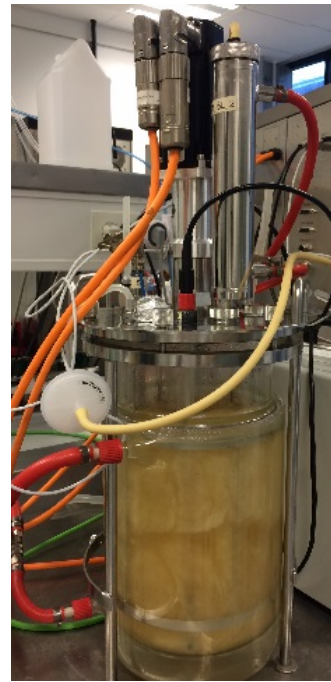


## Diplomingeniørprojekt

# Sammenligning af procesparametre mellem engangs-fermenter og konventionelle glas- og stål fermenter



**Hajar H. Al-Khafaji s103762**

**Diplomingeniør- Kemi og Bioteknologi**

**Danmarks Tekniske Universitet Lyngby**

**Institut for systembiologi DTU**

**DTU-vejleder: Mhairi Workman**

**Virksomhed: CerCell**

**Virksomheds-vejledere: Per Stobbe og Rasmus Kirstrand**

**Periode 01/09-2014-13/02-2015**

## Diplomingeniørprojekt

**Dansk titel:** *Sammenligning af procesparametre mellem engangsfermenter og konventionelle glas- og stål fermenter*

**English title:** *Comparison of process parameters in single use and conventional glass and steel fermentors*

**Forfatter:** *Hajar H. Al-Khafaji*

**Studie nummer:** *s103762*

**ECTS Point:** *20*

**Periode:** *01/09-2014 - 13/02-2015*

**Universitet:** *Danmarks Tekniske Universitet (DTU)*

**Institut:** *Institut for Systembiologi (DTU)*

**Virksomhed:** *Cercell*

**Vejledere:** *Mhairi Workman (DTU), Per Stobbe og Rasmus Kirstrand (Cercell)*

**Underskrift:** \_\_\_\_\_ **Dato:** \_\_\_\_\_

## Forord

Det er et samarbejdes diplomingeniørprojekt, mellem instituttet for System Biologi DTU og virksomheden Cercell. Formålet med dette speciale er sammenligning af procesparametre mellem engangs-fermenter og konventionelle glas- og stål fermenter. Perioden for projektforløbet var fra september 2014 til februar 2015. Forsøgene blev udført på instituttet for systembiologi, DTU. Udstyret, værktøjer og apparater blev delvist leveret af DTU og af virksomheden Cercell. *E.coli* stammen blev leveret af Statens Serum Institut, SSI.

Jeg vil gerne takke mine vejledere Mhairi Workman, Per Stobbe og Rasmus Kirstrand for alt deres hjælp, støtte, råd og vejledning gennem projektets forløb. En særlig tak til Per Stobbe for hans støtte og hjælp i laboratoriet og igennem projekt forløbet. Det har været fantastisk at samarbejde med ham.

Desuden vil jeg takke Kevin Klejn fra Cercell for hans hjælp med udbringning af bioreaktor. Tak til Bent Svanholm for hans hjælp med sensorerne. Jeg takker Statens Serum Institut for deres samarbejde og udlevering af en *E.coli* stamme. Sidst men ikke mindst vil jeg takke min søde familie, for deres støtte og motivation til mig igennem projekt forløbet, og jeg vil takke dem for deres pasning af min lille datter.

## Abstract

The decision to use single-use systems for manufacturing pharmaceuticals depend on many factors, but the major driving force is a desire to save cost and time. Single-use-fermentor can offer many advantages relative to conventional glass/steel fermentor and has gained wide acceptance in the bio-pharmaceutical industry. The advantages of single-use-fermentor are among others elimination of cross contamination, reductions in water consumption, and eliminating clean in place (CIP) and steam in place (SIP).

The project concerns the comparison of process parameters between conventional glass/steel- and single use-fermentor. The process parameters are compared by examining the growth data for a wild-type *E. coli* bacterium. The transfer coefficient  $K_La$  value for two different sizes bioreactor with different turbines and different agitation speed. To investigate the growth data for the wild-type *E. coli* optical density, dry weight and specific growth rate are determined. For  $K_La$  determination, two optical sensors Presens and Hamilton Visiferm are used.  $K_La$  values are compared relative to the different sizes of bioreactors, turbines, and the stirring speed sensors. Finally, the  $K_La$  values of conventional glass/steel fermentors are compared with  $K_La$  values for single-use-fermentors.

A  $K_La$  value is very crucial for the maximum productivity in microbial fermentation and it can only be achieved by appropriate combination of aeration and agitation. An optimal  $K_La$  value will be used as an informative tool to overcome the problem of the difference in geometry and turbines among a variety of bioreactors during upscale from laboratory- to pilot scale fermentors. The optimal  $K_La$  value used to prove how much oxygen transfer rate a given bioreactor can provide.

The project objective was conducted with satisfactory results. The wild type *E.coli* showed results that coincide well for conventional glass/steel- and single-use-fermentor. The same applies to  $K_La$  values. The deviation of the  $K_La$  values are very small for the conventional glass/steel fermentor compared to single-use-fermentor. This suggests that single-use-fermentor can deliver the same results as conventional glass/steel fermentor.

The two used optical sensors Presens and Hamilton Visiferm can measure almost the same DO concentration in all bioreactor types. The used turbines, Rushton, Smith and Bakker showed some different results. Bakker turbines had the highest  $K_La$  value, than Smith turbines and Rushton turbines. The agitation speed had a great influence on the  $K_La$  value. The  $K_La$  value increases with increasing agitation speed, but at very high agitation speed (2000 rpm) the  $K_La$  value can be affected. As well, the bioreactor size have an effect on the  $K_La$  value. The  $K_La$  value increases with increasing bioreactor size. This applies are both for conventional glass/steel- and single-use-fermentor.

## Resume

Beslutningen om anvendelse af engangs-fermenter afhænger af mange faktorer, men den største drivkraft er ønsket om besparelse af omkostninger og tid. Engangs-fermenter kan tilbyde mange fordele i forhold til konventionelle glas/stål fermenter og har opnået bred accept i den bio-farmaceutiske industri. Fordelene ved engangs-fermenter er såsom eliminering af krydskontaminering, reducere vandforbruget og fjerne clean-in-place (CIP) og steam in place (SIP).

Projektet omhandler en sammenligning af procesparametre mellem konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter. Procesparametrene sammenlignes ved at undersøge vækstdata for en vildtype *E.coli* bakterie. Desuden bestemmes oxygen masseoverføringskoefficienten  $K_La$  for to forskellige fermenter størrelser med forskellige turbiner og forskellige omrøringshastigheder. For at undersøge vækstdata for vildtypen *E.coli* bestemmes optisk densitet, tørvægt og den specifikke væksthastighed. Til  $K_La$  bestemmelse anvendes to optiske sensorer, Presens og Hamilton Visiform.  $K_La$  værdier sammenlignes i forhold til de forskellige fermenter størrelser, turbiner, omrøringshastigheder og sensorer. Sidst men ikke mindst sammenlignes  $K_La$  værdier for konventionelle glas/stål fermenter med  $K_La$  værdier for engangs-fermenter.

En  $K_La$  værdi er meget afgørende for den maksimale produktivitet i mikrobiel fermentering og det kunne kun opnås ved en passende kombination af beluftning og omrøring. Den optimale  $K_La$  værdi vil blive anvendt som en informativ værktøj til at overvinde problemet med forskellen i geometri og turbiner blandt en række forskellige bioreaktorer under opskalering fra laboratorieskala- til pilotskala fermenter. Samt anvendes den optimale  $K_La$  værdi til at bevise, hvor meget oxygen overførselshastighed et givet fermenter kan levere.

Projektets formål blev gennemført med nogle tilfredsstillende resultater. Vildtypen *E.coli* viste resultater som stemmer fint overens med konventionelle glas/stål - og engangs-fermenter. Det samme gælder for  $K_La$  værdier. Afgivelsen af  $K_La$  værdierne er meget lille for konventionelle glas/stål fermenter i forhold til engangs-fermenter. Dette tyder på at engangs-fermenter kan levere de samme resultater som konventionelle glas/stål fermenter, under disse betingelser som vi udsætter dem for.

Desuden ses at de to anvendte optiske sensorer, Presens og Hamilton Visiform kan måle næsten de samme DO koncentrationer i alle fermenter typer. De anvendte turbiner, Rushton, Smith og Bakker viste nogle forskellige resultater. Bakker turbinen havde den højeste  $K_La$  værdi, dernæst Smith turbinen og til sidst Rushton turbinen. Omrøringshastigheden viste en stor indflydelse på  $K_La$  værdien.  $K_La$  værdien stiger med stigende omrøringshastighed, dog ved meget høje omrøringshastigheder (2000 rpm) kan  $K_La$  værdien blive påvirket. Samt har fermenter størrelsen en stor rolle for  $K_La$  værdien,  $K_La$  værdien stiger med stigende fermenter størrelse. Alt dette gælder for både konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter.

## Indholdsfortegnelse

|   |    |
|---|----|
| Forord .....  | 3  |
| Abstract .....  | 4  |
| Resume .....  | 5  |
| Indledning.....   | 8  |
| Introduktion.....   | 9  |
| Fermenterings historie .....  | 9  |
| Fermenterings-proces .....  | 9  |
| Den specifikke væksthastighed $\mu$ .....   | 12 |
| Fermenters opbygning .....  | 12 |
| Fordel og økonomiske analyse af konventionel glas/ stål - og engangs-fermenter..... | 14 |
| Opskalering.....  | 17 |
| Biologiske processer .....  | 18 |
| Omrøring .....  | 18 |
| Effekt tallet og Reynolds tal.....  | 21 |
| Effektforbruget .....   | 22 |
| Viskositet og Reologi .....   | 22 |
| Baffles .....   | 23 |
| KLa .....   | 24 |
| Oxygen overførsel fra gas boble til celle .....                                     | 25 |
| Proces teori.....   | 26 |
| Faktorer, som påvirker KLa værdien: .....   | 27 |
| Effekten af luftmængde på KLa værdien .....   | 28 |
| Mekanisk omrørte reaktorer:.....  | 28 |
| Ikke mekanisk omrørte reaktorer:.....   | 29 |
| Sparger.....  | 29 |
| Effekten af omrøring på KLa værdien.....  | 29 |
| Effekten af temperaturen på KLa værdien .....                                       | 30 |
| Fordelen ved anvendelse af KLa værdien.....   | 30 |
| Sensorer.....   | 30 |
| Presens DO sensor .....   | 30 |
| Hamilton Visiferm DO sensor .....   | 31 |

|   |    |
|---|----|
| Biomasse sensor .....                                 | 31 |
| Materialer og Metoder .....                           | 32 |
| Vækst bestemmelse .....                               | 32 |
| Fermentering .....                                    | 32 |
| Forkultur .....                                       | 32 |
| Inokulering af fermenter .....                        | 32 |
| Prøve udtagning.....                                  | 32 |
| OD .....  | 32 |
| DW .....  | 33 |
| KLa bestemmelse.....                                  | 33 |
| Resultater .....                                      | 34 |
| Fermentering .....                                    | 34 |
| KLa værdier .....                                     | 41 |
| Konventionelle glas/stål fermenter .....              | 41 |
| Engangs-fermenter .....                               | 42 |
| Diskussion .....                                      | 49 |
| Fremtiden .....                                       | 53 |
| Konklusion .....                                      | 54 |
| Referencer .....                                      | 56 |
| Appendiks .....                                       | 62 |
| A. Fremgangsmåde til vask af engangs-bioreaktor ..... | 62 |
| B. LB- medie-sammensætning .....                      | 63 |
| C. NaCl-opløsning .....                               | 63 |
| D. Beregning af $\mu_{max}$ .....                     | 63 |
| E. Beregning af KLa værdi .....                       | 64 |

## Indledning

Succesen med konventionelt glas/stål bioreaktor og fermenter har i løbet af de sidste 60 år bekræftet gyldigheden af teori og tekniske principper for skalerbar designs. Den konventionelle glas/stål fermenter kan skaleres fra en liter op til 250.000 liter og bioreaktor op til 25.000 liter. Industriens krav til øget effektivitet og reduceret anlægs investeringer har dannet grundlag for design af nye skalerbare engangs- bioreaktor. Største engangsbrug bioreaktor er på 2000 L (arbejdsvolumen) og kan tilbydes fra de 5 store men sælges kun i 500 stk. om året. Der er ingen udsigt at dette volumen øges. Ganske interessant findes der ingen engangs-fermenter på markedet. Alene Cercell tilbyder et engangs-fermenter produkt i volumen fra 100 mL til 50 liter (arbejdsvolumen). Dette studie beskæftige sig med fermentering.

Engangs-fermenter skal kunne leverer rigeligt med oxygen til systemet, fjerne varme fra kulturen meget hurtigt og kontrollerer opløst oxygen, temperaturen, pH osv. Disse udfordringer har konventionelt glas/stål fermenter løst problematikken i små og store skala via en række funktioner og metoder, som er blevet perfektioneret i løbet af de sidste 80 år [1].

Oxygen overførselshastigheden fra en gas-fase til et medie i aerob fermentering er en vigtig parameter i udformningen af en bioreaktor og især en fermenter. Aerobe organismer har brug for ilt for vækst, produktdannelse, og celle vedligeholdelse. Den volumetriske masseoverførselskoefficient,  $K_La$  angiver hastigheden af oxygen, der anvendes til fermentering, under hensyntagen til alle oxygen forbrugende variabler i en fermenter. Bestemmelsen af  $K_La$  værdi for en fermentering er vigtigt for at opretholde tilstrækkelig overførsel af oxygen i en fermenter [2]. Overførsel af oxygen fra en gas-fase til en væske-fase kompliceres af tilstedeværelsen af celler, produktformationen og anti-skummidler. Disse kan ændre boble størrelsen og grænsefladen, som påvirker opløseligheden af oxygen [3].

I dette studie, undersøges de relative effekter af omrøringshastighed, beluftningshastighed og forskellige turbine typer på  $K_La$  værdien af engangs-fermenter og konventionelle glas/stål fermenter.

Der er mange metoder til at bestemme  $K_La$  værdien. Alle metoder anvendes til at evaluere  $K_La$  værdien i ideelle blandinger af to faser i en fermenter og en ubetydelig modstand af gasfasen til oxygen overførsel på tværs af grænsefladen [2]. Til denne undersøgelse anvendes den dynamiske gasning ud metode. Denne metode kan direkte bestemme den volumetriske masseoverførselskoefficient i en fermenter, og estimerer den volumetriske mikrobielle oxygen optagelse og den gennemsnitlige iltmætning koncentration ved gas-væske-grænseflade [4].

Desuden bliver vækstdata (optisk densitet OD og tørvægt DW) for en vildtype *E.coli* dyrket i LB medie undersøgt ved anvendelse konventionelle glas/stålfermenter og engangs-fermenter af med samme omrøringshastighed og forskellige fermenter størrelser og forskellige turbiner.



## Introduktion

### Fermenterings historie

Fermentering er en vigtig del af den industrielle mikrobiologi. Kontrolleret fermenteringsteknologi fik sin oprindelse første gang ved fremstilling af vin, og blev perfektioneret i 1940'erne med produktion af antibiotika [5]. Efterhånden begyndte man at fremstille enzymer ved fermentering. Det startede på Grindstedværket og mange andre steder ud i verden, hvor man fremstillede svampeenzymer, og på Kongens Bryghus, hvor en bakteriel amylase blev produceret. I begge tilfælde benyttedes overfladedyrkning, hvor mikroorganismene sidder på en fast, befugtet fase, og i begge tilfælde var der betydelige produktionsvanskeligheder, fordi dyrkning på fast fase er vanskelig at kontrollere. I dag bliver enzymer (proteiner) fremstillet ved "submers" fermentering med en veldefinerede kulstof - og kvælstofkilder. Submers fermentering er en proces, hvor kulturen holdes opslemmet og ofte beluftet i en velomrørt tank. Omkring 1950 blev en storskala dansk gæringsindustri til fremstilling af industrielle enzymer etableret, og Novo virksomheden var alt væsentligt den dominerende aktør [6].

I 1995 skrev J. W. Frost og K. M. Draths [5], at "kemien er på vej ind i en ny æra", hvor vedvarende ressourcer og mikrobielle bio-katalysatorer vil være fremtrædende. Plantestivelse, som cellulose affald fra landbruget, og valle fra oste fremstilling er rigelige og vedvarende fermenterbare kulhydrater.

I dag er fermenteringsteknologien den primære metode til produktionen i den bioteknologiske industri. Fordelen ved fermenterings teknologien er, at de ikke bruger giftige reagenser eller kræver tilsætning af mellemliggende reagenser. Mikrobiologer søger nu naturligt forekommende mikrober, der producerer ønskede kemikalier. Derudover er de nu i stand til at manipulere mikrober at øge produktionen af disse kemikalier. I de seneste år har mikrobielle fermenteringer blevet revolutioneret ved anvendelse af genetisk manipulerede organismer. Mange fermenteringer bruger bakterier, men et stigende antal involverer dyrkning af mammale celler[5].

### Fermenterings-proces

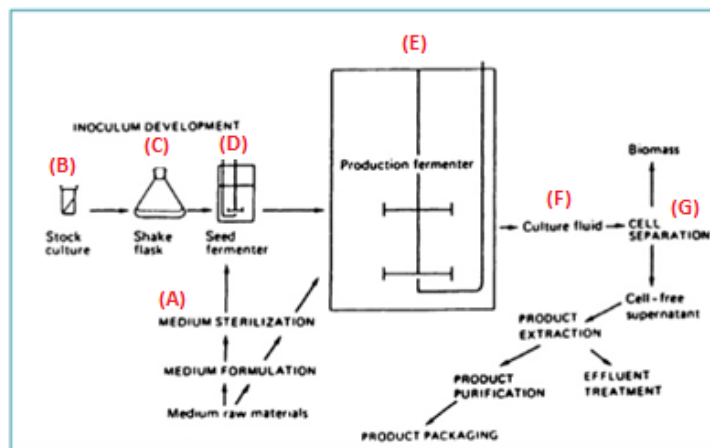
Fermentering er et almindeligt anvendt proces i industrien samt i produktionen af mange fødevarer, drikkevarer og lægemidler. Fermenterings-processen bruger mikroorganismer til at konvertere råvarer til et produkt. Fermenteringsprocesser indbefatter kemiske reaktioner, såsom oxidationer, reduktioner, hydrolyse og bio-syntese og dannelsen af celler. Nogle processer kan kræve tilstedeværelsen af luft (aerob), andre uden luft (anaerob). Hastigheden af fermentering afhænger af mikroorganismers koncentrationen, celler, cellulære komponenter og enzymer samt temperatur og pH [7].

#### Komponenterne i en fermenteringsproces:

Uanset typen af fermentering (måske med undtagelse af nogle omdannelse) kan grundlæggende komponenter for fermenteringsproces opdeles i seks trin:

- 1) Udarbejdelse af medie, der skal anvendes til dyrkning af processens-organisme under udviklingen af podnings kultur og produktions-fermenter.
- 2) Sterilisering af mediet, fermenter og hjælpeudstyr
- 3) Udarbejdelse af en aktiv, renkultur i tilstrækkelig mængde til at pode mediet
- 4) Væksten i organisme i produktions-fermenter under optimale forhold for produkt dannelse
- 5) Ekstraktion af produkt og dets oprensning
- 6) Bortskaffelse af spildevand produceret ved fremgangsmåden

Figur 1 viser en generaliseret, skematisk repræsentation af en fermenteringsproces.



Figur 1 En generaliseret, skematisk repræsentation af en fermenteringsproces [8]

De indbyrdes forhold mellem de 6 komponenter i en fermenteringsproces er illustreret i Figur 1. Hvor et sterilt medie (A) bliver podet med en stok kultur (B) i en ryste kolbe (C) som anvendes til at pøde en lille fermenter (D) og en produktions-fermenter (E) med. Når fermenteringsprocessen er overstået, fjernes dyrknings-væsken (F) fra produktions-fermenteren (E) og føres videre til separations processen (G). Her bliver cellerne separerede og bliver derefter sendt videre til oprensnings-proces [8].

#### Mikrobiel vækst kinetik i en batch-fermentering

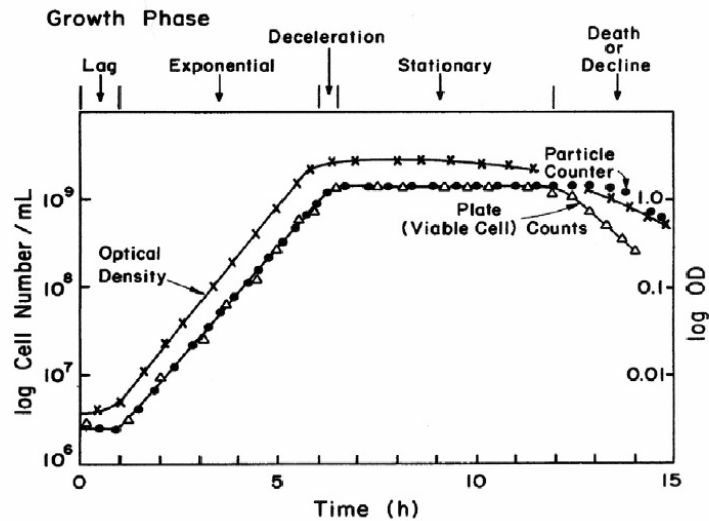
Mikrobiel vækst kinetik, er forholdet mellem den specifikke vækst hastighed ( $\mu$ ) og koncentrationen af substratet [9]. Batch-fermentering er et lukket system, der indeholder en indledende begrænset mængde næringsstof [8].

Batch-fermentering har nogle fordel og ulemper, ligesom alle andre fermenteringstyper. Disse fordel og ulemper ses for neden.

#### Fordel/ ulemper ved batch-fermentering:

- Høje koncentration af f.eks. sukker er nødvendigt i begyndelsen, ellers slutter fermenteringen for hurtigt
- Højt produkt koncentration til slut er muligt
- Inhibering af fermentering (eller uønsket metabolisme) kan sker på grund af højt substrat eller produkt koncentration
- Problemer med forureninger er minimalt (pga. kort fermenterings tid)

En typisk vækstkurve for en bakteriel population, kan ses i Figur 2. Her ses lag, eksponentiel, deceleration vækst, stationær og døde faserne.



Figur 2 Typisk vækstkurve for en bakteriel population [9]

Denne batch cyklus er opdelt i 5 forskellige faser: Lag fase, eksponentiefase, deceleration vækstfase, stationærfase og dødefasen.

#### Lag fase:

Når et friskt medie bliver inokuleret med et mikroorganisme, vil væksten først begynde efter et stykke tid. Denne tidsperiode kaldes lagfasen, og har følgende karakteristika:

- En periode hvor cellerne tilpasser sig i det nye omgivelser
- Nye enzymer syntetiseres.
- En lille stigning i celle masse og volumen, men ingen stigning i celle nummer
- Længden af denne fase varierer med typen af organisme, podnings-volumen og dyrkningsbetingelser, dårlig podnings tilstand (høj% af døde celler) og næringsfattigt medie

#### Eksponentiel fase:

- I denne fase har cellerne justeret sig til det nye omgivelser og formerede sig hurtigt (eksponentielt)
- Balanceret vækst
- Vækst hastigheden er afhængig af næringsstof
- Cellepopulation fordobler med regelmæssige tidsintervaller (fordoblingstid)
- Etableringen af den eksponentiel vækst er afhængig af en række faktorer, en levedygtig podnings kultur, en egnet energikilde, tilstedeværelsen af overskydende næringsstoffer og vækstfaktorer og et passende miljø (temperatur, pH, opløst ilt)

#### Deceleration vækst fase:

- En meget kort fase, hvor væksten accelererer og dette skyldes:
- Vigtigt næringsstof i kultur begynder at løbe ud. Dette næringsstof er ofte benævnt vækstbegrænsende substrat. Medier er ofte udformet på en sådan måde, at dette næringsstof er generelt karbon-kilde (dvs. glukose eller andre kulhydrater)
- Periode af ubalanceret vækst: Celler gennemgå intern omstrukturering for at øge deres chancer for at overleve

### Stationærfase:

Med udtømmning af næringsstoffer ( $S \approx 0$ ) og akkumulering af affald og sekundære stofskifteprodukter:

- Der er ingen vækst i organismen population.
- Vækst hastigheden er i ligevægt med dødeligheden. Dette kan være som et resultat af følgende:
  - Udtømmning af en eller flere essentielle næringsstoffer
  - Akkumulering af giftige vækst er forbundet med biproduktet
- Primære metabolit, eller vækst er forbundet, produktion stopper
- Sekundær metabolit, eller ikke vækst er forbundet, kan produktionen fortsætte såsom antibiotika, pigmenter
- Længden af den stationære fase er ofte afhængig af organismen
- Generelt har bakterier korte stationære faser.

### Dødefase

Den levende organisme population falder med tiden, på grund af en mangel på næringsstoffer og giftige metaboliske biprodukter og Største delen af cellerne vil dø [8],[9],[10].

### Den specifikke væksthastighed $\mu$

Den specifikke væksthastighed  $\mu$  er hastigheden af biomassedannelse i en fermenteringsproces.

