem Seitenwechsel, wohingegen die kleineren Partikel nach dem Seitenwechsel auf eine entsprechende Bandbreite angeordnet werden können. Die minimale Kanallänge für die Partikel mit Durchmesser $3,2 \mu\text{m}$ deutet sich bis zu den maximal betrachteten Reynoldszahlen von 130 mit einem Millimeter an. Die minimale Reynoldszahl liegt ungefähr bei 15, bei der maximal herangezogenen Kanallänge von 12 mm. Für die $2 \mu\text{m}$ Partikel liegen die Werte dementsprechend bei 4 mm und einer Reynoldszahl von 45. So lässt sich vorab aussagen, dass beide Partikelgrößen in der entworfenen Spiralgeometrie fokussiert werden können, jedoch nur die Partikel mit einem Verhältnis von a/D_h gleich 0,113 ($3,2 \mu\text{m}$) in eine weitere Flüssigkeit transferiert werden können.

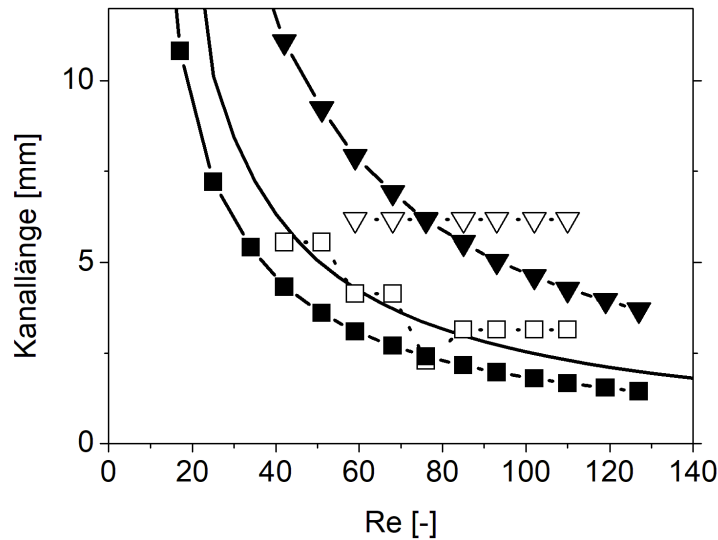


Abbildung 50: Vergleich der notwendigen Kanallänge pro Reynoldszahl für einen Seitenwechsel des Fluides (—) und die Fokussierung von sphärischen Partikeln der Durchmesser $3,2 \mu\text{m}$ (theoretisch ■ und experimentell □) und $2 \mu\text{m}$ (theoretisch ▼ und experimentell ▽) für einen rechteckigen Kanal mit Spiralstruktur und Seitenlängen von $19 \times 60 \mu\text{m}$ (Höhe \times Breite)

Vergleichbare Ergebnisse zeigen die Auswertungen der durchgeführten Versuche in Abbildung 50. Dort ist zu erkennen, dass Partikel in einem Bereich eines a/D_h von 0,07 bis 0,113 ($2 - 3,2 \mu\text{m}$) innerhalb einer spiralförmigen Kanallänge von 7 mm fokussiert werden können. Experimente für eine Fokussierung von Partikeln mit einem Verhältnis von $a/D_h = 0,035$ haben gezeigt, dass ihre Bewegung der des Mediums folgt und dementsprechend keine Fokussierung realisiert werden kann, siehe dazu auch Abschnitt 5.3.4. Bei einem Verhältnis des Partikeldurchmessers zu hydraulischen Durchmesser von 0,113 zeigt sich experimentell für die Fokussierung der gleiche Verlauf wie vorab berechnet. Die erforderlichen Kanallängen sind länger als theoretisch errechnet, passen aber mit denen des Seitenwechsels überein. Ein Transfer in die zweite Flüssigkeit ist realisierbar, da Seitenwechsel und Fokussierung gleichzeitig abgeschlossen sind. Die minimale Länge zur Fokussierung beträgt 3 mm und kann durch eine weitere Erhöhung der Reynoldszahl über einen Wert von 80 nicht verringert werden. Die minimale getestete Reynoldszahl, bei der eine Fokussierung innerhalb der maximalen Länge des Kanals von 7 mm erfolgte, liegt bei 42. Letztere hat für die Partikel mit einem a/D_h von 0,07 den Wert 58 bei der Länge 7 mm, welche sich mit einer Steigerung der Strömungsgeschwindigkeit nicht weiter verringern lässt. Somit kann festgestellt werden, dass Partikel im Grenzbereich einer möglichen Fokussierung die komplette Länge der Spiralstruktur zur Fokussierung benötigen, wohingegen Partikel mit

einem a/D_h größer als 0,1 auch innerhalb von 3 mm auf die entsprechende Bandbreite reduziert werden können. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Martel und Toner [76], welche eine minimale Länge von ≤ 5 mm für Kanalstrukturen mit einem H/W im Bereich 1 bis 0,5 gezeigt haben.

Nachdem die Fokussierung der Partikel und eine Trennung vom ursprünglichen Medium anhand der Versuchsergebnisse aufgezeigt wurde, sollen im Folgenden die Fragestellungen geklärt werden, wo sich die Position der Partikel nach der Fokussierung befindet und wie weit die Schwerpunkte von Partikeln und Fluid auseinanderliegen.

Ab einer Reynoldszahl von 85 (3 m/s) verlagert sich der Schwerpunkt der großen Partikel in Richtung Kanalzentrum, bei den kleineren beginnt dieser Trend etwa bei Re 70, siehe Abbildungen 51 a, 51 b und 51 c. Wie schon vorab beschrieben (7.3.3), bedeutet eine Reynoldszahl von ca. 100 bei Kanalstrukturen mit einer Krümmung kleiner als 0,0166 für Partikel im Bereich von $a/D_h = 0,149$ bis 0,066 eine Bewegung zur Außenseite. Dies tritt deutlicher hervor bei geringeren Kanallängen, da die Strömungsrichtung von innen nach außen eine Abnahme der Deankräfte bedeutet und somit der Einfluss der Auftriebskräfte zur Orientierung an der Kanalinnenseite mit fortlaufender Kanallänge wieder überwiegt. Im Umkehrschluss nimmt die minimale Länge zur Fokussierung in Abbildung 50 ab einer kritischen Reynoldszahl von ungefähr 80 wieder etwas zu. Der Verlagerung des Schwerpunktes geht eine weitere Beobachtung voraus: das Verbreitern des Partikelbandes. Bisher als ein Defokussieren bei breiten Kanälen gedeutet [75], ist es eher als die einsetzende Verschiebung des Schwerpunktes zu beschreiben. Wobei die Betrachtungsweise der Defokussierung bedingt ist durch die Auswertung des Intensitätsspektrums bei der Hälfte des Maximalwertes, siehe weiter unten. Der Seitenwechsel des Fluides zeigt dem gegenüber keinen kritischen Bereich hinsichtlich der Reynoldszahl, ab dem sich die Tendenz zu einer Veränderung der benötigten Länge umkehrt. Dies führt aber dazu, dass bei einer Fokussierung der Partikel vor einem Seitenwechsel des Mediums eine Strömungsgeschwindigkeit von 3 m/s respektive einer Reynoldszahl von 85 nicht überschritten werden sollte. Eine weitere Erkenntnis aus Abbildung 50 ist, dass der Seitenwechsel des Fluides mit der Fokussierung von Partikeln mit einem Verhältnis von Partikeldurchmesser zu hydraulischem Radius von 0,113 verläuft. Damit können kleinere Partikel zwar innerhalb der Struktur fokussiert und auch von größeren Partikeln separiert, siehe Abbildung 51, aber nicht vollständig aus dem Ursprungsmedium in ein Transfermedium überführt werden. In den Abbildungen 51 a, 51 b und 51 c ist das Verhalten der Schwerpunkte für das Fluid und für die Partikel anhand der Auswertungen aus Abbildung 50 dargestellt. Der Abstand zur Wand liegt dabei im Bereich des 3 bis 4 -fachen des Partikeldurchmessers oder auch bei 17 bis 20 % der Kanalbreite

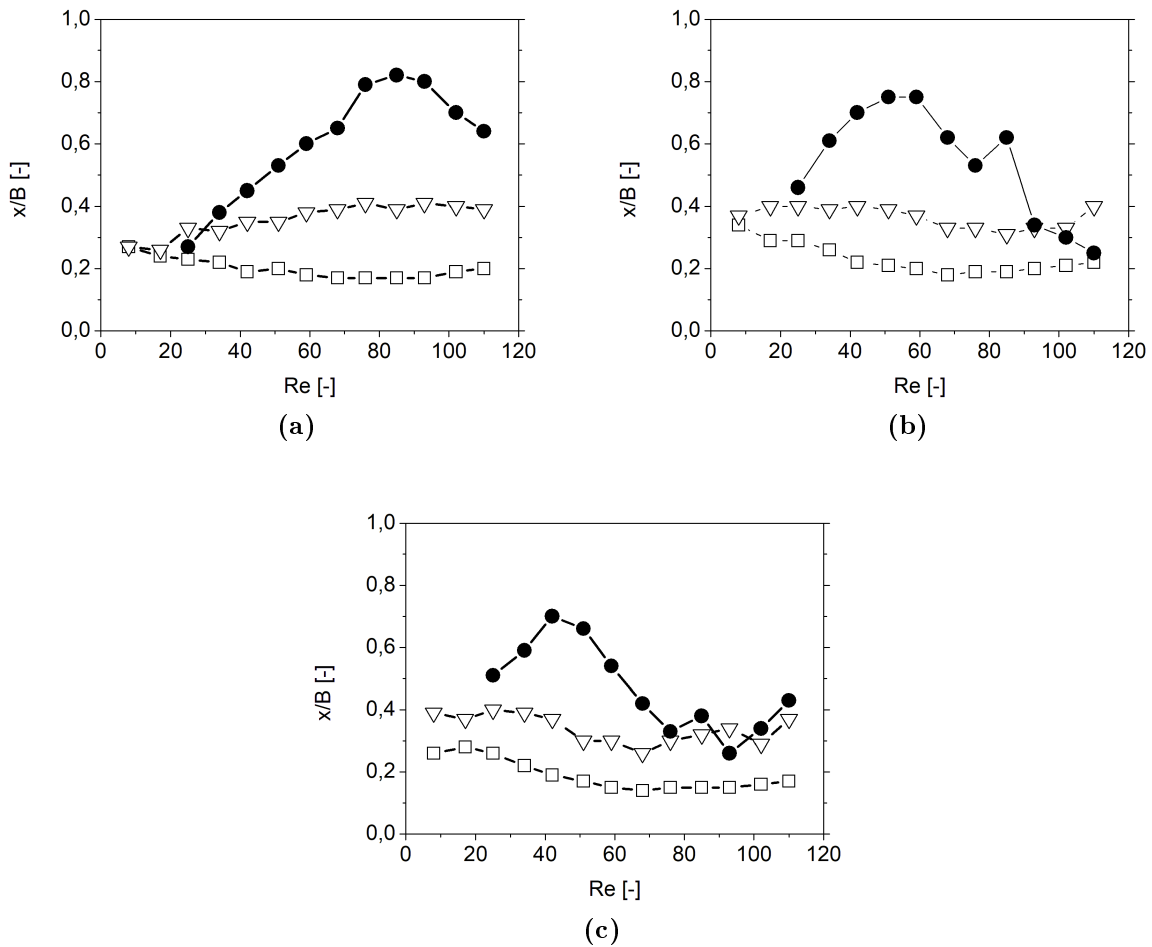


Abbildung 51: Schwerpunkte bezogen auf die Kanalbreite von Ursprungsfluid ● und Partikeln der Durchmesser 2 ∇ und 3 μm □ nach 3,1 mm (a), 5,5 mm (b) und nach 6,1 mm (c) des Spiralkanals

