

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Februar 2003 (13.02.2003)

PCT

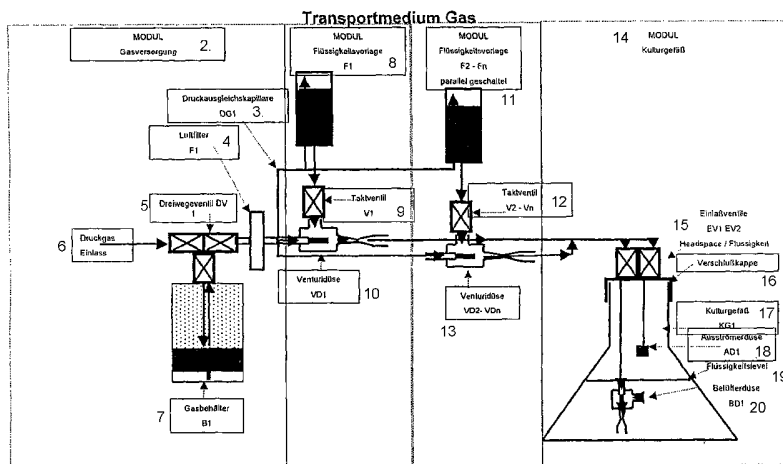
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/012025 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12M (74) **Anwalt:** JUNGBLUT, Bernhard; Albrecht, Lücke & Jungblut, Gelferstrasse 56, 14195 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02902 (81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 31. Juli 2001 (31.07.2001) (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (71) Anmelder und
(72) **Erfinder:** ERHARDT, Ursula [DE/DE]; Niebuhrstrasse 10, 10629 Berlin (DE). ERHARDT, Christoph [DE/DE]; Niebuhrstrasse 10, 10629 Berlin (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** BIO-REACTOR

(54) **Bezeichnung:** BIOREAKTOR



2. MODULE, GAS SUPPLY
3. PRESSURE COMPENSATION CAPILLARIES DG1
4. AIR FILTER F1
5. THREE-WAY VALVE DV 1
6. PRESSURE GAS, INLET
7. GAS CONTAINER B1
8. MODULE, LIQUID FEED
9. CLOCK VALVE V1
10. VENTURI NOZZLE VD1
11. MODULE LIQUID FEED F2-FN, PARALLEL MOUNTED
12. CLOCK VALVE V2-VN
13. VENTURI VALVE V2-VDN
14. MODULE, CULTURE VESSEL
15. INLET VALVE EV1, EV2; HEADSPACE/LIQUID
16. SEALING CAP
17. CULTURE VESSEL KG1
18. EJECTOR NOZZLE AD1
19. LIQUID LEVEL
20. VENTILATION NOZZLE BD1

(57) **Abstract:** A bio-reactor for cultivating cells, comprising a culture vessel, at least one gas supply and/or liquid feed in addition to supply devices for gases and/or liquids enabling gases or liquids to be fed to the culture vessel. A mixer device, especially a Venturi nozzle is arranged between the supply device and gas supply or liquid feed in order to mix gas and/or liquid from the gas supply or liquid feed.

(57) **Zusammenfassung:** Bioreaktor zur Kultivierung von Zellen, mit einem Kulturgefäß, mit einer oder mehreren Gasversorgungen und/oder einer oder mehreren Flüssigkeitsvorlagen sowie Zuführungseinrichtungen für Gase und/oder Flüssigkeiten, mittels welcher Gase und/oder Flüssigkeiten dem Kulturgefäß zuführbar sind, wobei zwischen der Zuführungseinrichtung und der Gasversorgung bzw. Flüssigkeitsvorlage eine Mischvorrichtung, insbesondere eine Venturidüse, zur Mischung von Gas und/oder Flüssigkeit aus der Gasversorgung bzw. Flüssigkeitsvorlage geschaltet ist.



WO 03/012025 A2



OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Bioreaktor

Gebiet der Erfindung.

5

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren und eine Vorrichtung, die eine quantitative Erzeugung von Gas/Gas-, Gas/Flüssigkeit- oder Flüssigkeit/Flüssigkeitsgemischen durch definierte Zuführung der zu dosierenden

10 Komponente(n) zu einem Carriermedium ermöglicht und so eine exakte, quantitative Dosierung einer einzigen Komponente oder eines Gemisches zu Kulturgefäßen für biologische oder (bio)chemische Reaktionen ermöglicht.

15

Stand der Technik.

Kulturgefäße für biologische oder (bio)chemische Reaktionen, soweit es sich nicht um Fermentationsanlagen im Maß-

20 stab größer 1000 ml handelt, werden derzeit üblicherweise weder begast noch verfügen Sie über geeignete Dosiereinrichtungen. Dies liegt daran, daß der technische und wirtschaftliche Aufwand für diese Regelsysteme nach dem Stand der Technik sehr hoch ist und mit fortschreitender Minia-

25 turisierung der Kulturgefäße technisch nicht machbar ist. Der aus der Praxis bekannte Stand der Technik zur vorliegenden Erfindung soll an Hand verschiedener quantitativer Dosiermodule dargestellt werden:

30 Gasdosierung:

Eine quantitative Gasdosierung erfolgt bei konstantem Vor-
druck über mechanische Flowmeter, die mit Nadelventilen

auf den gewünschten Gasfluß geregelt werden. Weiterhin existieren elektronische Massflowcontroller, die über eine Regeleinheit und elektrische Stellblenden den Gasfluß automatisch regeln. Der so geregelte Gasfluß kann in Größenordnungen zwischen ml Gas/h und m³ Gas /h liegen.

Biologische oder (bio)chemische Kulturgefäße werden in jeder ihrer Anwendungen über eine eigene Gasdosierstrecke versorgt. An der Auslaßöffnung zum Kulturgefäß hin können sich Perlausströmer befinden. (Braun Biotech International GmbH, Bioreaktoren Serie BIOSTA A,B,MD,Q,D,U). In keinem Fall wird der Gasstrom als Trägermedium für Flüssigkeiten oder andere Gase genutzt. Desweiteren werden keine Venturidüsen an der Auslaßöffnung verwendet, um die Durchmischung mit der Reaktionsflüssigkeit und damit die Effektivität der Begasung zu steigern.

Flüssigkeitsdosierung:

a) Pumpen

Standardmäßig werden zur quantitativen Dosierung von Flüssigkeiten Pumpen beliebiger Bauart eingesetzt. Diese entnehmen aus einem Vorratsgefäß entsprechend der Vorgabe eines übergeordneten Reglers ein Aliquot und pumpen dieses über eine Zuleitung zum Reaktionsgefäß. Die transportierende Kraft ist hier die Pumpleistung. Bei biologischen oder (bio)chemischen Kulturgefäßen sind Dosagepumpen für Säure, Lauge, Antischaummittel und ein bis zwei Substratlösungen üblich, die die Flüssigkeit einfach in die Reaktionsflüssigkeit pumpen (Braun Biotech International GmbH, Bioreaktoren Serie BIOSTA A,B,MD,Q,D,U). In keinem Fall wird die Flüssigkeit mit einem Gasstrom, der zur Aerosolbildung und damit zur homogenen Durchmischung und effektiveren Nutzung des Gases führt, kontaktiert.

b) Druckvorlagen

Bei größeren Kulturgefäßen (etwa ab 50 Liter) werden Flüssigkeitsvorlagegefäße verwendet, die gegenüber dem Kulturgefäß unter einem Überdruck stehen und mit diesem durch eine Zuleitung mit integrierten Taktventil verbunden sind. Soll nun eine Flüssigkeitsdosierung erfolgen, öffnet ein Regler für eine definierte Zeit das Taktventil, so daß durch den Überdruck Flüssigkeit zum Kulturgefäß gedrückt wird. Durch die Parameter Öffnungszeit, Querschnitt der Zuleitung, Überdruck und Viskosität der Flüssigkeit kann die Dosierung quantitativ geeicht werden (Braun Biotech International GmbH, Bioreaktoren Serie kundenspezifische Produktionsanlagen). Bei biologischen oder (bio)chemischen sind Vorlagegefäße für Säure, Lauge, Antischaummittel und ein bis zwei Substratlösungen üblich, die die Flüssigkeit einfach in die Reaktionsflüssigkeit "drücken". In keinem Fall wird die Flüssigkeit mit einem Gasstrom, der zur Aerosolbildung und damit zur homogenen Durchmischung und effektiveren Nutzung des Gases führt, kontaktiert.

