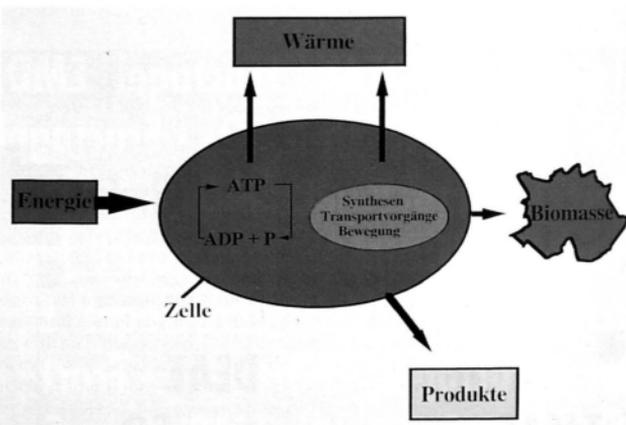


Alle Lebensvorgänge sind mit der Freisetzung von Wärmeenergie verbunden (Abb. 1). Die kontinuierliche Natur des Wärmesignals erlaubt ein Online-monitoring metabolischer Aktivität. Kalorimetrie kann also zur Erfassung von Stoffwechselprozessen genutzt werden. Die produzierten Wärmemengen sind je nach Organismus und Wachstumsbedingungen verschieden [25]. Gewöhnlich sind die in einer mikrobiellen Kultursuspension auftretenden Wärmemengen im Vergleich zu chemischen Reaktionen klein und werden insbesondere im Labormaßstab von 1 bis 2 l Volumen kaum erfaßt. Bei der ersten dokumentierten kalorimetrischen Vermessung einer Fermentation wurde daher ein Eichenfaß mit 21,4 m³ benutzt und darin Melasselösung mit 2,56 t an kristallisierbarem Zucker zu Alkohol vergoren. Die Temperaturerhöhung im Faß betrug 10 °C. Da große Mengen an Kohlendioxid freigesetzt wurden, berichtet der Autor auch folgenden Befund: „Die Experimente haben (mitunter) beeindruckend geendet, indem die von uns verwendeten Fässer explodierten ... Nichtsdestotrotz werden wir diese Versuche fortführen“ [9].

Kalorimetrische Meßtechniken

Seit den geschilderten Anfängen hat sich die kalorimetrische Meßtechnik stürmisch fortentwickelt [2, 12, 25]. Die verfügbaren Kalorimeter lassen sich je nach Größe ihrer Meßzelle und der damit verbundenen Sensitivität in Mikro- und Makrokalorimeter klassifizieren (s.u.). Man unterscheidet Kompensations- von Wärmeflußkalorimetern, die adiabatisch oder isotherm betrieben werden können. Im ersten Fall versucht man einen Wärmeabfluß aus dem Reaktionsgefäß so weit wie möglich zu vermeiden. Die Temperaturerhöhung in der Suspension wird gemessen und dient als Maß für die Wärmeentwicklung. Da Stoffwechselprozesse temperaturabhängig verlaufen, können unerwünschte Verfälschungen entstehen. Daher wird diese Betriebsart in der Biokalorimetrie kaum verwendet. Bei isothermem Betrieb wird ein kontrollierter Wärmeabfluß zwischen Fermenter und dem umgebenden Medium erzeugt und die Fermentertemperatur konstant gehalten. Diese Betriebsart ist in den Biowissenschaften am meisten verbreitet. Einige darauf aufbauende Kalorimeterkonzepte werden im folgenden beschrieben.

* Dr. M. Meier-Schneiders, Prof. Dr. G. Eigenberger, Institut für Chemische Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart, D-70199 Stuttgart.



1 Die Wärmeentwicklung einer Zelle ist ein Summensignal ihres gesamten Stoffwechsels. Energie wird in Form eines Substrates aufgenommen und metabolisiert. Neben Abwärme, Wasser und Kohlendioxid entstehen Zellmasse und, bei Gärungen und unvollständigen Oxidationen, diverse Produkte.