und zeigt damit das gleiche Verhalten wie Spiralstrukturen mit einem kleinsten Radius von 1 cm und einer Gesamtlänge von 6 cm [62, 75]. Damit beträgt der Abstand zwischen den äußeren Partikeln des fokussierten Stromes und der Kanalmitte ca. ein Fünftel der Kanalbreite. Da bei einem Optimum des Seitenwechsels bei einem Eingangsverhältnis von 1 zu 2 das Medium nur 50 % des Kanals einnimmt, siehe Abbildung 45, kann eine Trennung von Partikeln und der ursprünglichen Flüssigkeit erfolgen. Die Abstände zwischen den Schwerpunkten betragen bei den jeweiligen Optima 51, 55 und 65 % der Kanalbreite, bedingt durch die unterschiedlichen Deankräfte an den einzelnen Punkten der Spiralgeometrie von 5,8 , 8,2 und 13,5. Deshalb sollte beim Design einer derartigen Struktur ebenfalls in Betracht gezogen werden, dass am Punkt des Ausganges eine Deanzahl von ca. 10 vorliegt, wie sie auch schon in der Literatur [75] für die Partikelfokussierung angeführt wurde.

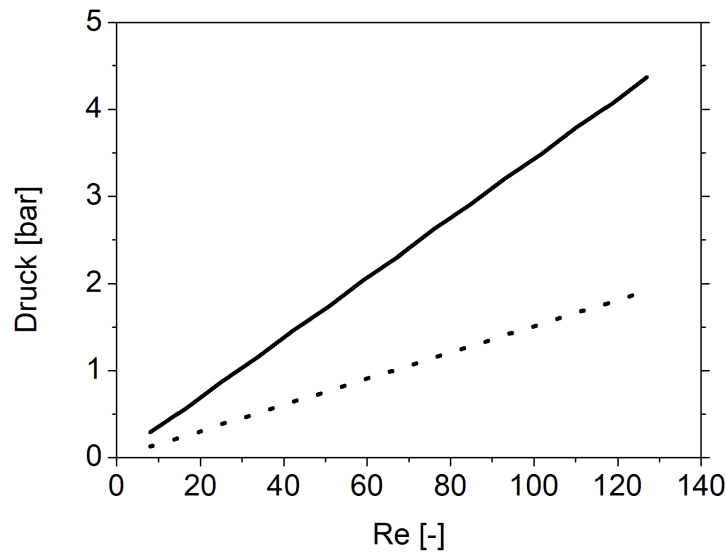


Abbildung 52: theoretischer Druckabfall über rechteckige spiralförmige Kanalgeometrien mit einem hydraulischen Durchmesser von $28,6 \mu\text{m}$ und einer Kanallänge von 7 mm (—) und 3 mm (- - -)

Aufgrund der vorangegangenen Feststellungen ist eine Kanallänge von 3 mm für eine Separation ausreichend. Dadurch kann der notwendige Druck, welcher aufgebracht werden muss, wesentlich reduziert werden, siehe Abbildung 52. Einen Einfluss auf das Fluidverhalten für den Seitenwechsel hat dieser Druckunterschied nicht (Abb. 48) und auch bei der Partikelfokussierung wurde kein Unterschied zwischen den verschiedenen Kanallängen diesbezüglich beobachtet. Lediglich die geklebte Verbindung zwischen den Aderendhülsen und der Mikrochipoberfläche zeigte Undichtigkeiten oberhalb von 5 bar, weshalb auch keine höheren Volumenströme getestet wurden.

Der Druck stellt einen kritischen Parameter für eine praktische Anwendung an einem Bioreaktor dar. So ist es zwar möglich, CHO -Zellen durch Beaufschlagung des Reaktors mit 2,5 bar innerhalb einer entsprechenden Spiralstruktur zu fokussieren [4], jedoch bedeutet dies eine Veränderung der Fermentationsbedingungen, wie zum Beispiel die Löslichkeit von Gasen im Medium, sodass eine Veränderung metabolischer Vorgänge nicht auszuschließen ist. Zudem konnte bei den angesprochenen Versuchen, keine vollständige Trennung von Zellen und Kulturmedium erfolgen [4, 1].

Tests mit einem druckbeaufschlagten Reaktor haben gezeigt, dass für einen Seitenwechsel des Mediums innerhalb einer Spiralstruktur mit einer Kanalgeometrie von $19 \times 60 \mu\text{m}$ auf einer Länge von 7 mm 3,1 bar Überdruck auf dem Reaktor benötigt werden. Der dabei von der Spritzenpumpe ausgehende Volumenstrom für die Transferflüssigkeit betrug $50 \mu\text{L}/\text{min}$, was ausgehend von diesem Volumenstrom einer Reynoldszahl von 42 entspricht

und mit den Ergebnissen aus Abbildung 49 kongruent ist. Die Bandbreiten am Eingang in die Spirale zeigten aber auf, dass das Eingangsverhältnis bei den Versuchen mit dem Druckreaktor ca. 1 zu 4 ist. Im Ergebnis bedeutet dies aber einen geringeren Durchsatz an Mikroorganismen für anschließende Analysen. Ob für ein geringeres Einlaufverhältnis von zum Beispiel 1 zu 2 ein höherer Druck oder ein kleinerer Volumenstrom seitens der Spritzenpumpe zielführend ist, muss in zukünftigen Fragestellungen geklärt werden. Da die Anschlussbedingungen hinsichtlich Schlauchlänge und -durchmesser die Gleichen wie bei Versuchen nur mit Spritzenpumpen waren, ist eine nähere Betrachtung durch eventuelle zusätzliche Druckverluste seitens der Versuchsbedingungen nicht notwendig. Beim Design erfolgte eine Optimierung der Einlaufsituation beider Eingänge in die Spirale, so dass Druckdifferenzen zwischen den beiden Einlässen ausgeschlossen werden können. Somit kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund des Fehlens von Luft innerhalb der Spritze, im Gegensatz zum Reaktor, eine geringere Kompressibilität vorliegt. Die Möglichkeit, die Strömungssituation mit Hilfe einer pulsfreien Mikropumpe zu garantieren, wäre eine weitere Option, welche bei zukünftigen Untersuchungen bedacht werden sollte.

Die Validierung der Ergebnisse, insbesondere bei der Partikelfokussierung, anhand der gewählten Methode sollen im Folgenden etwas ausführlicher diskutiert werden. Die Bandbreite wurde auf zweierlei Arten bestimmt. Zum Einen wie in der Literatur etabliert bei der Hälfte des Maximums (HdM) und zum Anderen bei einem Fünftel (FdM), wie in den weiter oben angeführten Diagrammen zu finden. Der Grund hierfür ist, wie schon bei der Beschreibung des Flüssigkeitsverhaltens, dass für eine exakte Beschreibung der Bandbreite eine vollständige Trennung von Organismen und Ursprungsmedium sicherzustellen ist. Dies gilt vor allem, wenn das etablierte Filtrationsverfahren, wie aus Abschnitt 7.1 bekannt, ersetzt werden soll.

Dabei folgen die größeren Partikel bis zu einer Reynoldszahl von ca. 75 den theoretisch vorhergesagten Ergebnissen bei einer Einschränkung auf die HdM, siehe Abbildung 54 a. Bei einer Strömungsgeschwindigkeit oberhalb dessen ergibt diese Bestimmung der Bandbreite eine minimale Länge von 0,6 mm. Zurückzuführen ist dies darauf, dass aufgrund der starken Eingangskrümmung und den damit verbundenen Deankräften bereits zu Beginn des Kanals eine Fokussierung stattfindet. Dabei schließt eine Bestimmung der Bandbreite bei der Hälfte des Maximums die noch nicht fokussierten Partikel nicht mit ein und stellt so ein nicht exaktes Ergebnis dar. Dieser Effekt wird bei einer Eingrenzung innerhalb eines Fünftel der maximalen Intensität nicht beobachtet und somit wird die minimale Länge zur Fokussierung hier mit 3 mm festgelegt, was im gleichen Bereich liegt wie bei Martel und Toner für ein Verhältnis von 0,5 bei 2-fachen Partikeldurchmesser [76].