c) Mischstationen mit Venturidüsen

Venturidüsen sind als solche aus Bioreaktor-fremden Bereichen bekannt. Venturidüsen erzeugen auf Grund ihrer strömungstechnischen Form am Seiteneinlass einen Unterdruck, durch den zum strömenden Medium 1 hin (Gas oder Flüssigkeit) ein weiteres Medium 2 (Gas oder Flüssigkeit) angesaugt werden kann. Im Auslaßbereich der Düse erfolgt eine homogene Durchmischung der beiden Medien. Wenn die Querschnitte der Düse, die Viskosität der Medien und der Vor-
druck vor der Düse bekannt sind, läßt sich eine

quantitative Mischung erzielen. Medium 1 kann nach der Düse auf Grund seines Oberdrucks weiterhin als Transportmedium fungieren. Eingesetzt werden Venturi Düsen für vielfältige Applikationen zum Entgasen (Wasserstrahlpumpe), in Durchflußmessern (delta Druck) oder Mischen verschiedener Medien, z.B. Verdünnen von Konzentraten mit einem zweiten Medium. Im Mikromaßstab lassen sich Venturidüsen für eine quantitative Probenahme eines Mediums einsetzen (Fox Valve Development Corp, Hamitton Buisness 10 Park, Dover, New Jersey 07801 USA, Intemetfoxvalve.com). Obwohl mit dem Einsatz von Venturidüsen eine Vielzahl von Anwendungen für Dosieren und Mischen im täglichen Gebrauch bekannt ist (z.B. Whirl pool), obwohl sie keinerlei bewegte Verschleißteile aufweisen und somit eine ideale Dosier- 15 vorrichtung darstellen, ist der Einsatz von diesen Düsen im Bereich biologische und (bio-)chemische Kulturgefäße zur Dosierung von Gasen oder Flüssigkeiten mittels eines Transportmediums bisher nicht beschrieben. Weiterhin ist kein Dosiersystem gemäß der vorliegenden Erfindung für 20 biologische oder (bio-)chemische Kulturgefäße beschrieben, das ein Transportmedium mit mehreren Dosagemedien (Gas oder Flüssigkeit) vereinen kann, dabei eine quantitative Dosierung ermöglicht, und ggf. am Auslaß noch Verneblerdüsen oder Mischdüsen besitzt, um eine bessere Durchmischung 25 mit der Reaktionsflüssigkeit oder effektivere Ausnutzung der dosierten Flüssigkeit zu gewährleisten.

Zusammengefasst sind die Nachteile des Stands der Technik für Kulturgefäße für biologische und(bio)chemische 30 Reaktionen:

- für eine Miniaturisierung unter 1000ml Kulturgefäßvolumen nicht geeignet

- bei Parallelansätzen aufwendig, stör anfällig, unwirtschaftlich und nur bedingt einsetzbar
- kostenintensiv.

5 Die Dosierung von Flüssigkeiten, Gasen oder Gemischen daraus in Kulturgefäße für biologische oder (bio)chemische Reaktionen erfordert einen erheblichen wirtschaftlichen und mechanischen Aufwand und ist bei größerer Anzahl parallel betriebener Kulturgefäße nicht mehr realisierbar.

10

Technisches Problem der Erfindung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, ein
15 effektives, wirtschaftliches und für Miniaturisierung geeignetes Fluiddosierverfahren, sowie eine Vorrichtung dafür zur Verfügung zu stellen.

20 Grundzüge der Erfindung.

Das Problem wird gelöst durch ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Erzeugung eines Carrierfluids, das gleichzeitig zur Begasung des Kulturgefäßes verwendet werden kann.

25

Dem Carrierfluid können quantitativ und definiert die zu dosierenden Fluide beigemischt werden. Ohne Verwendung von Pumpen und anderen aufwendigen mechanischen Teilen können so im Kulturgefäß in der Reaktionsflüssigkeit und in der
30 Atmosphäre des Gefäßes definierte und geregelte Bedingungen geschaffen werden, wobei gleichzeitig die Eigenschaften der dosierten Fluide optimal genutzt werden.

Besonders geeignet ist die Erfindung für den parallelen Betrieb mehrerer Kulturgefäße. Die vorliegende Erfindung ist anwendbar in allen Bereichen, in denen in
5 Kulturgefäßen biologische oder biochemische Reaktionen durchgeführt werden, speziell im Bereich Biotechnologie, Lebensmitteltechnik und Umweltschutz.

10 Detaillierte Beschreibung der Erfindung.

Die Aufgabe wird bezüglich des Verfahrens dadurch gelöst, daß das zu dosierende Fluid oder die zu dosierenden Fluide einem oder mehreren Träger- und Transportfluiden (Carrier-
15 fluiden) in definierter Konzentration beigemischt werden und dieses Carrierfluid, bzw. diese Carrierfluide dem Kulturgefäß in definierter Menge und/oder Zeiteinheiten entweder ins Reaktionsmedium oder in den Headspace zugeführt werden.

20

Die Aufgabe wird bezüglich der Vorrichtung gelöst durch Vorrichtungen zur Beimischung von einem oder mehreren zu dosierenden Fluiden zu einem oder mehreren Carrierfluiden und die Zuführung in ein oder mehrere Kulturgefäße, wie
25 Sie in den folgenden Beispielen und den Patentansprüchen beschrieben werden.

Folgend erfolgt die Beschreibung der Erfindung beispielhaft mit der Beschreibung der einzelnen Moduie und erfindungsgemäßen Eigenschaften an einem 1000 ml Kulturgefäß
30 mit 500 ml Flüssigkeitsvolumen. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die Zahlen (vor allem die relativen Angaben) an Kulturgefäße mit Volumen von 1 ml bis 50 m³

angepasst werden können, wobei die Querschnitte der Düsen und Dosierstrecken jeweils anzupassen sind.

a) Gas als Transportmedium der Vorrichtung

5

Das Modul Gasversorgung der Vorrichtung besteht aus folgenden, wesentlichen Bauteilen (Zeichnung 1):

- Druckgaseinlaß
- Dreiwegeventil DV1 oder Einlaß- und Auslaßventil
- 10 - Gasbehälter B1
- Gasfilter F 1
- Druckausgleichskanal DGI

Der Druckgaseinlaß mit einem Eingangsüberdruck gegenüber
15 dem Kulturgefäß von 0,1 bis 10 bar, bevorzugt 0,2 bis 1 bar, insbesondere 0,5 bar, ist über einen druckbeständigen Schlauch, Innendurchmesser 0,5 bis 8 mm, bevorzugt 0,5 bis 2mm, insbesondere 1 mm, mit dem Dreiwegeventil DV1 (s. Zeichnung 1) verbunden. Das Ventil DV1 ist so geschaltet,
20 daß der Gasbehälter B1 mit einem Behältervolumen von 1% bis 40%, bevorzugt 1 bis 10%, insbesondere 5%, des Flüssigvolumens im Kulturgefäß, mit Druckluft oder einem anderen Gas gefüllt wird). Das Füllvolumen des Gasbehälters kann über einen eingebauten Stempel von 0% bis 100% des
25 Behältervolumens variiert werden. Nach Erreichung des Druckausgleiches wird das Ventil DV1 in die andere Stellung, Gasbehälter - Kulturgefäß, geschaltet. Es entsteht durch den Druckausgleich zum Kulturgefäß hin ein Gasstrom, der nach einem optionalen Gasfilter durch nachstehend be-
30 schriebene Module geleitet werden kann und letztlich im Headspace oder der Reaktionsflüssigkeit des Kulturgefäßes ausströmt. Die nach dem Dreiwegeventil DV1 abzweigende Druckausgleichskapillare sorgt für einen ausgeglichenen

Druck zwischen der Gaszuführung und den Modulen Flüssigkeitsvorlage. Am Ausgang des Moduls Gasversorgung kann ein Filter zur Filtration des Transportmediums angebracht sein. Das Kulturgefäß wird durch diese erfindungsgemäße

5 Vorrichtung diskontinuierlich auf einfachste Weise mit definierten und damit quantifizierbaren "Gasportionen" versorgt. Je kleiner das Behältervolumen und je höher die Taktrate des Ventils ist, desto mehr nähert sich dieser diskontinuierliche Gasstrom einem kontinuierlichen Gas-

10 trom an. In folgender Tabelle ist das Behältervolumen 5% des Flüssigvolumens der Reaktionsflüssigkeit (Beispiel 25 ml Behältervolumen, 500 ml Reaktionsflüssigkeitsvolumen) und die Begasungsrate VF der Quotient aus Gasvolumen/h zu Volumen Reaktionsflüssigkeit.