Væksthastigheden er afhængige af generations tiden for organismen, da det er den hastighed organismen formerer sig med [11]. Den specifikke væksthastighed er interessant, da det er vigtige i mange sammenhæng at kende til de forhold, hvor organismen formerer sig hurtigst. Ved en eksponentielt vækst forstås at biomassen øges eksponentielt. Den maksimale væksthastighed bestemmes ud fra eksperimentelle fermenterings data som plottes ind i Excel og vha. den eksponentiel regression bestemmes  $\mu_{\max}$  ved et R-kvadrat større end 0,95. Når organismen vokser eksponentielt, kan dette beskrives ved følgende Ligning 1.

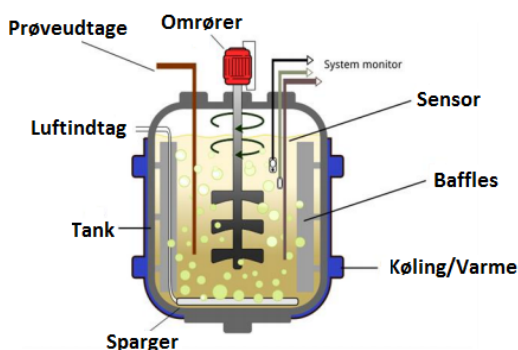
#### Ligning 1

$$x = x_0 e^{\mu t}$$

Her er  $x$  biomassekoncentrationen til tiden  $t$ , og  $x_0$  er biomassekoncentration til tiden  $t = 0$  og  $\mu$  er den specifikke væksthastighed, som angives i enheden  $\text{timer}^{-1}$  [12].

### Fermenters opbygning

En fermenter (bioreaktor) er en beholder der indeholder vækstmedie, som består af alle de næringsstoffer en celle skal bruge for at opnå optimal vækst. En fermenter er general forsynet med en omrører vha. en motor, 2 sensorer (pH - og DO- elektroder), sparger, baffles, luftindtag, prøveudtage og køling/varme regulator. Identifikationen af fermenterer illustrerede på nedenstående Figur 3. I de fleste tilfælde vil en fermenter være tilsluttet en computer, som samler alle data fra vækstmediet såsom ilt koncentration, pH, temperatur, gas-flow og omdrejningshastighed.



Figur 3 Identifikation af de enkelte dele på en fermenter [10]

En fermenter kan bestå af glas/stål og af Polycarbonat, Nylon og rustfrit stål. Begge fermenter består af de samme delelementer, som er vist på Figur 3.

Figur 4 viser en konventionel glas/stål fermenter af Sartorius Biostat.



Figur 4 Konventionel glas/stål fermenter [13]

Figur 5 Viser en engangs-fermenter og en engangs-bioreaktor, som er designet af Cercell



Figur 5 Engangs-fermenter



Engangs-bioreaktor [14]

## Fordel og økonomiske analyse af konventionel glas/ stål - og engangs-fermenter

Engangs-fermenter blev først introduceret til bio-fremstillings-industrien omkring år 1999, og er blevet en alvorlig konkurrent til de konventionelle glas/stål fermenter [15].

I dag er bio-farmaceutiske produkter karakteriseret ved mangfoldighed, stigende efterspørgsel og høje udviklingsomkostninger, som tvinger et stigende antal af bio-videnskabelige virksomheder til at anvende engangs-fermenter [16]. I dag er der en accelererende udvikling inden for brugen af engangsfermenter [17], da engangsfermenter tilbyder mange fordele, såsom reducere i tid og omkostninger i forhold til konventionelle glas/stål fermenter og har opnået en bred accept i den bio-farmaceutiske industri [18].

Engangs-fermenter bliver hovedsaglig anvendt af den farmaceutiske industri, da den farmaceutiske industri fokuserer på den kliniske side af branchen og kræver en stor sterilitet under fremstillingsprocessen af lægemidler [19].

Engangs-fermenter spænder fra lav profil forgæring til høj profil farmaceutiske kompatibel cellekulturer. Den høje indeslutningsniveau af engangsbrug systemer er ikke kun nyttigt for produktion i den bio-farmaceutiske industri, men også til fremstilling af papir, bio-raffinaderier og mælkesyrebakterier i fødevarer[20].

Den mest anvendt form for aerob fermenter i dag, er konventionelle glas/stål fermenter. Ideel til vækst af høj-celle-densitet kulturer i store volumen tanke har konventionelle glas/stål fermenter opstået som industriens foretrukne teknologi [21]. Men høj-celle-densitet kulturer har været en succes for kun et begrænset antal af mikroorganismer eller celletyper, der kan overleve i storskala reaktorer [22]. Desuden har konventionelle glas/stål fermenter været plaget af store ulemper[23]:

- Investeringer af høj kapital, energi krav og vedligeholdelse behov
- Forskydning
- Behov for intensiv rengøring og sterilisation
- Risikoen for krydskontaminering

Der findes mange artikler, undersøgelser, konferencer og møder, som diskuterer økonomi og fordele ved anvendelse af engangs-fermenter i forhold til konventionel glas/stål fermenter Ved anvendelse af glas/stål fermenter går omkostningerne til rengøring og sterilisation, såsom til vand, damp til autoklavering og andre rengøringsmidler [17]. Fordelene ved engangs-fermenter er såsom stigninger i batch succes sats, eliminerer potentiel krydskontaminering, hurtigere overgang mellem kampagner, reduktion i vand- og spildevandsanlæg, og eliminerer clean-in-place (CIP) og steam-in-place (SIP)(Autoklavering). Men en af de primære fordele ved engangs-fermenter er ønsket om at reducere omkostninger og tiden [18].

Risikovurdering for kontaminering er reducerede eller næsten elimineret ved anvendelse af at engangsfermenter. Da hvert system er nyt og sterilt før brug og kan derefter kasseres. I forhold til konventionelle glas/stål fermenter vil høje risiko for kontaminering forekommer fra forkert praktisk udførelse eller menneskelige fejl. Samtidigt kan bekymring for farlige bio-materialer, inddampning og bortskaffelse ikke være et problem, da engangs-bioreaktor kan anvendes som beholdere og kasseres med farligt bio-materiale [17],[24].

Jeff Craig [16], global direktør for forretningsudvikling og markedsføring for ATMI Life Sciences, har udtalt, at "De fleste, hvis ikke alle, af bio-producenter overvejer, hvordan man kan integrere engangs-fermenter i deres fremstillinger for at forbedre driftseffektiviteten og reducere omkostningerne". En anden undersøgelse foretaget af BioPlan Associates [16] i 2008, en virksomhed, der sporer tendenser i bio-fremstillinger, afslørede, at engangsfermenter er voksende, og bliver stadig mere populære. Steve Wilkowski fra Dow Corning fortæller, at flere virksomheder begynder at anerkende fleksibilitet og omkostningsmæssige fordele ved anvendelse af engangs-fermenter [16].

Ifølge 2009 BioPlan Associates [16] er brugen af engangs-fermenter blevet for doublet fire gang siden 2005 og er stadig i stigende udvikling iblandt bio-farmaceutiske industri for at reducere omkostninger og tiden. Gottschalk siger, at "Ingen fremstillings modeller kan opfylde alle krav til produkter og processer, og der er ingen værdi i at holde sig kun til engangs-fermenter. Han og andre hævder, at i den nærmeste fremtid vil bio-produktionsanlæg sandsynligvis være hybride operationer, som både indeholder konventionelle glas/stål fermenter og engangs-fermenter. Ikke desto mindre vil den stigende brug af engangs-fermenter fortsatte med at sænke omkostningerne og forbedre driftseffektiviteten [16].

En væsentlig fordel ved at bruge engangs-fermenter er besparelsen i generelle produktionsomkostninger på arbejdskraft og materialer. Ved behandlingen af omkostninger af arbejdskraft til montering, sterilisering, rengøring samt udgifter til kemikalier og vand, kan den besparelse opnås signifikant igennem engangs-fermenter [24].

Sammenligning af driftsomkostningerne for konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter er komplekse, som det ses på Figur 6, Figur 7 og Figur 8. Driftsomkostningerne er beregnet over 10 år (2010-2019). Driftsomkostninger såsom vand, personale, og forsyningselskaber skal skaleres til en procent, som afspejler de lokale økonomiske markedsforshold.

Figur 7 viser priser og mængder som er anvendt til at estimere besparelsen af drift omkostnings for engangs-fermenter. Plant kapacitet (antal batch fermenteringer) stiger over den 10-årige periode, som er typisk for mange faciliteter. Plant kapacitet ændrer sig igennem tiden, og det er en vigtig del af evalueringen driftsomkostninger, fordi kapaciteten påvirker udgifterne til engangs-fermenter. Mange driftsomkostninger for konventionelle glas/stål fermenter vil også stige med stigende anlægskapacitet (vand, CIP kemikalier), men nogle, såsom udgifter til rutinemæssig vedligeholdelse, idriftsættelse, validering, og kapital vil ikke ændre sig.

| Cost Basis                                       | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015  | 2016  | 2017  | 2018  | 2019  |
|--|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Operator labor rate (USD/h)                      | 23   | 25   | 28   | 31   | 34   | 37    | 41    | 45    | 49    | 54    |
| WFI (USD/L)                                      | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.07 | 0.07 | 0.08  | 0.09  | 0.10  | 0.11  | 0.12  |
| CIP detergent cost (USD/L)                       | 1.5  | 1.6  | 1.7  | 1.7  | 1.8  | 1.9   | 2.0   | 2.1   | 2.2   | 2.3   |
| 100 L single-use bag, price (USD)                | 265  | 278  | 292  | 307  | 322  | 338   | 355   | 373   | 392   | 411   |
| 500 L single-use bag, price (USD)                | 350  | 368  | 386  | 405  | 425  | 447   | 469   | 492   | 517   | 543   |
| 1,000 L single-use bag, price (USD)              | 500  | 525  | 551  | 579  | 608  | 638   | 670   | 704   | 739   | 776   |
| 1,500 L single-use bag, price (USD)              | 600  | 630  | 662  | 695  | 729  | 766   | 804   | 844   | 886   | 931   |
| 3,000 L single-use bag, price (USD)              | 800  | 840  | 882  | 926  | 972  | 1,021 | 1,072 | 1,126 | 1,182 | 1,241 |
| Liquid waste disposal cost (USD/m <sup>3</sup> ) | 5.0  | 5.5  | 6.1  | 6.7  | 7.3  | 8.1   | 8.9   | 9.7   | 10.7  | 11.8  |
| Plastic waste disposal cost (USD/bag)            | 10   | 11   | 12   | 13   | 15   | 16    | 18    | 19    | 21    | 24    |

Figur 6 Priser, der anvendes til at estimere besvarelse af drift omkostninger for engangs-fermenter [18]

| Item                                     | Cost  |
|--|-------|
| Validation labor rate (USD/h)            | 50    |
| Maintenance cost, % of direct costs (QA) | 3.0%  |
| Water used per buffer CIP (L)            | 2,000 |
| Buffer preps per batch, base case        | 7     |
| Buffer preps per batch, single use       | 3     |
| 100 L bags used per batch                | 5     |
| 500 L bags used per batch                | 3     |
| 1,000 L bags used per batch              | 1     |
| 1,500 L bags used per batch              | 2     |
| 3,000 L bags used per batch              | 1     |
| Labor hours per CIP                      | 1     |
| Labor hours per SIP                      | 1     |
| Labor hours per bag set up               | 1     |
| Labor hours per buffer prep              | 8     |
| Commissioning hours saved                | 3,652 |
| Qualification hours saved                | 3,712 |

Figur 7 Priser og mængder som er anvendt til at estimere besvarelse af drift omkostninger for engangsbrug-systemer [18]

| Fermentations per year (upside)                | 2010           | 2011            | 2012         | 2013            | 2014            | 2015           | 2016          | 2017          | 2018           | 2019           |
|--|----------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| Product A                                      | 104            | 125             | 141          | 156             | 164             | 175            | 186           | 204           | 217            | 227            |
| Product B                                      |                |                 | 1            | 15              | 28              | 30             | 30            | 34            | 37             | 43             |
| Total  | 104            | 125             | 142          | 171             | 192             | 205            | 216           | 238           | 254            | 269            |
| <b>Operating costs (USD)</b>                   | <b>2010</b>    | <b>2011</b>     | <b>2012</b>  | <b>2013</b>     | <b>2014</b>     | <b>2015</b>    | <b>2016</b>   | <b>2017</b>   | <b>2018</b>    | <b>2019</b>    |
| Single-use bags                                | 507,494        | 638,061         | 764,543      | 966,960         | 1,136,179       | 1,272,680      | 1,410,531     | 1,634,164     | 1,830,546      | 2,035,890      |
| Bag disposal                                   | 12,492         | 14,958          | 17,070       | 20,561          | 23,009          | 24,546         | 25,909        | 28,588        | 30,498         | 32,304         |
| Total  | 519,986        | 653,019         | 781,613      | 987,521         | 1,159,187       | 1,297,226      | 1,436,441     | 1,662,751     | 1,861,044      | 2,068,194      |
| <b>Operating savings (USD)</b>                 | <b>2010</b>    | <b>2011</b>     | <b>2012</b>  | <b>2013</b>     | <b>2014</b>     | <b>2015</b>    | <b>2016</b>   | <b>2017</b>   | <b>2018</b>    | <b>2019</b>    |
| Buffer prep and hold CIP                       | 170,280        | 224,284         | 281,541      | 373,037         | 459,191         | 538,851        | 625,656       | 759,368       | 891,129        | 1,038,287      |
| Liquid waste handling                          | 21,285         | 25,487          | 29,085       | 35,033          | 39,204          | 41,823         | 44,146        | 48,709        | 51,965         | 55,042         |
| Maintenance savings                            | 241,935        | 266,129         | 292,741      | 322,015         | 354,217         | 389,639        | 428,603       | 471,463       | 518,609        | 570,470        |
| HVAC costs                                     | 791            | 870             | 957          | 1,053           | 1,158           | 1,274          | 1,402         | 1,542         | 1,696          | 1,866          |
| Commissioning savings                          | 182,600        |                 |              |                 |                 |                |               |               |                |                |
| Qualification savings                          | 185,600        |                 |              |                 |                 |                |               |               |                |                |
| Annual operator labor hour savings             | 4,878          | 5,841           | 6,665        | 8,029           | 8,984           | 9,585          | 10,117        | 11,163        | 11,909         | 12,614         |
| FTE savings                                    | 2              | 2               | 3            | 3               | 4               | 4              | 4             | 5             | 5              | 6              |
| Operation labor savings                        | 95,680         | 105,248         | 173,659      | 191,025         | 280,170         | 308,187        | 339,006       | 466,133       | 512,746        | 676,825        |
| Total  | 903,051        | 627,861         | 784,652      | 930,196         | 1,142,929       | 1,289,363      | 1,448,933     | 1,758,383     | 1,988,059      | 2,355,110      |
| <b>Yearly savings in operating costs (USD)</b> | <b>383,065</b> | <b>(25,159)</b> | <b>3,039</b> | <b>(57,326)</b> | <b>(16,259)</b> | <b>(7,863)</b> | <b>12,493</b> | <b>95,632</b> | <b>127,015</b> | <b>286,916</b> |

Figur 8 Estimeret besvarelse af driftsomkostninger for engangsbrug-systemer [18]



Betydelige besparelser forventes i idriftsættelse og kvalifikation til dette alternativ, som er typisk for engangsbrug applikationer. Dette anvendes som en tidsbesparelse for kun 2010. Erfaringen er, at løbende Validerings omkostninger til engangsbrug- og glas/stål fermenter er ens.

Figur 8 viser, besparelse af drift omkostninger, og dette varierer med årene med en maksimal besparelse på \$ 383000 i 2010 og et tab på \$ 57,000 i 2013. De høje besparelser i 2010 afspejler den ene gang kredit for besparelser i idriftsættelse og kvalificering. Til dette alternativ, forøges besparelsen og anlægskapacitet stiger, dette viser at udgifterne til bortskaffelse af engangs-fermenter er mindre end udgifterne til CIP og arbejdskraft for glas/stål fermenter.

Ved anvendelse af engangsfermenter vil der tydeligt være en reducere af driftstimerne, hvor der bliver en mindre fuldtidsansat (FTE). Tankegangen er, at spare nogle få hundred timer og ikke reducerer driftsomkostningerne, men blot lysne arbejdsplanen [18],[25].

## Opskalering

Proces udvikling for stor skala bio-produktion er generelt mere arbejdskrævende, tidskrævende og dyrt end for sammenlignelige ikke-biologiske processer på grund af det store antal individuelle processer og potentielle variabler involveret [26].

Opskalering er et vigtigt og potentielt tidskrævende trin i udvikling af industrielle processer. Det omfatter meget mere end blot at gøre det samme på et større volumen. Det kræver frembringelsen af fast proces forståelse på forskellige skalaer til sikre ensartet kvalitet og titer hele opskalering fra tidlig klinisk forsøg til endelig produktionskala. Detaljeret forståelse af bioreaktor egenskaber på forskellige skalerer har betydeligt letter udvikling og opskalering af solide produktionsprocesser [27]. Typisk parametre bekymring er ilt overførsel, blanding, og varme-overførsel karakteristika samt den genererede forskydningskræfter. I løbet af de seneste 30 år, har konventionelle glas/stål fermenter udviklet sig som den gyldne standard ved både laboratorier størrelse og ved opskalering [28]. Opskalering kan være en meget kompliceret proces, da reaktor design, omrører design, og gasning strategi kan afvige fra den klassiske tankreaktorer design og principper [29].

Design ændringerne på tværs af skalaer kunne påvirke blandede adfærd, oxygen transfer, boble dispersion, og forskellige andre vigtige parametre. Derimod er en homogen kultur miljø på tværs af skalaer en vigtige dyrkningsmetode for parametre som pH, oxygen partialtryk, temperatur, og næringsstofforsyning for at opnå en velkontrollerede og sikker produktionsprocessen [30].

Sartorius Stedim Biotech er en førende leverandør af avanceret udstyr og service til udvikling, kvalitetssikring og produktion af bio-farmaceutiske produkter.

Figur 9 viser en oversigt over volumener for engangsfermenter designet af Sartorius Biostat. Af ses at Sartorius Biostat har designet engangs-bioreaktor i op til 1000 l (arbejdsvolumen).

| Single-Use Bioreactors | Vessel Size [L] |                |
|------------------------|-----------------|----------------|
|                        | Working Volume  | Minimum Volume |
| BIOSTAT® RM            | 0.5             | 0.05           |
|                        | 1               | 0.1            |
|                        | 5               | 0.5            |
|                        | 10              | 1              |
|                        | 25              | 5              |
|                        | 50              | 10             |
|                        | 100             | 20             |
| 300                    | 60              |                |
| BIOSTAT® STR           | 50              | 12.5           |
|                        | 200             | 50             |
|                        | 500             | 125            |
|                        | 1000            | 250            |

Figur 9 Opskalering af engangs-fermenter designet af Sartorius Biostat

## Biologiske processer

Biologiske processer er nogle af de mest komplicerede processer. Mange parametre kan påvirke fermenteringsprocessen, og det er ikke altid at disse parametre er kendte. Nogle af parametrene kan være inden for meget kritiske intervaller. Indlysende parametre er fx. impellers type, størrelse og - hastighed. Ikke så indlysende parametre som påvirkes ved blanding, såsom varmeoverførsel, pumpekapacitet, strømningmønstre, forskydningshastighed og energispredning [31],[32],[33].

## Omrøring

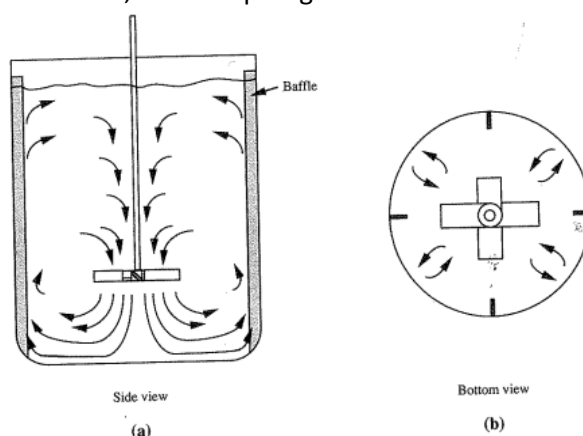
Omrøring har flere formål i en fermenteringsproces:

- At holde uopløselige partikler jævnt fordelt i et medie
- Reducere boble diameter af beluftning og derved at øge gas - væske grænseflade areal
- Spredde de tilførte komponenter til fermenterings tanken, som fx medie og syre-base, der anvendes til pH regulering
- Blande indholdet i en fermenter for at sikre en ensartet blanding

I de fleste industrielle fermenter udføres omrøringen af en eller flere impeller. En lang række forskellige impeller er blevet udviklet til forskellige væskeforhold [34],[35]. Størstedelen af impeller kan opdeles i to hovedkategorier, aksial - og radial strømning. Den aksiale strømnings impeller er egnet til partikelsuspensioner og høj volumenstrøm. Til fermentering er høj konvektiv strømning vigtig, pga. varmeoverførsel og til suspensionspartikler, til disse formål vil aksiale strømnings impeller være effektive. Energioptagelse er mindre i forbindelse med radiale strømnings impeller sammenlignet med aksiale strømnings impeller, som resulterer i store hastighedsgradienter i en fermenterings væske [36].

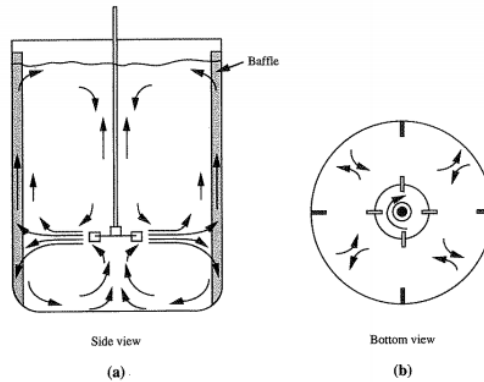
Impeller er et aksialt roterende element, som leverer eller absorberer energi. Impellers dynamik kan modelleres ved både Bernoulli's princip og Newtons' 3 lov.

Aksial-strømnings-impeller indfører væsentlig forskydningshastighed til væsken og anvendes fx til at blande ikke - blandbare væsker samt til at blande væsker med høj viskositet [37]. Desuden er aksial strømning meget nyttig til at blande væske-faste suspensioner, fordi den forhindrer faste partikler i at stabilisere sig på bunden af tanken [38]. Aksiale strømnings impeller anvender bulk-bevægelse og bruges på homogeniserings processer, hvor øget væske volumenstrøm er vigtig [37]. Med en aksial strømning impeller opnås en strømning parallelt med rotationsaksen, som vist på Figur 10.



Figur 10 Aksial strømnings impeller i en tank med baffles, (a) tank ses fra siden, (b) tank ses nedefra [39]

Turbiner er et radiale roterende element i en fermenter. Ambitionen er at reducere ikke ensartethed i væsken, blande opløselige komponenter, sprede gasser og faste partikler såsom celler [40]. Med radiale strømning impeller opnås en strømning vinkelret på rotationsakse, som vist på Figur 11.



Figur 11 Radial strømning impeller i en tank med baffles. (a) tank ses fra siden, (b) tank ses nedefra [38]

Rushton, Smith og Bakker turbinerne er relevante for den bioteknologiske industri. Turbinernes navne er opkaldt efter designernes/opfindernes navne.

Rushton turbinen har 90 grader vinklede flade blade, som er symmetriske og genererer en stærk radial strømning. En variant af Rushton turbinen er Smith turbinen, hvor bladene er halvcirkel formede, og den genererer radial strømning. Bakker turbinen har asymmetrisk dybt konkave blade design, og den har langt højere gas spredning end Smith og Rushton turbinerne. For både Rushton, Smith og Bakker turbinerne er det nødvendigt at anvende marine impeller til aksial strømning [40].

Figur 12 viser Rushton, Smith og Bakker turbiner



Figur 12 Rushton, Smith og Bakker turbiner [41]

Figur 13 viser gas spredning for Rushton, Smith og Bakker turbine. Ud fra figuren ses at gas spredning er største ved anvendelse af Bakker turbine.



Figur 13 Gas spredning for Rushton, Smith og Bakker turbinerne [41]

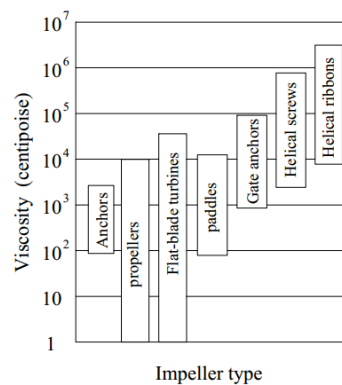
Inden valg af omrører type er det vigtigt at vide, hvilket strømningmønster der er brug for til formålet. Samtidigt vil andre hensyn spille en rolle, som fx viskositeten.

Hvis formålet er at danne en ensartet suspension, ville det være en god ide at anvende en impeller, da den har et gunstigt strømningbillede og bruger meget mindre energi end turbiner. Hvis omrøreren også skal findele boblerne af en gas, som skal reagere med væsken, vil det være bedst at anvende en turbine-omrører [42].

Design af de forskellige typer impeller er afstemt efter typen af viskositeten og organismer i fermenteringsvæsken. Viskositeten af en blanding kan øges markant under fermenteringsprocessen. En impeller kan være egnet til en fermenteringsproces i begyndelsen, og derefter kan den vise sig at være ineffektiv ved slutning af processen [35],[43].

