

Entwicklung und Anwendung eines modularen Bioreaktors mit tubulären Membranen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von M.Sc. Christoph Berend Wolff geboren am 15.Mai 1984
in Hannover

2013

Referenten

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Detlef Bahnemann

Tag der Promotion: 07.03.2013

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfeleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere, dass die Dissertation nicht bereits als Masterarbeit oder andere Prüfungsleistung verwendet worden ist.

Hannover, Dezember 2012

Christoph Wolff

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

Wolff, C., Beutel, S., Scheper, T., "Tubular membrane bioreactors for biotechnological processes", Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, DOI: 10.1007/s00253-012-4620-0

Kopf, F., Schlüter, M., Kaufhold, D., Hilterhaus, L., Liese, A., Wolff, C., Beutel S., Scheper, T., "Laminares Mischen in Miniatur-Hohlfasermembranreaktoren durch Ausnutzung von Sekundärströmungen", Chemie Ingenieur Technik, 2011, 83. 1066-1073

Kaufhold, D., Kopf, F., Wolff, C., Beutel, C., Hilterhaus, L., Hoffmann, M., Scheper, T., Schlüter, M., Liese, A., "Generation of Dean Vortices and enhancement of oxygen transfer rates in membrane contactors for different hollow fiber geometries" Journal of Membrane Science, 2012, 423-424. 342-347

Bice, I., Celik, H., Wolff, C., Beutel, S., Zahid, M., Hitzmann, B., Rinas, U., Kasper, C., Gerady-Schahn, R., Scheper, T., "Downstream processing of high chain length polysialic acid using membrane adsorbers and clay minerals for application in tissue engineering", Engineering in Life Science, 2012,

Vortrag

2011, Berlin, European Congress of Applied Biotechnology, Christoph Wolff
"Development and Characterization of a novel Hollow Fiber Bioreactor"

Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Thomas Scheper für die Ermöglichung dieser Arbeit, der Übernahme des Referats und für die große Unterstützung bei vielen interessanten Projekten an denen ich mitwirken durfte.

Bei Prof. Detlef Bahnemann möchte ich mich für die Übernahme des Ko-Referats bedanken. Cornelia Kasper möchte für die gute Zusammenarbeit und den Zugang zur Zellkultur danken. Der DFG und dem BMBF danke ich für die Finanzierung meiner Forschungen.

Bei Sascha Beutel bedanke ich mich für die tolle Begleitung seit Beginn meiner Masterarbeit, seine Tür stand immer offen genauso wie seine Ohren. Dörte Solle danke ich für ihre Unterstützung im Endspurt dieser Arbeit und ihre Korrekturen.

Bei Stephen Kroll möchte ich mich für die unzähligen Meter an Kapillaren, viele konstruktive Gespräche und gute Ratschläge bedanken. Martina Weiß möchte ich für die gute Zusammenarbeit und im Besonderen für ihre große Hilfe bei kleinen Bildern danken. Der Feinmechanikwerkstatt des TCI mit Thorsten Stempel und Friedbert Gellermann danke ich einmal für die große Unterstützung bei der Entwicklung meiner Reaktoren aber vor allem für die ständige Unterstützung bei den vielen kleinen Problemen im Arbeitsalltag eines Doktoranden. Bei Thoreilf Hentrop und Martin Pähler bedanke ich mich ebenfalls für 3 Jahre gute Zusammenarbeit.

Sonja Kress danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur und die wunderschönen REM Bilder. Bei Daniel Landgrebe und Matthias Rheinheimer möchte ich mich für die gemeinsamen Experimente bedanken. Danke Tim für deine Unterstützung.

Dem VE_Team, und der Eule danke ich für 3 erfolgreiche Jahre mit 2 Titeln! Ich erwarte den nächsten Pokal für „Haaannohhhver“ von euch.

Liebes Technikums Team (TT), euch danke ich dafür, dass ich Teil der Speerspitze sein durfte. Dr *cater. Ing.* danke ich für die stetige Versorgung mit Koffein und Insiderinformationen aus der Welt unserer alten Liebe 96. Dem ganzen TCI danke ich für 3 ½ Jahre, die ich nicht vergessen werde und nicht missen möchte!

Ich bin meiner Familie und meinen Freunden für die aufmunternden Worte und die Unterstützung dankbar.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Julia. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft.

Danke.

Zusammenfassung

Stichworte: tubuläre Membran, Zellkultur, Bioreaktor

Bioreaktoren, die Membranen zur Immobilisierung von Zellen nutzen, ermöglichen interessante Anwendungsmöglichkeiten für die biotechnologische Forschung. In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung, Charakterisierung und Testung eines Bioreaktorsystems mit tubulären Membranen vorgestellt.