15

Tabelle 1

	Taktrate Ventil/min	Gasstrom/min in % Flüssigvolumen	VF (l /h)
	0	0	0
20	1	5%	3
	2	10%	6
	5	25%	15
	10	50%	30
	15	75%	45
25	20	100%	60
	25	125%	75
	50	250%	150

Für aerobe, biologische oder (bio)chemische Reaktionen

30 liegen die VF Werte üblicherweise zwischen 5 und 60 (l/h). Dies lässt sich mit vorliegenden, erfindungsgemäßen Modul auf einfachste Weise in einem nahezu "kontinuierlichen" Gasstrom erreichen, wobei auf komplizierte, mechanische

oder elektronische Durchflußmessungen und -Regler verzichtet werden kann. Wesentlich für eine optimale und kontinuierliche Gasversorgung von Kulturen von Mikroorganismen bei optimaler Ausnutzung des Gases ist der sogenannte "gas hold up", also die Aufenthaltszeit der Gasblasen in der Reaktionslösung, während der an der Grenzfläche zwischen Gasblase und Flüssigkeit durch Diffusion der Gasaustausch erfolgen kann. Ein Optimum der Nutzung des Gases bei gleichzeitig optimaler Begasungsrate erreicht man, wenn der "gas hold up" gleich der Taktrate des Ventils DV1 ist. Es erfolgt immer eine Dosierung von Gas, wenn die Gasblasen aus der Flüssigkeit verschwinden. Eine Variation der Menge des durchgesetzten Gases kann über das variable Volumen des Gasbehälters erfolgen. Weiterhin reduziert der erfindungsgemäße Aufbau des Moduls die Tendenz zur Schaumbildung, da immer nur soviel Gas dosiert wird, wie für eine optimale Versorgung der Kultur nötig ist.

b) Flüssigkeit als Transportmedium

20

An Stelle des Moduls Gasversorgung kann Flüssigkeit als Transportmedium eingesetzt werden. In diesem Fall wird das Modul Gasversorgung durch eine geregelte Flüssigkeitspumpe ersetzt, die entweder mit einer Saugleitung mit der Reaktionsflüssigkeit im Kulturgefäß verbunden ist und diese umwälzt oder aus einem eigenen Vorratsgefäß ansaugt (Zeichnung 2). Das Modul Antriebspumpe besteht aus folgenden wesentlichen Bauteilen:

- Flüssigkeitspumpe
- 30 - Saugleitung
- Druckleitung zum Kulturgefäß hin
- Filter (optional)

Der Einsatz von Flüssigkeit als Transportmedium bietet sich besonders dann an, wenn die Reaktionsflüssigkeit effektiv, aber unter Vermeidung von Gasblasen in der Kultur, mit Gasen angereichert werden soll, z.B. CO₂ Dosierung in 5 Zellkulturmedien oder minimale Substanzmengen zudosiert werden sollen. Hier ist zum Beispiel die Dosage von Katalysatoren oder die Dosage von biologischen Wirkstoffen zu nennen. Wirkstoffe sind meist extrem teuer und nur in konzentrierter Form langzeitstabil. Sie werden erfindungsgemäß mit Flüssigkeitsmodulen (s.u.) in kleinsten Mengen und 10 in beliebiger Kombination dosiert.

c) Modul Flüssigkeitsvorlage

15 Das Modul Flüssigkeitsvorlage besteht aus folgenden wesentlichen Bauteilen (Zeichnung 1):

- Vorratsbehälter Flüssigkeit
- Druckausgleichsleitung, abgezweigt aus der Druckausgleichskapillare
- 20 - Zuleitung zum Taktventil und zur Venturidüse
- Taktventil
- Venturidüse

Die Flüssigkeitsvorlage ist mit einer zur Reaktionsflüssigkeit im Kulturgefäß zu dosierenden Flüssigkeit gefüllt, 25 wobei ein Restvolumen von Gas von mindestens 2% des Volumens der Vorlage zum Druckausgleich vorhanden sein muß.

Ist das Transportmedium eine Flüssigkeit, entfällt das Restvolumen des Gases in der Vorlage und der Druckausgleich über Kapillaren (Zeichnung 2). Dafür kann die Vorlage zur Vermeidung von Unterdruck mit atmosphärischem Außendruck belüftet werden. Die Flüssigkeitsvorlage kann 30 beliebig, hängend, stehend, liegend zur Vorrichtung

angebracht werden, wobei die Druckausgleichsleitung in das vorhandene Gasvolumen münden sollte. Die Flüssigkeitsvorlage hat gegenüber dem Flüssigkeitsvolumen der Reaktionsflüssigkeit ein Volumen von 0,5% bis 50%, bevorzugt 5%.

5 Sie ist über eine Zuleitung mit dem Taktventil V1, dieses mit der Venturidüse VD1, verbunden. Liefert das Modul Gasversorgung oder Antriebspumpe einen Strom von Transportmedium über die Venturidüse, entsteht am Seiteneinlass der Düse ein Unterdruck gegenüber dem sonst druckausgeglichenen System. Bei gleichzeitiger Öffnung des Taktventils V1
10 wird somit Flüssigkeit aus der Flüssigkeitsvorlage zum Gasstrom in der Düse hin angesaugt. Die angesaugte Menge der Flüssigkeit korreliert mit folgenden Parametern

15 Tabelle 2

- Düsenabmessungen
- Druck und Gasström über die Düse
- Querschnitte der Zuleitung und des Taktventils
- Viskosität der Flüssigkeit

20 - Temperatur

und kann daher quantitativ und reproduzierbar kalibriert werden. Es läßt sich folglich nur durch die Taktzeit des Ventils V1 bei konstanten Parametern gemäß Tabelle 2 eine
25 quantitative Dosierung von Flüssigkeitsaliquots zum Transportmedium durchführen. Im Auslaß der Düse wird die angesaugte Flüssigkeit und das Transportmedium homogen vermischt. Zwischen dem Modul Gasversorgung oder Modul Antrieb (Zeichnung 1 und 2) und dem Modul Kulturgefäß können
30 mehrere Module Flüssigkeitsvorlage, bevorzugt 4 Module, zwischengeschaltet werden. Die Schaltung kann parallel (bevorzugt) oder hintereinander erfolgen. Auf diese Weise wird es möglich, in das Transportmedium gleichzeitig keine

bis mehrere unterschiedliche Flüssigkeiten quantitativ zu dosieren, diese in beliebiger Menge zu kombinieren und vor dem Einlaß ins Kulturgefäß homogen zu durchmischen. In biologischen Kulturen sind neben der Titration des pH Wertes mit Säuren und Laugen und dem Zusatz von Mitteln zur Schaumbekämpfung vor allem sogenannte "fed batch" Verfahren gebräuchlich. Hierbei wird der Kultur geregelt ein oder mehrere Substrate, z.B. Kohlenstoff oder Stickstoffquelle, zudosiert. Die vorliegende Vorrichtung ermöglicht auf einfachste Weise, die Zusammensetzung der Flüssigdosage zu variieren. So können zeitabhängig oder in Abhängigkeit von kulturspezifischen Regelparametern nur über die Variation der Taktzeit Substratgradienten erstellt werden oder zusätzliche Nährstoffe beigemischt werden, z.B. Wachstumsfaktoren, Mineralien oder Vitamine aus weiteren Flüssigkeitsmodulen.