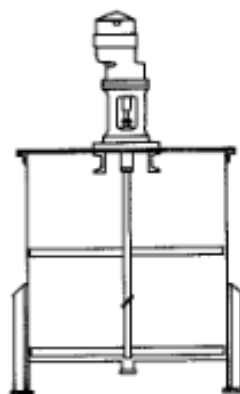
Som vist på Figur 14 [44] anbefales brug af propeller eller flade-blade turbiner for lavt viskositet væske. Og for højt viskositet anbefales brug af Anchor, Paddles, Gate anchors, Helical screws og Helical ribbons.

Figur 14 viser viskositetsområder for de forskellige impeller typer



Figur 14 Viskositetsområder for forskellige impeller [45]

Til aerobe fermenteringer anvendes mest radiale strømning turbinen, da den er god for gas spredning [46]. Samtidigt kan der opstå problemer ved ilttilførsel ved aerobe fermenteringer. Da viskositeten af fermenteringsvæske kan blive rigtig høj i løbet af fermenteringsprocessen. Løsningen kunne være anvendelse af langsom omrører med skråtstillede vinger[42], som er vist Figur 15.



Figur 15 Langsom omrører med skråtstillede vinger [47]

Rushton turbinen er kendt for at være højt producerende af forskydningshastighed. Derfor anvendes Rushton turbinen typisk i fermenterings processer, men Rushton turbinen er også kendt som dårligt producerende af flydende strømning for en given input effekt. Den aksiale impeller er kendt for at producere store mængder af væskestrømning for en given input effekt.

For stor forskydningshastighed er spild af energi og kan medføre skade på mikroorganismene og produktet, og for lidt strømning kan forårsage gradient af koncentrationen og temperaturen, som også kan forårsage uønskede biprodukt [31],[32],[33]. Den aksiale strømnings impeller producerer højt strømning og lav forskydningshastighed samt lavt effektforbrug og den giver gode og relativt rolige konvektionsstrømme. Bevægelsen i tankens yderste dele vil blive langsom, hvis væsken ikke har lav viskositet, vil den stå stille nær enderne. Hvor den radiale strømnings impeller producerer lav strømning og højere forskydningshastighed i et område omkring sin periferi, idet der er stor hastighedsforskel mellem turbinebladens kant og beholdervæggen, hvor hastigheden er nul. Dette medfører et højt effekt forbrug, men den høje forskydningshastighed bevirker en effektiv bearbejdning af væsken, hvilket er ønskeligt. Muligheden for flow begrænsning er aldrig et spørgsmål, og derfor er den radiale flow impeller den mest anvendt turbine [42],[48].

### Effekt tallet og Reynolds tal

Strømningsbilledet er afhængige af effekt tallet og Reynolds tal. Væsentligt for at vælge den rigtige impeller til en given proces er effekt tallet og Reynolds tal for en impeller. Effekt tallet kan beregnes ved følgende Ligning 2 [49] og er et dimensionsløst tal:

#### Ligning 2

$$Ne = \frac{P}{\rho D^5 n^3}$$

#### Hvor:

Ne: Effekt tallet

P: Effekt forbruget

$\rho$ : Densitet

n: Omdrejnings hastighed

D: Diameter

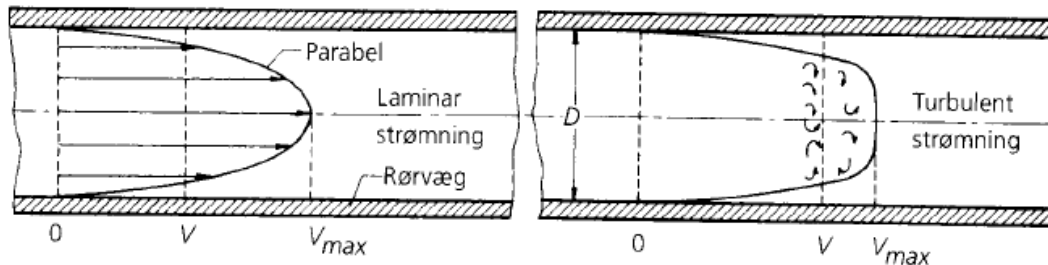
Effektforbruget er stærkt afhængig af densiteten, viskositeten, impeller typer og dimensioner. Effektforbruget er forskelligt fra impeller til impeller og samtidig er effekt tallet Ne også forskellig.

Reynolds tal kan bruges til at identificere, i hvilken tilstand væsken befinder sig. Generelt i område  $Re < 50$  er strømning overalt laminar, også i omrørers umiddelbare nærhed. I den øverste del af tanken kan der være helt stillestående væske, impeller kan ikke spille nogle nævneværdi rolle. For  $Re < 10$  vil der næppe være megen virkning tilbage, her vil brugen af en omrører der går tættere til væggen være bedre.

I området  $50 < Re < 1000$  begynder der at opstå turbulent strømning omkring omrøreren for den laveste del af området, og også længere borte for de højere Re. Der vil stadig være laminar strømning langt bort fra omrøreren. Baffles bliver i stigende grad aktuelle, idet tendensen til totalrotationen gør sig gældende.

For  $Re > 1000$  er der i en bioreaktor med baffles turbulent strømning overalt [50]. Både massefylde og viskositet påvirker strømnings området. Flow mønstret og Reynolds tal er afhængige af systemets geometri [51].

Laminar strømning findes ved højere viskositet og lav strømningshastighed. Ved denne strømning er alle væskedeles baner parallelle. Strømningen er størst i midten og aftager mod periferien. Ved turbulent strømning er væsken i hvirvlende bevægelse. Og den forekommer ved høj strømningshastighed [52], [53]. Figur 16 viser hastighedsfordeling for laminar og turbulent strømning.



Figur 16 Hastighedsfordeling for laminar (venstre side) og turbulent strømning (højre side) [53]

Reynolds tal kan beregnes ud fra nedenstående Ligning 3 [49], som er et dimensionsløst tal:

Ligning 3

$$Re = \frac{\rho_a N D^2}{\eta}$$

Hvor:

$\rho$ : Densitet

N: Omdrejningshastighed

D: Diameter

$\eta$ : Viskositet

### Effektforbruget

Energi er en stor omkostning i aerobe fermentering. Energien bliver forbrugt til omrøring, beluftning og til køleanlægget [54]. Måling af omrøringshastighed er vigtige i forbindelse med kontrollen af bulk bevægelse, levering af oxygen og andre næringsstoffer i gasfasen. Måling kan foretages ved anvendelse af et effektmåler, som måler den elektricitet strømforbruget af omrøring [55]. Friktionen i omrørers motor kan reducere den overførte energi til væsken. Derfor er den elektriske effekt, som forbruges af omrørers motor altid større end blandings effekten med et værdi som er afhængige af effektiviteten af drevet [56].

### Viskositet og Reologi

Stigningen i viskositet påvirker strømforbruget og forårsager belastning på akslen, gear og motoren af fermentoren. En lav forskydningshastighed kan derfor foretrækkes, når man arbejder med dilatant væsker (væsker hvor viskositeten stiger med stigende forskydnings hastighed).

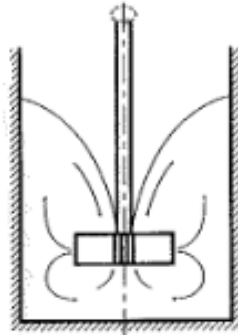
En reologisk karakterisering af mediet er vigtigt for at sikre, at fermenter opsætningen er i stand til at klare den maksimale belastning stødt under fermentering [57].

De reologisk egenskaber påvirkes af vekselvirkningen mellem et pr. parametre såsom cellemorfologi og biomasse koncentration. Små ændringer kan forårsage signifikante stigninger i viskositet [58]. Viskositeten måles af et reometer, det er en relativ nem måleteknik. Men databehandlingen er forholdsvis kompliceret i forhold til andre måletekniker [59].

Viskositeten af en væske er temperaturafhængig, og generelt falder viskositeten, når temperaturen stiger. Opvarmning under en reologisk måling kan derfor forårsage den målte viskositet falder, hvis reometeret ikke er udstyret med nøjagtig temperaturstyring [60].

## Baffles

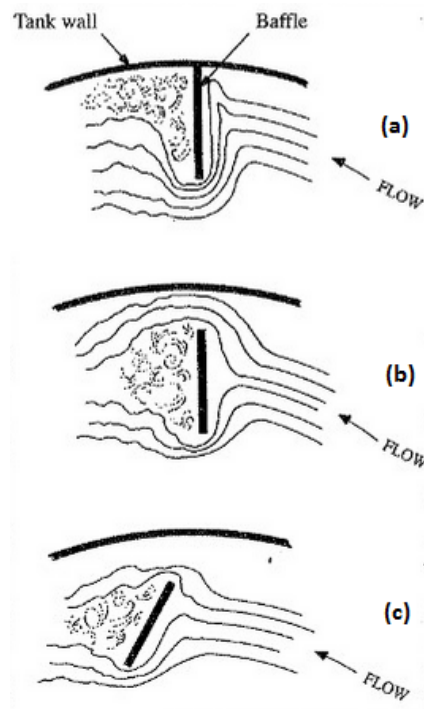
En hurtiggående omrører vil være tilbøjelig til at sætte hele væskemassen i rotation omkring sin akse. Dette vil nogle gang være uheldigt da væskedelenes relativ bevægelse og dermed forskydningshastigheder kan blive mindre, samtidig kan rotationen muliggøre, at væsken rejser sig langs bioreaktorvæggen, hvilket sammen med omrørerens suge virkning i aksialretningen kan føre til dannelse af en suge tragt, som vist på nedenstående Figur 17.



Figur 17 Dannelse af sugetragt [47]

For at undgå suge tragt installeres Baffles langs bioreaktorvæggen. Hvis væsken indeholder faste partikler, kan disse afsætte sig langs baffles, hvilket kan modvirkes ved, at man monterer baffles i et par centimeter afstand fra bioreaktorvæggen [61]. Figur 3 viser placering af baffles i en bioreaktor.

Figur 18 viser baffles arrangementer. (a) Ved væske med lav viskositet, er baffles fastgjort vinkelret på væggen. (b) For moderate viskositet væsker indstilles Baffles væk fra væggen. (c) Ved høj viskositets væsker indstilles Baffles væk fra væggen i en vinkel.



Figur 18 Baffles arrangementer [62]

## KLa

Den volumetriske oxygen masse overførings koefficient KLa er en vigtig parameter i biokemisk teknik og er defineret som den reciprokke tid til overførsel af oxygen fra gas til væske fasen [63] .

KLa beskriver den effektivitet, hvormed oxygen kan leveres til en fermenter for et givet sæt driftsbetingelser.

Målingen af KLa foretages, fx når en ny reaktor design skal evalueres, nyt gas sprednings udstyr eller der skal foretages driftsbetingelser. KLa værdi kan også bruges til at optimere styrevariablerne i løbet af livscyklus bio baseret proces. Denne optimering vil blive baseret på oxygen forbrug ved forskellige punkter i processen og biologisk vækstfase. Kriterierne for optimering kan være produkt udbytte, strømforbrug eller behandlingstid.

Opløst oxygen (DO) er ofte den begrænsende substrat i fermentering. For bakterier og gærkulturer er oxygen koncentrationen sædvanligvis 10 % - 50 % af luftmætning. For optimal vækst er det derfor vigtigt at fastholde DO niveauer over denne kritiske værdi ved gennemluftning (sparging) bio - processer med luft eller ren oxygen. Oxygen masse overførselshastighed til flydende fermenteringens væske skal være lig med eller overstige den hastighed, hvormed voksende celler optager oxygen [64].

KLa værdien kan både bestemmes med eller uden biologiske organismer. Uden biologisk organismer, kan bestemmelse af KLa give indsigt i masseoverførsel effektivitet af reaktoren, samt enhver påvirkning, som følger af driftsforholdene eller medie tilsætningsstoffer [65].

Bestemmelse af KLa værdien kan især være nyttigt, når virksomheder træffer beslutninger om bruge af engangs-fermenter i deres samlede produktionsstrategi. For dem, der overvejer at bruge engangs-fermenter teknologien, kan KLa målinger give meningsfuld støtte til store investeringsbeslutninger. KLa værdierne fra en engangs-fermenter kan kombineres med de driftsbetingelser, der er nødvendige for at nå dette interval, er afgørende for udvælgelsen af potentielle reaktor udstyr [64].

KLa værdien er kun gældende for den fermenteringsopsætning og driftsbetingelse, den er målt i. Ved at ændre på et af følgende parametre: omdrejningshastighed, beluftning, omrører type og antal, temperatur, overtryk, fermenters udformning, medie sammensætning eller viskositet, vil KLa værdien ikke gælde længere [10].



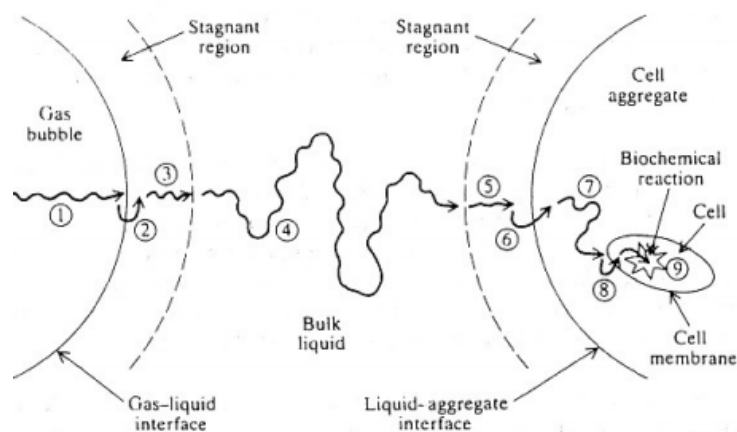
## Oxygen overførsel fra gas boble til celle

I aerob fermentering skal oxygenmolekyler overvinde en række transport modstande inden det kan udnyttes af cellerne. Otte masse transfer trin involveret i transport af oxygen fra det indre af gas bobler til stedet af intra-cellulære reaktioner er vist skematisk i.

Trine som er involveret i massetransfer af gas boble til celle:

1. Diffusion af oxygen fra bulk gas til væske-grænsefladen
2. Transport over gas-væske-grænseflade
3. Diffusion af oxygen igennem fra gas-væske interface til godt blandet bulk væske
4. Transport af oxygen gennem velblandet væske til en forholdsvis ublandet væske-regionen omkring cellerne
- 5.-7. Negligeret
8. diffusion gennem stillestående region omkring cellerne
9. Transport fra celle envelope til intra-cellulære reaktions side

Figur 19 viser trinene involveret i massetransfer af gas boble til celle



Figur 19 Trin til overførsel af oxygen fra gas boble til celle [10]

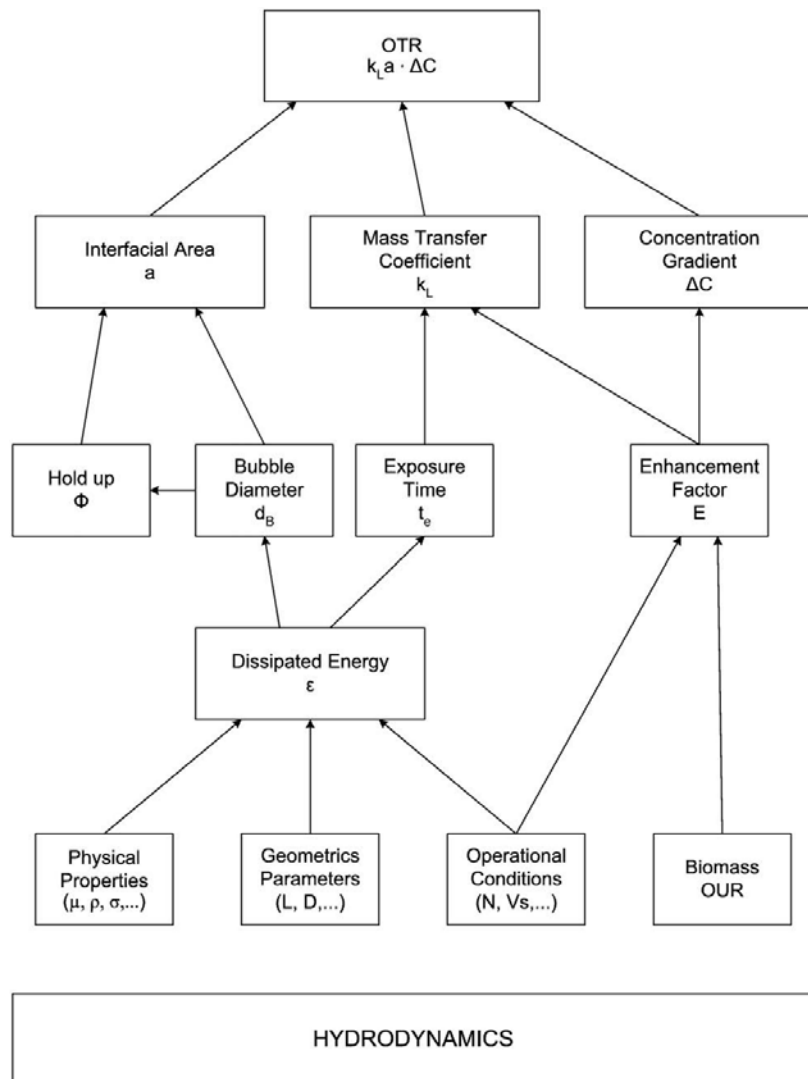
Modstanden er blevet negligeret på grund af den gas grænse lag på indersiden af boblen. På grund af den lave opløselighed af oxygen i vandige opløsninger, kan der antage, at grænsefladen dominerer gas-væske masseoverføring.

Trin 5-7 bliver negligeret, hvis cellerne er individuelt suspendede i væske grænse overflade i stedet for i en celle klump.

De relative størrelser af de forskellige masseoverføring resistanser er afhængige af egenskaberne af sammensætning og reologisk af væsken, blanding intensitet, boblestørrelse, celle-klump størrelse og andre faktorer [10],[66].

## Proces teori

Oxygen overførselshastighed (OTR) i en bioreaktor er stærkt påvirket af de hydrodynamiske betingelser, som anvendes i bio - processer. Dette er illustreret i Figur 20.



Figur 20 Sammenhæng i Bio - Processers variabler, der påvirker oxygen overførselshastighed [67]

Disse betingelser er kendt for at være en funktion af energioptagelse, som afhænger af driftsbetingelser, fysisk-kemiske egenskaber af kulturen, de geometriske parametre for bioreaktoren, samt tilstedeværelsen af oxygen-forbrugende celler [64]. Desuden har gennem-bobling af gas, blanding, cellelinje, medietype, temperatur, pH, saltindhold og skumdæpende midler en indflydelse på KLa værdien. Hver gang en af disse faktorer ændres, vil KLa værdien også ændres. Dette vil betyde at KLa værdien er en meget begrænset måling [67].

Under en bio - proces overføres oxygen fra gas fasen (typisk i form af bobler) til væsken, hvor den i sidste ende kan blive absorberet i en celle og forbruges. I den simpleste form kan denne proces beskrives som strømning igennem et barriere lag udtrykkes som produktet af den drivende kraft og masseoverføringskoefficient (KLa):

Ligning 4

$$J^0 = k_G(p_G - p_i) = k_L(C_i - C_L)$$

- $J^0$ : Den molære strøm af oxygen gennem gas - væske - grænseflade [ $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]
- $k_G$  og  $k_L$ : De lokale masseoverføring koefficienter
- $p_G$ : Partiel tryk af oxygen i gas fasen
- $C_L$ : Koncentrationen af opløst oxygen i væsken
- $P_i$  og  $C_i$ : Værdier ved gas - væske - grænsefladen

Da grænseflade koncentrationer ikke er direkte målbare, overvejes et særligt tilfælde af Ligning 5 som beskriver flux under eller ved ligevægt:

Ligning 5

$$J^0 = k_G(p_G - P^*) = k_L(C^* - C_L)$$

- $p^*$ : Oxygentrykket i ligevægt med væskefasen
- $C^*$ : Iltmætningen i bulk væske
- $K_G$  og  $K_L$ : De overordnede masseoverførselshastigheder koefficienter.

Det kan antages at  $K_L = k_L$ , da opløseligheden af oxygen i vandet er meget lav, og de fleste af resistens masseoverføring er på den flydende side af grænsefladen. Som et resultat, er oxygen massetransport pr enhed reaktor volumen,  $dCO_2 / dt$ , som fremkommer ved at multiplicere det samlede flux af gas - væske grænsefladeareal pr væskevolumen,  $a[64]$ .

Ligning 6

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_L a (C^* - C_L)$$

Ud fra Ligning 6 udledes y-akse værdien  $\ln(100 - DO_2(t))$  bestemmes [63]:

Ligning 7

$$\frac{dC_{O_2}}{C^* - C} = k_L a * dt$$

Ligning 8

$$\int \frac{dC}{C^* - C} = \int k_L a * dt$$

Ligning 9

$$\ln(C^* - C) = -k_L a * t + c$$

Faktorer, som påvirker  $KLa$  værdien:

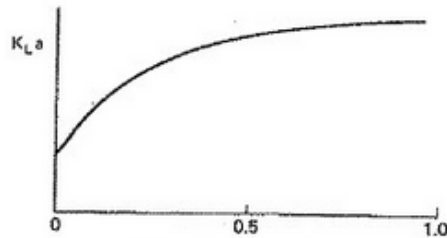
Som illustreret i Figur 20, bliver  $KLa$  værdien påvirket af mange variabler. Disse omfatter alt fra størrelse og udformning af selve bioreaktoren til sparging af gas, blanding, cellelinje, medietype, temperatur, pH, saltindhold og skumdæpende midler.  $KLa$  værdien bliver ændret hver gang et af disse elementer bliver ændret. Derfor er  $KLa$  målingerne meget begrænset [64].

Desuden er der også påvist, at følgende faktorer påvirker  $KLa$  værdien i en fermentering tank; luftmængde, omrøring, de reologiske egenskaber af mediet og tilstedeværelsen af anti-skummidler [68].

## Effekten af luftmængde på KLa værdien

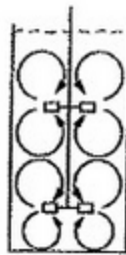
### Mekanisk omrørte reaktorer:

Virkningen af luftstrømningshastigheden på KLa værdien er illustreret i Figur 21, hvor KLa værdien stiger med stigende mængde luftstrøm. Luftstrømmen anvendes i sjældent tilfælde over intervallet 0,5-1,5 (volumen luft pr volumene medie pr minut) [68].

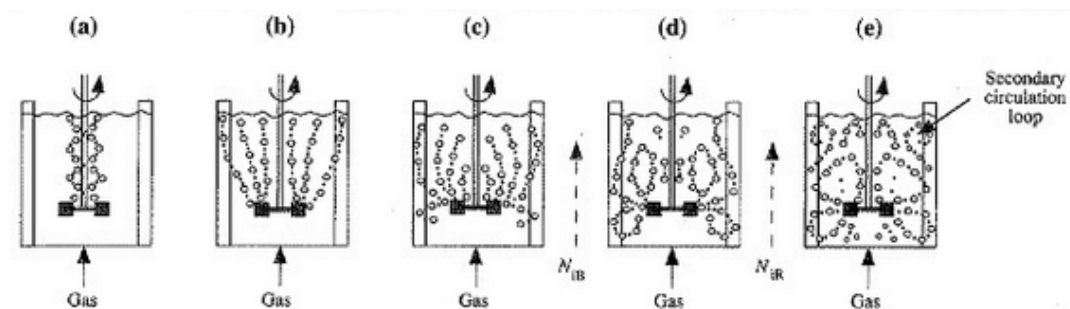


Figur 21 Effekten af luftmængde på KLa værdien i en ømrørt fermenter [68]

Figur 22 og Figur 23 viser effekten af gas flowet og omdrejningshastighed på strømningsmønstret i en omrørte fermenter. Figur 22 viser en strømnings profil uden beluftning. Figur 23 (a) viser en strømning med lav omdrejningshastighed og høj gas flow. Figur 23 (b) til (e) viser strømnings profiler med stigende omdrejningshastighed og faldende gas flow [69].



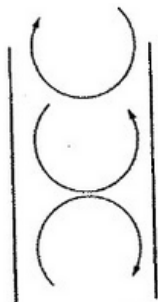
Figur 22 Strømning uden beluftning [70]



Figur 23 Effekten af gas flowet og omdrejningshastigheder på strømningsmønstret i en omrørte fermenter [69]

### Ikke mekanisk omrørte reaktorer:

Strømningsmønstret af bobler gennem en boble reaktor er afhængig af gas overfladisk hastighed, som er angivet i enheden (cm/sek.). Ved en gas hastighed på under 1 - 4 (cm/sek.), vil boblerne stige jævnt igennem mediet. Denne type af strømning kaldes homogene. Ved høje gas hastigheder vil boblerne blive produceret ujævnt i bunden af tanken, og boblerne vil smelte sammen, hvilket resultere i forskellige fluiddensitet. Forskellig fluiddensitet skaber kredsløbs strømme og flow, som er illustrerede i Figur 24. Denne type af strømning kaldes heterogen [71].



Figur 24 Heterogene strømningstype [71]

Værdien af den volumetriske masseoverførselskoefficient i en tank er væsentlige afhængig af den overfladiske gas hastighed. (Heijnen og Van't Reit, 1984) [72] har revideret emnet og påvist, at det præcise matematiske forhold mellem  $K_La$  og overfladiske gas hastighed er afhængig af de sammensmeltende egenskaber af mediet, typen af strømning og boble størrelse.