Das Reaktorsystem besteht aus einem Reaktorgehäuse mit drei Zugängen zum extrakapillaren Reaktionsraum und Sichtfenstern aus Glas für faseroptische Sauerstoffsensoren. Die tubulären Membranen werden in ein separates und modifizierbares Bauteil eingesetzt. Dieser Haltezylinder ermöglicht so die Aufteilung des Reaktors in zwei durch die Membranen voneinander getrennte Reaktionsräume. Durch Modifikation dieses einen Bauteils können einfach unterschiedliche Reaktorkonfigurationen mit verschiedenen Membranen realisiert werden.

Drei unterschiedliche Reaktorvarianten sind eingehend auf ihre reaktionstechnischen Eigenschaften hin charakterisiert worden. In den Reaktoren wurden polymere Hohlfasern und keramische Kapillaren verbaut. In einem Reaktor wurden Modifikationen zur Veränderung der Hydrodynamik vorgenommen.

Anhand verschiedener Modellorganismen wurde das Reaktorsystem evaluiert. Adhärenz Säugetierzellen, Hybridomazellen in Suspension, Mikroalgen und filamentöse Pilze sind zu diesem Zweck kultiviert worden.

Die einzelnen Komponenten des Reaktorsystems wurden in einer Mess- und Steuerungsumgebung zusammengefasst, um eine bessere Prozesskontrolle zu ermöglichen. Neben der Nutzung im Bereich der Kultivierung wurden zwei weitere Anwendungsfelder erschlossen. Zum einen die Verwendung oberflächenmodifizierter Kapillaren zum enzymatischen Zellaufschluss, zum anderen die Anwendung in der Aufarbeitung eines Aromastoffes.

Abstract

Keywords: tubular Membrane, cell culture, bioreactor

Membrane based bioreactors for immobilized cell culture offer great potential for biotechnological applications. This thesis presents the development, characterization and testing of a novel bioreactor system using tubular membranes for cultivation processes.

The tubular membranes divide the reactor into two compartments. The extracapillary space can be accessed by three ports enabling multiple options to operate the systems. Glass panels in the reactor housing provide access for fiberoptical oxygen sensors. The tubular membranes are inserted into a separated component that is integrated in the reactor housing. By modifying this component the reactor can easily be adapted to various membrane materials. The number, arrangement and diameter of the membranes can be chosen freely.

Three reactor variants were evaluated in regard to their hydrodynamic behavior. Inorganic and polymeric Membranes were used and one reactor was modified to alter the hydrodynamics of the system. Reynolds numbers, residence time behavior, mixing time and $k_L a$ values were determined.

To evaluate the performance of the reactor system several model organisms were cultivated. Adherent mammalian cells and suspension cell, microalgae and filamentous fungi were cultivated in the system to prove the functionality. Furthermore the reactor components were combined in measuring and controlling environment.

In addition to the cultivation applications the reactor system has been used in a downstream process. Also the continuous lysis of gram positive bacteria cells using lysozyme modified ceramic capillaries in a flow through system was tested.

Inhaltsverzeichnis

Referenten	I
Erklärung	II
Publikationen	III
Danksagung	IV
Zusammenfassung	VI
Abstract	VII
Inhaltsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	2
3 Theorie	4
3.1 Immobilisierung von Zellen	4
3.2 Membranbioreaktoren.....	5
3.3 Tubuläre Membranen.....	6
3.4 Bioreaktoren mit tubulären Membranen.....	8
3.5 Anwendungsbeispiele.....	14
3.6 Der <i>universelle</i> TMBR	20
4 Praktische Arbeiten	23
4.1 Reaktordesign.....	23
4.2 Reaktorcharakterisierung	42
4.3 Anwendungsbeispiele.....	56
4.4 Nutzung von modifizierten tubulären keramischen Membranen zum Zellaufschluss.....	73
4.5 Integration des Reaktorsystems in Mess- und Steuerungstechnik.....	75
4.6 Evaluation neuer Fertigungstechniken für den Bau von Reaktorprototypen	79
4.7 Erkenntnisse aus den Arbeiten der Projektpartner	87
5 Zusammenfassung und Ausblick	89
6 Anhang	92
6.1 Abbildungsverzeichnis	92
6.2 Verwendete Chemikalien und Materialien	95

6.3	Lösungen.....	97
6.4	Geräte.....	98
6.5	Methoden.....	99
6.6	Technische Zeichnungen.....	103
6.7	Abkürzungen.....	106
	Literaturverzeichnis.....	108
	Lebenslauf.....	113