d) Modul Dosiervorlage für Gase

Das Modul Dosiervorlage für Gase (Zeichnung 3 und 4) besteht aus folgenden wesentlichen Bauteilen

- Gasbehälter B2, über Stempel im Füllvolumen verstellbar
- Gaseinlaß
- Dreiwegeventil

25

Das Dreiwegeventil wird vom Gaseinlaß zum Gasbehälter B2 geschaltet. Der Behälter füllt sich mit Gas, wobei über den eingebauten Stempel das Füllvolumen variiert werden kann, somit aber quantitativ bekannt ist. Soll nun eine Gasdosage erfolgen, wird das Dreiwegeventil für eine definierte Taktzeit zur Venturidüse hin umgeschaltet, wobei sichergestellt sein sollte, daß an der Düse ein Unterdruck, der durch das Transportmedium erzeugt wird,

30

anliegt. Bei bekanntem Vordruck am Gaseinlaß, Füllvolumen des Gasbehälters und der Taktzeit des Dreiwegeventils läßt sich so eine quantitative Gasdosage erreichen. Zwischen dem Modul Gasversorgung oder Modul Antrieb (Zeichnung 1 und 2) und dem Modul Kulturgefäß können mehrere Module Gasdosage, bevorzugt 2 Module, zwischengeschaltet werden. Die Schaltung kann parallel (bevorzugt) oder hintereinander erfolgen. Auf diese Weise wird es möglich, in das Transportmedium gleichzeitig kein bis mehrere

10 unterschiedliche Gase quantitativ zu dosieren, diese in beliebiger Menge zu kombinieren und vor dem Einlaß ins Kulturgefäß homogen zu durchmischen. Die Gasmodule können an Stelle oder in beliebiger Kombination mit den Flüssigkeitsmodulen eingesetzt werden. In biologischen Zellkultu-

15 ren wird häufig CO₂ zur Regelung des pH Wertes eingesetzt, das mit diesem Modul unter Vermeidung von Gasblasen in der Reaktionsflüssigkeit einfach und quantitativ dosiert werden kann. Weiterhin kann durch die Gasdosage eine künstliche Atmosphäre im Kulturgefäß geschaffen und geregelt wer-

20 den, die für biologische Kulturen vorteilhaft ist. Zu nennen sind hier beispielsweise die Kultur von Pflanzenzellen, die eine höhere CO₂ Konzentration (als Substrat) bevorzugen oder die Anzucht anaerober Organismen unter Stickstoff- oder Schwefelatmosphäre .

25

e) Modul Kulturgefäß

Das Modul Kulturgefäß besteht im wesentlichen aus folgenden Bauteilen:

- 30 - Kulturgefäß KG1, gefüllt mit der Reaktionsflüssigkeit und darüber liegenden Gasraum (headspace) und Verschuß des Gefäßes
- Zuleitung für das Transportmedium

- Einlaßventil EV1 mit Zuleitung in den Headspace des Kulturgefäßes
- Einlaßventil EV2 mit Zuleitung in die Reaktionsflüssigkeit
- 5 - Belüfterdüse BDI in der Reaktionsflüssigkeit
- Ausströmerdüse AD1 im Headspace des Kulturgefäßes

Durch die am Verschuß des Kulturgefäßes angebrachten Einlaßventile kann gewählt werden, ob das Transportmedium in den Luftraum des Kulturgefäßes (headspace) oder in die Reaktionsflüssigkeit dosiert werden soll. Das Einlassventil EV1 zum headspace führt zu einer im Luftraum angebrachten Verneblerdüse AD1, die nochmals eine Zerstäubung des Transportmediums bewirkt. Das gesamte, vernebelte Transportmedium und die Dosagen sinken einheitlich auf die Oberfläche der Reaktionsflüssigkeit. Diese Feinverteilung bewirkt eine schnelle Mischung des Transportmediums und der Dosagen mit der Reaktionsflüssigkeit und kann zu einer effektiveren Nutzung der dosierten Flüssigkeit führen. Die Effektivität von Antischaummitteln, die in dieser Weise dosiert werden, kann hierdurch bis um das Zehnfache gesteigert werden, folglich der Verbrauch entsprechend minimiert werden. Weiterhin ist es möglich, nur einen Gasstrom ohne zudosierte Flüssigkeit zur Schaumbekämpfung einzusetzen. Der Schaum wird durch den Strom des Gases einfach "niedergeblasen". Häufig reicht dieser Effekt für die Schaumbekämpfung schon aus, ohne daß nachfolgend Antischaummittel in oben beschriebener Weise dosiert werden muß. Die Vermeidung von Antischaummitteln in biologischen Prozessen ist oberstes Ziel, da diese negative Auswirkungen auf die Kultur selbst und den späteren Aufreinigungsprozess haben können, sowie biologisch schlecht abbaubar sind und somit nicht einfach entsorgt werden können.

Headspace Dosierungen in oben beschriebener Weise werden überwiegend eingesetzt werden, wenn nur eine Oberflächenbelüftung der Reaktionsflüssigkeit gewünscht ist, z.B. bei anaeroben Kulturen oder wenn Flüssigkeiten dosiert werden, die eine schnelle Wirkung auf die Reaktionsflüssigkeit haben sollen. Als Beispiel sei hier die Titration des pH Wertes mit Säuren oder Laugen genannt, sowie die Schaumbekämpfung in oben beschriebener Weise. Das Einlaßventil EV2 führt zu einer in der Reaktionsflüssigkeit angebrachten Venturidüse BD1. Das Transportmedium (und die Dosagen) strömt durch die Belüfterdüse BD1 in die Reaktionsflüssigkeit. Hierbei wird am seitlichen Einlaß der Düse durch den entstehenden Unterdruck Reaktionsflüssigkeit angesaugt, die im Auslaßbereich der Düse effektiv vermischt wird.

Sollen die Mikroorganismen (z.B. Gewebezellen) nicht den Scherkräften in der Düse ausgesetzt werden, ist die seitliche Einlaßöffnung mit einer Filtermembran verschließbar. Neben dem Mischeffekt, der die Mischzeiten der Reaktionsflüssigkeit drastisch verkürzt und den deutlich beschleunigten Gasaustauschraten entstehen (bei Transportmedium Gas) sehr viel kleinere Luftblasen als bei Begasungen entsprechend dem Stand der Technik. Diese kleineren Blasen erhöhen die für den Gasaustausch zwischen Luftblase und Reaktionsflüssigkeit zur Verfügung stehende Grenzfläche, erhöhen also die Gasaustauschrate und verbleiben länger in der Reaktionsflüssigkeit als große Blasen, erhöhen also den "gas hold up" und somit wieder die Gasaustauschrate. Das Gas wird effektiver genutzt, so daß, abhängig von der Art der Kultivierung, auf ein Schütteln oder Rühren des Kulturgefäßes ggf. verzichtet werden kann. Desweiteren wird durch kleinere Blasen die Tendenz zur Schaumbildung minimiert. Werden auf diese Weise Aerosole dosiert, z.B. Substrate im Gasstrom, führen die kürzeren Mischzeiten zu

einer schnelleren, homogenen Verteilung in der Reaktionsflüssigkeit. Substratgradienten auf Grund schlechter Mischung können vermieden werden, die Kultur wird gleichmäßig in der gewünschten Weise versorgt.