Desværre er disse egenskaber sjældent kendt for en kommerciel proces, der gør anvendelsen af disse ligninger problematiske. (Van't Riet og Tramper, 1991) [71] påstod imidlertid, at de relationer, der er afledt af de ikke sammensmeltende egenskaber af mediet, ikke-viskose og store bobler (diameter 6 mm) vil give et rimeligt nøjagtigt estimation for de fleste ikke tyktflydende situationer:

#### Ligning 10

$$K_La = 0,32 (V_s^c)^{0,7}$$

Hvor  $V_s^c$  er den overfladiske lufthastighed korrigeret for lokalt tryk

### Sparger

En afgørende faktor for en vellykket cellekultur proces er mængde af gas overførsel. I konventionelle glas/stål fermenter er sparger installeret direkte under den nederste turbine, for at sikrer korrekt gas boble spredning [73]. Sparger med små huller frembringer små bobler og forbedre overførslen af oxygen på grund af deres høje gas-væske grænseoverflade-område [28]. På Figur 3 ses placering af en sparger i en fermenter.

### Effekten af omrøring på $K_La$ værdien

Omrøring har vist sig, at have en stor betydning for  $K_La$  værdien i en fermenter.

Ifølge (Banks, 1977) [74], er omrøringen en hjælp til overførelsen af ilt på følgende måder:

- 1) Ved omrøring øges arealet for oxygen overførsel ved at dispergere luft i mediet i form af små bobler
- 2) Omrøring forhindrer luftboblerne at flugte fra væsken
- 3) Omrøring forhindrer sammensmeltning af luftbobler
- 4) Omrøring reducerer tykkelsen af den flydende film på gas -væske-grænseflade ved at skabe turbulent strømning i mediet.

### Effekten af temperaturen på KLa værdien

Temperaturen af aerobe fermenteringer påvirker både opløseligheden af oxygen og masse-overførsel koefficient. Stigende temperatur forårsager i et falde, således at den drivende kraft for masseoverføring reduceres. Samtidig forøges diffusivitet af oxygen i den grænseflade der omgiver boblerne, hvilket resulterer i en stigning i masse-overførsel koefficient. Effekten af temperaturen på oxygenoverførsel er afhængige af temperatur størrelsen. For temperaturer mellem 10°C og 40°C: temperaturstigning er mere tilbøjelige til at øge hastigheden af oxygen overførsel. Over 40°C falder opløseligheden af ilt betydeligt og der forekommer skader på drivkraften og masseoverførings hastighed [75].

### Fordelen ved anvendelse af KLa værdien

Der er en række vigtige fordele ved anvendelse af KLa værdien

- 1) Med sikkerhed kan den biologiske vækst ikke forhindres af utilstrækkelig oxygen koncentration
- 2) Bedre mulighed for at finde niveau af oxygen koncentration for en optimal proces
- 3) Undgåelse af energi spildt og omkostninger forbundet med unødigt høje oxygen koncentration
- 4) Flere informationer for købsbeslutninger af udstyret

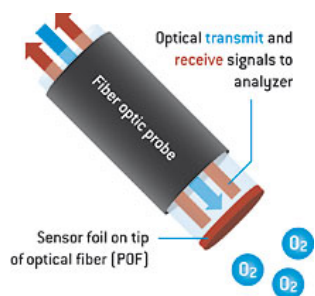
Ved at måle KLa værdien med en let og præcis metode, kan have stor betydning for at forbedre effektiviteten af fermenteres drift [64].

## Sensorer

### Presens DO sensor

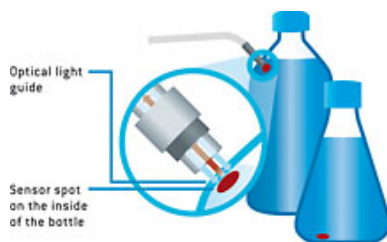
Presens er en optiske oxygen-sensor, som måler partieltrykket af både opløste og gas formigt oxygen. Oxygen sensor belægning er integreret i høj kvalitet rustfrit stål fittings. De optiske oxygen sensor viser en fremragende langtidsstabilitet og stå ru procesbetingelser. Sensoren kan autoklaveres og blive renses i CIP (90 ° C, 5% NaOH). Ingen behov for rengøring, men udskiftning membranen er nødvendig og den har en lang holdbarhed [76].

Figur 25 viser Presens optiske oxygen-sensor.



Figur 25 Presens optiske oxygen-sensor [76]

Desuden findes Presens sensor i non-invasive optiske oxygen-sensor. Denne sensor er fastgjort på den indre overflade af glasset eller transparent plastmateriale og kan derfor måle oxygenkoncentrationen i en non-invasiv og non-destruktiv måde udefra, igennem væggen af beholderen. Dette ses på Figur 26. Den kan både anvendes til glas/stål - og engangsbrug fermenter. Non-invasive optiske oxygen-sensor kan blive dampsteriliseret, autoklaveret og blive renses i Place (CIP). Måleområder for Presens DO sensor er fra 1 ppb til 45 ppm opløst oxygen og måling af ultra lav luftformig oxygen ned til 0,5 ppm og signalet er uafhængig af strømningshastighed [77].



Figur 26 Non-invasive optisk oxygen- sensor [77]

### Hamilton Visiform DO sensor

Hamilton Visiform er en optisk oxygen-måling med indbygget analysator i 12 mm-format.

Visiform DO, HAMILTON er den første virksomhed, som tilbyder selvstændig oxygen måling i det populære 12 mm format. Kombineret i Visiform sensor aksel er: høj temperatur-resistente optisk elektronik, mikroprocessor, 4 til 20 mA analog output, digital RS 485-interface med ModBus-protokol, og ECS-interface (*ECS er elektrokemisk sensor*). Anvendelse af 4 til 20 mA analoge output eller digital RS 485 interface (begge integreret i 12 mm aksel) gør en ekstern måleforstærker unødvendig, så målesignaler skal tilføres direkte i en proces styresystem. Visiform DO sensorer er udviklet til at blive dampsteriliseret, autoklaveret og renses i Place (CIP) uden vanskeligheder. Derfor er VISIFORM™ DO sensor ideel til brug i fermentering og lignende krævende anvendelser [78]. Hamilton Visiform oxygen sensor er vist på Figur 27.



Figur 27 Hamilton Visiform oxygen sensor [78]

### Biomasse sensor

Biomasse sensor er en sensor som måler biomasse indholdet under fermentering. Biomasse sensorer fås i 120, 225, 325 mm længde. Sensoren kommunikerer online gennem en forforstærkeren til et display, yderligere analog output, USB, Ethernet, fieldbus, profibus eller nettet. Biomasse sensoren aflæser biomassen med en enheden udtrykt i permittivitet, 1 pF/cm svare til  $1 \cdot 10^6$  ml celler for suspension celler. Biomasse sensoren og forstærkeren er fra firmaet Hamilton/ Fogale og Aberinstruments [79]. Dette kan ses på Figur 28.



Figur 28 Viser biomasse sensoren, forstærkeren og displayet [79]

## Materialer og Metoder

Vækstdata (optiske tæthed (OD) og tørvægt (DW)) for en vildtype *E.coli* dyrket i engangs-fermenter sammenlignes med vækstdata for konventionelle glas/stål fermenter. Desuden blev KLa værdi bestemt for engangs-fermenter og sammenlignes med data for konventionelle glas/stål fermenter for forskellige set-up (forskellige omrøringshastigheder, fermenter størrelse og turbiner typer).

Engangs-fermenter er designet af virksomheden Cercell. Bioreaktorerne modtages ikke sterile. De gøres sterile ved anvendelse af fremgangsmåde i appendiks A.

### Vækst bestemmelse

#### Fermentering

Batch fermenteringer blev udført i en Biostat B anlæg med (3, 5.7 og 15 liter) engangs-fermenter og (2 og 5 liter) konventionelle glas/stål fermenter med LB-medie (*Medie sammensætning findes i appendiks B*) og følgende betingelser, som ses i Tabel 1.

Tabel 1 Betingelser til fermenterings forsøgene

| Betingelser |            |                      |   |
|-------------|------------|----------------------|---|
| pH          | Temperatur | Beluftningshastighed | Beluftning  |
| 7           | 37 ° C     | 1 vvm                | 1 liter/min ( <i>Afhængige af fermenter volumen</i> ) |

#### Forkultur

100 ml sterilt LB medie bliver inokuleret med en enkelt koloni fra vildtypen *E.coli* i et sterilt rystekolbe. Rystekolben bliver inkuberet ved 37°C i omkring 20 timer.

#### Inokulering af fermenter

Alle fermenteringer blev inokuleret fra en forkultur med en  $OD_{600} = 0,09$ , undtagen fermentering for 15 liter engangs-fermenter som blev inokuleret med  $OD_{600} = 0,15$ .

#### Prøve udtagning

Igennem fermenteringens forløbet blev der taget prøve af mediet med celler (biomasse) til OD og DW bestemmelse.

#### OD

Formålet med den optiske densitet (OD) er at estimere mængden af biomasse. Måling af OD med et spektrofotometer er en hurtig og nem måde at udvikle en vækstkurve. Et spektrofotometer måler den optiske densitet ved at skyde en lysstråle gennem en kuvette som indeholder biomasse. For *E.coli*-celler i et LB-medie, anvendes en bølgelængde på 600 nm. Spektrofotometeret kan måle en absorbans mellem 0,1-0,4. Når OD overstiger 0,4 skal biomassen fortyndes for at opnå det rigtige estimat, da høje cellekoncentration kan bevirke mange refleksioner [12].

1 ml af medie med celler udtages og absorbansen måles med en spektrofotometer. Prøve udtagning til OD bestemmelse blev foretaget hver time i de første 3 timer af fermenteringsforløbet og derefter hver halve time. Hver prøve udtagning var på 1 ml biomasse.



## DW

Prøve udtagning til tørstofs bestemmelse (DW) blev taget første gang ved fordoblingens tiden, omkring 3 timer efter fermenteringens start og derefter blev prøven taget en gang hver time. Der bliver anvendt biomasse filter, som bliver tørret i mikrobølgeovn i 20 min og derefter placeret i en tørrings kasse. Hver prøve udtagning var omkring 5 ml biomasse. Dette blev overført til et sterilt falkon-rør. Falkon-røret og filteret blev vejede inden brug. Biomassen filteres gennem et 0,2µm Millipore filter og blev vasket 3 gang med 5 ml destilleret vand. Derefter bliver filteret med biomasse tørret i mikrobølgeovn i 20 min, hvorefter den blev placeret igen i tørrings kassen i omkring 20 min. Til sidst bliver det tomme falkon-rør og filteret med biomasse vejede. Enheden for tørstofbestemmelsen er gram celler pr. liter.

## KLa bestemmelse

Bestemmelsen af KLa værdien er baseret på gasning - ud metoden, som måler opløst oxygen i en væske ved hjælp af oxygen sensorer. Nitrogen og opløst oxygen indføres til en fermenter vha. en sparger ved samme beluftningshastighed. Sensoren tilsluttes en computerstøttet dataopsamling med en sampling frekvens mellem 1 og 5 sek. Til denne undersøgelse blev der anvendt en salt-medium NaCl-opløsning (*Medie sammensætning findes i appendiks C*). NaCl-opløsning anvendes til at efterligne celledyrkningsmediet, da den har en væsentlig større kapacitet end vand. Der blev anvendt to forskellige sensorer, Presens - og Hamilton Visiform sensorer. Undersøgelsen blev gennemført i et Biostat B anlæg med engangs-fermenter på (3 og 5.7 liter) og konventionelle glas/stål fermenter på (2 og 5 liter). For alle fermenter blev undersøgelsen gennemført ved 4 forskellige omrøringshastigheder (500, 1000, 1500 og 2000 rpm) og 3 forskellige turbiner (Smith, Rushton og Bakker) og med de betingelser, som ses i Tabel 2.

Tabel 2 Betingelser til KLa bestemmelse

| Betingelser |            |                      |   |
|-------------|------------|----------------------|---|
| pH          | Temperatur | Beluftningshastighed | Beluftning  |
| 7           | 37 ° C     | 1 vvm                | 1 liter/min ( <i>Afhængige af fermenter volumen</i> ) |

### Gasning - ud metode blev udført på følgende ud:

Omrøring startes i en fermenter ved en temperatur på 37°C og der blev indført nitrogen til NaCl-opløsningen for at fjerne oxygen og akkumulering af opløst oxygen i væsken. Derefter stoppes nitrogen indførsel og dataopsamling startes. Herefter tilføres oxygen til NaCl-opløsning indtil den når en mættet oxygen-koncentration, som er angivet ved en stabil DO værdi på 100%. Dette gentages 5 gange for hver opsætning.

## Resultater

De resultater som er opnået i dette projekt er vækstdata af en *E.coli* stamme, som er dyrket i LB-medie. Ved anvendelse af konventionelle glas/stål - og engangs-fermenter ved samme betingelses forhold, som ses i Tabel 1. KLa værdien af hver fermenter blev målt ved samme betingelsesforhold, som ses i Tabel 2 for alle konventionelle glas/stål - og engangsfermenter. Der blev udført dobbelt bestemmelse af hver fermenteringsforsøgene for bestemmelse af vækst. Ved bestemmelse af KLa værdien, gentages hvert forsøg 5 gange.

Der blev anvendt en 2 liters og 5 liters konventionelle glas/stål fermenter med Rushton turbiner. To 3 liters engangs-fermenter med Rushton og Smith turbiner, og tre 5 liter engangs-fermenter med Rushton, Smith og Bakker turbiner anvendes ligeledes. Engangsfermenterne er designet af virksomheden Cercell. Til vækstbestemmelse blev alle ovenstående fermenter typer anvendt undtagen engangs-fermenter med Bakker turbiner. Engangs-fermenter med Bakker turbiner blev kun anvendt til KLa bestemmelse.

- **Forkortelser**

- G/S = Glas/stål fermenter
- SUF= Single-use-fermentor= engangs-fermenter

### Fermentering

Tabel 3 Viser en oversigt over det anvendte parametre til fermenterings forsøgene. Her ses de anvendte fermenter typer, deres størrelser, turbiners diameter, sparger type og de anvendte beluftning, omrøringshastighed og beluftningshastighed.

Tabel 3 Oversigt over det anvendte parametre til fermenterings kørsler

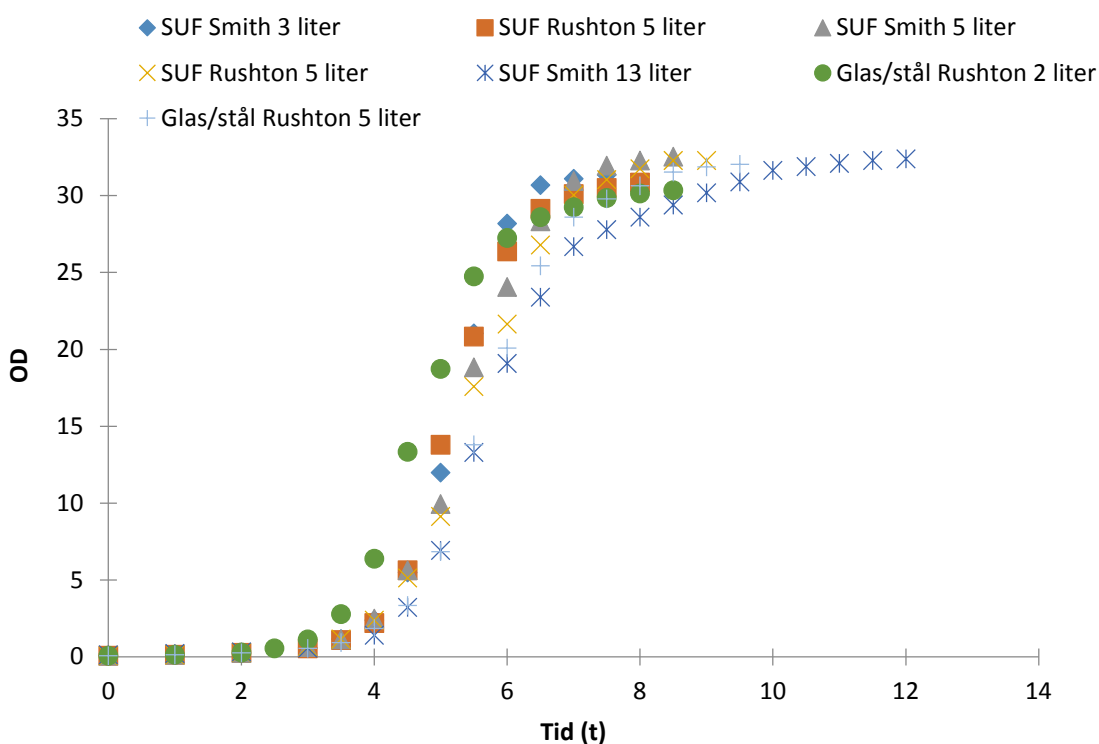
| Parametre                  |             |             |             |             |             |             |             |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Fermenter type             | SUF         | SUF         | SUF         | SUF         | SUF         | Glas/stål   | Glas/stål   |
| Turbiner type              | Smith       | Rushton     | Smith       | Rushton     | Smith       | Rushton     | Rushton     |
| Antal turbiner             | 2           | 2           | 3           | 3           | 4           | 2           | 3           |
| Turbinens diameter (mm)    | 60          | 60          | 70          | 70          | 70          | 50          | 60          |
| Total volum (liter)        | 3           | 3           | 5,7         | 5,7         | 13          | 2           | 5           |
| Arbejds volume (liter)     | 2           | 2           | 4           | 4           | 12          | 1½          | 4           |
| Omrørings-hastighed (rpm)  | 1000        | 1000        | 1000        | 1000        | 1000        | 1000        | 1000        |
| Sparger type               | Ringsparger | Ringsparger | Ringsparger | Ringsparger | Ringsparger | Ringsparger | Ringsparger |
| Beluftnings-hastighed(VVM) | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           | 1           |
| Belufning (liter/min)      | 2           | 2           | 4           | 4           | 12          | 1½          | 4           |

Tabel 4 viser en oversigt over fermenterings resultater. Her ses tidsperioden for fermenterings forsøgene, værdien for  $OD_{max}$ ,  $\mu_{max}$  og  $DW_{max}$  for hver fermenter.

Tabel 4 Oversigt over fermenterings resultater

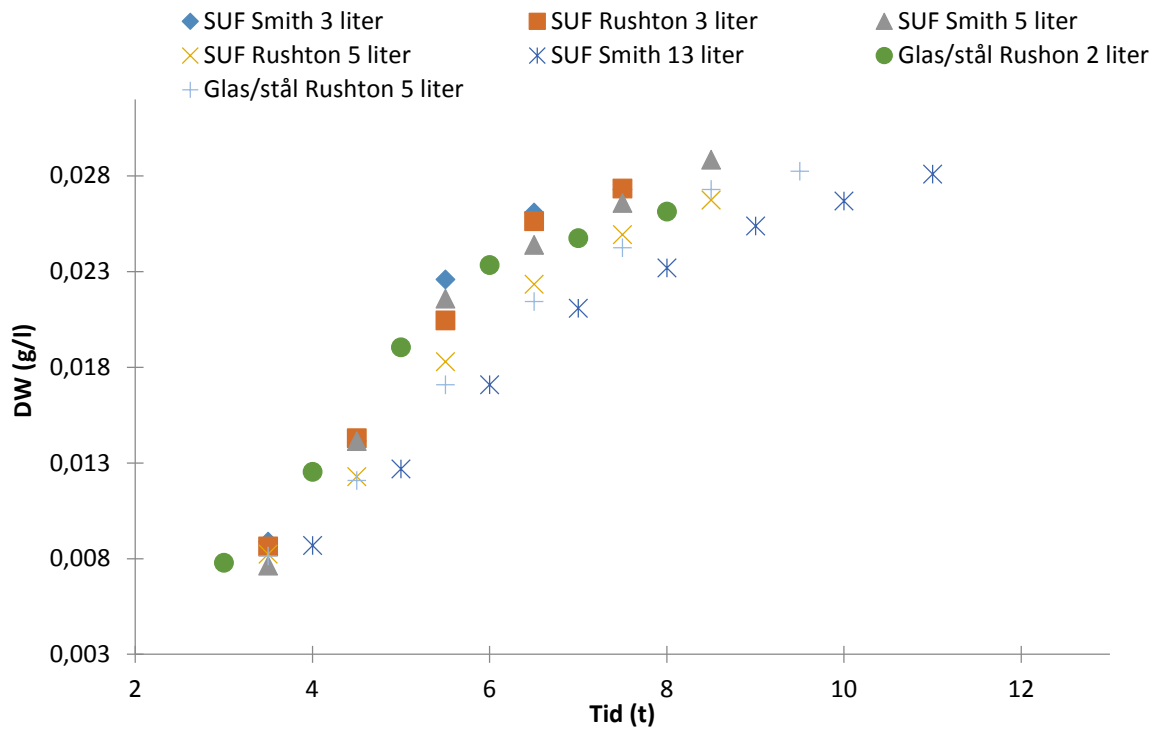
|                     | SUF           |                 |               |                 |                | Glas/stål       |                 |
|---------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                     | Smith 3 liter | Rushton 3 liter | Smith 5 liter | Rushton 5 liter | Smith 13 liter | Rushton 2 liter | Rushton 5 liter |
| Antal timer         | 7,5           | 8               | 8,5           | 9               | 12             | 8,5             | 9,5             |
| $OD_{max}$          | 31,35         | 30,85           | 32,55         | 32,3            | 32,4           | 30,35           | 32,05           |
| $\mu_{max}(t^{-1})$ | 0,379         | 0,384           | 0,367         | 0,368           | 0,395          | 0,370           | 0,384           |
| $DW_{max} (g/l)$    | 0,0273        | 0,0274          | 0,0289        | 0,0268          | 0,0281         | 0,0262          | 0,0283          |

Figur 29 viser OD målinger for alle konventionelle glas/stål - og engangsfermenter over tiden ved en omrøringshastighed på 1000 rpm. Her ses en lagfasen mellem 0-4 timer, en eksponentiel fase mellem 4- 7 timer og en stationær fase 7-12 timer.



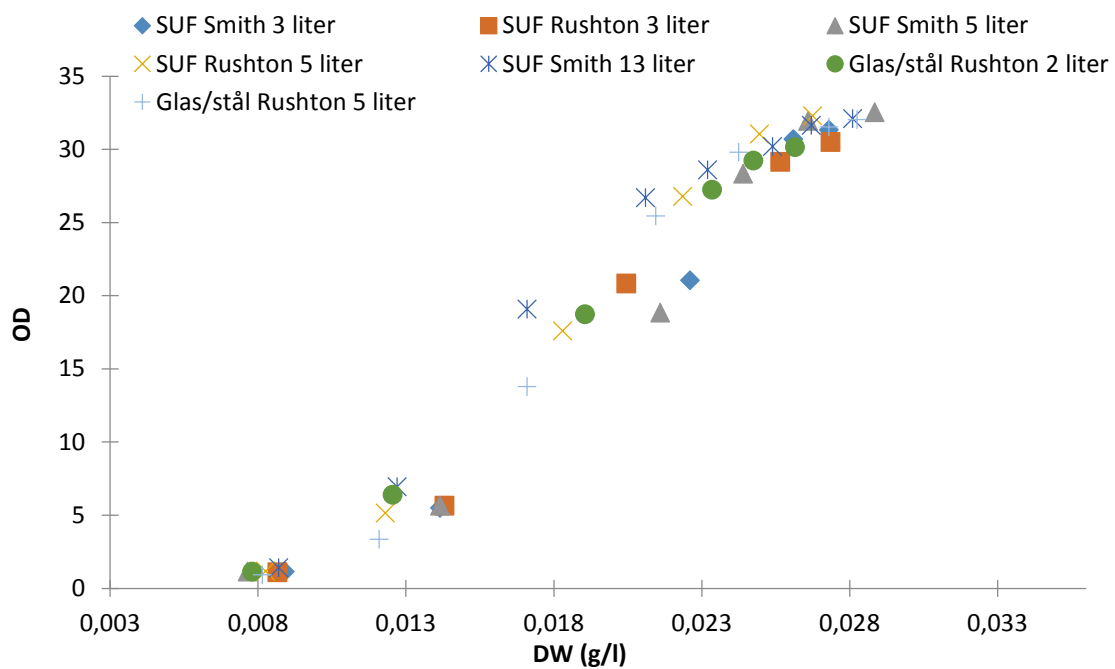
Figur 29 OD målinger gennem fermenterings forløbet for alle anvendte fermenter

Figur 30 Viser tørvægts bestemmelse (DW) gennem fermenterings forløbet for både konventionelle glas/stål - og engangsfermenter over tiden ved en omrøringshastighed på 1000 rpm. Her ses at DW stiger igennem fermenterings forløbet for alle fermenter typer.