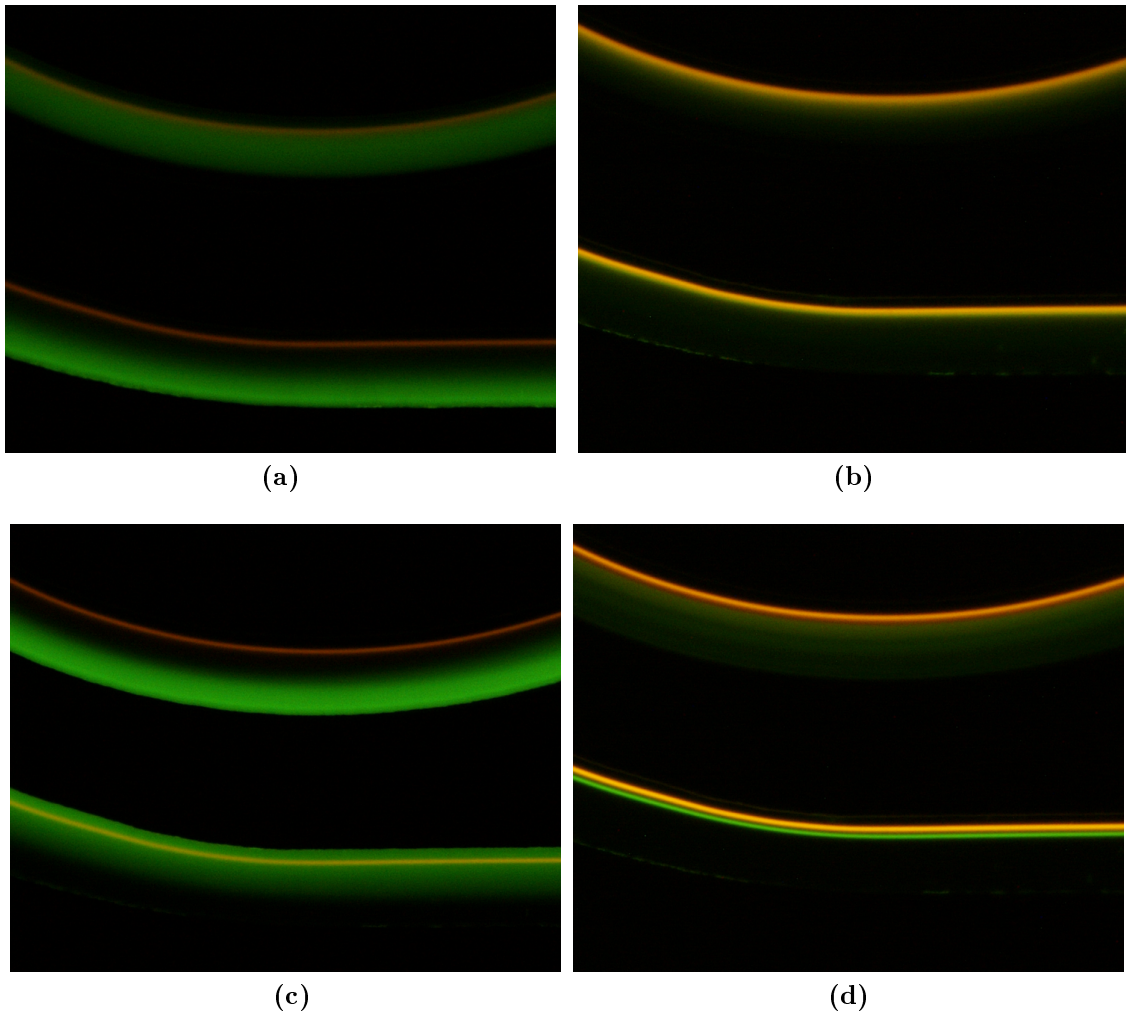


Abbildung 53: Fluoreszenzaufnahmen der Partikel und des Fluides bei den Längen 3,1 mm (im Bild oben) und 7 mm (im Bild unten) für die Reynoldszahlen 42 und 75

- (a) Calcein (grün) und $3,2 \mu\text{m}$ (rot) gemeinsam bei Re 42
- (b) $3,2 \mu\text{m}$ (rot) und $2 \mu\text{m}$ (grün) gemeinsam bei Re 42
- (c) Calcein (grün) und $3,2 \mu\text{m}$ (rot) gemeinsam bei Re 75
- (d) $3,2 \mu\text{m}$ (rot) und $2 \mu\text{m}$ (grün) gemeinsam bei Re 75

Eine weiterer Unterschied zwischen der Betrachtung von HdM und FdM ergibt sich bei den kleineren Partikeln in Abbildung 54 b. Diese werden mit ansteigender Geschwindigkeit zu Beginn nach außen transportiert wonach sich die minimale Länge vergrößert. Im Allgemeinen verkürzt sich die notwendige Länge mit steigender Geschwindigkeit, in diesem Fall aber wird die Migrationslänge der Partikel zur Innenseite erhöht, sodass auch die minimale Kanallänge zur Fokussierung ansteigt. Dieses bleibt bei einer Betrachtung von FdM unberücksichtigt und gibt allgemein eine größere und konstant gleiche Kanallänge wieder.

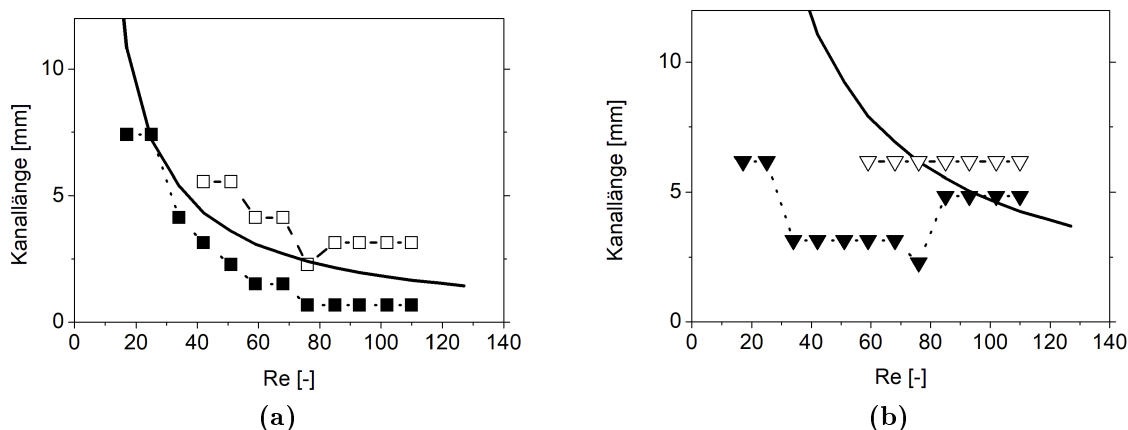


Abbildung 54: Vergleich zwischen der Partikelfokussierung einer Begrenzung bei 50 % der maximalen Intensität (HdM) für Partikeldurchmesser von $3,2 \mu\text{m}$ (■) und $2 \mu\text{m}$ (□) und 20 % (FdM) für Partikeldurchmesser von $3,2 \mu\text{m}$ (▼) und $2 \mu\text{m}$ (▽) bei einer Kanallänge von 7. Die theoretischen Kanallängen sind nach Martel und Toner [76] berechnet (—).

Der mit Fluoreszenzmikroskopie ermittelte Fokussierungseffekt von Partikeln und dem Verhalten von Fluiden bringt noch weitere Einschränkungen mit sich. Und zwar die Tatsache, dass trotz Fokussierung meist nur eine 90-prozentige Separation vorliegt, wenn die Partikel an den Ausgängen gesammelt und ausgewertet werden. Neben der schon diskutierten Auswertung des Spektrums ist dessen Aufnahme per Fotografie oder auch die unvollständige Einfärbung von Zellen oder Partikeln ein Grund dafür. Die Parameter für die Bildaufnahmen bewegen sich dabei in einem Bereich von 250 ms bis zu drei Sekunden, bei der nur eine oder bis zu 300 übereinandergelegte Aufnahmen ausgewertet werden. Somit muss für eine praktische Anwendung eine Validierung erfolgen, da auch bei einem Verhältnis von 1 zu 6 keine vollständige Trennung von Medium und Organismen erfolgen konnte [4]. Dies ist für eine Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten aber unerlässlich.

Bei Mikrokanälen aus PDMS wurden Deformationen bei druckgetriebenen Strömungen festgestellt. Die bei der vorliegenden Arbeit verwendete Verbindung aus Borosilikatglas und Silizium wird bei den auftretenden Drücken innerhalb der Versuche ebenfalls Verformungen durchlaufen. Ein weiteres Problem bei der Implementierung von Mikrostrukturen in die Analyse von mikrobiellen Fermentierungsprozessen liegt in der Tatsache, dass schon kleinere Verunreinigungen innerhalb des Kanals dazu führen, dass die Stromlinien umgelenkt werden. Dabei hat sich vor allem der Einlauf- und auch der Auslaufbereich als besonders problematisch gezeigt. So blockierten Verunreinigungen in Form von Staubpartikeln und Fasern sehr leicht bei der ausgangsseitigen Trennung der beiden Ströme und verän-

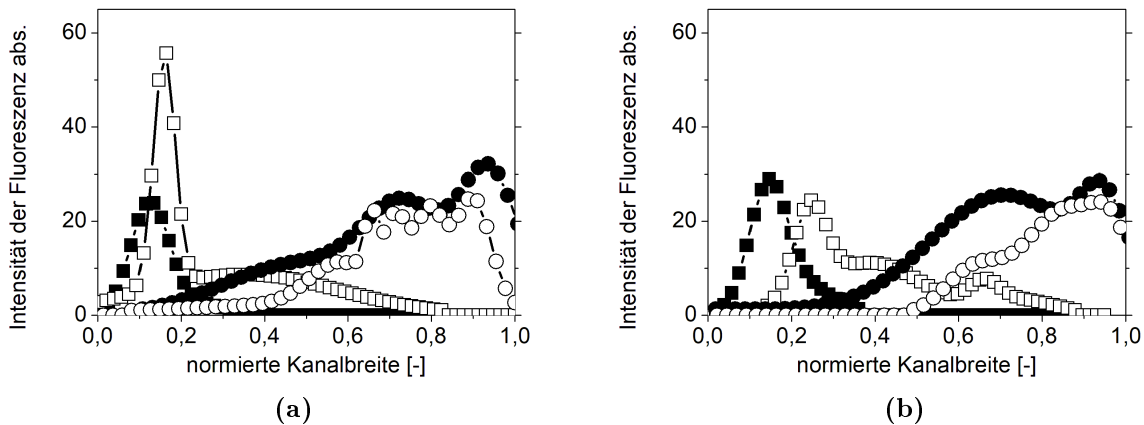


Abbildung 55: Position und Breite des Fluoreszenzbandes der Partikel mit Durchmessern von $3,2 \mu\text{m}$ ■ und $2 \mu\text{m}$ □ sowie des Fluides bei Eingangsverhältnissen von $1 : 1$ ● und $1 : 2$ ○ nach $3,1 \text{ mm}$ Kanallänge bei einer Reynoldszahl von 42 (a) und 7 mm bei einer Reynoldszahl von 75 (b)

derten so die Strömungsbahnen der Fluide und der Partikel. Die Spülung der Kanäle zur Entfernung der Verunreinigungen gestaltete sich bisweilen schwierig bis erfolglos, sodass die einmal verdreckten Mikrostrukturen nahezu unbrauchbar für die Versuche waren. Dies stellt somit ein Problem bei der Einbindung von Mikrosystemen in die Schnellprobennahmen dar, da sich das Handling zur Vermeidung von Verschmutzungen schwieriger gestaltet.

Die kontinuierliche Probennahme per Spiralstruktur und das Verhältnis der Probe zur Transferflüssigkeit von 50% bedeuten bei einer Reynoldszahl im Bereich von $42 - 80$ einen Volumenstrom von $30 - 60 \mu\text{L}/\text{min}$. Eine Aufbereitung der Proben nach dem Schema der automatisierten Schnellprobennahme entfällt hierbei als Option, sodass eine Notwendigkeit zur online Analytik entsteht. Neben der Problematik des Zellaufschlusses innerhalb des Mikrosystems stellt sich die Frage nach einer geeigneten Analysemethode für intrazelluläre Metaboliten. Tests, welche die Möglichkeiten einer optischen Analyse mittels Nahfeldinfrarotspektroskopie (NIR) anhand eines ATR Spektroskops im Institut für Technische Biokatalyse der TUHH durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass die Konzentrationen der intrazellulären Aminosäuren zu gering sind, um daraus Ergebnisse zu generieren. Die angeregten Wassermoleküle der Lösung resultieren in einem starken Grundrauschen der Messung und verhindern so die Messung der geringen Konzentration von gelösten Stoffen.