MARTIN MEIER-SCHNEIDERS*, GERHARD EIGENBERGER*

Biokalorimetrie

Methoden und Nutzungspotential

Kalorimetrische Methoden werden seit Jahrzehnten in der Chemie und in den Biowissenschaften eingesetzt. Zur Bearbeitung einiger bestimmter bio-technischer Fragestellungen sind die bisher verfügbaren Geräte jedoch weniger geeignet. Ein neu entwickeltes Fermenter-Kalorimeter erlaubt nun die einfach durchzuführende und reproduzierbare Quantifizierung der Wärmeentwicklung von Stoffwechselprozessen unter technisch relevanten Fermentationsbedingungen.

Mikrokalorimetrie

Kommerziell verfügbar und in den Anwendungsgebieten Physiologie, Ökologie, Pharmakologie, Bodenbiologie und Abwasserreinigung etabliert ist ein bestimmter Mikrokalorimetertyp. Mikrokalorimeter werden auch vielfach zur Materialprüfung benutzt [3, 4, 5, 8, 12, 13, 24, 28]. Sie bestehen aus einer Meß- und Referenzzelle in einem Thermoblock, der von einem großvolumigen Temperierbad umgeben ist. Das Meßprinzip beruht auf Wärmeabfluß. Als Signal dient die Temperaturdifferenz zwischen beiden Zellen, die mit Thermosäulen oder Peltierelementen gemessen wird. Mikrokalorimeter zeichnen sich durch geringen Bedarf an Probenvolumen (einige ml) und hohe Sensitivität aus (je nach Betriebsart 0,05 bis 0,2 µW).

Die miniaturisierte Bauweise ist jedoch für viele biologische und auch biotechni-

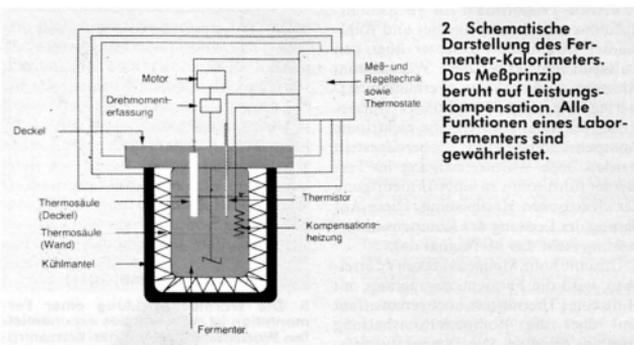
sche Fragestellungen von Nachteil, weil sich die Stoffeigenschaften (Viskosität) und die Betriebsbedingungen (Gasgehalt) in der Meßzelle im Versuchsverlauf ändern, in der Referenzzelle jedoch stets konstant bleiben.

Zeitgleiche Probenahmen für analytische Messungen parallel zur Wärmemessung sind kaum möglich. Dies ist für einige der genannten Einsatzbereiche auch nicht nötig, für die Nutzung in der Biotechnologie hingegen unerlässlich. Teilweise Abhilfe erreicht man mit Durchflußbetrieb: Dabei wird die separat in einem Fermenter kultivierte Zellsuspension über Wärmetauscher zur Meßzelle und wieder zurück zum Fermenter gepumpt. Die Analysen werden mit der Fermentersuspension durchgeführt, die Wärmemessung dagegen bezieht sich auf die Meßzelle [11, 14]. Die Aufenthaltszeit der Suspension im Wärmetauscher liegt im Bereich von einigen Minuten. Der physiologische Zustand der Zellen ist während dieser Zeit nicht kontrollierbar. Es ist sehr wahrscheinlich, daß der Metabolismus der Zellen dabei Veränderungen erfährt, so daß quantitative Aussagen nur eingeschränkte Gültigkeit besitzen.