5

Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, dass sie für einen völlig neuen Anwendungsbereich Funktionsmodule in geeigneter Weise zusammenbringt und so eine bisher aufwendige und komplexe Technik in einer einfachen, kompakten Vorrichtung vereint. Der Einsatz der Vorrichtung für biotechnologische Prozesse unter sterilen Bedingungen wird möglich. Hierdurch werden regelungstechnisch Bereiche zugänglich, die bisher mit dem Stand der Technik nicht bedient werden konnten. Als Beispiel sei hier die neuerdings durchgeführte Parallelermentation von Kulturgefäßen, üblicherweise bis zu 16 Gefäße, genannt (Das GIP GmbH, www.dasgip.de), die der Medien und Verfahrensoptimierung von biologischen Verfahren dient. Hierbei sollen unter möglichst produktionsnahen Bedingungen Einwirkungen verschiedener Parameter auf das Ergebnis der Kultur untersucht werden, wobei meß- und regeltechnisch möglichst schon die Bedingungen der Produktionsanlage erwünscht wären, d.h. effektive Begasung und Dosage verschiedener Flüssigkeiten. Wie bereits oben erwähnt, würde eine derartige Parallelermentation 96 Pumpen, 96 Regler und 16 geregelte Zuluftstrecken erfordern und ist damit technisch und wirtschaftlich praktisch nicht mehr realisierbar und erreicht trotzdem nicht, sogar wenn als Kulturgefäß Blasen-säulen eingesetzt werden, die meß- und regeltechnischen Bedingungen einer Produktionsanlage. Der Trend geht zu einer weiteren Miniaturisierung und Erhöhung der Zahl der Kulturgefäße, um parallel in kürzerer Zeit mehr Ergebnisse in reproduzierbarer und quantifizierbarer Form

(dokumentierbar) zu erhalten. Dies ist mit dem Stand der Technik nicht mehr realisierbar, wohl aber mit der vorliegenden Erfindung. Die Funktionsmodule können in beliebiger Größe hergestellt werden und so an die Größe des Kulturgefäßes angepasst werden, wobei die Volumen der Kulturgefäße zwischen 1 ml und 50 Kubikmeter liegen können. Bei Kulturgefäßen mit einem Flüssigkeitsvolumen von 1 ml bis 500 ml kann die gesamte Vorrichtung inkl. der Flüssigkeits- und Gasvorlagen und der Ventilsteuerung am Hals des Kulturgefäßes befestigt. Der Datenaustausch mit der Steuer EDV erfolgt über Infrarotschnittstelle. Es ist somit zum Kulturgefäß nur eine Zuleitung, bestehend aus Gaszuführung und Spannungsversorgung erforderlich. Eine weitere Miniaturisierung der Vorrichtung kann dadurch erfolgen, daß die Funktionsteile und Zuleitungen in entsprechende Werkstoffe, wie Stahl oder Kunststoffe, geätzt, geschnitten oder gespritzt werden und die Ventulfunktion durch eingelegte Dichtungen, die über Stöße betrieben werden, oder beliebige andere Miniventile realisiert werden kann. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann mit Einbauten im Kulturgefäß, z.B. Patentanmeldung mit dem Titel "Vorrichtung als Einsatz für Kulturgefäße zur optimierten Begasung und Dosierung von geschüttelten oder gerührten Dreiphasensystemen" (Aktenzeichen wird nachgereicht) kombiniert werden. Durch Kombination entsteht ein leistungsfähiges Kulturgefäß, das auf einfachste Weise in fast beliebigem Maßstab die komplette Meß- und Regeltechnik und die verfahrenstechnischen Parameter eines Hochleistungsfermenters wiedergibt und simulieren kann.

30

Ausführungsbeispiel.

Materialien:

Kulturgefäß: 1000 ml Erlenmeyerkolben (Enghals) mit Kappsenberg.

5 Mediumszusammensetzung:

- | | |
|-----------------------------------|-----------|
| Hefeextrakt für die Mikrobiologie | 20 g/l |
| Glucose für die Mikrobiologie | 1 g/l |
| Ammoniumsulfat | 1,5 g/l |
| Kochsalz | 0,1 molar |
- 10 Magnesiumchlorid 0,5 g/l
Kaliumphosphatpuffer 0,1 molar, pH 7,2 als Lösungsmittel
Olivenöl, extravirgine 1 ml/l
- 15 Dreiwegeventil DV1: The Lee Company, Typ LHDA12311115H
Taktventil V1, V2: The Lee Company, Typ LFVA 123021 OH
Einlaßventil EV1, EV2: The Lee Company, Typ LFVA 123021 OH
Venturidüse VD1 VD2: Spaying Systems, Typ
Belüfterdüse BD1: Spaying Systems, Typ
- 20 Ausströmerdüse AD1: Spaying Systems, Typ
Luftbehälter B1: Braun Melsungen, Einwegspritze 50 ml mit Luer Lock
Luftfilter F1: Sartorius, Einmalsterilfilter, 0,2 µm
Flüssigkeitsvorlagen: Einmalampullen, 25 ml mit Bördelkap-
- 25 pe und Gummidichtung
Schläuche: Teflonschlauch, 1 mm Innendurchmesser
Kupplungen: LuerLock
Schaumdetektion: isolierte Nadel mit Masseschluß zur Reaktionsflüssigkeit
- 30 Ventilsteuerung: Braun Melsungen DCU 3 System

Die Medienbestandteile sind beim einschlägigen Fachhandel in gleicher Qualität erhältlich. Die Bestandteile Glucose

und Magnesiumchlorid wurden als geeignete Aliquots separat sterilisiert und anschließend unter sterilen Bedingungen zugegeben. Das Kulturgefäß wurde mit 500 ml Medium befüllt und im Autoklaven sterilisiert. Die Zuleitungen zum Head-
5 space und zur Reaktionsflüssigkeit mit den Düsen wurden durch eine Bohrung im Deckel geführt, verschlossen und ebenfalls mit dem Gefäß mitsterilisiert. Die Trennung zur erfindungsgemäßen Vorrichtung erfolgte am Ausgang der Ein-
laßventile. Als Flüssigkeitsvorlagen dienten jeweils 24 ml
10 Glucoselösung (100 g/l) und 24 ml Antischaummittel (Dow Silikonöl, 10 % Suspension), die jeweils separat sterilisiert wurden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung wurde, soweit die einzelnen Bauteile keine andere Befestigung vor-
sahen, gemäß Zeichnung 1 mit Luer Lock Verbindungen und
15 Teflonschläuchen verbunden und auf einer Arbeitsplatte befestigt. Der Leitungsteil zwischen Luftfilterausgang und Ausgang der Einlaßventile sowie die zu- und Abführungen der Flüssigkeitsvorlage wurden mit 10 m Natronlauge de-
kontaminiert (2h), und anschließend mit sterilem 0,1 m
20 Phosphatpuffer pH Wert = 7,2, gespült. Nach der Sterilisation und dem Abkühlen des Kulturgefäßes erfolgte die Beimpfung mit einer Reinkultur des Mikroorganismus mit je einem Milliliter unter sterile Bedingungen. Die Reinkultur wurde aus einem Röhrchen mit E. coli, K12, erhältlich bei
25 der deutschen Stammsammlung (DSM Hannover) und Kultivierung des Inhalts dieses Röhrchens in 10 ml Standard 1 Medium (Merck Darmstadt) bei 37 °C über 12 Stunden unter sterilen Bedingungen hergestellt. Die optische Dichte der Reinkultur betrug zum Zeitpunkt der Überimpfung 0,9 OD
30 (546 nm). Die Vorrichtung wurde mit den Einlaßventilen mit dem Kulturgefäß und mit dem Modul Gasversorgung gekoppelt. An die Flüssigkeitsvorlage 1 wurde die Glucoselösung, an die zweite das Antischaummittel angeschlossen. Die