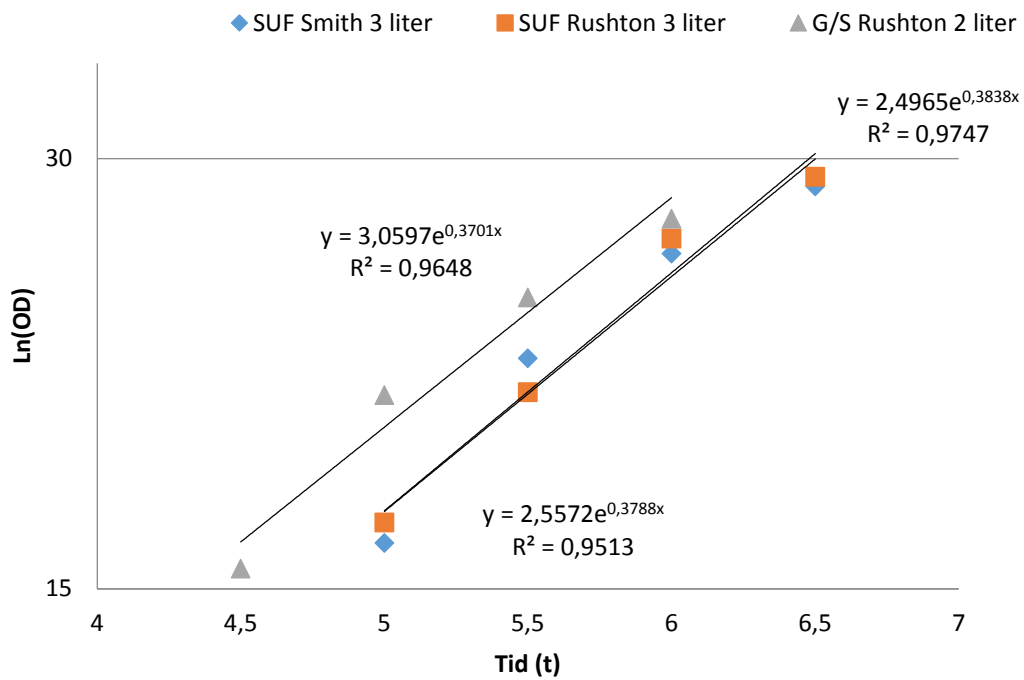
Figur 30 Tørvægt (DW) målinger gennem fermenterings forløbet for alle anvendte fermenter typer

Figur 31 Viser sammenhængen mellem OD og DW for alle anvendte fermenter typer. Her ses, at sammenhængen mellem OD og DW stiger lineært for alle fermenter typer.

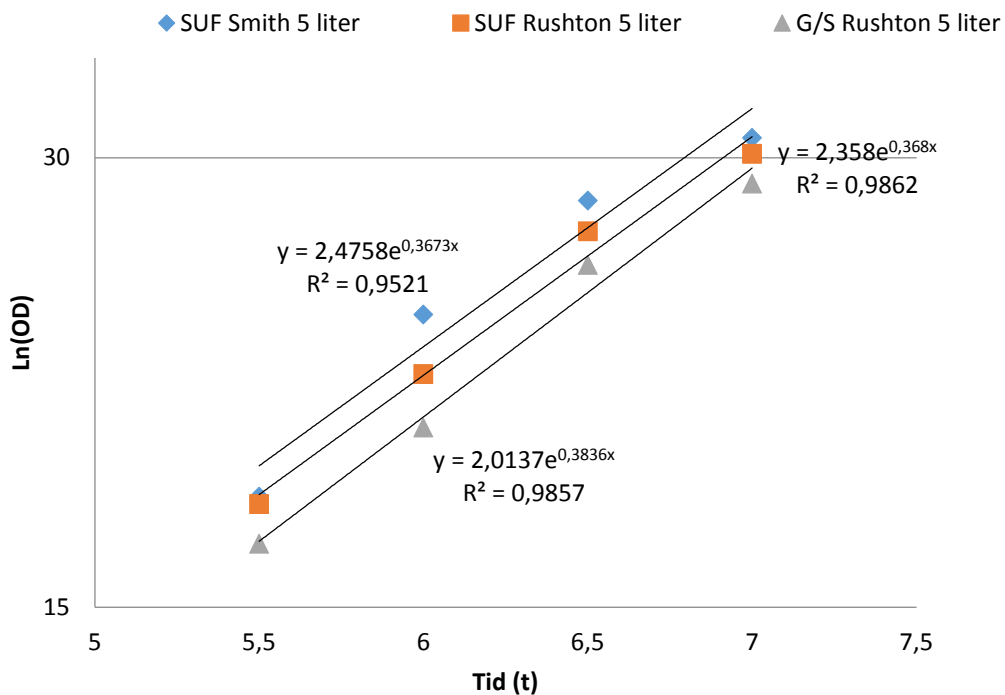


Figur 31 Sammenhængen mellem OD og DW for alle fermenterings forsøgene

Figur 32 og Figur 33 Viser  $\mu_{max}$  værdien for konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter med 3 og 5 liter. Hers ses en  $\mu_{max}$  værdien, som er næsten ens for alle fermenter typer.



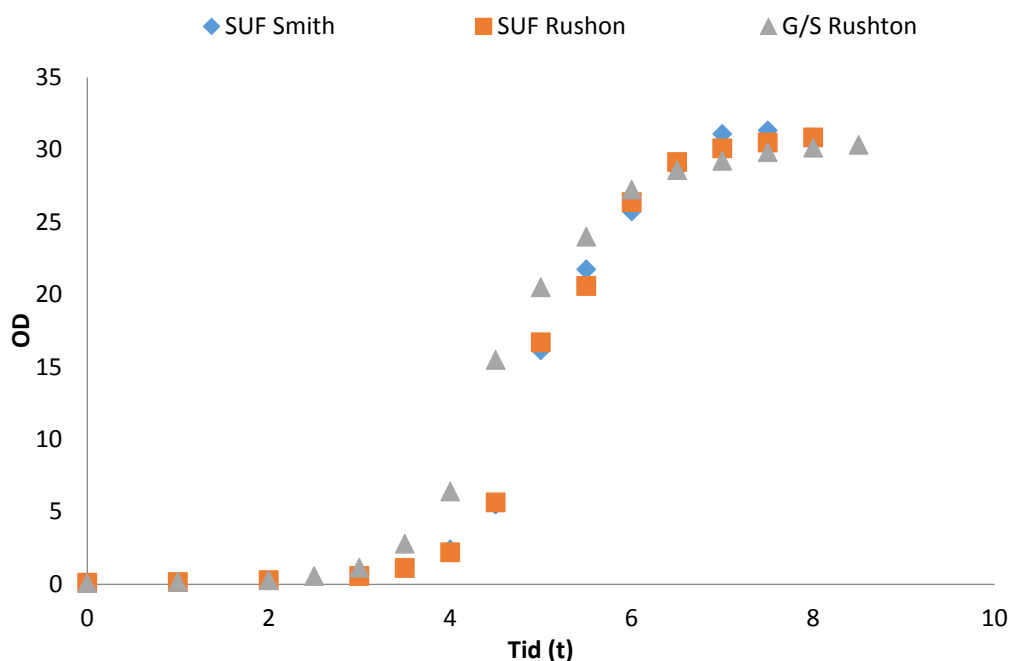
Figur 32  $\mu_{max}$  for 2 l konventionelle glas/stål fermenter og 3 l engangs-fermenter



Figur 33  $\mu_{max}$  for 5 l konventionelle glas/stål - og engangs-fermenter

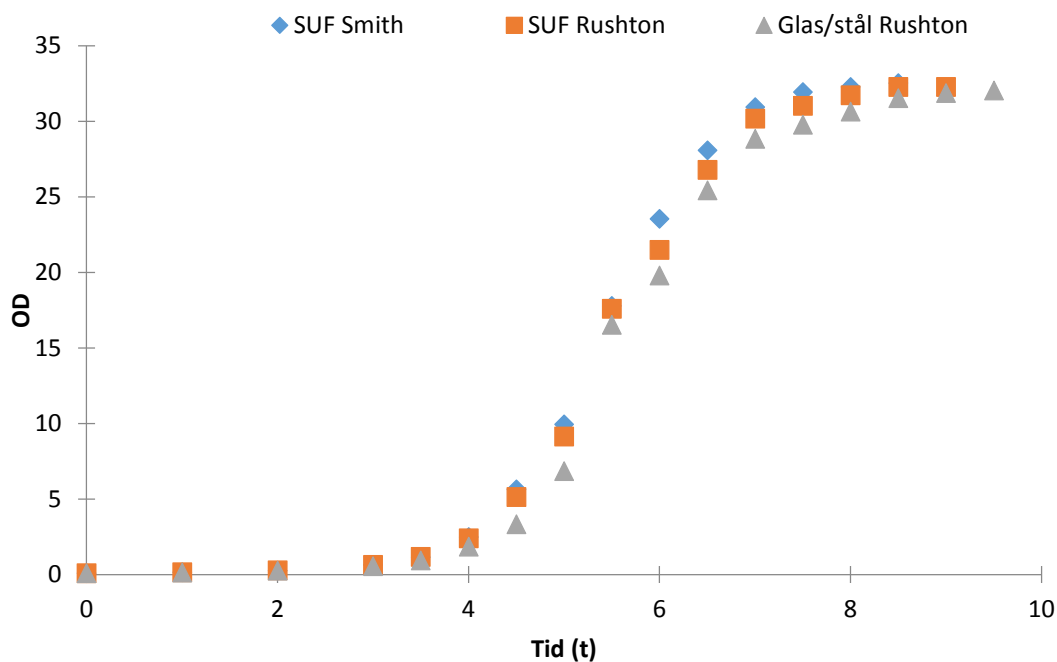
Beregningseksempel af  $\mu_{max}$  findes i appendiks D

Figur 34 viser OD målinger for 2 l konventionelle glas/stål- og 3 l engangs-fermenter. Her ses en lagfase, en eksponentiel fase og en stationærefase, som er ens for alle typer fermenter



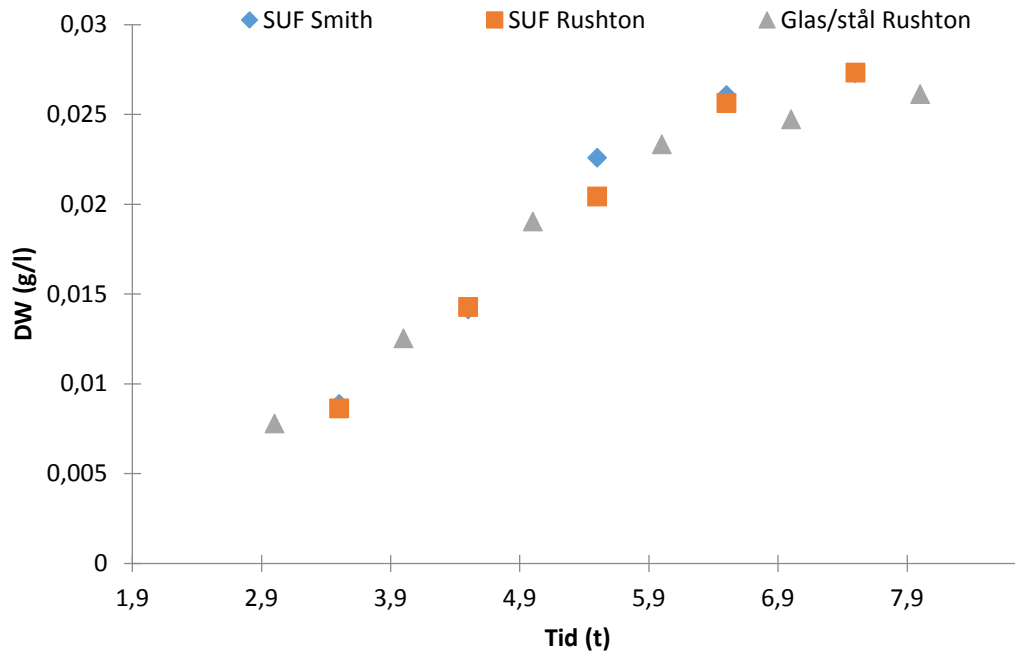
Figur 34 OD målinger gennem fermenterings forløbet for 2 l konventionelle glas/stål- og 3 l engangs-fermenter

Figur 35 viser OD målinger for 2 l konventionelle glas/stål- og 3 l engangs-fermenter. Her ses en lagfase, en eksponentiel fase og en stationærefase, som er ens for alle typer fermenter



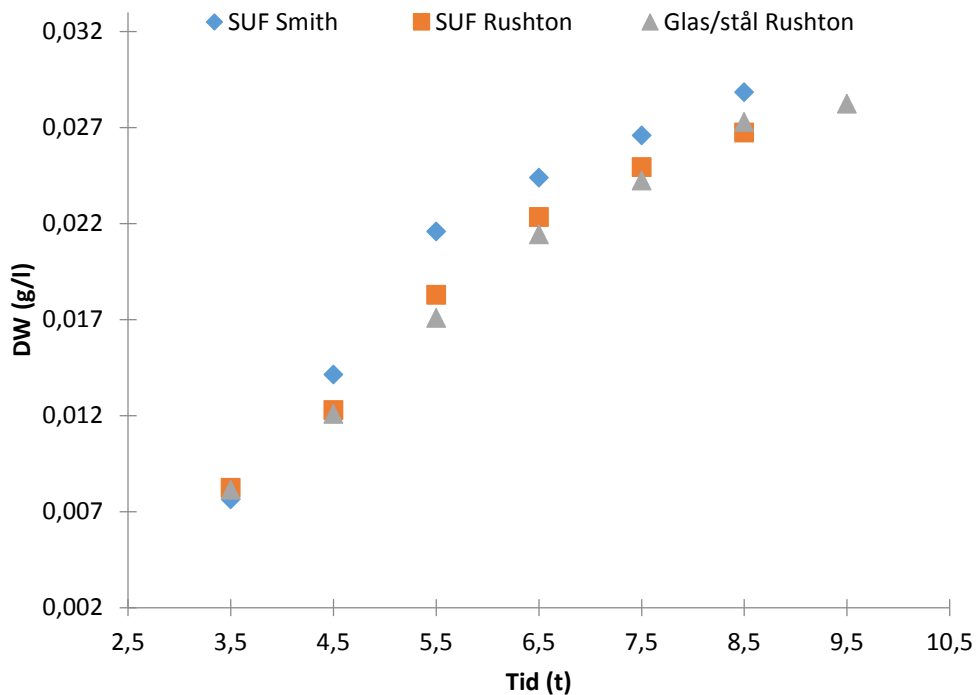
Figur 35 OD målinger gennem fermenterings forløbet for 5 l konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter

Figur 36 viser (DW) målinger for 2 l konventionelle glas/stål fermenter og 3 l engangs-fermenter. Figuren viser at DW vokser eksponentielt for alle typer fermenter.



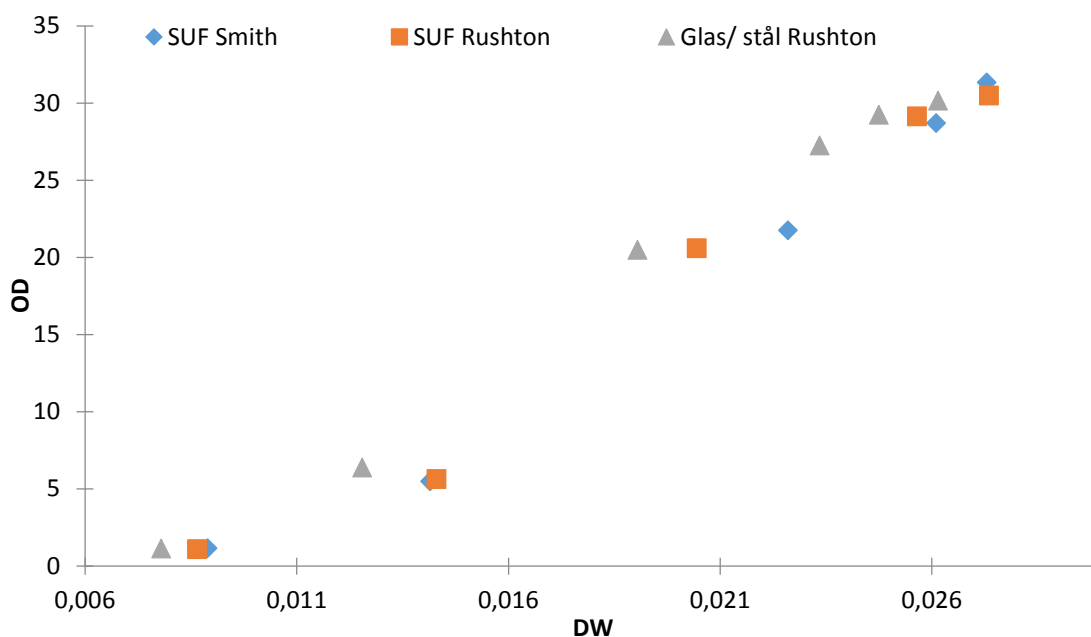
Figur 36 DW målinger gennem fermenterings forløbet for 2 l konventionelle glas/stål fermenter og 3 l engangs-fermenter

Figur 37 viser DW målinger for 2 l konventionelle glas/stål fermenter og 3 l engangs-fermenter. Figuren viser at DW vokser eksponentielt for alle typer fermenter



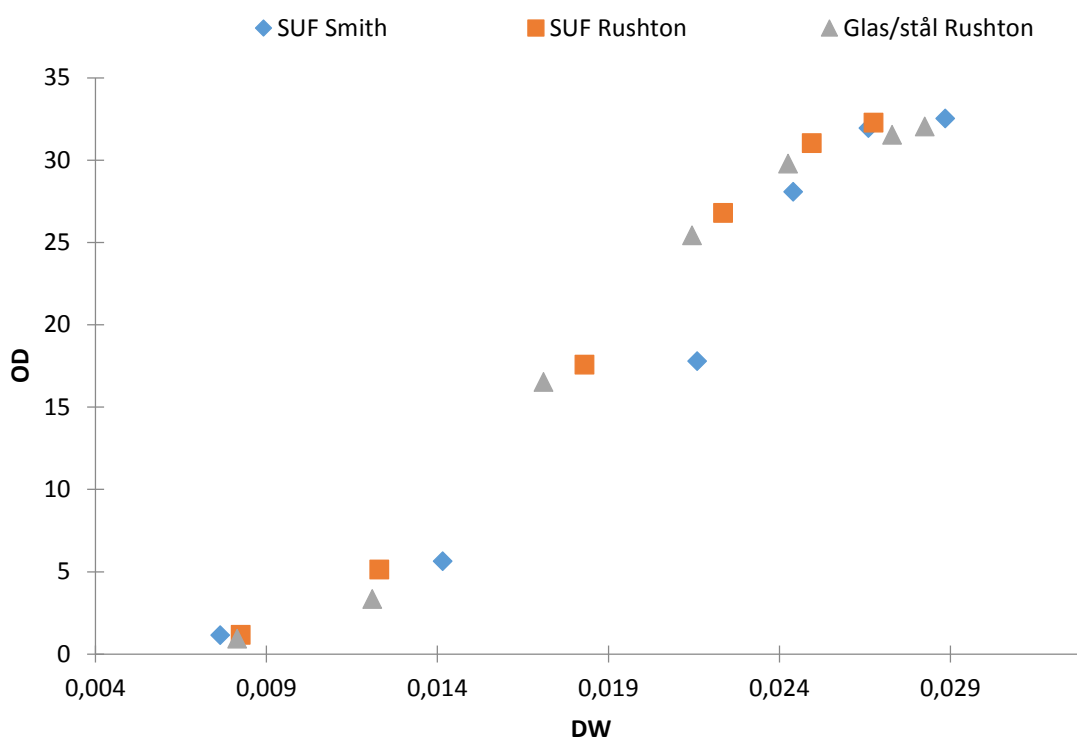
Figur 37 DW målinger gennem fermenterings forløbet for 5 l konventionelle glas/stål - og engangs-fermenter

Figur 38 viser sammenhængen for OD og DW for 2 l konventionelle glas/stål - og 3 l engangs- fermenter. Her ses at OD og DW har et lineært forhold for begge typer fermenter.



Figur 38 Sammenhængen mellem OD og DW for 2 liter konventionelle glas/stål- og 3 liter engangs-fermenter

Figur 39 viser sammenhængen for OD og DW for 5 l konventionelle glas/stål - og engangs- fermenter. Her ses at OD og DW har et lineært forhold for begge typer fermenter.



Figur 39 Sammenhængen mellem OD og DW for 5 liter konventionelle glas/stål - og engangs-fermenter



## KLa værdier

Til KLa bestemmelse anvendes de samme parametre, som er vist i Tabel 3 bortset fra omrøringshastighed. Her anvendes omrøringshastighederne 1000, 1500, 2000 rpm for de forskellige fermenter typer.

Tabel 5 viser tidsperioder for alle de anvendte fermenter typer til bestemmelse af KLa værdier ved det forskellige omrøringshastigheder (500,1000,1500 og 2000 rpm)

**Tabel 5 Omrøringshastigheder og tidsperioder for de anvendte fermenter typer til bestemmelse af KLa værdier**

| SUF                                   |         |         |         |         |         |         | Glas/stål |         |         |         |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|
| Type                                  | 3 liter | 3 liter | 5 liter | 5 liter | 5 liter | 5 liter | 2 liter   | 2 liter | 5 liter | 5 liter |
| <b>Omrørings-<br/>Hastighed (rpm)</b> | 1000    | 1500    | 500     | 1000    | 1500    | 2000    | 1000      | 1500    | 1000    | 1500    |
| <b>Tidsperiode<br/>(min)</b>          | 1½-2    | 1-1,15  | 5       | 2-2½    | 1½-2    | 1-1½    | 1½        | 1½      | 1½      | 1½      |

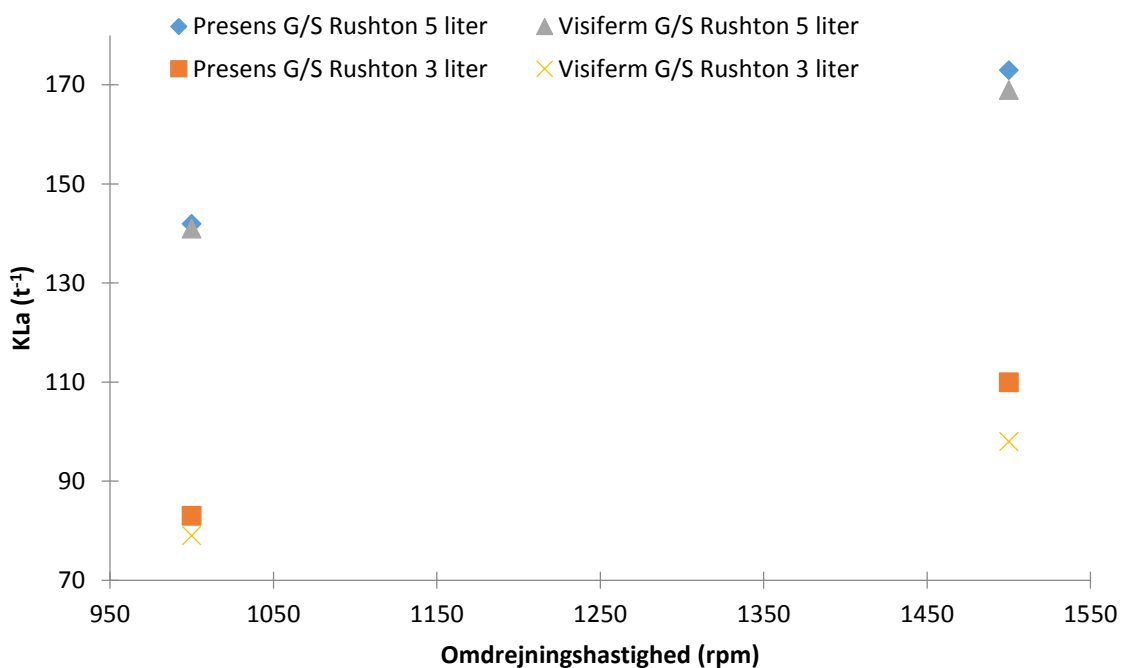
## Konventionelle glas/stål fermenter

Tabel 6 Viser KLa værdien for 2 og 5 l konventionelle glas/stål fermenter ved anvendelse af Presens og Hamilton Visiform sensorer. Her ses at KLa værdierne ved anvendelse af Presens sensor stemmer fint overens med KLa værdier målt med Hamilton sensor

**Tabel 6 KLa værdier for 2 og 5 liter konventionelle glas/stål fermenter med Presens og Hamilton Visiform sensorer**

| Type                            | KLa værdier(t <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------|-------------------------------|
| <b>Presens sensor</b>           |                               |
| Rushton 5 liter 1000 rpm        | 142                           |
| Rushton 5 liter 1500 rpm        | 173                           |
| Rushton 2 liter 1000 rpm        | 83                            |
| Rushton 2 liter 1500 rpm        | 110                           |
| <b>Hamilton Visiform sensor</b> |                               |
| Rushton 5 liter 1000 rpm        | 141                           |
| Rushton 5 liter 1500 rpm        | 169                           |
| Rushton 2 liter 1000 rpm        | 79                            |
| Rushton 2 liter 1500 rpm        | 98                            |

Figur 40 viser sammenhængen mellem KLa værdierne for 2 og 5 l konventionelle glas/stål fermenter ved anvendelse af 2 sensorer, Presens og Visiform. Her ses at KLa værdien stiger med stigende fermenter størrelse. Desuden ses at KLa værdien for de to nævnte sensorer er næsten ens.