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Diskontinuierliche Probennahme

Bezugnehmend auf die eingangs vorgenommene Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, die Anlage zur automatisierten Schnellfiltration (RSU) für verschiedene Kultivierungsszenarien und -einflüsse zu optimieren und anzupassen, soll nun eine Zusammenfassung erfolgen. Dabei wird aufgeführt, welche Phänomene auf diesem Weg untersucht wurden, genauso wie und ob diese mit der Anlage unter der Prämisse einer verlässlichen und genauen Bestimmung intrazellulärer Metaboliten bewältigt werden können. Dabei soll als erstes auf die Ionenstärke eingegangen werden, welche für die benötigte Waschlösung im Rahmen der Filterkuchenwaschung unabdingbar ist. Im Verlauf einer Kultivierung über einen längeren Zeitraum mit steigender Biomasse und einer weiterführenden Fütterung sowie einer Produktion von Sekundärmetaboliten, wie zum Beispiel Aminosäuren, verändert sich dieser Parameter fortlaufend. Dies ist vor allem an einem Anstieg für das umgebende Medium aufgrund der Sekretion von Metaboliten durch die Mikroorganismen erkennbar, was zu Veränderungen von über 10 % der Ionenstärke führen kann. Bolten et al. [11] hatten bereits festgestellt, dass Unterschiede zwischen Waschlösung und Fermentationsbrühe über diesem Wert Verluste intrazellulärer Metaboliten provozieren.

Das bedeutet, dass die Ionenstärke kontinuierlich angepasst werden sollte, da er sich bisher und auch beim Großteil der in der Literatur zu findenden Untersuchungen an der Zusammensetzung des Ausgangsmediums orientiert. Die Schwierigkeit liegt jedoch nicht in der Messung der elektrischen Leitfähigkeit und der anschließenden Rechnung, sondern in der Tatsache, dass sich die Leitfähigkeitsmessung durch die vorhandene Biomasse beeinflussen lässt. Dies geschieht durch eine Veränderung und Anpassung der Zellwand an die Umgebung und kann den gemessenen Wert um bis zu Faktor 5 geringer erscheinen lassen. Außerdem müsste eine dynamische Regelung der Salzkonzentration der Waschlösung integriert werden, um diese regelmäßig an die Verhältnisse im Reaktor anzupassen.

Als nächstes wurde festgestellt, dass Fermentationen mit höheren Biomassen und der Produktion von Metaboliten mit einem erhöhten Schaumanteil von bis zu 60 % in der Fermentationsbrühe einhergehen können. Dieser Schaum führt bei gewöhnlichen Probenentnahmen aus dem Reaktor und im selben Maße auch bei der automatisierten Schnellfiltration zu einer Reduktion des Flüssigkeitsanteils in der Probe. Durch die ebenfalls einhergehende Reduktion der Waschlösung erhöht sich das Waschverhältnis zwar, was eine bessere Filterkuchenwaschung bedeuten würde. Jedoch kann der Luftanteil in der Probe zu fehlerhaften Ergebnissen führen, da die bestimmten intrazellulären Metaboliten durch nicht bestimmbar Biomassen verfälscht werden könnten, da die Biomasse auf die Menge des Mediums im

Filtrat bezogen bestimmt wird. Daraufhin wurde eine Analyse dieser Strömungssituation in der Probenentnahme vorgenommen, was schließlich zu einer Modifikation der Anlage führte. Die Modifikation beruht auf einer Reduzierung des Luftanteils in der Probenentnahme durch eine zusätzlich eingespeiste Mischlösung mit gleicher Ionenstärke. Durch diese Mischung wurden neben der eingeschlossenen Luft, die Probengröße und der Einfluss von chemischen Antischaummitteln als Filtrationswiderstände verringert, sodass eine verlässlichere Biomassenbestimmung anhand der Flüssigphase in der Probe bei höheren Biomassekonzentrationen realisiert werden konnte, ohne die bisherige Probennahmedauer von 5 Sekunden zu überschreiten.

Nach dem Umbau der Anlage wurde die Modifikation getestet und im Anschluss bei Kultivierungen zweier *C. glutamicum* Stämme dem bisher etablierten Aufbau gegenübergestellt. Anhand der Kriterien der Probenvolumina und der Filterkuchenwaschung bei unterschiedlichen Fermentationsstadien konnte gezeigt werden, dass die Modifikation zu einem geringeren Anteil an Restmedium auf dem Filter hauptsächlich in Situationen höheren Schaumaufkommens und in Stagnationsphasen führt. Dabei kann der Unterschied zur etablierten Methode bis über 30 % betragen. Zudem konnte in Einklang mit der Literatur bestätigt werden, dass eine Erhöhung des Waschverhältnisses keine verbesserte Filterkuchenwaschung ermöglicht, also größtenteils eine Verdrängungswäsche stattfindet und die minimal mögliche Restkonzentration an Medium 2 bis 3 % nicht unterschreiten kann. Durch die Modifikation wird aber aktiv die Probengröße aus dem Reaktor minimiert, was zu dem höheren Waschverhältnis führt. Bei einer Reduzierung eben dieses Verhältnisses wird auch eine weitere Reduzierung der Filtrationsdauer möglich. Dies sollte im weiteren Ausblick für die Anlage umgesetzt werden, um der Anlage ein breiteres Anwendungsspektrum zu ermöglichen. Um eine abschließende Aussage zur gleichbleibenden Qualität der Probenentnahme bei höheren Biomassekonzentrationen und verschiedenen Fermentationszenarien treffen zu können, wurden intrazelluläre Konzentrationen verschiedener Aminosäuren betrachtet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Ergebnisse von etabliertem set-up und Modifikation in den meisten Probenahmen zu mehr als 80 % übereinstimmen. Die vorab aufgestellte Theorie, dass sich die Ergebnisse systematisch aufgrund der Schaumproblematik im ursprünglichen Aufbau verfälschen lassen, konnte somit nicht bestätigt werden. Lediglich bei einigen Aminosäuren wurden größere Unterschiede festgestellt, welche auf die jeweiligen Eigenschaften der Aminosäuren zurückführbar sein sollten und ihre Wechselwirkungen mit den verwendeten Filtermedien. Was anhand der Modifikation jedoch positiv beeinflusst werden kann. Trotzdem sollte den ersten Hinweisen nachgegangen werden, nach denen sich die Verluste der Metaboliten bei der durchgeführten Extraktion etwas höher darstellen als bislang angenommen. Anschließend erfolgte eine metabolische Untersuchung beider Stämme auf Basis der bestimmten intrazellulären Aminosäuren, um

eine Aussage über die beide Organismen unterscheidende genetische Modifikation treffen zu können: die verstärkte Produktion der Aminosäure Lysin bei LC 298. Zudem konnten bei der Analyse der intrazellulären Stoffe Rückschlüsse über die Einflüsse und Veränderungen in den Fermentationsbedingungen gezogen werden, was eine Anwendung der Anlage zur systematischen Untersuchung intrazellulärer Stoffwechselfvorgänge und Metabolitenpools weiter unterstreicht.

8.2 Kontinuierliche Probennahme

Ist die voran beschriebene Anlage auch noch so wichtig für die Quantifizierung intrazellulärer Metaboliten, hat sie dennoch ihre Unzulänglichkeiten. Zum Beispiel die Diskontinuität der Daten, gefolgt von möglichen Einschränkungen bei der dagegen sehr aufwendigen Extraktion und Bestimmung der intrazellulären Stoffe. Aufbauend auf vorliegenden Literaturdaten für die Partikelfokussierung und der Fluidmanipulation in Mikrosystemen wurde die Spiralform als geeignetste Form für das angestrebte Ziel einer kontinuierlichen und vollständigen Trennung von Fermentationsmedium und Bakterien herausgearbeitet. Die Datenlage zur Partikelfokussierung in solch einer Geometrie ist breiter und vollständiger als zur Fluidmanipulation. Es wurde deshalb ein eine Datenbasis und Möglichkeit zur Beschreibung für das kontrollierte Bewegen einer Flüssigkeit innerhalb eines Mikrokanals erarbeitet und im Anschluss die Parameter für beide Phänomene in einer Geometrie übereingebracht, um eine Separation zu ermöglichen. Der wichtigste Parameter für eine Fokussierung ist der von Partikeldurchmesser zu hydraulischem Radius (a/Dh), der es ermöglicht, oberhalb des Grenzwertes von 0,07 eine Fokussierung auf mindestens den 3,8-fachen Partikeldurchmesser zu erreichen. Auf beide, also auf Fluid und Partikel, wirkt das Verhältnis von Kanalhöhe zu Kanalbreite (H/W). Es trennt innerhalb der Fluidmanipulation die gewollte Vermischung von zwei Flüssigkeiten und den provozierten Seitenwechsel, wenn das Verhältnis von 1 über- oder unterschritten wird, bestimmt aber gleichzeitig auch die Länge des Kanals für den Seitenwechsel mit abnehmendem Wert. Gleichermaßen bewirkt es eine Fokussierung, je kleiner das Verhältnis desto geringer die notwendigen Scherkräfte. Werden die Scherkräfte kleiner, folgt eine notwendige Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit, welche wiederum den Bereich einer stabilen Fokussierung vermindert. Weiterhin wird die Position durch die Strömungsgeschwindigkeit indirekt beeinflusst, da jene auf das Kräftegleichgewicht einwirkt, welches an den Partikeln oder Organismen ansetzt und die gerichtete Bewegung initiiert. Dies wird schlussendlich noch durch die Krümmung der Spiralstruktur beeinflusst. Nach allen Vorüberlegungen wurde eine Spiralstruktur einer Geometrie mit hydraulischem Durchmesser von $28,6 \mu\text{m}$ bei einem H/W von 0,3 und einer Krümmung von 0,0242 gefertigt, um Partikel im Größenbereich von $2 - 3,2 \mu\text{m}$ zu

fokussieren und aus dem Fermentationsmedium zu separieren.