1 Einleitung

Bioreaktoren müssen für jeden Organismus, der in ihnen kultiviert werden soll, die optimale Wachstums- und Produktionsumgebung bereitstellen. Idealerweise sollten sie modular aufgebaut sein, um den unterschiedlichsten Bedürfnissen gerecht zu werden. So benötigen Bakterien, genauso wie Stammzellen, einfache Zucker wie Glukose als Energie- und Kohlenstoffquelle. Doch liegen die optimalen Konzentrationen weit auseinander. Strikt anaerobe Bakterien benötigen andere Umgebungen als Mikroalgen, die wiederum Licht als Energiequelle nutzen. Für höhere Organismen müssen die Lebensbedingungen an das Alter und die Zellkonzentration ständig angepasst werden. Es ist erstaunlich, dass in der modernen Biotechnologie nur wenige Reaktortypen für die unterschiedlichsten Kultivierungszwecke eingesetzt werden. Der einfache Rührkesselreaktor ist immer noch das eigentliche Arbeitspferd in der Biotechnologie. Auch die Übertragbarkeit von *Screeningreaktoren* über den Labormaßstab hin zum Produktionsprozess steckt noch in den Kinderschuhen. Während im Labor hauptsächlich mit Schüttelkolben gearbeitet wird, werden die Rührkesselreaktoren verschiedenster Größe im Produktionsprozess verwendet. Beide Systeme stellen aber in den seltensten Fällen ideale Lebens- und Wachstumsbedingungen für die Organismen bereit.

Idealerweise sollte ein Bioreaktor aus verschiedenen Kompartimenten bestehen. In einem sollten die Zellen unter idealen Bedingungen wachsen und in anderen produzieren. Die Versorgung der Kompartimente sollte unabhängig voneinander, je nach den Ansprüchen der Organismen, sein. Dabei geht es neben der Versorgung mit Substraten, Wachstumsfaktoren und Ähnlichem, aber auch um gezielte Abtrennung von Störkomponenten, die Energieversorgung durch Licht oder die Bereitstellung optimaler hydrodynamischer Bedingungen. Eine solche Versorgung oder Abtrennung kann über Membranen erfolgen, die hydrodynamische Kompartimentierung durch die Membrangeometrie und die Energiezufuhr in Form von Licht über Glasfasern. Die Glasfasern selbst können nicht nur zum Energieeintrag, sondern auch zur direkten Beobachtung des Prozessgeschehens erfolgen. Spektroskopische Sensoren oder Chemosensoren bieten damit die Möglichkeit, die Module eines Reaktors jederzeit genau zu beobachten. Ein solches Reaktorsystem nähert sich in seiner Komplexität dem Gewebe höherer Lebewesen an und sollte damit auch komplexeste Lebensräume bereitstellen können.

2 Zielsetzung

Diese Arbeit entstand innerhalb der DFG Forschergruppe „Modulare Hohlfaserreaktoren in der Biotechnologie und Berücksichtigung mikroskaliger Effekte“.

Vier Arbeitsgruppen beschäftigten sich kooperativ mit folgenden Bereichen:

- Entwicklung und Charakterisierung neuer Tubularmembranbioreaktoren

- Beschreibung und Simulation der Hydrodynamik in Tubularmembransystemen

- Enzymatische Biokatalyse in Tubularmembranbioreaktoren

- Kultivierung in Tubularmembranbioreaktoren

- Neue tubuläre Membranen für Bioreaktoren

Am Institut für Technische Biokatalyse an der TU Hamburg Harburg (TUHH) im Arbeitskreis von Prof. Andreas Liese wurden Einzelfaserreaktoren entwickelt und charakterisiert. Zudem wurde der Frage nach möglichen Anwendungen für die enzymatische Katalyse nachgegangen.

Eng verknüpft mit den unterschiedlichen Arbeiten zur Reaktorentwicklung führte das Institut für Mehrphasensysteme (TUHH) unter Prof. Michael Schlüter Untersuchungen und Simulationen zur Hydrodynamik in und an Tubularmembranen im mikroskaligen Bereich durch. Die Verbesserungen der Leistungsfähigkeit im Bereich des Massentransfers durch Sekundärströmungen standen hier im Fokus.

Über die Integration der Arbeitsgruppe Advanced Ceramics von Prof. Kurosch Rezwan (Universität Bremen) in das Kooperationsprojekt wurde das Spektrum der verwendeten Hohlfasermembranen um keramische Kapillaren erweitert.

Die vorliegende Promotionsarbeit ist in den Teilbereichen Reaktorentwicklung und Charakterisierung sowie Kultivierung in Hohlfaserbioreaktoren angesiedelt. Ziel der Dissertation war die Neuentwicklung eines modularen Bioreaktorsystems mit tubulären Membranen für Kultivierungszwecke. An das System wurden dabei besondere Ansprüche in Hinblick auf die Modularität. Der Einsatz unterschiedlicher tubulärer Membranen sollte möglich sein, um ein breites Anwendungsspektrum abzudecken und die Reaktoren an die unterschiedlichen Kultivierungsarbeiten anzupassen. Deshalb sollten auch unterschiedliche Betriebsführungen möglich sein.