Reaktionskalorimetrie

Reaktionskalorimeter dagegen sind einfacher als Mikrokalorimeter für biotechnische Zwecke zu handhaben. Aufgrund des großen Arbeitsvolumens von 1 bis 2 L ist dieser Kalorimetertyp im Vergleich zu Mikrokalorimetern weniger störänfällig gegen Außeneinflüsse [1]. Reaktionskalorimeter werden häufig zur Untersuchung und Optimierung chemischer Reaktionen eingesetzt [21, 22]. Bei einem weit verbreiteten System wird mit Hilfe einer Wärme- und Kälteflußregelung die Reaktor- und Meßzelle konstant gehalten; Wärme- und Kältefluß und Wärmeentwicklung sind dann einander direkt proportional. Der meist aus Glas bestehende Fermenter ist von einem Kühlmantel umgeben. Sowohl die Fermenter- als auch die Meßzelle werden mit Hilfe von Widerstandsthermometern bestimmt. Der Wärme- und Kältefluß zwischen Fermenter und Meßzelle wird nicht direkt gemessen, sondern unter Berücksichtigung des Wärmedurchgangskoeffizienten und der wärmetauschenden Fläche berechnet. Die Temperatur der Meßzelle wird durch Mischen eines warmen mit einem kalten Teilstrom eingestellt; entsteht Wärme im Reaktionsgefäß, so wird die Menge des warmen Teilstroms vermindert; dies liefert das Meßsignal.

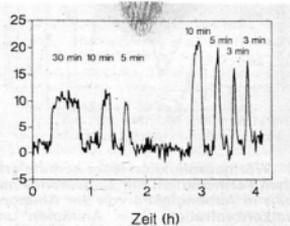
Die geschilderten Nachteile von Mikrokalorimetern für biologische Untersuchungen sind vermeidbar, wenn man ein



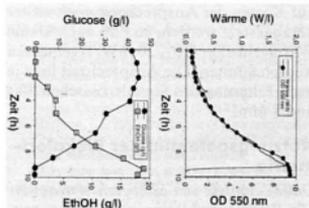
2 Schematische Darstellung des Fermenter-Kalorimeters. Das Meßprinzip beruht auf Leistungskompensation. Alle Funktionen eines Labor-Fermenters sind gewährleistet.

solches Reaktionskalorimeter zu einem Fermenter umrüstet und als Biokalorimeter betreibt. Die solchermaßen erzielten Ergebnisse stellen ganz unzweifelhaft einen grundlegenden Beitrag zur thermodynamischen Charakterisierung biologi-

scher Reaktionen und zur Nutzung des Wärmesignals in der Biotechnik dar [6, 16, 20, 25, 26]. Allerdings sind modifizierte Reaktionskalorimeter kommerziell nicht verfügbar. Der zeit- und kostenaufwendige Umbau muß daher von jedem potentiellen Anwender selbst durchgeführt werden, was eine Verbreitung der Technik behindert. Weiterhin von Nachteil für biokalorimetrische Untersuchungen ist die geringe Sensitivität des Reaktionskalorimeters von 200 mW/l Arbeitsvolumen. Die erstellten Bilanzen sind daher relativ ungenau. Zusammenfassend ist festzustellen, daß auch diese Meßtechnik für die biotechnische Nutzung nicht optimal ist.



3 Aufgrund des rauscharmen Meßsignals kann auch der Eintrag kleiner Wärmemengen (10 und 20 mW/l) detektiert und in Abhängigkeit von der Einstrahlungsdauer und Signalfilterung quantifiziert werden.



4 Anaerobe Batch-Fermentation mit *Zymomonas mobilis* in Komplexmedium (pH 5,5, 30 °C, Rührgeschwindigkeit 500 UPM). Verlauf von Optischer Dichte und Wärmeentwicklung (rechtes Diagramm) und Glucose- bzw. Ethanolkonzentration im Medium (linkes Diagramm).

Fermentations-Kalorimetrie

Aufgrund der geschilderten Nachteile der verfügbaren Systeme begannen wir mit der Entwicklung und Erprobung eines eigenen, zweckbestimmt konstruierten Kalorimeters von 200 mW/l Arbeitsvolumen. Es hat ein Arbeitsvolumen von 2 L und verfügt gleichzeitig über alle Fermenterfunktionen (Temperieren, Rühren, Begasen, pH-Regeln, Probenahmen, In-situ-Sterilisierung, computergesteuerte Meß- und Regeltechnik, Betriebsarten Batch-, Fed-Batch- und kontinuierliche Kultur). Aufgrund dieser Kopplung bezeichnen wir das Gerät als Fermenter-Kalorimeter und die Meßtechnik sinngemäß als Fermentations-Kalorimetrie.