Mit Hilfe dieser Geometrie konnte eine Modifikation aus der von Sudarsan et al. [103] aufgestellten linearen Beziehung für das radiale Verhalten von Fluidelementen über die Kanalbreite erarbeitet werden, die eine Vorhersage eines Seitenwechsels möglich macht. Die optimale Kanallänge für einen bestmöglichen Switch lässt sich somit anhand der einheitenlosen Reynoldszahl vorhersagen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Variation der Eingangströme zueinander die Separation von Medium und Partikeln weiter optimiert. Über die Verknüpfung der Ergebnisse des Fluidverhaltens und der theoretischen Kanallänge für die Partikelfokussierung kann nun vorab eine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern sich eine Separation bestimmter Partikelgrößen innerhalb einer vorgegebenen Spiralgeometrie ausgehend von einer Strömungsgeschwindigkeit realisieren lässt. Was prädictiv hier für sphärische Partikel einer Größe von $3,2 \mu\text{m}$ gezeigt werden konnte und sich in den Versuchsergebnissen bestätigte. So ist eine Fokussierung anhand des aus der Literatur bekannten Grenzwertes von 0,07 möglich, eine Fokussierung bei gleichzeitiger Separation aus dem Ursprungsmedium lässt sich aber erst bei einem höheren Wert von 0,113 zeigen. Weiterhin konnte anhand der Ergebnisse gezeigt werden, dass eine bisher als Defokussierung betrachtete Aufweitung des Partikelbandes mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit eher eine Verschiebung des Schwerpunktes eben jenes Fluoreszenzbandes darstellt und eine Positionsverschiebung stattfindet, welche ebenfalls für eine Trennung von Medium und Partikeln von Bedeutung ist, da sie die minimal notwendige Kanallänge zur Fokussierung beeinflusst. Als minimale Kanallänge für eine Fokussierung von Partikeln mit einem Grenzwert von 0,113 und einem Switch der Ursprungsflüssigkeit kann auf Basis der Ergebnisse bei 3 mm festgelegt werden, wenn die einfließenden Ströme in einem Verhältnis von eins zu zwei stehen. Dabei sollte aber auf eine Strömungssituation und Geometrie geachtet werden, welche am Ausgang eine Deanzahl von 10 bewerkstelligt, um ein erneutes Defokussieren zu unterbinden. Somit erscheint eine schnelle Separation von Medium und Organismen für Stoffwechseluntersuchungen umsetzbar.

Was als letzte Überlegung und Testergebnis dem Ganzen noch gegenüber steht, ist die Tatsache, dass eine Druckbeaufschlagung des Fermenters oder Reaktors notwendig ist, um eine dauerhafte gleichförmige Strömung zu gewährleisten. Ist dies gewährleistet, ist eine Integration in die bestehende Schnellprobenanlage möglich. Zu beachten ist dabei das die Parameter so gewählt werden, dass der notwendige Druck den der realisierbaren Unterdruckentnahme aus dem Bioreaktor innerhalb der Anlage nicht übersteigt, siehe Korrelation Druck über die Reynoldszahl in 52.

Eine zukünftige Weiterentwicklung sollte dennoch die Aufgabe haben, einen Weg zu finden, einen kontinuierlichen Strom aus einem Bioreaktor zu entnehmen, ohne die Kultivierungssituation hinsichtlich der Gaslöslichkeit zu beeinflussen.

Literatur

- [1] *Inertial-based media exchange and quenching for continuous cell preparation in a lab-on-a-chip*. Heidelberg, 3. - 5.12.2012
- [2] AMAN RUSSOM ; AMIT K GUPTA ; SUNITHA NAGRATH ; DINO DI CARLO ; JON F EDD ; MEHMET TONER: Differential inertial focusing of particles in curved low-aspect-ratio microchannels. In: *New Journal of Physics* 11 (2009), Nr. 7, S. 075025
- [3] AMINI, H. ; SOLLIER, E. ; WEAVER, W. M. ; DI CARLO, D.: Intrinsic particle-induced lateral transport in microchannels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (2012), Nr. 29, S. 11593–11598
- [4] BAHNEMANN, Janina ; RAJABI, Negar ; FUGE, Grisca ; BARRADAS, Oscar P. ; MÜLLER, Jörg ; PÖRTNER, Ralf ; ZENG, An-Ping: A new integrated lab-on-a-chip system for fast dynamic study of mammalian cells under physiological conditions in bioreactor. In: *Cells* 2 (2013), Nr. 2, S. 349–360
- [5] BECKER, Judith: *Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig*. Bd. v.46: *Systems metabolic engineering of corynebacterium glutamicum towards improved lysine production*. 1st ed. Göttingen : Cuvillier Verlag, 2010. – ISBN 978-3-86955-426-6
- [6] BECKER, Judith ; WITTMANN, Christoph: Bio-based production of chemicals, materials and fuels–Corynebacterium glutamicum as versatile cell factory. In: *Current opinion in Biotechnology* 23 (2012), Nr. 4, S. 631–640
- [7] BEDEKAR, A. S. ; WANG, Y. ; KRISHNAMOORTHY, S. ; SIDDHAYE, S. ; SUNDARAM, S.: Simulation of flow induced dispersion in lab on chip systems. In: *IEEE Transactions on Computer-Aided Design of Integrated Circuits and Systems* 25 (2006), Nr. 2, S. 294–304
- [8] BELLMANN, A. ; VRLJIĆ, M. ; PATEK, M. ; SAHM, H. ; KRÄMER, R. ; EGGELING, L.: Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of Corynebacterium glutamicum. In: *Microbiology* 147 (2001), Nr. 7, S. 1765–1774
- [9] BHAGAT, Ali Asgar S. ; BOW, Hansen ; HOU, Han W. ; TAN, Swee J. ; HAN, Jongyoon ; LIM, Chwee T.: Microfluidics for cell separation. In: *Medical & Biological Engineering & Computing* 48 (2010), Nr. 10, S. 999–1014

-
- [10] BHAGAT, Ali Asgar S. ; KUNTAEGOWDANAHALLI, Sathyakumar S. ; PAPAUTSKY, Ian: Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration. In: *Lab on a Chip* 8 (2008), Nr. 11, S. 1906
- [11] BOLTEN, Christoph J. ; KIEFER, Patrick ; LETISSE, Fabien ; PORTAIS, Jean-Charles ; WITTMANN, Christoph: Sampling for Metabolome Analysis of Microorganisms. In: *Analytical Chemistry* 79 (2007), Nr. 10, S. 3843–3849
- [12] BOMMAREDDY, Rajesh R. ; CHEN, Zhen ; RAPPERT, Sugima ; ZENG, An-Ping: A de novo NADPH generation pathway for improving lysine production of *Corynebacterium glutamicum* by rational design of the coenzyme specificity of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. In: *Metabolic engineering* 25 (2014), S. 30–37
- [13] BRAND, Sven: *Untersuchung der Zellhüllenstruktur von Corynebacterium glutamicum ATCC13032*, Universität Bielefeld, Diss., 2001
- [14] BRODY, J. P. ; YAGER, P. ; GOLDSTEIN, R. E. ; AUSTIN, R. H.: Biotechnology at low Reynolds numbers. In: *Biophysical Journal* 71 (1996), Nr. 6, S. 3430–3441
- [15] BRÖER, Stefan ; EGGELING, Lothar ; KRÄMER, Reinhard: Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems. In: *Applied Environmental Microbiol.* 59 (1993), Nr. 1, S. 316–321
- [16] BRUUS, H.: *Theoretical Microfluidics*. OUP Oxford, 2008 (Oxford Master Series in Physics). – ISBN 9780199235087
- [17] BUNCH, Alan W.: High cell density growth of micro-organisms. In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 12 (1994), Nr. 1, S. 535–562
- [18] BURKE, Jeffrey M. ; ZUBAJLO, Rebecca E. ; SMELA, Elisabeth ; WHITE, Ian M.: High-throughput particle separation and concentration using spiral inertial filtration. In: *Biomicrofluidics* 8 (2014), Nr. 2, S. 024105
- [19] CANELAS, André ; RAS, Cor ; PIERICK, Angela t. ; VAN DAM, Jan ; HEIJNEN, Joseph ; VAN GULIK, Walter: Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. In: *Metabolomics* 4 (2008), Nr. 3, S. 226–239
- [20] CAO-HOANG, L. ; DUMONT, F. ; MARECHAL, P. ; LE-THANH, M. ; GERVAIS, P.: Rates of chilling to 0 ° C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (2008), Nr. 6, S. 1379–1387

-
- [21] CARSTENSEN, E. L. ; COX JR., H. A. ; MERCER, W. B. ; NATALE, L. A.: Passive electrical properties of microorganisms: I. Conductivity of *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. In: *Biophysical Journal* (1965), Nr. Volume 5, S. 289–300
- [22] CHEN, Zhen: *Protein design for industrial strain development: The case of amino acid*. Shaker Verlag GmbH, Germany, 2012. – ISBN 384401554X
- [23] CHEN, Zhen ; BOMMAREDDY, Rajesh R. ; FRANK, ; RAPPERT, Sugima ; ZENG, An-Ping: Deregulation of feedback inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase for improved lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Applied Environmental Microbiology* 80 (2013), Nr. 4, S. 1388–1393
- [24] CHEN, Zhen ; MEYER, Weiqian ; RAPPERT, Sugima ; SUN, Jibin ; ZENG, An-Ping: Coevolutionary analysis enabled rational deregulation of allosteric enzyme inhibition in *Corynebacterium glutamicum* for lysine production. In: *Applied Environmental Microbiology* 77 (2011), Nr. 13, S. 4352–4360
- [25] CHEN, Zhen ; RAPPERT, Sugima ; SUN, Jibin ; ZENG, An-Ping: Integrating molecular dynamics and co-evolutionary analysis for reliable target prediction and deregulation of the allosteric inhibition of aspartokinase for amino acid production. In: *Journal of Biotechnology* 154 (2011), Nr. 4, S. 248–254
- [26] CHOI, Sungyoung ; PARK, Je-Kyun: Continuous hydrophoretic separation and sizing of microparticles using slanted obstacles in a microchannel. In: *Lab on a Chip* 7 (2007), Nr. 7, S. 890 – 897
- [27] COLOMBIÉ, Sophie ; LATRILLE, Eric ; SABLAYROLLES, Jean-Marie: Interest of on-line monitoring electrical conductivity during wine fermentation. In: *European Food Research and Technology* 226 (2008), Nr. 6, S. 1553–1557
- [28] DA LUZ, Julian A.: *Automatisierte Schnellfiltration zur Untersuchung intrazellulärer Metabolite in Mikroorganismen*, Technische Universität Hamburg - Harburg, Diss., 2017
- [29] DA LUZ, Julian A. ; HANS, Enrico ; FRANK, ; ZENG, An-Ping: Analysis of intracellular metabolites of *Corynebacterium glutamicum* at high cell density with automated sampling and filtration and assessment of engineered enzymes for effective l-lysine production. In: *Engineering in Life Sciences* 17 (2017), Nr. 5, S. 512–522

