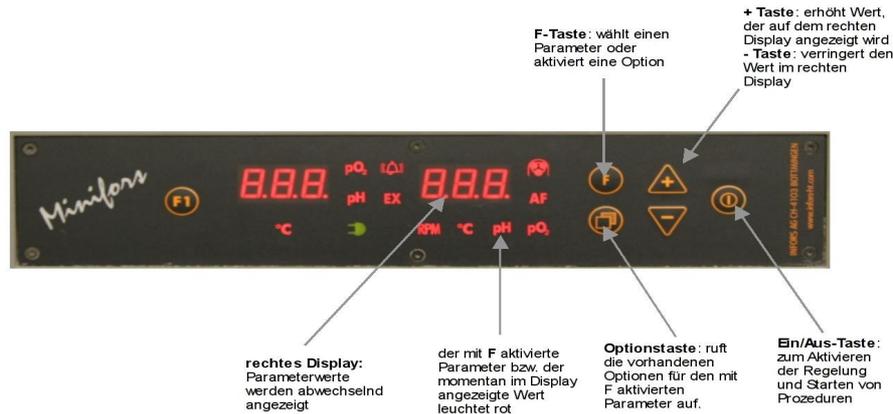


Vorbereitung des Bioreaktors für die Kultivierung

1. Während des Autoklavivorganges kann bereits die pH-Sonde kalibriert werden.
2. Unter sterilen Bedingungen arbeiten (z.B. Sterilbank)
 - a. Die leeren Korrekturmittelflaschen gegen gefüllte Korrekturmittelflaschen tauschen: Glucose (50 % w/v), Antifoam (wenige Tropfen genügen), Säure (H_3PO_4 0,66 mol/L), Lauge (NaOH 1 mol/L).
 - b. Die pH-Sonde wird mit 70% Ethanol oberflächensterilisiert und in den Deckel des Kulturgefäßes eingeschraubt. Es ist von Vorteil einen der hinteren, zur Konsole zugewandten Öffnungen zum Einbau zu verwenden, da eine der nach vorne gewandten Öffnungen für die Inoculation benötigt wird. (Wichtig ist, dass der Rührer während des Einbaus der Sonden ausgeschaltete ist)
3. Kulturgefäß auf das Grundgerät aufsetzen (dabei leicht anheben, um den Deckel an dem Halter über dem Wärmetauscher einzuhängen).
4. Wärmeleitplatte anbringen.
5. Antriebskupplung absenken.
6. Klemme vom Zuluftschlauch entfernen und unsterile Seite des Filters mit dem Rotameter mittels Silikonschlauch verbinden. **Nicht mit Schelle befestigen**, damit bei einem Überdruck im Reaktor an dieser Stelle der Schlauch sich ablösen kann.
7. Pumpenköpfe an den jeweiligen Positionen an der Konsole des Bioreaktors anclippen.
8. Die Probenahmeflasche wird zur Hälfte mit 70%igem Ethanol gefüllt und der Probenahmeschlauch eingelegt.
9. Alle Klemmen, mit Ausnahme der des Probenahmeschlauchs von den Schläuchen entfernen.
10. Pumpenschläuche füllen.
(Dazu muss die F-Taste so oft gedrückt werden, bis das Pumpensymbol aufleuchtet. Mit der Optionstaste wird die gewünschte Pumpe, z.B. AF für Antifoam, ausgewählt. Über die Tasten + bzw. - kann eine Pumprate von 0 bis 100% eingestellt werden. Zur Bestätigung muss die F-Taste gedrückt werden)
11. Kühlwasserschlauch am Abluftkühler anschließen (Der Kühlwasserzulauf wird unten, der Kühlwasserablauf oben angeschlossen - konstruktionsbedingt kein Gegenstromprinzip).
12. Kühlwasser aufdrehen, bzw. Kryostat einschalten.
13. Druckluftversorgung herstellen und öffnen. Für die Druckluftversorgung auf druckfeste Schläuche achten! Normale Wasserschläuche sind nicht druckresistent. Schlauchenden müssen mit Schellen arretiert werden.
14. Elektroden anschließen; der rote Stecker der Antischaumsonde wird in die Sonde und der schwarze Stecker in den Deckel eingesteckt.
15. Temperaturfühler (Pt100) in die Pt100-Fassung (Pt steht für Platin) stecken.
16. pO_2 -Sonde kalibrieren.
17. Ventil für Druckluftversorgung öffnen. Rotameter auf die gewünschte Begasungsrate (1 vvm (Volumen Luft pro Volumen Medium und Minute)) stellen. D.h. bei einem Volumen von 1,5 L Medium entspricht dies einem vvm von 1,5 L/min.
Der Abluftkühler muss davor auf Betriebstemperatur abgekühlt sein.
18. IRIS-Software starten und die Parametereinstellungen vornehmen.



Kalibrierung der Sonden

pH-Sonde

Kalibrierung der pH-Sonde (2-Punkt Kalibrierung):

Die Kalibrierung der pH-Sonde erfolgt **vor** Einbau in den Bioreaktor mit Hilfe zweier Pufferlösungen (pH 7 und pH 4). Erst muss gegen pH 7 und anschließend gegen pH 4 geeicht werden, diese Reihenfolge ist unbedingt zu beachten.