Abb. 2 zeigt eine Schemazeichnung mit der zugehörigen Peripherie. Das Gerät besteht aus zwei ineinander sitzenden Glasgefäßen, dem Fermenter und dem umschließenden Doppelmantel. Die Messung der Wärmeentwicklung beruht auf Leistungskompensation, allerdings nach einem anderen Konzept als vorstehend für das Reaktionskalorimeter be-

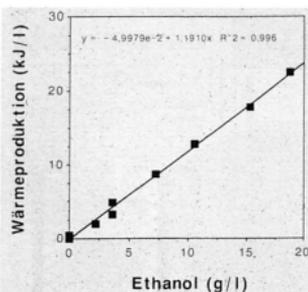
schrieben. Proportional zur Temperaturdifferenz zwischen Fermenter und Kühlmantel wird dem Fermenter über den Luftspalt ein konstanter Wärmestrom entzogen. Wird keine Fermentationswärme freigesetzt, so muß dieser Wärmestrom vollständig durch eine elektrische Kompensationsheizung bereitgestellt werden. Jede Wärmeerzeugung im Fermenter führt somit zu einer Erniedrigung der elektrischen Heizleistung. Diese Änderung der Leistung der Kompensationsheizung stellt das Meßsignal dar.

Um eine hohe Meßgenauigkeit zu erreichen, wird die Fermentertemperatur mit Hilfe eines Thermistors hochgenau erfaßt und über die Kompensationsheizung konstant gehalten. Die Temperaturdifferenz im Luftspalt zwischen Fermenter und Kühlmantel wird mit Hilfe eines regelbaren Thermostaten konstant gehalten. Zur Messung dieser Temperaturdifferenz dient eine selbstentwickelte Thermoauße, die eine Serienschaltung von Thermoelementen darstellt und durch ihre U-förmige Anordnung eine hochgenaue integrale Temperaturdifferenzmessung über den Umfang des Fermenters erlaubt. Wärmeverluste über den Deckel werden verhindert, indem dieser ebenfalls auf Fermentertemperatur geregelt wird. Als Meßglied für diesen Regelkreis dient ebenfalls eine Thermoauße.

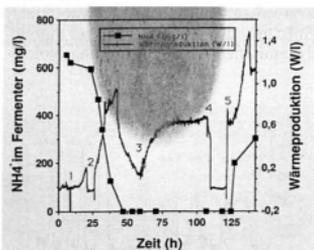
Alle Zulaufe werden mit Hilfe eines Wärmetauschers vortemperierte. Im Falle einer Begasung wird das Gas zusätzlich mit Wasser gesättigt. Änderungen der eingetragenen Rührleistung sowie deren Änderung durch Viskositätswechsel während einer Fermentation werden durch Drehmomentmessung erfaßt und in der Energiebilanz ebenso berücksichtigt wie die durch Dosierung von Lauge entstehende Neutralisationswärme. Zur Berechnung der mit dem Abgaskondensat entzogenen Verdampfungswärme wird die erzeugte Abgasmenge erfaßt.

Ein wesentliches Charakteristikum des Fermenter-Kalorimeters ist die einfache Sterilisierbarkeit und der monoseptische Betrieb. Die Sterilisierung kann *in situ* mit der Wärmeträgerflüssigkeit und rechnergesteuert durchgeführt werden. Lauge- und Substratzufuhr erfolgen rechnergesteuert über Schlauchpumpen und Dosierwaagen. Die Software für die Meß- und Regeltechnik wird derzeit auf ein PC-basierendes Echtzeitbetriebssystem übertragen und an einen neuen Prototypen des Fermenter-Kalorimeters angepaßt.

Das Fermenter-Kalorimeter wurde zunächst physikalisch getestet. Die Auflösung des Meßsignals ist bei guter Langzeitstabilität der Basislinie besser als



5 Die Wärmeentwicklung einer Fermentation ist während des exponentiellen Wachstums eng mit der Konzentration von Biomasse, Edukt und Produkt korreliert (hier gezeigt für Ethanol bei der anaeroben Batch-Fermentation mit *Zymomonas mobilis* aus Abb. 4).



6 Wärmeproduktion einer kontinuierlichen Fermentation mit *Zymomonas mobilis* in Abhängigkeit von der Ammoniumkonzentration. 1 = Animpfen und Batchphase, 2 = Ammoniumverbrauch bei kontinuierlicher Kultur, 3 = geringe Ammoniumzufuhr, 4 = Substrat- und Ammonium-Stop, 5 = Ammoniumüberschuß (Definiertes Medium, pH 5,5, 30 °C, Rührgeschwindigkeit 500 UPM, D = 0,2 h).