-
- [30] DA LUZ, Julian A. ; HANS, Enrico ; ZENG, An-Ping: Automated fast filtration and on-filter quenching improve the intracellular metabolite analysis of microorganisms. In: *Engineering in Life Sciences* 14 (2014), Nr. 2, S. 135–142
- [31] DEBUS, J-D ; MENDOZA, M. ; HERRMANN, H. J.: Dean instability in double-curved channels. In: *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* 90 (2014), Nr. 5-1, S. 053308
- [32] DI CARLO, D. ; IRIMIA, D. ; TOMPKINS, R. G. ; TONER, M.: Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2007), Nr. 48, S. 18892–18897
- [33] DI CARLO, Dino: Inertial microfluidics. In: *Lab on a Chip* 9 (2009), Nr. 21, S. 3038–3046
- [34] DI CARLO, Dino ; EDD, Jon F. ; HUMPHRY, Katherine J. ; STONE, Howard A. ; TONER, Mehmet: Particle segregation and dynamics in confined flows. In: *Phys. Rev. Lett.* 102 (2009), Nr. 9, S. 094503
- [35] DIETMAIR, Stefanie ; TIMMINS, Nicholas E. ; GRAY, Peter P. ; NIELSEN, Lars K. ; KRÖMER, Jens O.: Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. In: *Analytical Biochemistry* 404 (2010), Nr. 2, S. 155–164
- [36] EGGELING, Lothar ; BOTT, Michael: A giant market and a powerful metabolism: L-lysine provided by *Corynebacterium glutamicum*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (2015), Nr. 8, S. 3387–3394
- [37] EMMELYN GRAHAM: *Introduction to multiphase and wet gas flows: NEL Präsentation*
- [38] FAN, L. S.: *Gas-liquid solid fluidization engineering*. Butterworth-Heinemann Ltd, 1989 (Butterworths series in chemical engineering). – ISBN 978-0-409-95179-0
- [39] FIORINI, Gina S. ; CHIU, Daniel T.: Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. In: *BioTechniques* Vol. 38 (2005), Nr. 3, S. 429–446
- [40] FOLEY, Greg: A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions. In: *Journal of Membrane Science* 274 (2006), Nr. 1–2, S. 38–46

-
- [41] FRÄNZEL, Benjamin ; TRÖTSCH, Christian ; RÜCKERT, Christian ; KALINOWSKI, Jörn ; POETSCH, Ansgar ; WOLTERS, Dirk A.: Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. In: *Proteomics* 10 (2010), Nr. 3, S. 445–457
- [42] GOSSETT, Daniel R. ; DI CARLO, Dino: Particle focusing mechanisms in curving confined flows. In: *Analytical chemistry* 81 (2009), Nr. 20, S. 8459–8465
- [43] GREGORATTO, Ivano ; MCNEIL, Calum J. ; REEKS, Michael W. ; PAPAUTSKY, Ian ; WANG, Wanjun: Micro-devices for rapid continuous separation of suspensions for use in micro-total-analysis-systems. In: *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems*. 2007 (Proc. of SPIE Vol. 646), S. 646503–646503–8
- [44] HAN, Sung O. ; INUI, Masayuki ; YUKAWA, Hideaki: Effect of carbon source availability and growth phase on expression of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in the tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In: *Microbiology* 154 (2008), Nr. 10, S. 3073–3083
- [45] HANS, Enrico ; ZENG, An-Ping: Automatisierte Probenfiltration zur Analyse intrazellulärer Metaboliten bei höheren Biomassekonzentrationen. In: *Chemie Ingenieur Technik* (2022), Wiley Online Library
- [46] HANS, M. A. ; HEINZLE, E. ; WITTMANN, C.: Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (2001), Nr. 5, S. 776–779
- [47] HANSSON, Jonas ; KARLSSON, J. M. ; HARALDSSON, Tommy ; BRISMAR, Hjalmar ; VAN DER WIJNGAART, W. ; RUSSOM, Aman: Inertial microfluidics in parallel channels for high-throughput applications. In: *Lab on a Chip* 12 (2012), Nr. 22, S. 4644 – 4650
- [48] HOWELL, JrPeter B. ; MOTT, David R. ; GOLDEN, Joel P. ; LIGLER, Frances S.: Design and evaluation of a Dean vortex-based micromixer. In: *Lab on a Chip* 4 (2004), Nr. 6, S. 663 – 669
- [49] IKEDA, Masato ; MITSUHASHI, Satoshi ; TANAKA, Kenji ; HAYASHI, Mikiro: Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-arginine and L-citrulline producer. In: *Applied Environmental Microbiology* 75 (2009), Nr. 6, S. 1635–1641
- [50] IKEDA, Masato ; OHNISHI, Junko ; HAYASHI, Mikiro ; MITSUHASHI, Satoshi: A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. In: *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 33 (2006), Nr. 7, S. 610–615

- [51] JOHN, S. ; SCHLÜTER, M. ; SCHEID, S. ; PARCHMANN, H. ; RÄBIGER, N.: Eine Methode zur Berechnung der Relativgeschwindigkeit von Gasblasen in Dreiphasenströmungen – Teil 1: Blasenbewegung unter Feststoffeinfluss. In: *Chemie Ingenieur Technik* 77 (2005), Nr. 12, S. 1885–1891
- [52] JOHNSTON, I. D. ; McDONNELL, M. B. ; TAN, C. K. L. ; McCLUSKEY, D. K. ; DAVIES, M. J. ; TRACEY, M. C.: Dean flow focusing and separation of small microspheres within a narrow size range. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 17 (2014), Nr. 3, S. 509–518
- [53] JONGE, Lodewijk d. ; DOUMA, Rutger ; HEIJNEN, Joseph ; VAN GULIK, Walter: Optimization of cold methanol quenching for quantitative metabolomics of *Penicillium chrysogenum*. In: *Metabolomics* 8 (2012), Nr. 4, S. 727–735
- [54] JUNKER, Beth: Foam and its mitigation in fermentation systems. In: *Biotechnology Progress* 23 (2007), Nr. 4, S. 767–784
- [55] KARA, Selin ; ANTON, Fabienne ; SOLLE, Dörte ; NEUMANN, Markus ; HITZMANN, Bernd ; SCHEPER, Thomas ; LIESE, Andreas: Fluorescence spectroscopy as a novel method for on-line analysis of biocatalytic C–C bond formations. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66 (2010), Nr. 1, S. 124–129
- [56] KARIMI, A. ; YAZDI, S. ; ARDEKANI, A. M.: Hydrodynamic mechanisms of cell and particle trapping in microfluidics. In: *Biomicrofluidics* 7 (2013), Nr. 2, S. 21501
- [57] KELLE, R. ; HERMANN, T. ; BATHE, B.: L-Lysine Production. In: EGGELING, Lothar (Hrsg.) ; BOTT, Michael (Hrsg.): *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. 1st Edition. CRC Press, 2005. – ISBN 9780429129056, S. 465 – 491
- [58] KIM, Sooah ; LEE, Do Y. ; WOHLGEMUTH, Gert ; PARK, Hyong S. ; FIEHN, Oliver ; KIM, Kyoung H.: Evaluation and optimization of metabolome sample preparation methods for *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Analytical chemistry* 85 (2013), Nr. 4, S. 2169–2176
- [59] KINOSHITA, Shukuo ; UDAKA, Shigezo ; SHIMONO, Masakazu: Studies on the amino acid fermentation. In: *The Journal of General and Applied Microbiology* 3 (1957), Nr. 3, S. 193–205
- [60] KRAUSE, Felix S. ; BLOMBACH, Bastian ; EIKMANN, Bernhard J.: Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for 2-ketoisovalerate production. In: *Applied Environmental Microbiology* 76 (2010), Nr. 24, S. 8053–8061

- [61] KRÖMER, Jens O. ; WITTMANN, Christoph ; SCHRÖDER, Hartwig ; HEINZLE, Elmar: Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. In: *Metabolic engineering* 8 (2006), Nr. 4, S. 353–369
- [62] KUNTAEGOWDANAHALLI, Sathyakumar S. ; BHAGAT, Ali Asgar S. ; KUMAR, Girish ; PAPAUTSKY, Ian: Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. In: *Lab on a Chip* 9 (2009), Nr. 20, S. 2973–2980
- [63] LANG, F. ; LANG, P.: *Basiswissen Physiologie*. 2. Springer, 2007. – ISBN 978-3-540-71401-9
- [64] LARISCH, Christof: *Charakterisierung des Sigmafaktors SigB aus Corynebacterium glutamicum und seiner Rolle bei der Genexpression in der Transitionsphase des Wachstums*. Bielefeld, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, Diss., 2006
- [65] LENSCHOF, Andreas ; LAURELL, Thomas: Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. In: *Chemical Society reviews* 39 (2010), Nr. 3, S. 1203–1217
- [66] LEVY, Richard ; JORNITZ, Maik: Types of filtration: sterile filtration. In: JORNITZ, Maik (Hrsg.): *Types of Filtration* Bd. 98. Springer Berlin / Heidelberg, 2006. – ISBN 978-3-540-28625-7, S. 1–26
- [67] LIEW, M. K. ; FANE, A. G. ; ROGERS, P. L.: Fouling of microfiltration membranes by broth-free antifoam agents. In: *Biotechnology and Bioengineering* 56 (1997), Nr. 1, S. 89–98
- [68] LIGRANI, Phillip M.: *A study of Dean vortex development and structure in a curved rectangular channel with aspect ratio of 40 at Dean numbers up to 430*. NASA, 1994 (ARL/CR-144)
- [69] LINK, Hannes ; ANSELMANT, Bernd ; WEUSTER-BOTZ, Dirk: Leakage of adenylates during cold methanol/glycerol quenching of *Escherichia coli*. In: *Metabolomics* 4 (2008), Nr. 3, S. 240–247
- [70] LOSEY, M. W. ; JACKMAN, R. J. ; FIREBAUGH, S. L. ; SCHMIDT, M. A. ; JENSEN, K. F.: Design and fabrication of microfluidic devices for multiphase mixing and reaction. In: *Journal of Microelectromechanical Systems* 11 (2002), Nr. 6, S. 709–717
- [71] LUCKERT, K.: *Handbuch der mechanischen Fest-Flüssig-Trennung*. Vulkan Verlag, 2004. – ISBN 9783802721960

-
- [72] MAO, Xiaole ; LIN, Sz-Chin S. ; DONG, Cheng ; HUANG, Tony J.: Single-layer planar on-chip flow cytometer using microfluidic drifting based three-dimensional (3D) hydrodynamic focusing. In: *Lab on a Chip* 9 (2009), Nr. 11, S. 1583 – 1589
- [73] MARION, G. M. ; BABCOCK, K. L.: Predicting specific conductance and salt concentration in dilute aqueous solutions. In: *Soil Science* 122 (1976), Nr. 4, S. 181–187
- [74] MARKX, Gerard H. ; HUANG, Ying ; ZHOU, Xiao-Feng ; PETHIG, Ronald: Dielectrophoretic characterization and separation of micro-organisms. In: *Microbiology* (1994), Nr. 140, S. 585–591
- [75] MARTEL, Joseph M. ; TONER, Mehmet: Inertial focusing dynamics in spiral microchannels. In: *Physics of Fluids* 24 (2012), Nr. 3, S. 32001
- [76] MARTEL, Joseph M. ; TONER, Mehmet: Inertial focusing in microfluidics. In: *Annual review of biomedical engineering* 16 (2014), S. 371–396
- [77] MASHEGO, Mlawule ; RUMBOLD, Karl ; MEY, Marjan d. ; VANDAMME, Erick ; SOETAERT, Wim ; HEIJNEN, Joseph: Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. In: *Biotechnology Letters* 29 (2007), Nr. 1, S. 1–16
- [78] MCCARTHY, A. A. ; CONROY, H. ; WALSH, P. K. ; FOLEY, G.: The effect of pressure on the specific resistance of yeast filter cakes during dead-end filtration in the range 30–500kPa. In: *Biotechnology Techniques* 12 (1998), Nr. 12, S. 909–912
- [79] MCCOY, Andrea J. ; ADAMS, Nancy E. ; HUDSON, André O. ; GILVARG, Charles ; LEUSTEK, Thomas ; MAURELLI, Anthony T.: L, L-diaminopimelate aminotransferase, a trans-kingdom enzyme shared by Chlamydia and plants for synthesis of diaminopimelate/lysine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006), Nr. 47, S. 17909–17914
- [80] MEYER, Hanna ; LIEBEKE, Manuel ; LALK, Michael: A protocol for the investigation of the intracellular Staphylococcus aureus metabolome. In: *Analytical Biochemistry* 401 (2010), Nr. 2, S. 250–259
- [81] N. NIVEDITA, P. LIGRANI, AND I. PAPAUTSKY (Hrsg.): *Evolution of secondary dean vortices in spiral microchannels for cell separations*. Freiburg, Germany, 27. - 31. 10.2013