Einige pH-Sonden reagieren sensibel auf die Eintauchtiefe in die Pufferlösung. Daher empfiehlt es sich schlanke hohe Gefäße zu Eichung der pH-Sonden für die Pufferlösungen zu verwenden.

1. Parameter wählen (pH)
2. Optionstaste drücken bis "cAL" auf dem linken Display erscheint.
3. Für 2-Punkt- Kalibrierung (für pH 7 und pH 4) die + Taste zwei Mal drücken (im rechten Display erscheint eine "2").
4. Kalibrationsprozedur mit der Ein/Aus-Taste starten ("cAL" blinkt im linken Display)
5. Die **pH-Sonde** wird zusammen **mit dem Temperaturfühler** in den pH 7 Puffer gehalten.
6. Sobald die Anzeige stabil ist (nach ca. 20 sec; "cAL" hört auf zu blinken) wird mit Hilfe der +/- Tasten der Wert 7,00 auf dem rechten Display eingestellt und danach durch Drücken der Ein/Aus-Taste bestätigt.
7. Durch weiteres Drücken der Ein/Aus-Taste wird der zweite Kalibrierungswert aktiviert.
8. Die **pH-Sonde** und der **Temperaturfühler** werden zunächst mit etwas destilliertem Wasser gespült und dann zusammen in den pH 4 Puffer gehalten.
9. Sobald die Anzeige stabil ist (ca. 20 sec) wird mit Hilfe der +/- Tasten der Wert 4,00 auf dem rechten Display eingestellt.
10. Ein erneutes Drücken der Ein/Aus-Taste beendet den Kalibriermodus (Anzeige: "Cal" "End").

Jetzt weiter mit Punkt 2. Vorbereitung des Bioreaktors für die Kultivierung.

pO₂-Sonde

Kalibrierung der pO₂-Sonde (1-Punkt Kalibrierung):

Die Kalibrierung der pO₂-Sonde erfolgt **vor** der Inokulation. Dazu wird die Temperatur auf Betriebsbedingungen (z.B. 30°C) eingestellt (achten Sie darauf, dass der Temperaturfühler in die Pt100-Fassung eingesteckt ist).

- F-Taste drücken bis °C-Symbol leuchtet. Im Display wird die aktuelle Temperatur angezeigt.
- Temperaturregelung wird durch Drücken der Ein/Aus-Taste angeschaltet.
- Den Sollwert durch +/- Tasten einstellen (eine Bestätigung ist nicht nötig)
- Nach einigen Sekunden springt die Anzeige automatisch auf den aktuellen Ist-Wert.

Nun die Rührerdrehzahl auf 800 Upm einstellen

- F-Taste drücken bis RPM-Symbol leuchtet. Im Display wird die aktuelle Drehzahl angezeigt.
- Rührer wird durch Drücken der Ein/Aus-Taste angeschaltet
- Mit +/- Tasten kann der Sollwert eingestellt werden
- Nach einigen Sekunden springt die Anzeige automatisch auf den aktuellen Ist-Wert

Die Belüftungsrate am Rotameter auf 4 vvm einstellen. Nach wenigen Minuten löst sich die maximal mögliche Menge an Luftsauerstoff in der Flüssigphase. Dies entspricht einem pO_2 -Wert von 100%.

1. Parameter wählen (pO_2)
2. Optionstaste drücken bis "cAL" auf dem linken Display erscheint.
3. Für 1-Punkt- Kalibrierung ($pO_2=100\%$) die + Taste einmal drücken (im rechten Display erscheint eine "1").
4. Kalibrationsprozedur mit der Ein/Aus-Taste starten ("cAL" blinkt im linken Display)
5. Sobald die Anzeige stabil ist wird mit Hilfe der +/- Tasten der Wert 100 auf dem rechten Display eingestellt.
6. Ein erneutes Drücken der Ein/Aus-Taste beendet den Kalibriermodus (Anzeige: "Cal" "End").

Animpfen (Inokulation)

1. Blindstopfen der Inokulationsöffnung mit 70 %igem Ethanol oberflächensterilisieren und den Deckel entfernen.
2. Vorkultur zügig in die Inokulationsöffnung gießen und mit Stopfen verschließen.
3. **Inokulations-Button in IRIS drücken.**



Probennahme

1. Klemme vom Probenentnahmeschlauch nehmen.
2. Probenentnahmeschlauch vom Ethanolbad in ein erstes Probenentnahmegefäß halten.
3. Abluftfilter mit dem Daumen zuhalten. Dadurch entsteht ein Überdruck im Kulturgefäß und das Medium fließt aus dem Probenentnahmeschlauch. Ca. vier ml ablaufen lassen. Dieser Vorlauf ist nicht repräsentativ und muss verworfen werden (Autoklavieren).
4. Anschließend die benötigten Proben in ein sauberes Gefäß abfüllen. Den Probenentnahmeschlauch sofort abklemmen und darauf achten, dass keine Probenflüssigkeit zurück in den Bioreaktor läuft (Kontaminationsgefahr).
5. Probenentnahmeschlauch wieder in das Ethanolbad legen.

Beenden einer Kultivierung

1. Beenden der Fermentation:
"File, close" auswählen
2. Beenden von IRIS:
"File, exit"
3. Abbau des Bioreaktors.