Figur 40 Sammenhængen mellem KLa værdier for 2 og 5 l konventionelle glas/stål fermenter med Presens og Hamilton Visiform sensor

Beregningseksempel af KLa værdien findes i appendiks E

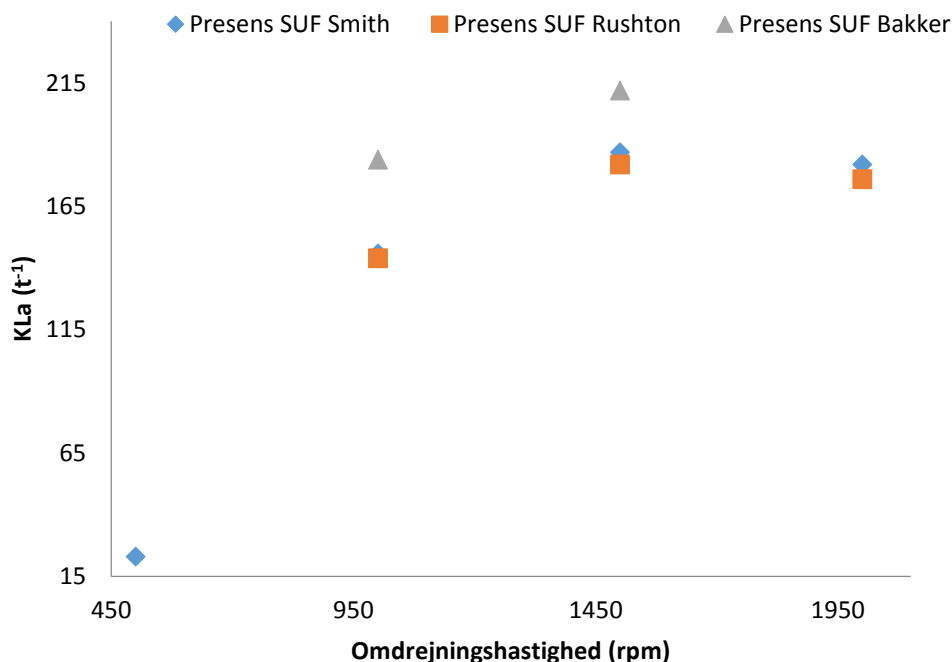
### Engangs-fermenter

Tabel 7 Viser KLa værdier for 5 l engangsfermenter med Rushton, Smith og Bakker turbiner ved en omrøringshastighed fra 500 -2000 rpm, og anvendelse af Presens sensor.

Tabel 7 KLa værdier for 5 l engangsfermenter ved anvendelse af Presens sensor

| Presens sensor           |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| Type                     | KLa værdier (t <sup>-1</sup> ) |
| Rushton 5 liter 1000 rpm | 144                            |
| Rushton 5 liter 1500 rpm | 182                            |
| Rushton 5 liter 2000 rpm | 176                            |
| Smith 5 liter 500 rpm    | 23                             |
| Smith 5 liter 1000 rpm   | 146                            |
| Smith 5 liter 1500 rpm   | 187                            |
| Smith 5 liter 2000 rpm   | 182                            |
| Bakker 5 liter 1000 rpm  | 184                            |
| Bakker 5 liter 1500 rpm  | 212                            |

Figur 41 Viser sammenhængen mellem KLa værdierne for 5 l engangs-fermenter ved anvendelse af Presens sensor. Her ses at KLa værdien stiger med stigende omrøringshastighed, dog ikke ved 2000 rpm, og forskellen er ret stor mellem 500 rpm og 1000 rpm. Samt ses at KLa værdien er næsten ens for Smith og Rushton turbiner, men er lidt større Bakker turbinen.



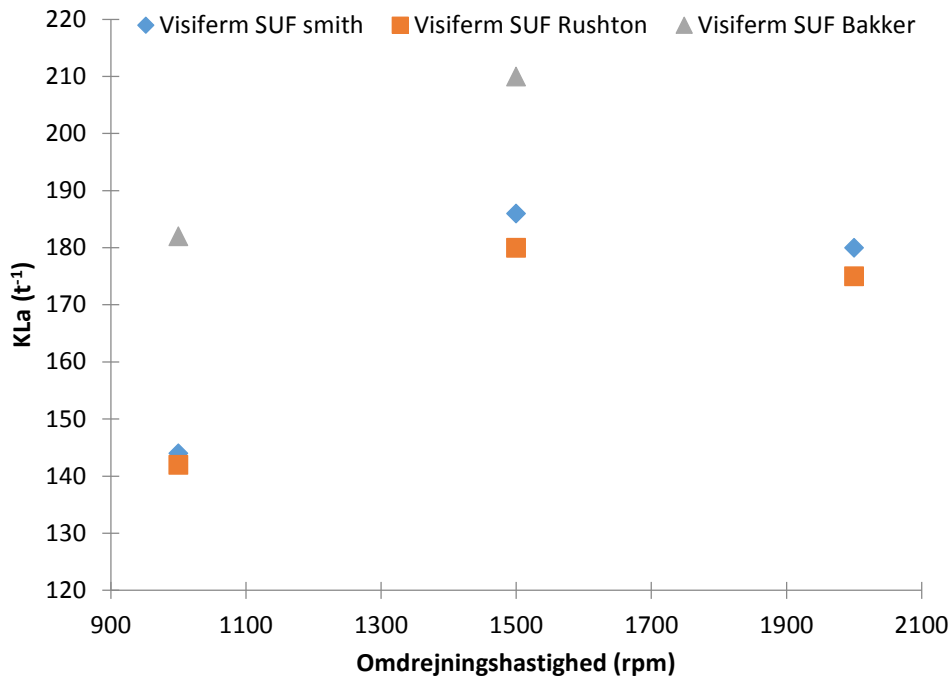
Figur 41 Sammenhængen mellem KLa værdier for 5 liter engangsfermenter ved anvendelse af Presens sensor

Tabel 8 Viser KLa værdier for 5 l engangsfermenter med Rushton, Smith og Bakker turbiner ved en omrøringshastighed ved 1000 - og 1500 rpm, som er målt med Hamilton Visiform sensorer.

Tabel 8 KLa værdier for 5 liter engangsfermenter ved anvendelse af Hamilton Visiform sensor

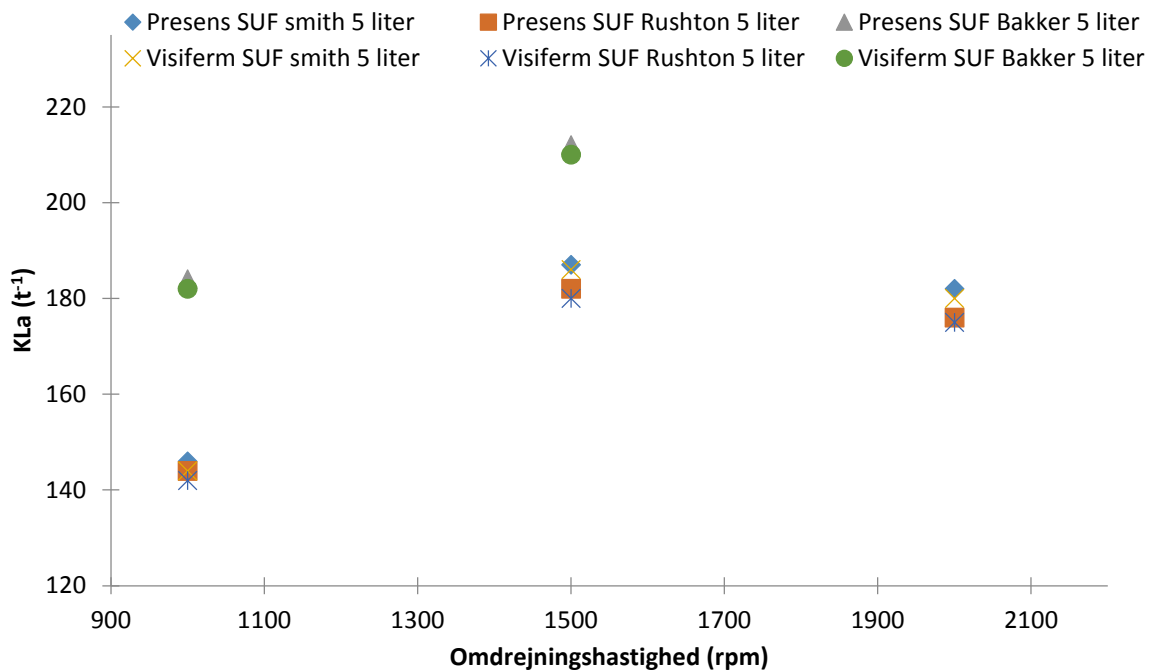
| Hamilton Visiform sensor |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| Type                     | KLa værdier (t <sup>-1</sup> ) |
| Rushton 5 liter 1000 rpm | 142                            |
| Rushton 5 liter 1500 rpm | 180                            |
| Rushton 5 liter 2000 rpm | 175                            |
| Smith 5 liter 1000 rpm   | 144                            |
| Smith 5 liter 1500 rpm   | 186                            |
| Smith 5 liter 2000 rpm   | 180                            |
| Bakker 5 liter 1000 rpm  | 182                            |
| Bakker 5 liter 1500 rpm  | 210                            |

Figur 42 Viser sammenhængen mellem  $KLa$  værdier for 5 liters engangs-fermenter ved anvendelse af Hamilton Visiform sensorer. Her ses at  $KLa$  værdien stiger med stigende omrøringshastighed, dog ikke ved 2000 rpm. Samt ses at  $KLa$  værdien er næsten ens for Smith og Rushton turbiner, men er lidt større Bakker turbinen.



Figur 42 Sammenhængen mellem  $KLa$  værdier for 5 liter engangs-fermenter ved anvendelse af Hamilton Visiform sensor

Figur 43 Viser sammenhængen mellem Presens og Hamilton Visiform sensorer for 5 l engangs-fermenter. Her ses ingen forskel på  $KLa$  værdier.  $KLa$  værdier stemmer fint overens for de to anvendte sensorer.



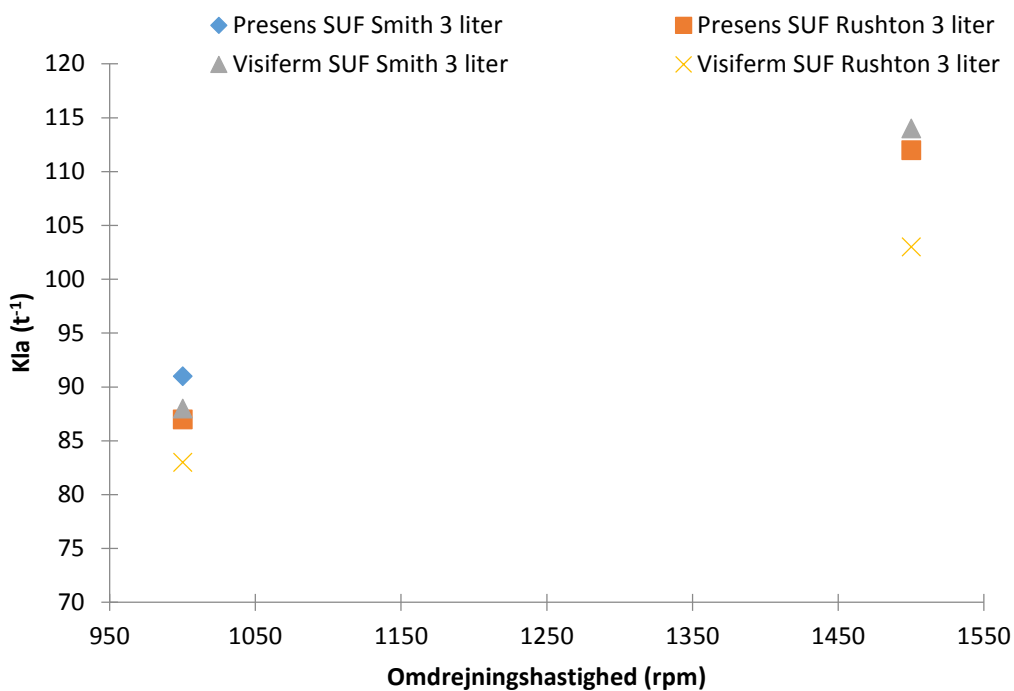
Figur 43 Sammenhængen mellem Presens og Hamilton Visiform sensorer for 5 l engangsfermenter

Tabel 9 Viser KLa værdier for 3 l engangsfermenter med Smith og Rushton turbiner ved en omrøringshastighed på 1000 - og 1500 rpm, og er blevet målt Presens og Hamilton Visiform sensorer.

Tabel 9 KLa værdier for 3 liter engangsfermenter ved anvendelse af Presens og Hamilton Visiform sensorer

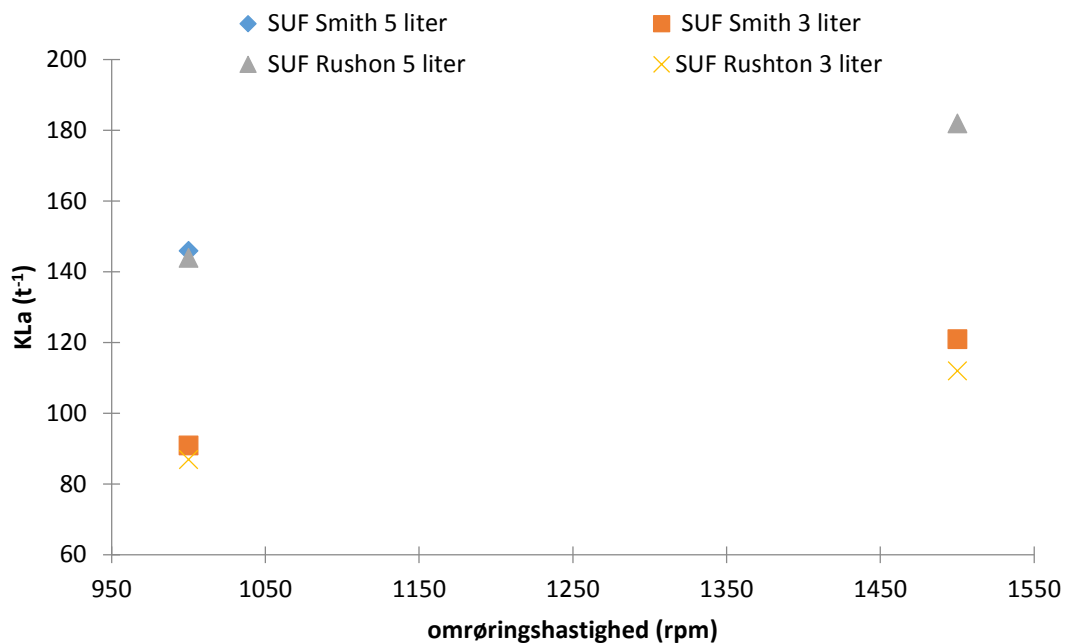
| Presens sensor           |                   |
|--------------------------|-------------------|
| Type                     | KLa værdier (1/t) |
| Rushton 3 liter 1000 rpm | 87                |
| Rushton 3 liter 1500 rpm | 112               |
| Smith 3 liter 1000 rpm   | 91                |
| Smith 3 liter 1500 rpm   | 121               |
| Hamilton Visiform sensor |                   |
| Rushton 3 liter 1000 rpm | 83                |
| Rushton 3 liter 1500 rpm | 103               |
| Smith 3 liter 1000 rpm   | 88                |
| Smith 3 liter 1500 rpm   | 114               |

Figur 44 Viser sammenhængen mellem KLa værdier for 3 l engangs-fermenter ved anvendelse af Presens og Hamilton Visiform sensorer. KLa værdien målt med Presens sensor stemmer fint overens med KLa værdier målt med Hamilton Visiform sensorer



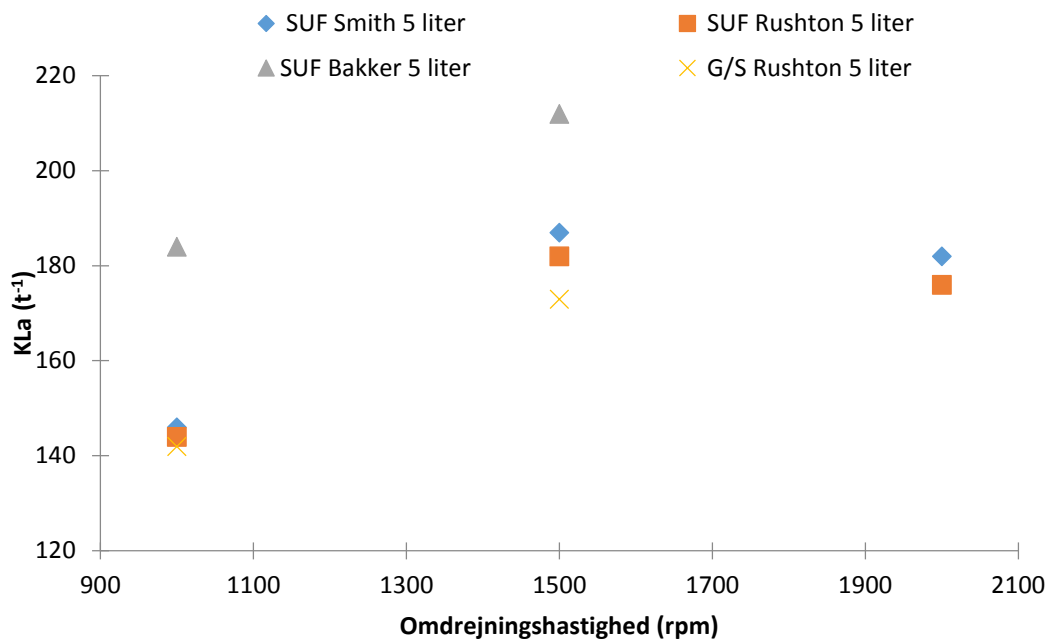
Figur 44 Sammenhængen mellem KLa værdier for 3 liter engangs-fermenter ved anvendelse af Presens og Hamilton Visiform sensorer

Figur 45 sammenlign af KLa værdierne for 3 og 5 l engangs-fermenter med Rushton og Smith turbiner. Her ses at KLa værdien stiger med stigende fermenter størrelse for både Rushton og Smith turbinen.



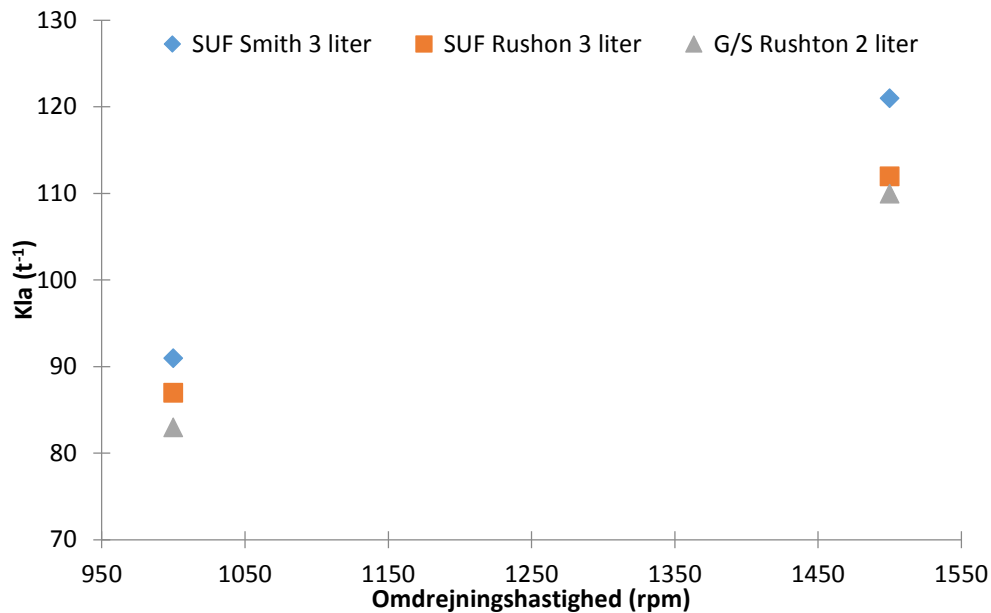
Figur 45 Sammenligner KLa værdien for de 2 forskellige størrelser engangs-fermenter

Figur 46 viser sammenligningen af 5 l konventionelle glas/stål fermenter med 5 l engangs-fermenter ved anvendelse af Presens sensor. Her ses at KLa værdien stemmer fint overens mellem KLa værdien for engangs-fermenter med Rushton og Smith turbiner og konventionelle glas/stål fermenter med Rushton turbiner. Dog ses at KLa værdien er højere ved anvendelse af Bakker turbinen.



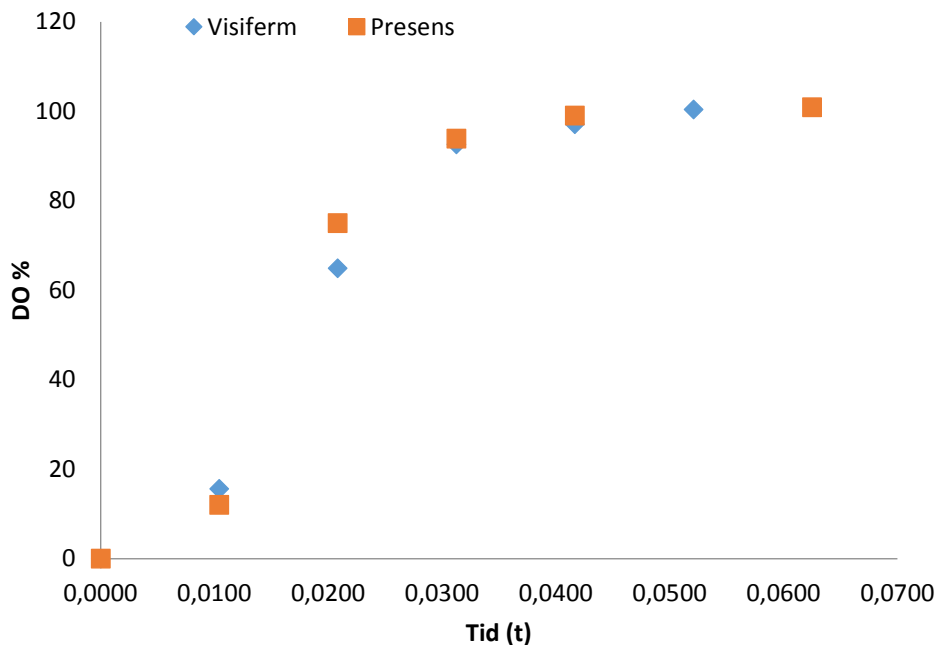
Figur 46 Sammenligning af 5 l konventionelle glas/stål fermenter og 5 l engangs-fermenter ved anvendelse af Presens sensorer

Figur 47 Viser KLa værdier for 2 liters konventionelle glas/stål fermenter og 3 liters engangs-fermenter ved anvendelse af Presens sensor. Her ses at KLa værdien stemmer fint overens mellem KLa værdien for engangs-fermenter med Rushton og Smith turbiner og konventionelle glas/stål fermenter med Rushton turbiner.



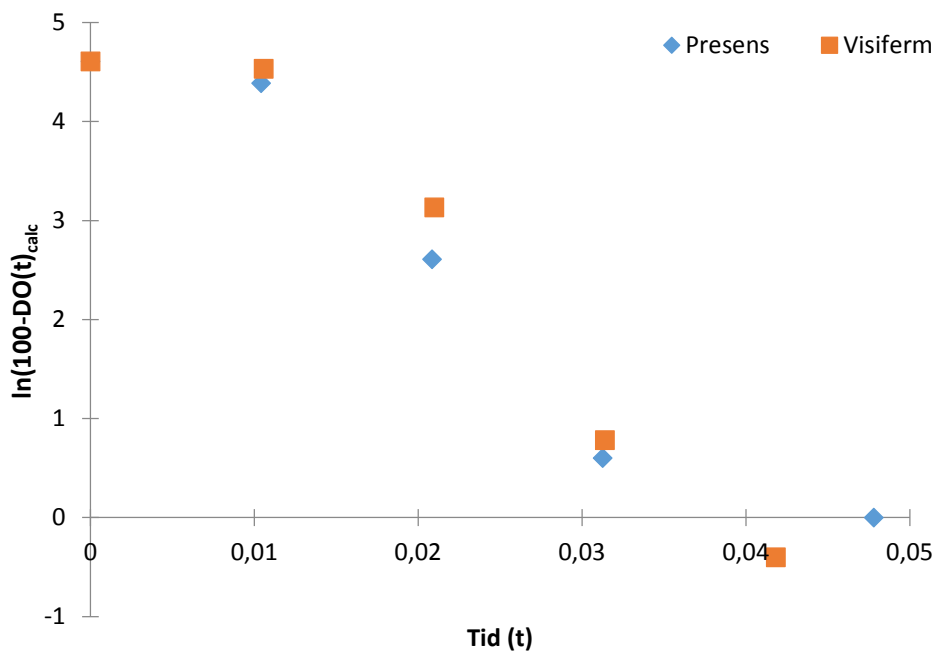
Figur 47 Sammenligning af 2 liters konventionelle glas/stål fermenter med 3 liters engangs-fermenter ved anvendelse af Presens sensorer

Figur 48 viser målinger af opløst oxygen og målt med Presens og Hamilton Visiform sensorer. Her ses, at målinger for opløst oxygen for begge sensorer er næsten ens og der er ingen tidsforskel imellem dem.



Figur 48 Målinger af opløst oxygen % over tiden målt med Presens - og Hamilton Visiform sensorer

Figur 49 viser DO koncentrationer målt med Presens og Hamilton Visiform sensorer. Her ses, at DO koncentrationen for begge sensorer er næsten ens og der er ingen tidsforskel imellem dem.