10 mW/l (Abb. 3). Sie kann bei Bedarf auf Kosten der Ansprechzeit noch weiter herabgesetzt werden, so daß auch kleine Wärmeeinträge (10–20 mW/l) gemessen werden können. Die Ansprechzeit liegt je nach Filterung des Signals zwischen 30 s und 8 min.

Nutzungspotential der Biokalorimetrie

Online-Analyse von Stoffwechselprozessen
Die Wärmeproduktion einer Zellsuspension ist ihrer gesamten Stoffwechselaktivität proportional. Das Nutzungspotential dieses Befundes wird im folgenden anhand eigener Fermentationsversuche in Verbindung mit den Ergebnissen anderer zusammengefaßt. Abb. 4 zeigt im rech-

ten Diagramm die Entwicklung der optischen Dichte im Vergleich zum Thermogramm bei einer anaeroben Batch-Fermentation im Fermenter-Kalorimeter mit *Zymomonas mobilis*. Beide Kurven verlaufen weitgehend parallel. Die Biomassebildung kann daher anhand der Wärmeproduktion online, d.h. direkt während des Reaktionsgeschehens, beobachtet werden. Die begleitende HPLC-Analytik zeigt (Abb. 4 linkes Diagramm), daß zum Zeitpunkt des drastischen Abfalls in der Wärmeproduktion das Substrat (Glucose) verbraucht war.

Nicht nur zwischen Wärmeentwicklung und Substratverbrauch, sondern auch zwischen Wärme, Produktbildung und der Biomasseentwicklung besteht enge Korrelation (vgl. Abb. 5). Aus dem Wärmesignal lassen sich daher spezifische Aussagen in Verbindung mit den genannten Parametern gewinnen.

Geringere Zahl von Kontrollmessungen
Aufgrund der Reproduzierbarkeit unserer Experimente und der bestehenden Korrelation von Edukten und Produkten mit der Wärmeproduktion läßt sich anhand der anfangs etablierten Beziehung bei nachfolgenden Batch-Fermentationen sehr genau auf die Edukte und Produkte schließen. Das Wärmesignal ist vorteilhaft, weil für die Messung eine Probenahme und deren Aufarbeitung nicht nötig ist. Analytische Kontrollmessungen werden daher seltener benötigt, was den mitunter zeit- und kostenintensiven Aufwand deutlich reduziert. Ein erster Versuch zur Online-Abschätzung von Prozeßparametern anhand der Wärmetönung wurde kürzlich für eine aerobe Batch-Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben [15].

Energiebilanz nutzbar für Scale-up

Die sichere Bilanzierung einer Fermentation ist notwendig für die kostengünstige Maßstabsvergrößerung vom Labor- auf den Produktionsmaßstab. Es reicht zur Bilanzierung einer Batch-Fermentation aus, die Edukt-Anfangskonzentrationen und die Produkt-Endkonzentrationen zu bestimmen und diese Daten mit der Wärmeproduktion zu verbinden. Da der Verlauf der Wärmeentwicklung einer Fermentation im großtechnischen Maßstab relativ einfach über eine genaue Kühlmittelebilanz ermittelbar ist, können die im Labormaßstab gefundenen Charakteristika der Wärmeproduktion ohne weiteres direkt auf die großtechnische Anlage übertragen werden.

Eine erste diesbezügliche Nutzung von Thermogrammen wurde kürzlich be-

schrieben [27]. Aufgrund der benutzten, sehr einfachen Laborapparatur (Schüttel- flasche mit 60 ml Kultursuspension) unterscheiden sich die Ergebnisse im Vergleich zur Pilotanlage mit 2 m³ Volumen jedoch um etwa 25%. Die mit Hilfe des Fermenter-Kalorimeters erzielten Thermogramme dagegen sind quantitativ nutzbar und sollten eine wesentlich bessere Übertragbarkeit garantieren.