-
- [82] NAKANISHI, Kazuhiro ; TADOKORO, Takaaki ; MATSUNO, Ryuichi: On the specific resistance of cakes of microorganisms. In: *Chemical Engineering Communications* 62 (1987), Nr. 1, S. 187–201
- [83] NARSIMHAN, Ganesan: Foam formation and stabilization. In: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1 (1996), Nr. 6, S. 759–763
- [84] NEGAR RAJABI, Tzu-Nen Tzeng Oscar Platas Barradas An-Ping Zeng JÄ¶rg M. Janina Bahnemann B. Janina Bahnemann: Lab-on-a-chip for cell perturbation, lysis, and efficient separation of sub-cellular components in a continuous flow mode. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 215 (2014), S. 136–143
- [85] NGUYEN, N.T. ; WERELEY, S.T. ; WERELEY, S.T.: *Fundamentals and Applications of Microfluidics*. Artech House, 2002 (Artech House MEMS library). – ISBN 9781580533430
- [86] NÍ MHURCHÚ, Jenny: *Dead - end and crossflow microfiltration of yeast and bentonite suspensions: experimental and modelling studies incorporating the use of artificial neural networks*. Dublin, School of Biotechnology, Diss., 01.07.2008
- [87] OGAWA-MIYATA, Yuri ; KOJIMA, Hiroyuki ; SANO, Konosuke: Mutation analysis of the feedback inhibition site of aspartokinase III of Escherichia coli K-12 and its use in L-threonine production. In: *Bioscience, Biotechnology, and biochemistry* 65 (2001), Nr. 5, S. 1149–1154
- [88] OHNISHI, J. ; MITSUHASHI, S. ; HAYASHI, M. ; ANDO, S. ; YOKOI, H. ; OCHIAI, K. ; IKEDA, M.: A novel methodology employing Corynebacterium glutamicum genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (2002), Nr. 2, S. 217–223
- [89] PARCHE, Stephan ; BURKOVSKI, Andreas ; SPRENGER, Georg A. ; WEIL, Brita ; KRÄMER, Reinhard ; TITGEMEYER, Fritz: Corynebacterium glutamicum: a dissection of the PTS. In: *Journal of molecular Microbiology and Biotechnology* 3 (2001), Nr. 3, S. 423–428
- [90] PAYOT, T. ; FICK, M.: On-line estimation of lactic acid concentration by conductivity measurement in fermentation broth. In: *Biotechnology Techniques* 11 (1997), Nr. 1, S. 17–20
- [91] PIRUSKA, A. ; BHAGAT, A. A. S. ; ZHOU, K. ; PETERSON, E.T.K. ; PAPAUTSKY, I. ; SELISKAR, C. J.: Characterization of SU-8 optical multimode waveguides for

- integrated optics and sensing on microchip devices. In: PAPAUTSKY, Ian (Hrsg.) ; WANG, Wanjun (Hrsg.): *MOEMS-MEMS 2006 Micro and Nanofabrication*, SPIE, 2006 (SPIE Proceedings), S. 611207
- [92] PRINS, A. ; VAN'T RIET, K.: Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer. In: *Trends in Biotechnology* 5 (1987), Nr. 11, S. 296–301
- [93] RÖNSCH, Hendrik ; KRÄMER, Reinhard ; MORBACH, Susanne: Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. In: *Journal of Biotechnology* 104 (2003), Nr. 1-3, S. 87–97
- [94] RUSHTON, Albert ; WARD, Anthony S. ; HOLDICH, Richard G.: *Solid-liquid filtration and separation technology*. 2., compl. rev. ed. Weinheim : VCH, 2000. – ISBN 978-3527296040
- [95] SAHM, Hermann ; EGGELING, Lothar ; GRAAF, Albert A.: Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Biological chemistry* 381 (2000), Nr. 9-10, S. 899–910
- [96] SARTOR, M.: *Untersuchungen zum Einfluss elektrokinetischer Repulsionseffekte auf die Tiefenfiltration mit partikulären Schüttbetten*. Saarbrücken, Universität des Saarlandes, Diss., 22.10.2006
- [97] SCHADEL, Friederike ; DAVID, Florian ; FRANCO-LARA, Ezequiel: Evaluation of cell damage caused by cold sampling and quenching for metabolome analysis. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 92 (2011), Nr. 6, S. 1261–1274
- [98] SCHMID, Roland ; UHLEMANN, Eva-Maria ; NOLDEN, Lars ; WERSCH, Gregor ; HECKER, Rolf ; HERMANN, Thomas ; MARX, Achim ; BURKOVSKI, Andreas: Response to nitrogen starvation in *Corynebacterium glutamicum*. In: *FEMS Microbiology letters* 187 (2000), Nr. 1, S. 83–88
- [99] SCHNEGAS, Stefan ; SALIKOV, Vitalij ; ANTONYUK, Sergiy ; HEINRICH, Stefan ; RAJABI, Negar ; MÜLLER, Jörg: Fluid paths inside a spiral-shaped microchannel: a CFD study with discussion about possible Chinese hamster ovary cell trajectories. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 18 (2015), Nr. 4, S. 685–694
- [100] SEGRÉ, G. ; SILBERBERG, A.: Radial Particle Displacements in Poiseuille Flow of Suspensions. In: *Nature* 189 (1961), Nr. 4760, S. 209–210

-
- [101] SEO, Jeonggi ; LEAN, Meng H. ; KOLE, Ashutosh: Membrane-free microfiltration by asymmetric inertial migration. In: *Applied Physics Letters* 91 (2007), Nr. 3, S. 033901
- [102] SUDARSAN, Arjun P. ; UGAZ, Victor M.: Fluid mixing in planar spiral microchannels. In: *Lab on a Chip* 6 (2006), Nr. 1, S. 74–82
- [103] SUDARSAN, Arjun P. ; UGAZ, Victor M.: Multivortex micromixing. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006), Nr. 19, S. 7228–7233
- [104] SUN, Jiashu ; LIU, Chao ; LI, Mengmeng ; WANG, Jidong ; XIANYU, Yunlei ; HU, Guoqing ; JIANG, Xingyu: Size-based hydrodynamic rare tumor cell separation in curved microfluidic channels. In: *Biomicrofluidics* 7 (2013), Nr. 1, S. 11802
- [105] TACHIBANA, M.: On the behaviour of a sphere in the laminar tube flows. In: *Rheologica Acta* 12 (1973), Nr. 1, S. 58–69
- [106] TARGETT, Matthew J. ; RETALLICK, William B. ; CHURCHILL, Stuart W.: Flow through curved rectangular channels of large aspect ratio. In: *AIChE Journal* 41 (1995), Nr. 5, S. 1061–1070
- [107] TAYMAZ-NIKEREL, Hilal ; MEY, Marjan d. ; RAS, Cor ; PIERICK, Angela t. ; SEIFAR, Reza M. ; VAN DAM, Jan C. ; HEIJNEN, Joseph J. ; VAN GULIK, Walter M.: Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*. In: *Analytical Biochemistry* 386 (2009), Nr. 1, S. 9–19
- [108] TSAI, Chung-Jung ; DEL SOL, Antonio ; NUSSINOV, Ruth: Protein allostery, signal transmission and dynamics: a classification scheme of allosteric mechanisms. In: *Molecular Biosystems* 5 (2009), Nr. 3, S. 207–216
- [109] VAN GULIK, Walter M.: Fast sampling for quantitative microbial metabolomics: Analytical Biotechnology. In: *Current Opinion in Biotechnology* 21 (2010), Nr. 1, S. 27–34
- [110] VAN OUYEN, Jan ; NOACK, Stephan ; BOTT, Michael ; EGGELING, Lothar: Proline addition increases the efficiency of l-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. In: *Engineering in Life Sciences* 13 (2013), Nr. 4, S. 393–398
- [111] VARDAR-SUKAN, Fazilet: Foaming: Consequences, prevention and destruction. In: *Biotechnology Advances* 16 (1998), Nr. 5, S. 913–948

-
- [112] VARELA, C. ; AGOSIN, E. ; BAEZ, M. ; KLAPA, M. ; STEPHANOPOULOS, G.: Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (2003), Nr. 5, S. 547–555
- [113] VILLAS-BÔAS, Silas G. ; BRUHEIM, Per: Cold glycerol–saline: The promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells. In: *Analytical Biochemistry* 370 (2007), Nr. 1, S. 87–97
- [114] VILLAS-BÔAS, Silas G. ; HØJER-PEDERSEN, Jesper ; ÅKESSON, Mats ; SMEDSGAARD, Jørn ; NIELSEN, Jens: Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. In: *Yeast* 22 (2005), Nr. 14, S. 1155–1169
- [115] VOLMER, Martin ; NORTHOFF, Stefan ; SCHOLZ, Sebastian ; THÜTE, Tobias ; BÜNTEMEYER, Heino ; NOLL, Thomas: Fast filtration for metabolome sampling of suspended animal cells. In: *Biotechnology Letters* 33 (2011), Nr. 3, S. 495–502
- [116] WAGNER, Heinz: Einfluss der Temperatur auf die elektrische Leitfähigkeit verdünnter waessriger Loesungen_. In: *VGB Powertech Sonderdruck* 92. (2012), Nr. 3, S. 82–89
- [117] WIESCHALKA, Stefan ; BLOMBACH, Bastian ; EIKMANN, Bernhard J.: Engineering *Corynebacterium glutamicum* for the production of pyruvate. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 94 (2012), Nr. 2, S. 449–459
- [118] WILKENS, M.: *Forschungsprojekt ‚qFlushing – Entfernen von organischen Lösungsmitteln aus Haufwerken und Filterkuchen‘*. TU Bergakademie Freiberg,
- [119] WITTMANN, Christoph ; KRÖMER, Jens O. ; KIEFER, Patrick ; BINZ, Tina ; HEINZLE, Elmar: Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. In: *Analytical Biochemistry* 327 (2004), Nr. 1, S. 135–139
- [120] WU, Zhigang ; HJØRT, Klas: Microfluidic hydrodynamic cell separation: A Review. In: *Micro and Nanosystems* 1 (2009), Nr. 3, S. 181–192
- [121] WURM, M.: *Development of an integrated microfluidic system for metabolomic analysis of mammalian cells*, Technische Universität Hamburg - Harburg, Diss., 2011
- [122] WURM, M. ; SCHOPKE, B. ; LUTZ, D. ; MULLER, J. ; ZENG, A-P: Microtechnology meets systems biology: the small molecules of metabolome as next big targets. In: *Journal of Biotechnology* 149 (2010), Nr. 1-2, S. 33–51