Figur 49 DO koncentration over tiden målt med Presens og Hamilton Visiform sensorer

Tabel 10 Viser effektforbruget af Koll Morgn motor ved anvendelse af de forskellige fermenter typer, som er anvendt i dette projekt. Her ses at effektforbruget stiger med stigende omrøringshastighed, samt stiger effektforbruget med stigende fermenter størrelse. Den højeste effektforbrug ses ved anvendelse af engangsfermenter med Bakker turbinen.

Tabel 10 Effektforbruget af Koll Morgan motor ved anvendelse af de forskellige fermenter typer

| Omdrejningshastighed (rpm) | SUF                |                      |                    |                      |                     |                     | Glas/stål            |                      |
|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
|                            | Smith 3 liter Watt | Rushton 3 liter Watt | Smith 5 liter Watt | Rushton 5 liter Watt | Bakker 5 liter Watt | Smith 13 liter Watt | Rushton 2 liter Watt | Rushton 5 liter Watt |
| 0                          | 19,7               | 19,6                 | 19,8               | 19,5                 | 19,6                | 19,8                | 20                   | 20,1                 |
| 500                        | 30,2               | 32,6                 | 36,8               | 37,6                 | 40,2                | 66,2                | 37,1                 | 51,2                 |
| 1000                       | 39,5               | 38,6                 | 55,9               | 56,4                 | 126,7               | 167,9               | 54,5                 | 82,4                 |
| 1500                       | 41,8               | 42,1                 | 111,7              | 113,4                | 308,1               |                     | 79,1                 | 137,5                |
| 2000                       | 43,8               | 44,6                 | 203,6              | 204,5                |                     |                     | 93,4                 | 225,1                |



## Diskussion

I dette afsnit vil vækst data og KLa værdier blive sammenlignet for konventionelle glas/stål fermenter i forhold til engangs-fermenter. Spørgsmålet vil være om engangs-fermenter kan opnå de samme resultater som en konventionelle glas/stål fermenter. Samtidig vil resultater for omrøringshastighed, turbiner, bioreaktor størrelser og sensorer blive sammenlignet. Derudover diskuteres økonomi, fordel og ulemper ved anvendelse af konventionelle glas/stål fermenter i forhold til engangsfermenter. Til sidst diskuteres hvordan fremtiden vil være med engangs-teknologien og om det overhoved kan lad sig gøre at undlade alle konventionelle glas/stål fermenter.

Figur 29 og Figur 30 viser at OD og DW er voksende over en given tidsperiode for alle typer fermenter. Figur 29 viser hvordan OD vokser igennem fermenteringsforløbet, hvor der ses en lagfase, en eksponentiel fase, en deceleration fase og en stationær fase som er illustreret i Figur 2. Figur 2 viser en typisk vækstkurve for en bakteriel population. Det ses at OD og DW værdierne er ikke signifikant forskellige for alle typer fermenter, hvilket er forventet da den samme vildtype *E.coli* stamme er dyrket i alle typer bioreaktorer.

Figur 31 viser sammenhængen mellem DW og OD for alle fermenter, hvor Figur 38 og Figur 39 viser sammenhængen mellem DW og OD for de to forskellige størrelser fermenter. På alle 3 figurer ses et lineært forhold mellem OD og DW, hvilket betyder at de forskellige fermenter typer ikke har en betydning i dette studie for den dyrkede bakterie. Dette er som forventet, da det er den samme *E.coli* bakterie som bliver dyrkede. Målingen af DW er en meget følsom metode og der vil være nogle usikkerheder som medfører afvigelser fra linearitet. Dette ses heldigvis ikke ved de målte data for dette projekt. Da forholdet mellem OD og DW viser et lineært forhold, vil det betyde at OD og tørvægt vokser proportionalt med hinanden.

Figur 32 og Figur 33 viser værdien af den specifikke væksthastighed  $\mu_{max}$  for både konventionelle glas/stål - og engangs-fermenter. Ud fra Figur 29 ses at eksponentiel fasen finder sted mellem 4,5 og 7 timer. Derfor bestemmes  $\mu_{max}$  ved dette tidsperiode. Både Figur 32 og Figur 33 viser at alle typer fermenter har ikke en signifikant forskel på  $\mu_{max}$ , og er på omkring  $0,3 \text{ t}^{-1}$ . Dette er som forventede, da det er den samme bakterie som er groet op i alle typer bioreaktor. Men en specifikke væksthastighed på  $0,3 \text{ t}^{-1}$  er et lavt værdi for en *E.coli* bakterie. Den specifikke væksthastighed burde være omkring  $0,6 \text{ t}^{-1}$  for en *E.coli* bakterie, som er groet op i et LB medie.

Den lave værdi kan skyldes, at det er en langsom voksende bakterie i et LB medie. Da en bakterier kan ændre deres fysiologi eller endda deres fænotype under forskellige vækstbetingelser [80]. Desuden kan den lave værdi skyldes, at organismen er modificeret så sukkeret går til at producere et produkt, og den derfor ikke danner så meget biomasse.

Desuden beskriver ariklen [80], at et autoklaveret LB medie giver et lavt specifikt væksthastighed i modsætning til filter-steriliseret LB medie, som giver et højere specifikt væksthastighed. Dette kan også være en grund til opnåelse af en lavt specifikt væksthastighed i dette projekt, da det anvendte LB medie blev autoklaveret og ikke filter- steriliseret.

Figur 34 til Figur 37 viser at OD og DW målt for en *E.coli* bakterie dyrket i LB medie ved anvendelse af konventionelle glas/stål fermenter stemmer fint overens med OD og DW målinger fra engangs-fermenter for alle typer fermenter. Dette kan tyde på at engangs-fermenter kan opnå de samme resultater som konventionelle glas/stål fermenter, under disse betingelser som vi udsætter dem for.

Til dette projekt anvendes en 13 l engangs-fermenter med Smith turbine, som er designet af virksomheden Cercell. Pga. tidsbegrænsning er de målte data desværre kun for en enkelt bestemmelse og ikke af dobbelt

bestemmelse. Alligevel kan disse data indikere, at 13 l engangs-fermenter kan opnå de samme OD, DW og  $\mu_{\max}$  værdier som de andre fermenter typer. Dette er som forventede under vores betingelser, da vi kører batch forsøg, og derfor ikke ser hvad der sker når der er mange celler som f.eks. i en fed-batch, hvor KLa værdien kan have en indflydelse på max OD f.eks.

Generelt stiger KLa værdien med stigende omrøringshastighed og beluftningshastighed. Dette stemmer fint overens med teorien [85], [86]

For konventionelle glas/stål fermenter viser Figur 40 at KLa værdien stiger med stigende omrøringshastighed. Dette gælder også for engangs-fermenter, som ses i Figur 41 og Figur 44. Dette stemmer fint overens med artiklen [87], som også viser at KLa værdien stiger med stigende omrøringshastighed. Omrøringshastigheden er en af de afgørende parameter for tilstrækkelig oxygen overførsel og homogen blanding af næringsstoffer i fermenteringssystemer. Samtidige er omrøringshastigheden en afgørende parameter for opnåelse af lav eller høj KLa værdi. En lav omrøringshastighed kunne forårsage utilstrækkelig blanding af næringsstoffer og oxygenmasseoverførsel vil være begrænset. Mens kraftig omrøringshastighed kan mekanisk skade mikrobielle celler ved at udøve høj forskydningspænding, som i sidste ende vil påvirke KLa værdien og udbytte af biomasse [87]. Dette ses af Figur 41, her er KLa værdien mindre ved 2000 rpm i forhold til 1500 rpm. På samme måde for en lav omrøringshastighed, ved 500 rpm opnås et meget lille KLa værdi som er urealistisk i forhold til KLa værdier ved 1000 og 1500 rpm. Desuden vil luftbobler ved lav omrøringshastighed sidde fast i bunden af sensoren. Dette vil medføre nogle utilstrækkelig DO koncentrationer.

I dette projekt sættes beluftningshastigheden til at være konstant (1 vvm) igennem alle forsøgene. Dette skyldes at der skal være balance mellem beluftning og omrøring for at opnå en optimal og realistisk KLa værdi [87].

Figur 45 viser at KLa værdien stiger jo større en fermenter bliver. Dette skyldes at KLa værdien er proportional afhængig af grænseoverfladearealet.

oxygen overførselshastighed er en vigtig parameter i opskalering. Da oxygen overførselshastigheden styrer den samlede frekvens af en bio-proces og bestemmer kapaciteten af en bioreaktor [81]. Der findes rigtig mange metoder til bestemmelse af KLa værdien, dog findes der ingen metoder som sikre den samme KLa værdi for f.eks. en dobbelt bestemmelse, som kører med de samme drift betingelser. Dette kan skyldes at boblerne ind i en fermenter kan opleve forskellige fortyndingsniveauer afhængig af deres størrelse og forbrugt opholdstid i systemet. Som følge heraf, kan boblerne i systemet på ethvert tidspunkt have mange forskellige størrelser og opførsler, som hver har en mere eller mindre forskelligartede oxygenkoncentration [82]. Derfor bliver KLa værdien ofte fordrevet af teoretiske modeller, som er baseret på mere grundlæggende principper for at sikre en nøjagtige KLa værdi [83], [84].

Men den anden grund til de betydelige problemer vedrørende nøjagtigheden af KLa værdien, og hyppige uoverensstemmelser mellem forsøgsdata er, den stærke indflydelse af den type og størrelse fermenter har, påvirkning af fysisk-kemiske egenskaber på hydrodynamik pga. høj viskositet af væsken og dens reologiske adfærd [84]. Dette ses af Figur 46 og Figur 47, hvor KLa værdien er lidt forskellig afhængig af om det er konventionelle glas/stål fermenter eller engangs-fermenter med forskellige turbinetyper. I dette projekt anvendes saltmedie til bestemmelse af KLa værdi, derfor vil viskositeten og den reologiske adfærd ikke spille en stor rolle, da saltmediet vil have den samme viskositet igennem hele forsøget.

For 3 liters engangs-fermenter viser Figur 44 at KLa værdien er større ved anvendelse af Smith turbinen i forhold til Rushton turbinen. For 5 liters engangs-fermenter viser Figur 41 og Figur 42 at der opnås den højeste KLa værdi ved anvendelse af Bakker turbinen, og ligeledes opnås en højere KLa værdi ved anvendelse af Smith turbinen i forhold til Rushton turbinen. Dette skyldes, at Smith turbinen har en højere gas spredning i forhold til Rushton turbinen. Bakker turbinen har langt højere gas spredning i forhold til Smith turbinen, som illustreret i Figur 13. Figur 13 viser gas sprednings niveau for Rushton, Smith og bakker turbiner. Effekt

tallet kan også forklare evnen af gas spredning. Ifølge [88] ses at Bakker turbine har det mindste effekttal, som er på 2,5 og Rushton turbinen har et effekt tal mellem 4,5-6,5. Og jo lavere effekt tallet er jo bedre gas spredning vil turbinen have, og dette vil selvfølgelig medføre en højere oxygen overførselshastighed.

Figur 46 og Figur 47 viser at KLa værdier for konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter med Rushton turbinen er ikke signifikant forskellige. Tabel 6 viser at KLa værdien for konventionelle glas/stål er på  $142 \text{ t}^{-1}$ . Desuden viser Tabel 7 at KLa værdien for engangs-fermenter med Rushton turbinen er på  $144 \text{ t}^{-1}$ . Dette betyder at engangsfermenter opnår samme resultater som konventionelle glas/stål fermenter under disse betingelser som vi udsætter dem for.

Tabel 5 Viser at tidsperioden for bestemmelse af KLa værdien for konventionelle glas/stål fermenter er ens for både 2 og 5 liter bioreaktor ved 1000 og 1500 rpm. For engangsfermenter ses at tidsperioden er lidt anderledes for alle bioreaktor typer ved 1000, 1500 og 2000 rpm. Dog ses en stort forskel i tidsperioden for 500 rpm i forhold til 1000, 1500 og 2000 rpm. Forholdet imellem omrøringshastighed og koncentration af opløst oxygen er, at jo hurtigere omrøringshastigheden, jo kortere tid vil opnåelse af opløst oxygen koncentrationen fremkomme [89]. Dette kan ikke helt stemme overens for de eksperimentelle data i dette projekt, da der ikke ses noget tids forskelle for 2 og 5 liter konventionelle glas/stål fermenter ved 1000 og 1500 rpm. Men der ses stor forskel mellem 500 rpm og 1000 rpm. Dette viser også god sammenhæng med KLa værdier, da der også ses stor forskel for KLa værdier for 500 rpm i forhold til KLa værdier ved 1000 rpm.

Figur 43 viser at KLa værdier målt med Presens sensor stemmer fint overens med KLa værdier målt med Hamilton Visiferm sensor. Tabel 7 viser en KLa værdi målt med Presens sensor på  $144 \text{ t}^{-1}$ . Tabel 8 viser en KLa værdi på  $144 \text{ t}^{-1}$  målt med Hamilton Visiferm sensor Dette er som forventet, da begge sensorer er optiske sensorer og måler DO koncentrationer i en fermenter på samme tid under samme drift betingelser. Figur 48 og Figur 49 Viser opløst oxygen % og DO koncentrationer målt med Presens og Hamilton Visiferm sensorer. Her ses at de to grafer er næsten ens og forløber over den samme tidsperiode. Dette viser, at de to sensorer, som er optiske begge to fungerer på samme måde og kan levere de samme resultater, som forventet.

Ud fra Tabel 4 ses det at tidsperioden for fermenteringsforløbet er anderledes for de forskellige fermenter typer. Jo større fermenter jo længere tid vil fermenteringsforløbet være. Samtidig viser Tabel 4 at et fermenteringsforløb med en konventionel glas/stål fermenter tager længere tid end en engangs-fermenter. Tidsperioden er længere for engangs-fermenter med Rushton turbinen i forhold til Smith turbinen.

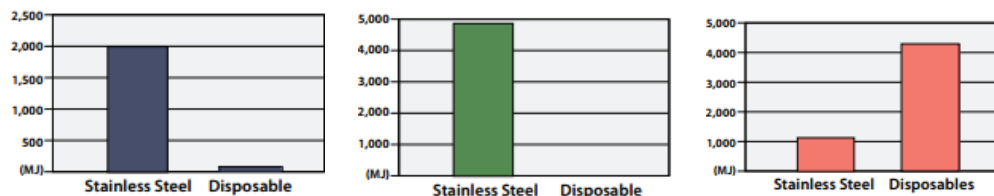
KLa værdien for 2 liters engangs-fermenter blev ikke målt ved 2000 rpm, da en fermenter er lille og ikke kunne klare en høj omrøringshastighed. For konventionelle glas/stål fermenter blev KLa værdien kun målt til en omrøringshastighed på 1500 rpm. Dette skyldes at den anvendte motor ikke var en Biostat motor men en Koll Morgan motor. Biostats motor kan kun kører op til en omrøringshastighed på 1200 rpm. Koll Morgan motor havde en strømgrænse på 1 ampere, som svarer til 1750 rpm, dvs. motoren kunne ikke kører ved højere hastighed end 1750 rpm for konventionelle glas/stål fermenter og engangs-fermenter med Bakker turbinen. Da Bakker turbinen har en større turbinediameter i forhold til Smith og Rushton.

Tabel 10 viser effektforbruget af Koll Morgan motor for de anvendte fermenter. Det ses at effektforbruget stiger med stigende omrøringshastighed. Dette skyldes at motoren bruger mere energi jo flere kræfter der forbruges. Desuden ses det at jo større turbinediameteren er jo højere vil energien blive. En 5 liters engangs-fermenter med Bakker turbine bruger mere energi end en 5 liters engangs-fermenter med Rushton og Smith turbine. Dette skyldes at Bakker turbinen har en større diameter i forhold til de to andre nævnte. Det betyder, at størrelsen af turbinen spiller en stor rolle i effektforbruget. Samtidigt har størrelsen af en fermenter også en store rolle på effektiviteten. Jo større en fermenter er, jo mere vil energiforbruget være. Effektforbruget for en 2 liters konventionel glas/stål fermenter er næsten den samme som en 5 liters engangs-fermenter. Dette kan f.eks. skyldes at designet og udformning af de to bioreaktorer kan også have en betydning. Ud over

effektforbruget for selve bioreaktoren har Bruce Rawlings og H  l  ne Pora [16] beregnet, at engangs-fermenter bruger halvdelen af den samlede energiforbrug i forhold til konventionelle glas/stål fermenter. Dette stemmer fint overens med det målte effektforbrug, som er vist i Tabel 10. Dog ses det at effektforbruget for engangs-fermenter bliver halveret i forhold til konventionelle glas/stål fermenter ved høje omrøringshastigheder (1000-2000 rpm) og er næsten den samme ved lave omrøringshastigheder (500 rpm).

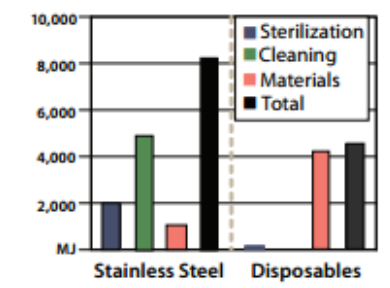
Der har været stor fokus på de miljømæssige konsekvenser af engangs-fermenter de seneste år. Denne udvikling har været drevet af mange faktorer, herunder bekymringer over milj  endringer, emissioner og energiforbrug; hurtigt stigende omkostninger og restriktioner for bortskaffelse af affald; større rolle anerkendelse af engangs-fermenter i bio-processer. Af disse grunde skal proces designere og brugere være i stand til at vurdere og give oplysninger om miljøbelastningen og bæredygtigheden af deres fremstilling af systemer. Denne opgave kan være meget vanskelig og udfordrende, især for komplekse flertrins processer, uanset om man inddrager konventionelle glas/stål fermenter eller engangs-fermenter. Lokale faktorer som restriktioner på bortskaffelse af affald eller vandressourcer, energi omkostninger, osv. vil også spille en afgørende rolle i enhver vurdering [90],[91],[92],[93].

I en undersøgelse, som fokuserer på energiforbruget udført i California [91] bliver tre vigtige funktioner analyseret for energiforbrug: sterilisering, rengøring, og materialer. Energiforbrug for andre aspekter af denne processen blev udelukket, herunder transport- og installationsomkostninger (som er begge forholdsvis ubetydelig sammenlignet med de centrale funktioner).



Figur 50 Energiforbrug: Sterilisering Rengøring Materialer [91]

Figur 50 viser energiforbruget som funktion af sterilisering, rengøring og materialer for glas/stål- og engangs-fermenter. For sterilisering viser det sig at glas/stål fermenter bruger mest energi, pga. den høje udgift til dampudvikling og varmekapacitet. Engangs-fermenter bliver steriliseret med gamma bestråling. Energiforbruget for gamma bestråling er lavt i forhold til damp og varme. For rengøring viser det sig igen at glas/stål fermenter bruger mest energi og dette skyldes højt energiforbrug for produktion af destilleret vand. For materialer er det engangs-fermenter, som bruger mest energi. Hvilket skyldes at materialet af engangs-fermenter kun anvendes en gang og derefter skal forbrændes, hvor glas/stål fermenter kan anvendes i op til 600 produktionsbatch.



Figur 51 Det samlede energiforbrug [91]

Figur 51 viser det samlede energiforbrug for glas/stål- og engangs-fermenter. Her viser figuren, at glas/stål fermenter bruger dobbelt så meget energi i forhold til engangs-fermenter [91],[94],[95]. Dette vil være et godt grundlag for at anvende engangs-fermenter, da energiforbruget er ret dyr.

Varmebelastning i en fermenter er summen af omrøringseffekten, metabolisk varme fra kulturen, fordampningskøling på væskeoverfladen, sensibel varme i gas strømmen, og varmetabet til miljøet [96]. For mikrobielle systemer kan fri varme og fordampningskøling imidlertid negligeres, da de er forholdsvis lav. Varmetabet til miljøet, er også lav på grund af den ydre beholders vægs isolering, og derfor bidrager varme fra agitation og kultur stofskifte mest til varmebelastning.

Engangs-fermenter har en lavere varmeoverførelseskoefficient sammenlignet med konventionelle glas/ stål fermenter. Varmeoverførelseskoefficienterne af engangs-fermenter er ca. halvdelen af konventionelle glas/stål fermenter og er afhængig af lineær tykkelse og formulering. De nedsatte varmeoverførelses hastigheder udgør en øget udfordring ved at opretholde en passende temperatur for hurtigt voksende mikrobielle kulturer i engangs-fermenter [97].

## Fremtiden

Brugen af engangs-fermenter er næsten fire dobbelt siden 2005 ifølge undersøgelsen 2009 BioPlan Associates [16]. Der er stadig stigning i antallet af bio-virksomheder, som anvender engangs-fermenter for at reducere omkostninger og arbejdstid. Her skal reduktion af omkostninger lige understreges. Hos akademiske laboratorier vil dette ikke være en fordel, da akademiske laboratorier ikke har en fast indtægt ligesom virksomheder. På den måde vil omkostninger stige i stedet for at blive reduceret.

Spørgsmålet er nu, i hvilken retning vil engangsteknologien gå hen i fremtiden? Hvor langt vil grænsen for opskalering indenfor engangs-fermenter være, og er det muligt at opskalere på samme måde som konventionelle glas/stål fermenter?

På trods af de åbenlyse besparelser i anlægsinvesteringer, omkostninger og forbedrede anlægsoperationer, er det usandsynligt, at engangs-fermenter vil eliminere brugen af konventionelle glas/stål fermenter [16]. ATMI Craig [16] antyder at der er visse størrelses begrænsninger og fysiske begrænsninger, som skal overvejes, inden afgørelsen om anvendelse af engangs-fermenter. "Fermenter større end 2.000 L vil bliver uhåndterlig og svære at håndtere," siger Craig. Derfor vil konventionelle glas/stål fermenter være en bedre løsning ved anvendelse i storskala.

I fremtiden vil der med stor sandsynlighed være hybride operationer, hvor virksomheder vil anvende konventionelle glas/stål og engangs-fermenter. Ikke desto mindre vil den stigende anvendelse af engangs-fermenter fortsætte med at stige, og driftseffektiviteten vil blive forbedret og omkostninger vil blive lavere, men konventionelle glas/stål fermenter vil aldrig blive elimineret fuldstændige [16].

## Konklusion

Projektets formål var at sammenligne procesparametre for konventionelle glas/stål - og engangs- fermenter. Dette er blevet opnået ved at bestemme vækstdata for en vildtype *E.coli* bakterie, og ved bestemmelse af KLa værdier for de forskellige fermenter typer med forskellige omrøringshastighed.

Vækstdata viste et ikke signifikant forskel for konventionelle glas/stål- og engangsfermenter. Dette tyder på at engangs-fermenter kan levere de samme resultater som konventionelle glas/stål fermenter. Vækstdata for *E.coli* bakterie viste et OD max omkring 30, en specifik væksthastighed omkring  $0,3 \text{ t}^{-1}$  og en DW max omkring  $0,028 \text{ g/l}$  for alle bioreaktor typer. Det ses desuden en lineær sammenhæng mellem OD og DW for alle bioreaktor typer.

Bestemmelse af KLa værdier viste, at KLa værdien stiger med stigende omrøringshastighed. Den største KLa værdi opnås af 5 l engangs-fermenter med Bakker turbine ved 1500 rpm og er på  $212 \text{ t}^{-1}$ . Desuden ses at KLa værdien er på  $23 \text{ t}^{-1}$  for engangs-fermenter med Smith turbinen ved 500 rpm. Dette er en rigtig lav værdi og er urealistisk i forhold til KLa værdier ved 1000, 1500 og 2000 rpm. Desuden er KLa værdien ved 2000 rpm lidt lavere end KLa værdien ved 1500 rpm, da en meget høj omrøringshastighed kan påvirke KLa værdien.

Desuden har teorien påvist, at ved høje omrøringshastigheder vil tidsperioden for opnåelse af opløst oxygen være kort. Dette ses desværre ikke ved alle omrøringshastigheder i dette projekt. Tidsforskellen mellem 1000 og 2000 rpm er lille for både 3 og 5 liters engangs-fermenter, hvorimod mellem 500 og 1000 rpm ses en stor tidsforskel. For konventionelle glas/stål fermenter ses ingen forskel i tidsperioden for de forskellige omrøringshastigheder og forskellige fermenter størrelser.

Størrelsen af en fermenter viste at have en indflydelse på KLa værdien. Jo større en fermenter er, jo højere vil KLa værdien være. KLa værdien for en 5 liters engangs-fermenter med Rushton turbine har en KLa værdi på  $144 \text{ t}^{-1}$  ved en omrøringshastighed på 1000 rpm. Hvor en 3 liters engangs-fermenter med Rushton turbine har en KLa værdi på  $87 \text{ t}^{-1}$ . Dette skyldes at KLa værdien er afhængig af grænseoverfladearealet.

Når der ses på KLa værdier mellem konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter med Rushton turbiner ses at værdierne er næsten ens. KLa værdien for en 5 liters konventionel glas/stål fermenter med Rushton turbine er på  $142 \text{ t}^{-1}$  ved 1000 rpm. Hvor KLa værdien for en 5 liters engangs-fermenter med Rushton turbine er på  $144 \text{ t}^{-1}$ . Dette betyder, at konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter kan levere det samme resultat, under disse betingelser som vi udsætter dem for. Det samme gælder for 2 liters konventionelle glas/stål fermenter og 3 liters engangs-fermenter.