Substratoptimierung und Prozeßführung
In der Biotechnik wird zunehmend kontinuierlich fermentiert. Dabei spielt die Optimierung der Substratzusammensetzung eine wichtige Rolle. Im Chemostatenbetrieb lassen sich im Fermenter-Kalorimeter positive wie negative Effekte auf die Stoffwechselaktivität, bedingt durch die schnelle zeitliche Auflösung des Wärmesignals, direkt erfassen. Wir haben dies bei einer kontinuierlichen Fermentation mit *Zymomonas mobilis* durch variierte Zulaufkonzentrationen von Glucose, Ammonium, Phosphat, Magnesium und Vitaminen getestet (Abb. 6).

Aus den Ergebnissen lassen sich Möglichkeiten zur thermogrammkontrollierten Substratoptimierung ableiten. Weiterhin stellt das Wärmesignal eine verlässliche und (bezüglich der Randbedingungen) unkritische Meßgröße zur Entwicklung modellgestützter Verfahren dar. Ein erstes Beispiel zur Führung einer Fermentation anhand des Wärmesignals findet sich unter [25].

Aerobe und anaerobe Fermentationen

Da unter Sauerstoffzufuhr im Vergleich zu anaeroben Reaktionen viel größere, leicht zu messende Wärmemengen frei werden, wurden die meisten publizierten, kalorimetrischen Experimente bisher mit Sauerstoff zehrenden Organismen durchgeführt. Die Bedeutung von anaeroben oder fakultativ anaeroben Fermentationen nimmt jedoch aufgrund ihres Potentials für Synthesen und Abbauprozesse zu [23], so daß sich hier ein breites Feld für kalorimetrische Meßverfahren mit hoher Empfindlichkeit eröffnet. Das gleiche gilt für Säuger- oder Insektenzellkulturen aufgrund der durch die niedrigen Zell-dichten bedingten geringen Wärmefreisetzung [30].

Fazit

Die Biokalorimetrie hatte in den letzten 15 Jahren des biotechnischen Aufschwungs neben apparativen Problemen vor allem einen Nachteil: „microbial calorimetry is unfamiliar to most workers“ [7]. In der Biotechnologie gab es daher kaum Ansätze zum Einsatz des Wärmesignals zur Untersuchung, Führung oder Optimierung von Fermentationsprozessen. Mit der Fermentations-Kalorimetrie steht nun eine geeignete, hochgenaue und einfach zu handhabende Meßtechnik zur Verfügung.

Literatur

- [1] Bar, R. (1988): Fermentation calorimetry vs microcalorimetry. *Trends Biotechnol.* 6(3), 55–60.
- [2] Battley, E. H. (1987): *Energetics of microbial growth*. John Wiley & Sons, New York.
- [3] Beaubien, A., Jolicoeur, C. (1984): The toxicity of various heavy metal salts, alcohols and surfactants to microorganisms in a biodegradation process: a flow microcalorimetry investigation. *Drug. Echem. Toxicol.*, 1, 261–281.
- [4] Beaubien, A., Jolicoeur, C. (1985): Applications of flow microcalorimetry to process control in biological treatment of industrial wastewater. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 57 (1), 95–100.
- [5] Beaubien, A., Lavallee, J. F., Lapiere, L., Keita, L. (1987): Metabolic activity and toxicological aspects of industrial biological processes: use of dynamic microcalorimetry as a method for monitoring and control. *Rev. Int. Sci. Eau* 3 (1), 1–7.
- [6] Birou, G., von Stockar, U. (1989): Application of bench-scale calorimetry to chemostat cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 12–16.
- [7] Boe, I., Lovrien, R. (1990): Cell counting and carbon utilization velocities via microbial calorimetry. *Biotech. Bioeng.* 35, 1–7.
- [8] Bunker, J. C., James, A. M. (1989): Microcalorimetric studies of the effects of platinum group metal complexes on bacterial growth. *Microbios* 58, 83–93.
- [9] Dubrunfaut, M. (1856): Note sur al chaleur et le travail produits lar la fermentation vineuse. *C. R. Acad. Sci.* 42, 945–948.
- [10] Eigenberger, G. (1987): Reaktionskalorimeter zur schnellen Erfassung von mikrobiellen Stoffwechseländerungen. In: Finanzierungsantrag des Zentralen Schwerpunktprojektes Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart, 509–520. Koordinationsstelle des ZSP Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 9m, 7000 Stuttgart 80.
- [11] Gandman, M., Vecht, S., Zomer, E. (1985): The use of bioactivity monitor for process optimization and scale up of *Bacillus thuringiensis* fermentation. *World Biotech. Rep.* 1, 665–670.
- [12] Gustafsson, L. (1991): Microbiological calorimetry. *Thermochim. Acta* 193, 145–171.
- [13] Hartung, J. (1986): On the use of flow microcalorimetry in estimating the biological effect of adverse substances on *E. coli*. *Zentralbl. Bakteriol., Mikrobiol. Hyg., Ser. B* 183 (1), 36–46.
- [14] Jolicoeur, C., To, T. C., Beaubien, A. (1988):