Flüssigkeitsvorlagen wurden stehend benutzt. Als Anschluß für die Drucküberlagerung wurde eine kurze, für die Flüssigkeitsentnahme eine lange Einmalinjektionsnadel benutzt, die steril durch die Gummidichtung geführt wurde. Am
5 Drucklufteinlaß wurde Pressluft mit einem Überdruck von 0,5 bar angeschlossen. Das Volumen des Gasbehälters wurde auf 25 ml eingestellt. Die gesamte Vorrichtung und das Kulturgefäß wurden in einem Inkubator auf 37 °C temperiert. Das Kulturgefäß wurde nicht geschüttelt, da alleine
10 der Gasstrom für ausreichende Gasversorgung der Kultur sorgte. Die Ventile der erfindungsgemäßen Vorrichtung wurden mit der Steuereinheit DCU3 verbunden und wie in Tabelle 3 gezeigt, geregelt:

15 Tabelle 3

Gasversorgung:

Taktrate 15 Füllungen und Gasströme pro Minute, entspricht einem VF von 45 oder 22,5 l Luft /h, Einlaßventil EV1 geschlossen, EV 2 offen, d.h. Gasstrom in die
20 Reaktionsflüssigkeit

Flüssigvorlage 1, Substrat:

Taktventil V1, geöffnet viermal pro Minute für 0,2 Sekunden, zeitgleich mit der Schaltung eines Gasstroms zum Kulturgefäß, DV1 zum Kulturgefäß hin offen, EV2 offen, entspricht einer Glucosedosage von 1 mi pro Stunde

Flüssigvorlage 2, Antischaummittel:

30 Taktventil V2 normalerweise geschlossen. Wenn die Aufnahmemadel ein Schaumsignal anzeigt, läuft folgender Algorithmus ab: Einlaßventil EV2 wird geschlossen, Einlaßventil EV1 geöffnet, d.h. Headspacebegasung Start eines

Timers. Ist das Schaumsignal der Aufnehmernadel nach 8 Sekunden negativ, wird das Ventil EV1 geschlossen und das Ventil EV2 geöffnet, Rückkehr zum Normalbetrieb. Liegt das Schaumsignal weiterhin an, wird zeitgleich mit jedem Takt
5 der Gasversorgung das Taktventil V2 für 1 Sekunde geöffnet und so Antischaummittel (18,7 ml/h) in den Luftstrom der Gasversorgung gemischt. Liegt das Schaumsignal nach weiteren 16 Sekunden immer noch an, wird das Ventil EV2 zusätzlich geöffnet, um die Kultur wieder mit Gas zu versorgen.
10 Dieser Zustand wird beibehalten, bis das Signal der Aufnehmernadel negativ ist. Danach Rückkehr in den Normalbetrieb.

Nach 24 Stunden wurde die Kultivierung der Mikroorganismen
15 gestoppt und die optische Dichte (OD) bei 546 nm in einem Photometer bestimmt. Die OD von ca. 90 entspricht dem zu erwartenden Wert in einem Hochleistungsfermenter und überzeugte von der Leistungsfähigkeit der Vorrichtung. Die Substratvordage war zu diesem Zeitpunkt gänzlich aufgebraucht.
20 An Antischaummittel wurde ein Verbrauch von etwa etwa 2 ml gemessen, deutlich weniger als die Menge, die ein herkömmlicher Fermenter für diesen Ansatz gebraucht hätte (etwa 12 ml, abhängig von Regelalgorithmus).

25 Bei der Durchführung dieses Ausführungsbeispiels waren besonders deutlich zu erkennen:

- Die kompakte, einfache Ausführungsweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung
- Die Effektivität des "gepulsten" Begasungssystems in Kombination mit der Belüfterdüse
30
- Die entstehenden, extrem feinen Gasblasen
- Die kurzen Mischzeiten des Systems

- Die Leistungsfähigkeit der Schaumbekämpfung durch den erfindungsgemäßen Aufbau
- Die exakte gleichmäßige Dosierung der Flüssigkeiten.

5 Es soll nochmals darauf hingewiesen werden, das diese Ergebnisse, die denen eines Hochleistungsfermenters entsprechen, ohne Schütteln oder Rühren des Kulturgefäßes erreicht wurden. In Kombination mit Einsätzen, durch Schüttler oder Rührer, läßt sich die Leistungsfähigkeit weiter
10 steigern.

15

20

25

30

Patentansprüche:

1. Verfahren zur dosierten Zugabe von einem oder mehreren Fluiden oder Fluidgemischen in ein oder mehrere Kulturgefäße, gekennzeichnet durch die Verwendung von
5 mindestens einem Carrierfluid, das quantitativ, diskontinuierlich aus einem unter Druck stehenden Vorratsgefäß mit definiertem Innenvolumen über ein Taktventil entnommen wird.
10
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Verwendung eines Carriergases oder einer Carriergasmischung.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, gekennzeichnet durch die Verwendung einer Carrierflüssigkeit oder einer Carrierflüssigkeitsmischung.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, gekennzeichnet
20 dadurch, dass das/die zu dosierende(n) Fluid(e) dem/den Carrierfluid(en) über eine oder mehrere Venturidüsen dosiert zugemischt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, gekennzeichnet
25 dadurch, dass die Zuleitung ins Reaktionsmedium im Kulturgefäß zur besseren Durchmischung über eine Venturidüse erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, gekennzeichnet
30 dadurch, dass ein Filter o.ä. am Seiteneinlass der Venturidüse im Reaktionsmedium den Eintritt von Mikroorganismen in die Düse verhindert.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, gekennzeichnet durch eine Zuführung in den Headspace des Kulturgefäßes.
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, gekennzeichnet durch eine Vernebelungseinrichtung wie z.B. eine Ausströmdüse am Eintritt in den Headspace.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, gekennzeichnet
10 durch eine Umschaltung der Zuführung ins Kulturgefäß von der Zuführung ins Reaktionsmedium zur Zuführung in den Headspace und zurück.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, gekennzeichnet
15 dadurch, dass das Carriergas oder die Carriergasmischung aus einem Gasbehälter unter Überdruck entnommen wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, gekennzeichnet
20 net dadurch, dass der Druck im Gasbehälter während des Prozesses nach einem oder mehreren Entnahmen einmal oder mehrfach über eine Zuleitung wieder erhöht wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11 zur Dosierung
25 von mehreren Fluiden, gekennzeichnet dadurch, dass diese dem Carrierfluid über verschiedene Venturidüsen in Serien- oder Parallelschaltung, bevorzugt in Parallelschaltung, zugleich oder in beliebiger Reihenfolge zugemischt werden.
- 30
13. Vorrichtung zur Dosierung von Gasen oder Flüssigkeiten oder Gemischen daraus zum Einsatz an Kulturgefäßen für biologische und (bio)chemische Reaktionen, dadurch

gekennzeichnet, daß die Vorrichtung aus mindestens einem Modul Gasversorgung gemäß Zeichnung 1 oder einem Modul Antriebspumpe gemäß Zeichnung 2 zur Erzeugung eines Carrierfluids, einer Venturidüse mit Taktventil und Flüssigkeitsvorlage mit einer Druckausgleichskapillare, oder einer Dosiervorlage für Gase, und einer Zuleitung, die in der Reaktionsflüssigkeit oder im Headspace des Kulturgefäßes mündet, besteht. Das Modul Gasversorgung oder das Modul Antriebspumpe erzeugt einen Strom von Carrierfluid, kontinuierlich oder diskontinuierlich, über die Zuleitung zum Kulturgefäß hin.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, das das Volumen des Gasbehälters B1 zwischen 1% und 40% des Volumens des Kulturgefäßes beträgt.

15. Vorrichtung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, das das Volumen des Gasbehälters durch einen Stempel im Bereich von 0% bis 100% des Gesamtvolumens variiert werden kann.

16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Taktrate des/der Ventils(e) auf den "gas hold up" der Gasblasen im Kulturgefäß abgestimmt werden kann, bevorzugt mit diesem identisch ist und die Menge des durchgesetzten Gases durch Verstellen des Stempels gemäß Anspruch 3 erfolgt.