Anvendelse af Presens og Hamilton Visiferm sensorer viser nogle KLa værdier som stemmer fint overens med både konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter. For en 2 liters konventionel glas/stål fermenter er KLa værdien på  $83 \text{ t}^{-1}$  ved anvendelse af Presens sensor. Hvor KLa værdien ved anvendelse af Hamilton Visiferm sensor er på  $79 \text{ t}^{-1}$  for den samme fermenter. Hvilket betyder at de to optiske sensorer kan levere samme resultat.

Ligeledes er der set på forskellen af KLa for de forskellige anvendte turbiner. Her ses at Bakker turbinen har den højeste KLa værdi, som er på  $212 \text{ t}^{-1}$ . Dernæst kommer Smith turbinen, som har en KLa værdi på  $187 \text{ t}^{-1}$ , og til sidst Rushton turbinen med en KLa værdi på  $182 \text{ t}^{-1}$ . Dette skyldes at Bakker turbinen har et større gas sprednings niveau i forhold til Smith - og Rushton turbinen. Desuden hænger det fint sammen med effekt forbruget for de 3 ovennævnte turbiner. Bakker turbinen har den mindste effekt, derefter kommer Smith og til sidst Rushton turbinen. Jo lavere effekt tallet er jo mere energiforbrug vil turbine bruge og jo høje vil ilt masseoverføringshastigheden være.

Effektforbruget til at drive en roterende impeller i en fluid er stærkt påvirket af omrøringshastigheden. Teoretisk vil en fordobling af omrøringshastigheden kræve 8 gange effekten. I dette projekt ses det netop, at effektforbruget stiger voldsomt med stigende omrøringshastigheden.

Det samlede energiforbrug for anvendelse af konventionelle glas/stål- og engangs-fermenter kan deles op i 3 punkter:

1. Sterilisering
2. Rengøring
3. Materialer

Det ses at konventionelle glas/stål fermenter bruger mere energi til sterilisering og rengøring i forhold til engangs-fermenter. Men for materialer er det engangs-fermenter, som bruger mest energi. Samlede set viser det sig, at konventionelle glas/stål fermenter bruger dobbelt så meget energi som engangsfermenter.

Der findes ingen data, videnskabelige artikler der beskriver energiforbruget der medgår til fremstilling af hverken glas, stål eller polymerer der benyttes til fremstilling af bioreaktor eller fermenter. Der findes en række artikler fra Andrew Sinclair [98] og Eric Langer [99] der begge konkluderer betydelige besparelser på facilitets investering, i tid for omstilling mellem processer, omkostning i drift, væsentlig reduceret forbrug af vand og energi. Dette emne ligger dog uden for dette projekt at undersøge.

## Referencer

- [1] P. Guertin, "Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture Chapter Contents 20.1," 2011.
- [2] T. Gauthier, J. Thibault, and A. LeDuy, "Measuring  $k_La$  with Randomly Pulsed Dynamic Method," *Biotechnol. Bioeng.*, pp. 889–893, 1991.
- [3] M. L. Schuler and F. Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. 1992, pp. 277–281.
- [4] L. A. Tribe, C. L. Briens, and A. Margaritis, "Determination of the volumetric mass transfer coefficient ( $k_La$ ) using the dynamic gas out-gas in method: Analysis of errors caused by dissolved oxygen probes."
- [5] C. Case, "Microbial Fermentations: Changing The Course Of Human History." [Online]. Available: [http://www.accessexcellence.org/LC/SS/ferm\\_background.php](http://www.accessexcellence.org/LC/SS/ferm_background.php). [Accessed: 22-Dec-2014].
- [6] J. Villadsen, "Dansk Bioteknologis historie – de første 75 år - Biokemisk Forening," *Institut for Kemiteknik og BioCentrum-DTU*. [Online]. Available: <http://www.biokemi.org/biozoom/issues/508/articles/2201>. [Accessed: 21-Dec-2014].
- [7] "FERMENTATION." [Online]. Available: <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/SeniorLab/Fermentation/>. [Accessed: 30-Dec-2014].
- [8] P. F. Stanbury, A. Whitaker, and S. J. Hall, *Principles of Fermentation Technology, chapter 1* . .
- [9] M. G. Ijoma, "Microbial growth kinetics."
- [10] "Undervisnings materiale."
- [11] "Bioenergi," in *Et undervisningsmateriale af GRØNVISION*, .
- [12] Biotech Academy, "Laboratoriemaual teori og øvelser."
- [13] "Konventionelle glas/stål fermenter." [Online]. Available: <http://www.tritechinc.com/mm5/graphics/00000001/images/350x350-hanil-liflus-gx-fermentor.jpg>. [Accessed: 15-Dec-2014].
- [14] P. Stobbe, CerCell Aps, "SUF." [Online]. Available: <http://cercell.com/products/bactovessel-config-suf/>. [Accessed: 15-Dec-2014].
- [15] H. Z. Labtimes, "The Art of Mixing," 2014.
- [16] C. Mintz, "Single - use, Disposable products: A 'State Of The Industry ' Update," *Life Sci. Lead.*, 2009.
- [17] M. Trotter, "Single-Use and Disposable Systems and Devices in the Biopharm Industry."



- [18] B. Bader and B. Barnoon, "Lifecycle Cost Analysis for Single-Use Systems." [Online]. Available: <http://www.biopharminternational.com/lifecycle-cost-analysis-single-use-systems?id=&pageID=1&sk=&date=>. [Accessed: 25-Dec-2014].
- [19] N. M. G. Oosterhuis and F. H. Van Dongen, "A Single-Use Bioreactor for Both Cell and Microbial Cultures," pp. 7–8, 2011.
- [20] E. Houtzager, R. van der Linden, G. de Roo, S. Huurman, P. Priem, and P. C. Sijmons, "Linear Scale-Up of Cell Cultures The Next Level in Disposable Bioreactor Design," *Bioprocess Int.*
- [21] R. D. Chu L, "Industrial Choices of Protein Production By Large-Scale Cell Culture," *Curr. Opin. Biotechnol.*, pp. 180–187, 2001.
- [22] G. R. Riesenbergs D, "High Cell Density Cultivation of Microorganisms," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 422–430, 1999.
- [23] Williams JA, "Keys to Bioreactor Selections.," *CEP Mag.* 98(3), pp. 34–41, 2002.
- [24] A. M. Trotter, "Adoption of Single-use Disposable Technology in Biopharma Industries," *Rev. Am. Pharm. Bus. Technol.*
- [25] R. J and B. R, "Economics of vaccine production using virus like particles in insect cell culture.," no. Interphex. Philadelphia, PA,, 2008.
- [26] G. Lye, J. Hubbuch, T. Schroeder, and E. Willmann, "Shrinking the Costs of Bioprocess Development," 2009.
- [27] B. H. Junker, "Scale-Up Methodologies for Escherichia coli and Yeast Fermentation Processes," *J. Bio. Bioeng.*, pp. 347–364, 2004.
- [28] D. De Wilde, T. Dreher, Z. Christian, H. Ute, G. Gerhard, A. Thorsten, and C. Fenge, "Superior Scalability of Single-Use Bioreactors," *Bioprocess Int.*
- [29] C. Löffelholz, "Bioengineering Parameters for Single-Use Bioreactors:," *Overv. Eval. Suitable Methods*, no. Chemie Ingenieur Technik 85(1–2), pp. 40–56, 2013.
- [30] P. O. Barradas, "Evaluation of Criteria for Bioreactor Comparison and Operation Standardization for Mammalian Cell Culture," *Eng. Life Sci.* 12, pp. 518–528, 2012.
- [31] L. DECHEMA and G. Lahnstein, "Gemeinsame Sitzung der Ausschuesse 'Technische Reaktionen' und 'Technische Reaktionsfuehrung' und 'Mischvorgaenge,'" *Germany*, 1993.
- [32] T.A. Post, "Axial Flow Mixing Impeller Improves Bioreactor Performance," *7th Eur. Conf. Mix.*, vol. Brugge, Be, 1991.
- [33] K. Lally, "Mass Transfer/A315 Advantages," *Banff, Alberta, Canada*, 1991.
- [34] J. Villadsen, J. Nielsen, and G. Lidén, "Bioreaction Engineering Principles," 2011.

- [35] A. W. Nienow, "Hydrodynamics of Stirred Bioreactors," *Appl. Mech. Rev.*, vol. 51, no. 1, p. 3, Jan. 1998.
- [36] "Improving mixing processes," *BRG Gr.*, 2008.
- [37] P. Stobbe, Cercell Aps, "Impeller-principles." [Online]. Available: <http://cercell.com/support/cellvessel-details/impeller-principles/>. [Accessed: 20-Dec-2014].
- [38] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. 1995, p. 145.
- [39] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. 1995, p. 146.
- [40] P. Stobbe, Cercell Aps, "Turbine-principles." [Online]. Available: <http://cercell.com/support/bactovessel-details/turbine-principles/>. [Accessed: 20-Dec-2014].
- [41] P. Stobbe, Cercell Aps, "Turbine-principles." [Online]. Available: <http://cercell.com/support/bactovessel-details/turbine-principles/#prettyPhoto>. [Accessed: 20-Dec-2014].
- [42] K. H. Clement, P. F. Jensen, A. Degn, and K. Thomsen, *Kemiske enhedsoperaioner*. 2009, p. Kapitel 4.
- [43] A. Amanullah, L. Serrano-Carreon, B. Castro, E. Galindo, and A. Nienow, "The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 57, no. 1, pp. 95–108, Jan. 1998.
- [44] F. A. Holland and F. S. Chapman, "Liquid mixing and processing in stirred tank."
- [45] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. 1995, p. 143.
- [46] P. KAUFMAN, P. KUBERA, and T. POST, "FERMENTATION: CRITICAL PROCESS PHENOMENA AND NEW TECHNOLOGY DEVELOPMENTS THAT AFFECT YIELD AND PRODUCTIVITY," vol. 17, 1997.
- [47] K. H. Clement, P. F. Jensen, A. Degn, and K. Thomsen, *Kemiske Enhedsoperaioner*. 2009, p. 119.
- [48] "The use of axial flow down-pumping agitators in biological processes," *Chem. Bus.*, no. Jan2008, Vol. 22 Issue 1, p5.
- [49] K. H. Clement, P. F. Jensen, A. Degn, and K. Thomsen, *Kemiske enhedsoperaioner*. 2009, p. 127.
- [50] K. H. Clement, P. F. Jensen, A. Degn, and K. Thomsen, *Kemiske enhedsoperaioner*. 2009, p. 128.
- [51] P. M. Doran, *Bioprocess engineering principles*. 1995, p. Chapter 6 Mixing.
- [52] K. H. Clement, P. F. Jensen, A. Degn, and K. Thomsen, *Kemiske enhedsoperaioner*. 2009, p. 130.
- [53] K. H. Clement, P. F. Jensen, A. Degn, and K. Thomsen, *Kemiske enhedsoperaioner*. 2009, p. 54.
- [54] S. S. Alves and J. M. T. Vasconcelos, "Optimisation of agitation and aeration in fermenters," *Bioprocess Eng.* 14, vol. 14, pp. 119–123, 1996.

- [55] D. R. Omstead, *Computer control of fermentation processes*. .
- [56] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. 1995, p. 150.
- [57] "Rheology of filamentous fermentation," *Biotechnol. Advances*, 1994.
- [58] Biotechnology and bioengineering, *Effect of biomasse concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology*. 2000, pp. 160–172.
- [59] J. T. M. Bongenaar, J, *A method for characterizing the rheological properties of viscous fermentation broths*, *Biotechnology and bioengineering*. 1973, pp. 201–206.
- [60] H. A. Barnes, J. F. Hutton, and K. Walters, "An introduction to Rheology," 1989.
- [61] K. H. Clement, P. F. Jensen, A. Degn, and K. Thomsen, *Kemiske enhedsoperaioner*. 2009, p. 118.
- [62] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. 1995, p. 142.
- [63] Dechema - working group Upstream processing, "Experimental determination of the volumetric mass transfer coefficient - gassing out- method."
- [64] J. James, "Measuring KLa for better bioreactor performance," 2012.
- [65] T. Polestar, "Measuring kLa Without Biologicals," p. 2011, 2011.
- [66] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. 1995, pp. 199–201.
- [67] K. James, "Measuring kLa for Better Bioreactor Performance," 2012.
- [68] P. F. Stanbury, A. Whitaker, and S. J. Hall, *Principles of Fermentation Technology, chapter 9*. .
- [69] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. 1995, p. 203.
- [70] W. Nienow, A. D. J. Wisdom, and J. C. Middleton, "The effect of scale and geometry on flooding, recirculation and power in gassed stirred vessels," *Pap. F1, 2nd. Eur. Conf. Mix.*, no. Cambridge, 1977.
- [71] V. Riet and J. Tramper, "Basic bioreactor design," *Marcel Dekker, New york*, 1991.
- [72] J. J. Heijnen and V. Riet, "Mass transfer, mixing and heat transfer phenomena in low viscosity bubble column reactors," *Chem. Eng. J. 28, B21*, 1984.
- [73] D. Marks, "Equipment Design Considerations for Large-Scale Cell Culture. *Cytotechnol.* 42," pp. 21–33, 2003.
- [74] G. T. Banks, "Aeration of moulds and streptomycete culture fluids. *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*," vol. 1, pp. 72–110, 1977.
- [75] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. 1995, p. 205.

- [76] "Presens sensor." [Online]. Available: <http://www.presens.de/products/brochures/category/sensor-probes/brochure/oxygen-probes.html>. [Accessed: 25-Dec-2014].
- [77] "Presens sensor." [Online]. Available: <http://www.presens.de/products/brochures/category/sensor-probes/brochure/non-invasive-oxygen-sensors.html>. [Accessed: 25-Dec-2014].
- [78] P. Stobbe, Cercell Aps, "Visiform." [Online]. Available: [http://cercell.com/media/1473/visiform\\_flyer\\_english.pdf](http://cercell.com/media/1473/visiform_flyer_english.pdf). [Accessed: 25-Dec-2014].
- [79] P. Stobbe, Cercell Aps, "Bio-mass-sensors." [Online]. Available: <http://cercell.com/support/sensor-details/bio-mass-sensors-in-general/>. [Accessed: 25-Dec-2014].
- [80] M. Berney, H.-U. Weilenmann, J. Ihssen, C. Bassin, and T. Egli\*, "Specific Growth Rate Determines the Sensitivity of Escherichia coli to Thermal, UVA, and Solar Disinfection," *Appl Env. Microbiol.*, vol. 72, pp. 2586–2593, 2006.
- [81] F. Garcia-Ochoa and E. Gomez, ". Estimation of oxygen mass transfer coefficient in stirrer tank reactors using artificial neuronal networks," *Enzym. Microb Techno*, vol. 28, 2001.
- [82] A. Brucato, F. Scargiali, and F. Grisafi, "Analysis of the differences in kLa values determined by different variants of the dynamic method in stirred tanks," vol. 11, 2007.
- [83] E. Gomez, V. E. Santos, A. Alcon, and F. Garcia-Ochoa, "Oxygen transport rate on Rhodococcus erythropolis cultures: Effect on growth and BDS capability," *Chem Eng Sci*, vol. 61, 2006.
- [84] P. Gogate, A. Beenackers, and A. Pandit, "Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review," *Biochem Eng*, vol. 6, 2000.
- [85] B. Atkinson, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, 2nd Edition*, Stockton Press, New York, NY, 1991, p. Chapter 12.
- [86] V. Linek, V. Vacek, and P. Benes, "A Critical Review and Experimental Verification of the Correct Use of the Dynamic Method for the Determination of Oxygen Transfer in Aerated Agitated Vessels to Water, Electrolyte Solutions and Viscous Liquids," *Chem. Eng. J.*, vol. 34, pp. 11–34, 1987.
- [87] M. Nadeem, J. I. Qazi, and B. Shahjahan, "Effect of Aeration and Agitation Rates on Alkaline Protease Production by Bacillus licheniformis UV-9 Mutant," *Biochem. J Biochem*, vol. 34, 2009.
- [88] P. Stobbe, Cercell Aps, "Power Number (Np)." [Online]. Available: <http://cercell.com/support/bactovessel-details/turbine-power/>. [Accessed: 29-Dec-2014].
- [89] E. Jackson, "DETERMINATION OF VOLUMETRIC MASS TRANSFER COEFFICIENT IN A STIRRED, SPARGED BIOREACTOR."
- [90] B. Well, "Guide to Disposal of Single-Use Bioprocess Systems," vol. S24–S27, no. BioProcess Int, 2007.
- [91] B. Rawlings and H. Pora, "Environmental Impact of Single-Use and Reusable Bioprocess Systems."

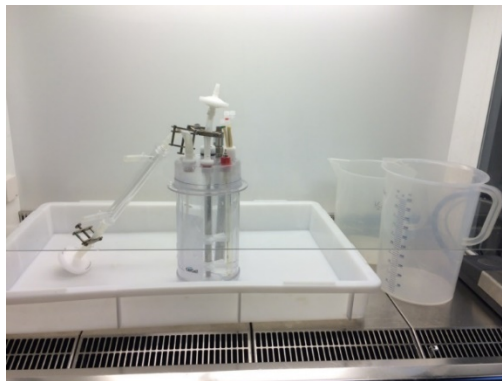
- [92] A. Sinclair and M. Monge, "Concept Facility Based on Single-Use Systems," *Part 2. BioProcess*, vol. S51–S55, 2005.
- [93] P. Liu, "Strategies for Optimizing Today's Increasing Disposable Processing Environments.," *BioProcess*, vol. S10–S1, 2005.
- [94] P. Atkins and J. Paula, *Atkins' Physical Chemistry*. 2006.
- [95] H. Haughney and J. Hutchinson, "Single-Use Systems Reduce Production Timelines," *Gen. Eng. News*, 2004.
- [96] J. Wiley, "Fermentation and Enzyme Technology," no. Nre York, pp. 69–70, 1979.
- [97] jpmoran, "Single-use Technology for Microbial Fermentation," 2014.
- [98] A. Sinclair, "No Titl." [Online]. Available: [www.biopharmservices.com](http://www.biopharmservices.com).
- [99] E. Langer, "No Title." [Online]. Available: [www.bioplanassociates.com](http://www.bioplanassociates.com).

## Appendiks

### A. Fremgangsmåde til vask af engangs-bioreaktor

1. Reaktoren skylles med demineraliseret vand
2. Alle slanger lukkes med klemmer
3. Reaktoren sættes ind i laf bænken med et stort bæger
4. Fyldes op med ethanol
5. Ethanolen hældes over i et bægerglas
6. Fyldes op med ethanol igen
7. Ethanolen hældes over i et bægerglas
8. Reaktoren fyldes op med sterilt vand
9. Vandet hældes ud
10. Reaktoren fyldes op med sterilt vand igen
11. Vandet hældes ud
12. Mediet hældes i reaktoren ind i laf banken
13. Alle sensoren skylles med ethanol 2x og derefter med vand 2x og sætte i reaktoren ind i laf bænken

Fremgangsmåden til vask af engangs-bioreaktor er illustreret i nedenstående Figur 52 og Figur 53.



Figur 52 Engangs-fermenter vaskes med ethanol og sterilt vand i laf bænken



Figur 53 Steril engangs-fermenter med sterilt medie i laf bænken

## B. LB- medie-sammensætning

### 4000 ml LB-medie

- Bacto Tryptone: 40 g
- Bacto Yest extract: 20 g
- NaCl: 40 g
- Antifoam, 50 mL/liter: 200 ml

Alle komponenter afvejes i et 5 L måleglas og tilføres en magnetisk omrører. Måleglasset fyldes op med RO-vand til ca. 3500 ml og lader opløsningen blive opløst under omrøringen. Derefter fyldes måleglasset op til 4000 ml og opløsningen overføres til 5 L Schott flaske. Mediet bør være sterilt før anvendelse, derfor autoklaveres den ved 121°C i 20 min.

## C. NaCl-opløsning

Fremstilling af NaCl-opløsning (10 g / L)

Kemikalier til 1 L NaCl-opløsning (10 g / L):

Fremgangsmåde:

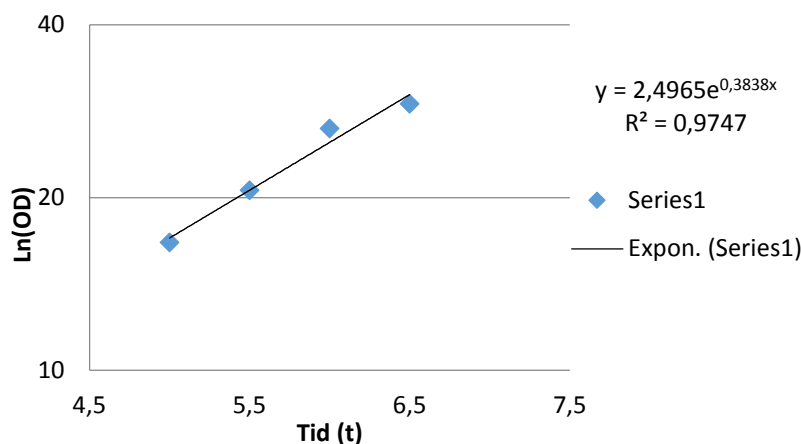
- 10 g NaCl afvejes i et 1 L måleglas
  - Tilføj magnetisk omrører
  - Tilføj cirka 800 ml demineraliseret vand
  - Opløs blandingen
  - Fyld måleglasset op til 1 l med RO-vand
  - Overfør NaCl-opløsning til en 1 L Schott flaske
  - For sterile anvendelser bør NaCl-opløsning autoklaveres (121 ° C, 20 min)
- NaCl-opløsning kan opbevares ved stuetemperatur [63]

## D. Beregning af $\mu_{\max}$

$\ln(\text{OD})$  plottes mod tiden for eksperimentale data fra eksponentiel fasen. Derefter vælges den eksponentielle regression. Og  $\mu_{\max}$  aflæses fra følgende forskrift:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad \text{Ligning 1}$$

Og dette er illustrerede på Figur 54



Figur 54 Eksempel på beregning af  $\mu_{\max}$

## E. Beregning af KLa værdi

Beregning af KLa værdien sker grafisk. Først beregnes y-aksen ved udledning af Ligning 6, som er

$$\ln(C^* - C) = -K_L a * t + c$$

Ude fra Ligning 6 fås

$$\text{Ligning 11} \\ \ln(100 - DO(t)_{\text{calc}})$$

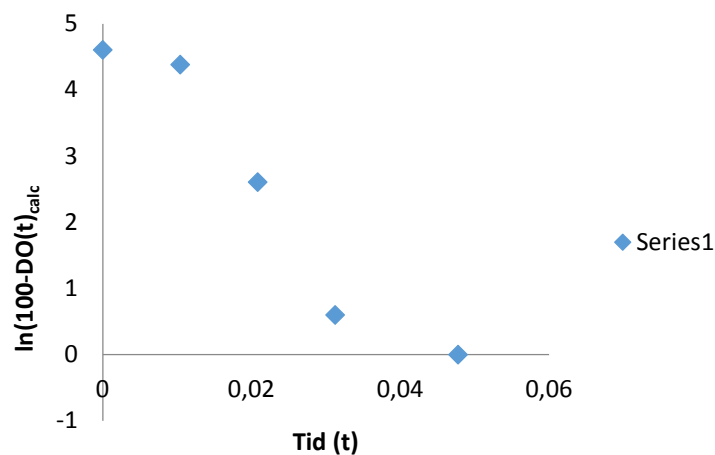
Som er y-aksen i den grafiske analyse.

$DO(t)_{\text{calc}}$  beregnes ved anvendelse af følgende Ligning 12

Ligning 12

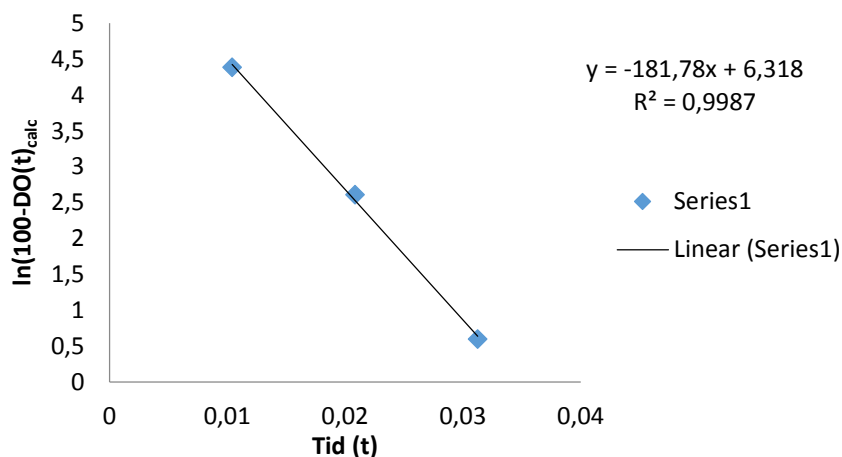
$$DO(t)_{\text{calc}} = \left( \frac{DO - DO_{\min}}{DO_{\max} - DO_{\min}} \right) * 100\%$$

Derefter plottes Ligning 11 mod den anvendte tid til bestemmelse af DO %, hvor følgende Figur 55 fås:



Figur 55 En typisk figur for OD koncentration mod tiden

For at kunne bestemme KLa værdien skal den lineær regression anvendes ved R-kvadrat større end 0,95. Derfor anvendes de første og sidste punkter ikke, og følgende Figur 56 fås:



Figur 56 En grafisk bestemmelse af KLa

Ud fra forskriften af den lineær regression aflæses KLa værdien til  $181,78 \text{ t}^{-1}$ .