Flow microcalorimetry in monitoring biological activity of aerobic and anaerobic wastewater-treatment processes. *Anal. Chim. Acta* 213, 165–176.

- [15] Larsson, C., Blomberg, A., Gustafsson, L. (1991): Use of microcalorimetric monitoring in establishing continuous energy balances and in continuous determinations of substrate and product concentrations of batch-grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* 38, 447–458.
- [16] Marison, I. W., von Stockar, U. (1987): A calorimetric investigation of the aerobic cultivation of *Kluyveromyces fragilis* on various substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 33–43.
- [17] Meier-Schneiders, M., Grosshans, U., Busch, C., Eigenberger, G. (1992): investigation and control of fermentation processes using fermenter-calorimetry. In: *Dechema-Biotechnol. Conf.*, 5, 403–407. G. Kreysa, A. J. Driesel (eds.), VCH-Publishers, Weinheim, FRG.
- [18] Meier-Schneiders, M., Grosshans, U., Busch, C., Eigenberger, G. (1993): Analyse von Stoffwechselprozessen mit Hilfe der Fermenter-Kalorimetrie. In: *International Symposium on Instrumentalized Analytical Chemistry and Computer Technology*, InCom-Tagungsband, p. 2. W. Günther, D. Kneucker, G. Wulff (eds.). Vogel-Verlag, Würzburg, FRG.
- [19] Ott, J., Meier, M., Eigenberger, G. (1991): Development of a laboratory fermenter-calorimeter for aerobic and anaerobic fermentations. In: *Biochemical Engineering – Stuttgart*, 352–356. M. Reuss, H. Chmiel, E. D. Gilles, H. J. Knackmuss (eds.), G. Fischer-Verlag, Stuttgart, FRG.
- [20] Randolph, T. W., Marison, I. W., Martens, D. E., von Stockar, U. (1990): Calorimetric control of fed-batch fermentations. *Biotech. Bioeng.* 36, 678–684.
- [21] Regenstein, W. (1983): Thermische Methoden zur Bestimmung der Makrokinetik. *Chimia* 37, 430–437.
- [22] Riesen, R., Grob, B. (1985): Reaktionskalorimetrie in der chemischen Prozeßentwicklung. *Swiss Chem.* 7, 39–43.
- [23] Russel, J. B. (1986): Heat production by ruminal bacteria in continuous culture and its relationship to maintenance energy. *J. Bacteriol.* 168 (2), 694–701.
- [24] Sand, W. (1987): Mikrokalorimetrie – ein modernes Verfahren für biologische Fragestellungen. *Forum Mikrobiologie*, 220–223.
- [25] von Stockar, U., Marison, I. W. (1989): The use of calorimetry in biotechnology. *Adv. Biochem. Eng.* 40, 92–136.
- [26] von Stockar, U., Marison, I. W. (1991): Large-scale calorimetry and biotechnology. *Thermochim. Acta* 193, 215–242.
- [27] Sumino, Y., Sono, K., Doi, M. (1993): Scale-up of a purine nucleoside fermentation from a shaking flask to a stirred tank fermentor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 581–585.
- [28] Tiefenbrunner, F., Haller, T., Weiß, C., Redl, B. (1987): Methods for detection of microbial activities in solid waste samples. *Forum Staedte-Hyg.* 38 (3), 144–150.
- [29] Traore, S. A., Belach, J. P. (1981): Microcalorimetric study of a well defined mixed culture. *Entropy* 98, 55–59.
- [30] Wadsö, I. (1988): Progress and problems in microcalorimetric work on mammalian cell systems. *Thermochim. Acta.* 137, 1–10.