30

17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens 1 Modul Flüssigkeitsvorlage oder Gasvorlage gemäß Zeichnung 1

zwischen Dreiwegeventil und Kulturgefäß geschaltet wird.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 17, da-
5 durch gekennzeichnet, daß das Modul Flüssigkeitsvorla-
ge aus mindestens einer Venturidüse und einem Flüssig-
keitsbehälter besteht und der Druckausgleich entweder
über die Druckausgleichskapillare zum Gasbehälter oder
durch eine Verbindung mit der Außenatmosphäre erfolgen
10 kann.
19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, da-
durch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeitsvorlagen
beliebig, hängend, stehend, liegend zur Vorrichtung
15 angebracht sind und immer einen Luftraum von minde-
stens 2% des Gesamtvolumens aufweisen, in den der
Druckausgleichs erfolgen kann.
20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 19, da-
20 durch gekennzeichnet, daß die Gasdosiervorlage minde-
stens aus einem Gaseinlaß, einem Dreiwegeventil oder 2
Ventilen, einem Gasbehälter mit variablen Innenvolumen
(analog Anspruch 15) besteht und eine Ventilöffnung
mit einem Seiteneinlaß einer Venturidüse verbunden
25 ist.
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 20, da-
durch gekennzeichnet, daß die Abmessungen der Kompo-
nenten der Vorrichtung und somit die erfindungsgemäßen
30 Eigenschaften an Kulturgefäße von 1 Milliliter bis 50
Liter Volumen angepasst werden kann.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß mit der Vorrichtung, insbesondere auch gemäß Anspruch 8, bessere Durchmischungen und Austauschraten mit der Reaktionsflüssigkeit erzielt werden, so daß auf ein Schütteln oder Rühren des Kulturgefäßes, abhängig von der Art der Kultivierung, verzichtet werden kann.
23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Art der diskontinuierlichen Begasung und des Gaseintrags die Neigung zur Schaumbildung der Reaktionsflüssigkeit reduziert wird.
24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß durch die Kombination Gas/Flüssigkeitsdosierung, ob in die Reaktionsflüssigkeit oder in den Headspace des Kulturgefäßes, eine kürzere Mischzeit mit der Reaktionsflüssigkeit erreicht wird und somit Konzentrationsgradienten (z.B. Substrat) minimiert werden.
25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß insbesondere durch die Dosierung in den Headspace des Kulturgefäßes eine effektivere Ausnutzung der Eigenschaften der dosierten Flüssigkeiten erfolgt.
26. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß mit dem Einsatz der Vorrichtung der Verbrauch von Antischaummitteln minimiert werden kann. Hierfür wird kurzzeitig der Gasfluß in die Reaktionsflüssigkeit abgeschaltet und auf die

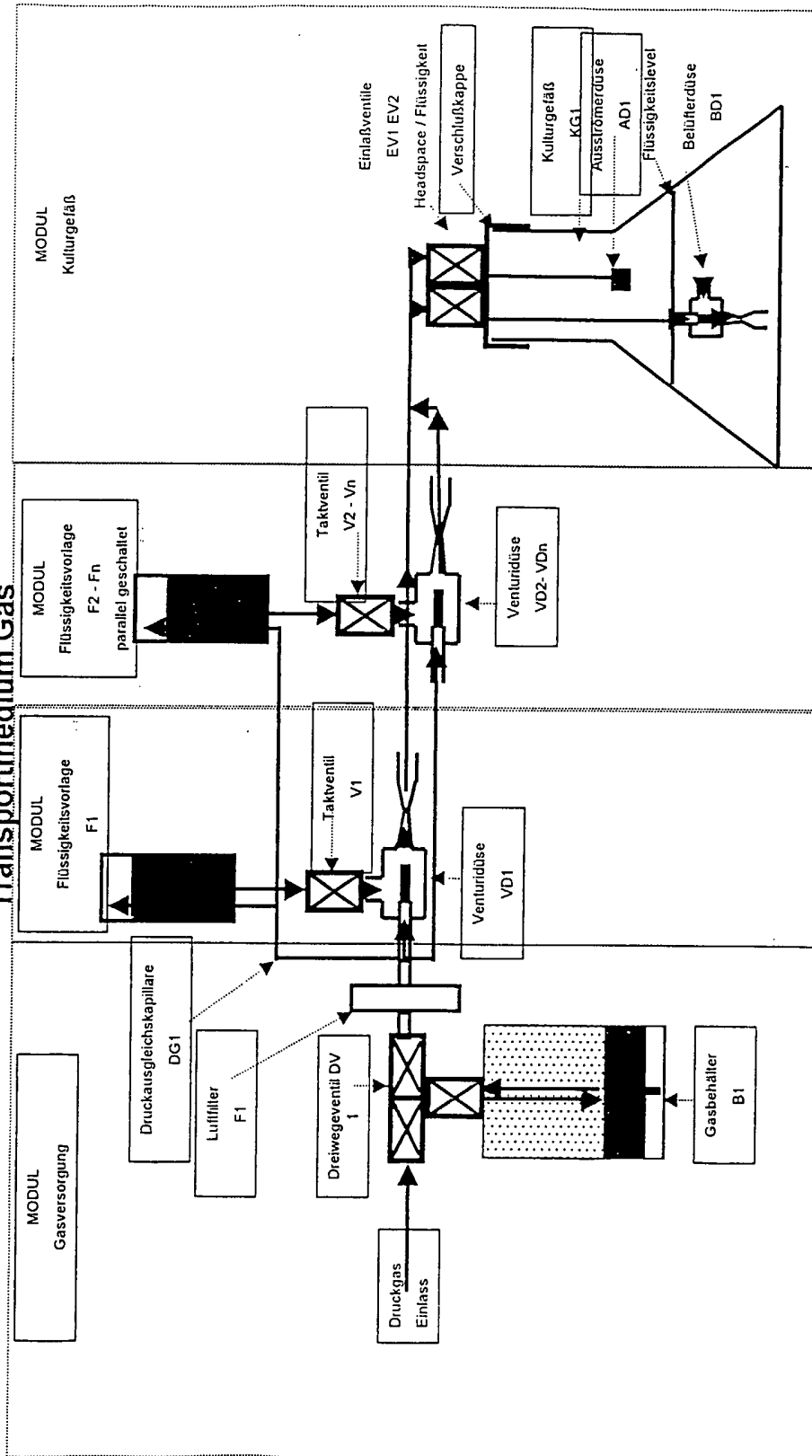
- Ausströmerdüse der Head Space Dosierung geschaltet. Die ausströmende Luft "bläst" den Schaum auf die Flüssigkeitsoberfläche zurück. In den meisten Fällen genügt dieser Effekt, um die Schaumbildung zu reduzieren. Im negativen Fall erfolgt eine Dosierung gemäß Anspruch 25, die in Kombination mit diesem Verfahren den Verbrauch von Antischaummitteln auf 10 % gegenüber dem Stand der Technik senken kann.
- 5
- 10 27. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß so die dosierten Flüssigkeiten oder eine Kombination mehrerer einen Effekt auf die Reaktionsflüssigkeit haben können, z.B. durch zeitabhängige Zugabe von Phagen zu Bakterienkulturen
- 15 oder Wachstumsfaktoren zu Zellkulturen oder pH Regelung mittels CO₂.
28. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 27 dadurch gekennzeichnet, daß die in dieser Weise dosierten Gase
- 20 zur Schaffung einer künstlichen Atmosphäre in head space des Kulturgefäßes, z.B. anaerobe Atmosphäre oder mit CO₂ angereichert, mit definierter Zusammensetzung benutzt werden.
- 25 29. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 13 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung nur mit einer Stromversorgung und Transportmedierversorgung verbunden ist und alle meß- und regeltechnischen Parameter mit der Kontroll EDV über Infrarotschnittsteile
- 30 ausgetauscht werden.
30. Bioreaktor zur Kultivierung von Zellen, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 29, mit einem

Kulturgefäß, mit einer oder mehreren Gasversorgungen und/oder einer oder mehreren Flüssigkeitsvorlagen sowie Zuführungseinrichtungen für Gase und/oder Flüssigkeiten, mittels welcher Gase und/oder Flüssigkeiten dem Kulturgefäß zuführbar sind, wobei zwischen der Zuführungseinrichtung und der Gasversorgung bzw. Flüssigkeitsvorlage eine Mischvorrichtung, insbesondere eine Venturidüse, zur Mischung von Gas und/oder Flüssigkeit aus der Gasversorgung bzw. Flüssigkeitsvorlage geschaltet ist.