-
- [123] XUAN, Xiangchun ; ZHU, Junjie ; CHURCH, Christopher: Particle focusing in microfluidic devices. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 9 (2010), Nr. 1, S. 1–16
- [124] XUN, Wenpeng ; FENG, Jianguo ; CHANG, Honglong: A microflow cytometer based on a disposable microfluidic chip with side scatter and fluorescence detection capability. In: *IEEE transactions on nanobioscience* 14 (2015), Nr. 8, S. 850–856
- [125] YANG, Tae H. ; WITTMANN, Christoph ; HEINZLE, Elmar: Dynamic calibration and dissolved gas analysis using membrane inlet mass spectrometry for the quantification of cell respiration. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (2003), Nr. 24, S. 2721–2731
- [126] YOON, Dong H. ; HA, Jin B. ; BAHK, Yoen K. ; ARAKAWA, Takahiro ; SHOJI, Shuichi ; GO, Jeung S.: Size-selective separation of micro beads by utilizing secondary flow in a curved rectangular microchannel. In: *Lab on a chip* 9 (2009), Nr. 1, S. 87–90
- [127] ZHANG, Jun ; LI, Weihua ; LI, Ming ; ALICI, Gursel ; NGUYEN, Nam-Trung: Particle inertial focusing and its mechanism in a serpentine microchannel. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 17 (2014), Nr. 2, S. 305–316
- [128] ZHANG, Jun ; YAN, Sheng ; SLUYTER, Ronald ; LI, Weihua ; ALICI, Gursel ; NGUYEN, Nam-Trung: Inertial particle separation by differential equilibrium positions in a symmetrical serpentine micro-channel. In: *Scientific Reports* 4 (2014), S. 4527
- [129] ZHOU, Jian ; PAPAUTSKY, Ian: Fundamentals of inertial focusing in microchannels. In: *Lab on a chip* 13 (2013), Nr. 6, S. 1121–1132

Tabellenverzeichnis

1	Batch - Fermentationsmedium	26
2	Gradient für die Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC	31
3	Gradient für die Bestimmung von Glycerin mittels HPIC	31
4	Partikelkonzentrationen	36
5	Filterblöcke und Wellenlängen für die Fluoreszenzmessungen	36
6	Probenahme Fermentationen Wildstamm und Mutant	72
7	maximale hydraulische Durchmesser für die Fokussierung von Partikeln . .	88
8	Seitenlängen der verschiedenen Verhältnisse von Kanalhöhe zu Kanalbreite (H/W)	88

Abbildungsverzeichnis

1	Schema RSU	6
2	Oberflächen- und Tiefenfiltration	7
3	Waschkurve der Durchströmungswäsche	9
4	Zentral- und Aminosäurestoffwechsel von <i>C. glutamicum</i> (vereinfachte Darstellung entnommen aus [45])	13
5	Prinzip der Sekundärströmung, Dean - Wirbel	19
6	Kräfteverhältnisse an Partikeln in der Sekundärströmung	23
7	Schema der automatisierten Schnellfiltration (zur Verfügung gestellt von Julian da Luz [29])	27
8	7 mm Spirale komplett in CAD	33
9	Masken checkplot	34
10	Spiralstruktur nach dem Ätzen und Bonden (zur Verfügung gestellt von Sven Bohne, Institut für Mikrosystemtechnik der TUHH)	35
11	Verlauf der Ionenstärke während einer Batch Fermentation von <i>C. glutamicum</i> bis OD 100	39
12	Verlauf der Ionenstärke während einer Batch Fermentation von <i>C. glutamicum</i> bis OD 30	41
13	Schaumanteil in einer manuellen Probenentnahme aus der Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> (ATCC 13032)	42
14	Schaumbildung während einer Hochzelldichtekultivierung von <i>C. glutamicum</i> (ATCC 13032)	42
15	Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des silikonhaltigen Antischaummittels Struktol J 673 A auf die automatisierte Schnellfiltration	43
16	Probenvolumen vs Biomasse vs Waschlösung	44
17	Örtliche Gaskonzentration Comsol Multiphysics Simulationen einer Mehrphasenströmung für das Entnahmesystem vor dem Eintritt in den Probenloop	46
18	Comsol Multiphysics Simulationen einer Mehrphasenströmung für das Entnahmesystem vor dem Eintritt in den Probenloop - 2D	47
19	Modifikation der etablierten automatisierten Schnellfiltration	50
20	Fed-Batch Kultivierung des Wildstammes <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 sowie eines daraus generierten Mutanten LC 298	51
21	Probenvolumina der automatisierten Schnellfiltration für <i>C. glutamicum</i> LC 298	53
22	Probenvolumina einer automatisierten Schnellfiltration von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	54

23	Restmedium auf dem Filter nach der Filterwäsche	57
31	Vergleich beider Filtrationsmethoden Zusammenfassung	70
32	Fermentationsverläufe der Fed - Batchkultivierungen	72
35	Vergleich intrazellulärer Aminosäuren des Pyruvatstoffwechsel	76
36	Vergleich intrazellulärer Aminosäuren des Phosphoenolpyruvatstoffwechsel	77
37	Abgaswert und Baseverlauf ATCC 13032	79
38	Vergleich intrazellulärer Metaboliten beider Stämme Zusammenfassung . .	80
39	simuliertes Fluidverhalten für das Verhältnis Kanalhöhe zu Kanalbreite . .	84
40	Fokussierungsparameter R_f	85
41	Oberflächenstruktur nach dem Ätzen einer Kanalgeometrie	88
42	theoretische Kanallänge für die Fokussierung	89
43	Position des Schwerpunktes einer fluoreszierenden Flüssigkeit	92
44	Breite einer fluoreszierenden Flüssigkeit	93
45	Fluoreszenzaufnahmen der fluoreszierenden Flüssigkeit im Kanal	94
46	Konfokalaufnahmen des fluoreszierenden Calcein	95
47	Darstellung des Optimums zum Seitenwechsel	96
48	Linearisierung zwischen Reynoldszahl und optimaler Länge für einen Seitenwechsel	97
49	Verhältnis von Reynoldszahl und Kanallänge für einen Seitenwechsel	97
50	Vergleich der Kanallängen für einen Seitenwechsel des Mediums und der Partikelfokussierung	100
51	Schwerpunkte von Partikelband und Fluid an verschiedenen Kanallängen .	102
52	Druckabfall über die Spirale	103
53	Fluoreszenzaufnahmen der Partikel und des Fluides	105
54	Vergleich der Auswertung der Intensität mittels HdM und FdM	106
55	Position und Breite des Fluoreszenzbandes der Partikel	107

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

a	Partikeldurchmesser	m
A	Fläche	m^2
α	Spezifischer Filterkuchenwiderstand	$\frac{m}{kg}$
α_0	Druckfreier spezifischer Filterkuchenwiderstand	$\frac{m}{kg}$
b	Breite des Fluoreszenzbandes	m
B	Breite des Kanals	m
c	Molalität	$\frac{mol}{kg}$
C_{SGp}	Scherkraftkoeffizient	–
C_L	Liftkoeffizient	–
Δp	Druckdifferenz	Pa
De	Deanzahl	–
D_h	hydraulischer Durchmesser	m
ϵ	Porosität	–
η	dynamische Viskosität	$\frac{kg}{m \cdot s}$
F_L	Liftkraft	N
F_{SG}	Scherkraft	N
F_D	Deankraft	N
FdM	Fünftel des Maximums	–
H	Höhe des Kanals	m
HdM	Hälfte des Maximums	–
I	Ionenstärke	$\frac{mol}{l}$
J	Filtratstrom	$\frac{m}{s}$
K	Kozeny – Konstante	–
L_m	Kannallänge	m
λ	Volumenfraktion der Partikel	–
m	Masse	kg

m	Masse des nassen Filterkuchens pro Einheit Filtrationsfläche	$\frac{kg}{m^2}$
μ_m	Spezifische mittlere Wachstumsrate	$\frac{1}{h}$
NZ	Zellzahl	–
p	Druck	Pa
p_{ke}	kapillarer Eintrittsdruck	Pa
q	Spezifische Verbrauchsrate/Bildungsrate	$\frac{g}{g}$
ρ	Dichte	$\frac{kg}{m^3}$
ρ_c	Nasszelldichte	$\frac{kg}{m^3}$
R, r	Radius	m
R_m	Membranwiderstand	m^{-1}
Re	Reynoldszahl	–
s	Dicke des Filterkuchens	m
S_v	spezifische Partikeloberfläche	$\frac{m^2}{m^3}$
S_r	remanente Sättigung	–
u	Geschwindigkeit	$\frac{m}{s}$
U_{max}	maximale Geschwindigkeit	$\frac{m}{s}$
u_D	Deangeschwindigkeit	$\frac{m}{s}$
\dot{V}	Volumenstrom	$\frac{m^3}{s}$
W	Breite des Kanals	m
x	Schwerpunkt des Fluoreszenzbandes	–
X	Biomassekonzentration	$\frac{g}{l}$
Y	Ausbeutekoeffizient	$\frac{g}{g}$
z	Ladungszahl	–
ATP	Adenosintriphosphat	
ADP	Adenosindiphosphat	
AMP	Adnosinmonophosphat	
BTM	Biotrockenmasse	

NADH Nicotinamidadenindinukleotid

NADPH Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NaCl Natriumchlorid

PDMS Polydimethylsiloxan

Prüfungsarbeiten

Bei der Erarbeitung der in dieser Dissertation dokumentierten Ergebnisse wurden einige Studierende betreut. Dabei sind folgende Prüfungsarbeiten entstanden:

Frank Th. (2014). Charakterisierung einer Schnellfiltrationsanlage zur Filtration mikrobieller Suspensionen. Technische Universität Hamburg-Harburg, Bachelorarbeit.

Sahar D. (2015). Quantifizierung intrazellulärer Aminosäuren des *C. Glutamicum* Mutanten LC 298. Technische Universität Hamburg-Harburg, Bachelorarbeit.