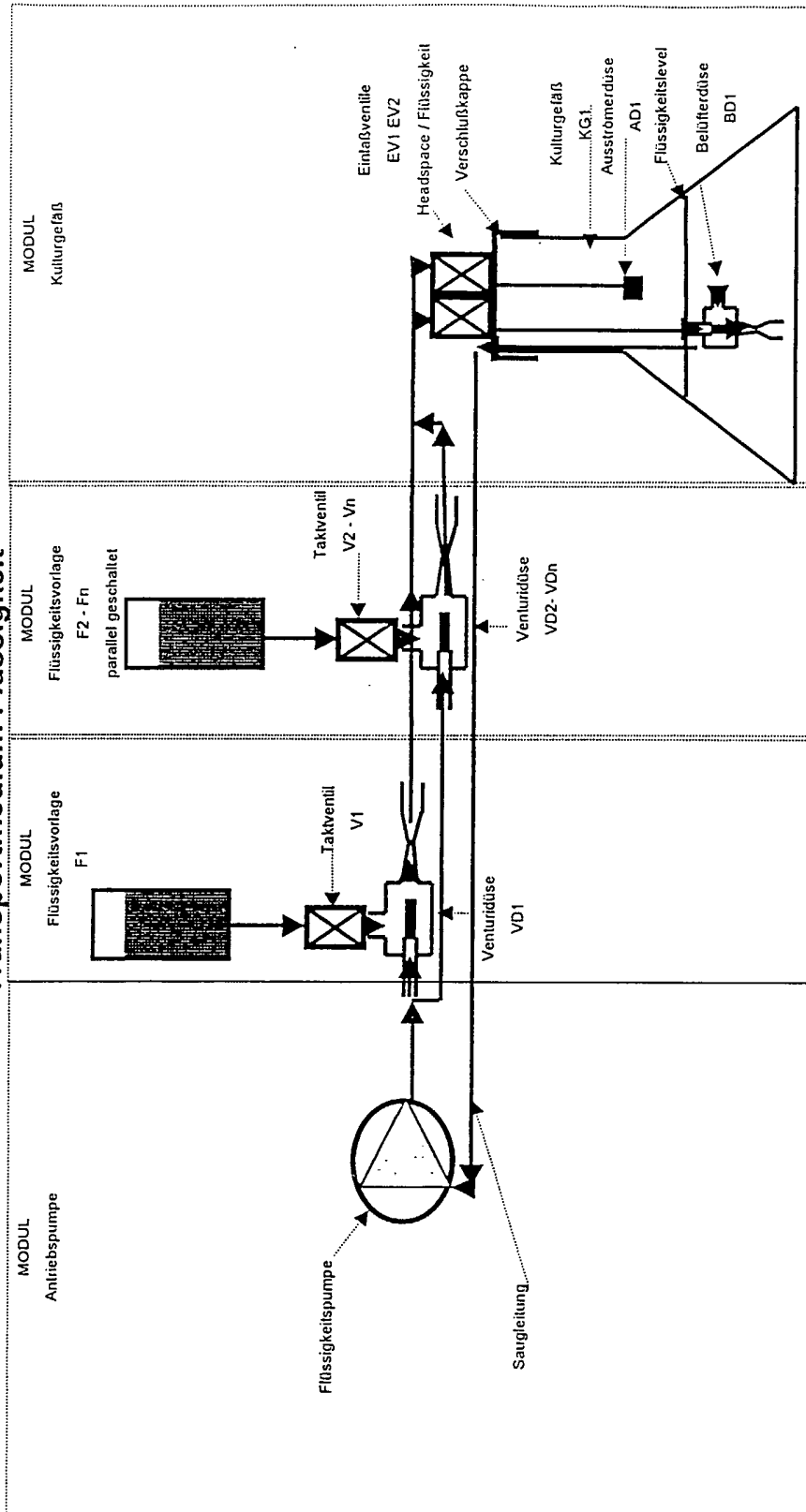
31. Bioreaktor nach Anspruch 30, wobei Gas und Flüssigkeit zu einem Aerosol gemischt werden.
32. Bioreaktor nach Anspruch 30 oder 31, wobei zwischen der Mischvorrichtung und der Gasversorgung bzw. der Flüssigkeitsvorlage ansteuerbare Ventile, insbesondere Taktventile geschaltet sind.
33. Verfahren zum Betrieb eines Bioreaktors nach einem der Ansprüche 30 bis 33, wobei ein Gas oder eine Flüssigkeit als Carrierfluid eingesetzt wird, wobei dem Carrierfluid in der Mischvorrichtung ein Gas oder eine Flüssigkeit zugemischt wird, und wobei die Mengenverhältnisse der miteinander gemischten Fluide definiert sind und gesteuert oder geregelt werden.
34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die gemischten Fluide in definiertem Mengenstrom dem Kulturgefäß zugeführt werden.

Zeichnung 1

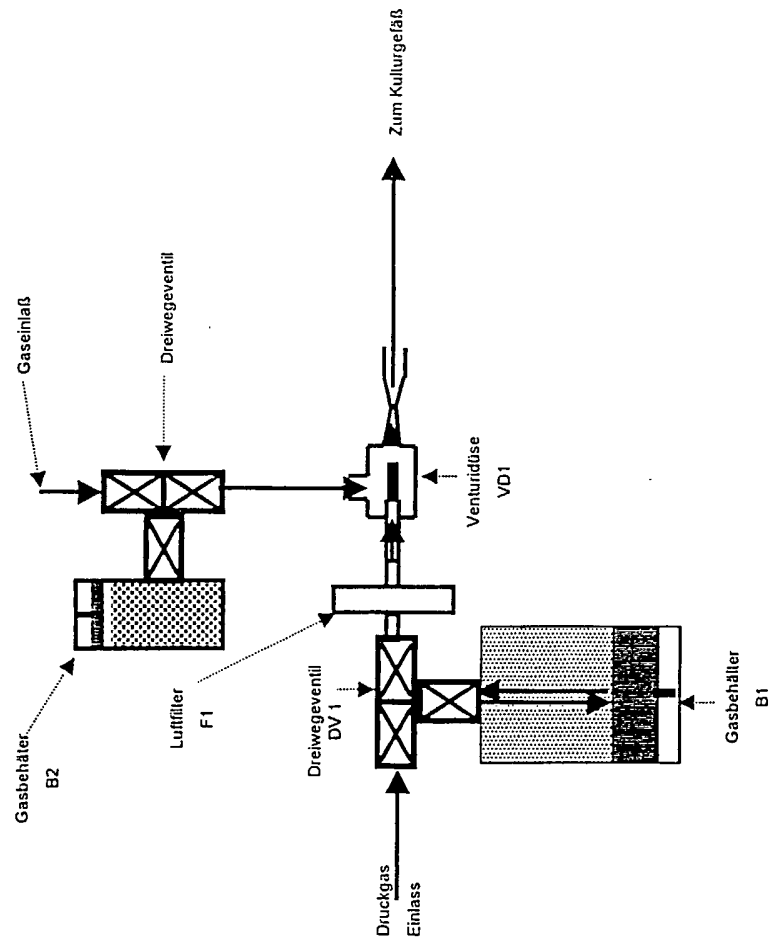
Transportmedium Gas



Zeichnung 2
Transportmedium Flüssigkeit



Zeichnung 3
Dosiervorlage für Gase, Transportmedium Gas



Zeichnung 4
Dosiervorlage für Gase, Transportmedium Flüssigkeit