Eine eingehende Charakterisierung des Reaktorsystems in den verschiedenen Konfigurationen sollte vorgenommen werden. Dafür werden das Verweilzeitverhalten, die Mischzeit und der Massentransfer bzw. Sauerstoffeintrag herangezogen. Das entwi-

ckelte modulare Reaktorsystem sollte dann bei der Kultivierung verschiedener Modellorganismen seine Leistungs- und Anpassungsfähigkeit unter Beweis stellen. Als Modellkulturen wurden Säugerzellen, Mikroalgen und filamentöse Pilze ins Auge gefasst.

3 Theorie

Einführend werden kurz Immobilisierungsmöglichkeiten für Zellsysteme vorgestellt. Hauptaugenmerk wird dabei auf Membranimmobilisierungstechniken gelegt. Zu diesen gehören auch Reaktoren mit tubulären Membranen.

3.1 Immobilisierung von Zellen

Die Immobilisierung von Zellen kann für Kultivierungs- und Produktionsprozesse wichtig sein. Bei langsam wachsenden Kulturen kann ein Auswaschen im kontinuierlichen Betrieb verhindert werden und empfindliche Zellen können durch die Immobilisierung geschützt werden.

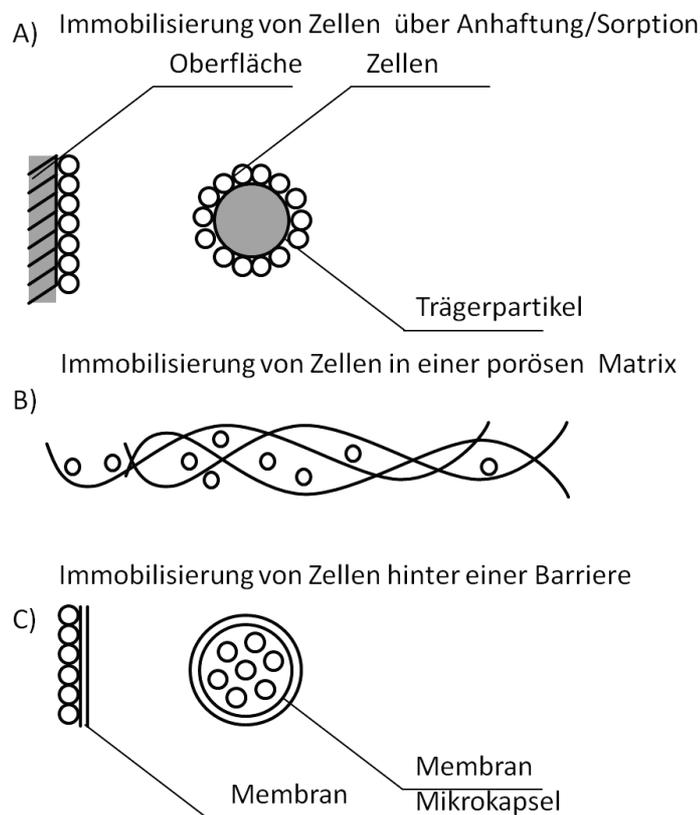


Abbildung 3-1: Strategien zur Immobilisierung von Zellen; A: Immobilisierung auf Oberflächen; B: Immobilisierung in einer porösen Matrix; C: Immobilisierung mittels einer Barriere

Man unterscheidet nach Belfort drei Typen von Immobilisierungsverfahren (Belfort 1989). Die Abbildung 3-1 beschreibt schematisch diese drei Formen der Immobilisierung.

Im einfachsten Fall werden die Zellen auf eine Oberfläche aufgebracht. Beispiele für diese Form der Immobilisierung sind Biofilme und das Aufbringen von Zellen auf

Trägerpartikel. Beim zweiten Fall handelt es sich um die Einbettung von Zellen in porösen Matrices. Hier kommen beispielsweise Hydrogele zum Einsatz. Im dritten Fall werden Membranen zur Zellimmobilisierung verwendet (Piret 1990). Die Zellen werden dabei durch die Membran zurückgehalten. Sie können sich auch auf der Membranoberfläche oder in den Poren befinden.

3.2 Membranbioreaktoren

In membranbasierten Bioreaktoren (MBR; *membrane based bioreactor*) werden die Zellen über Membranen immobilisiert. Die Membranen teilen den Reaktor dabei in zwei oder mehr Reaktionsräume. Die Membranbarriere ermöglicht die komplette Rückhaltung von Zellen, die selektive Separation von Produkten, schädlichen Metaboliten aber auch die gezielte Zufütterung von Substraten. Man unterscheidet Membranreaktoren nach Membrantypus, Hydrodynamik und Betriebsweise. Außerdem wird zwischen zwei generellen Grundformen differenziert, die in Abbildung 3-2 aufgeführt sind (Giorno und Drioli 2000).

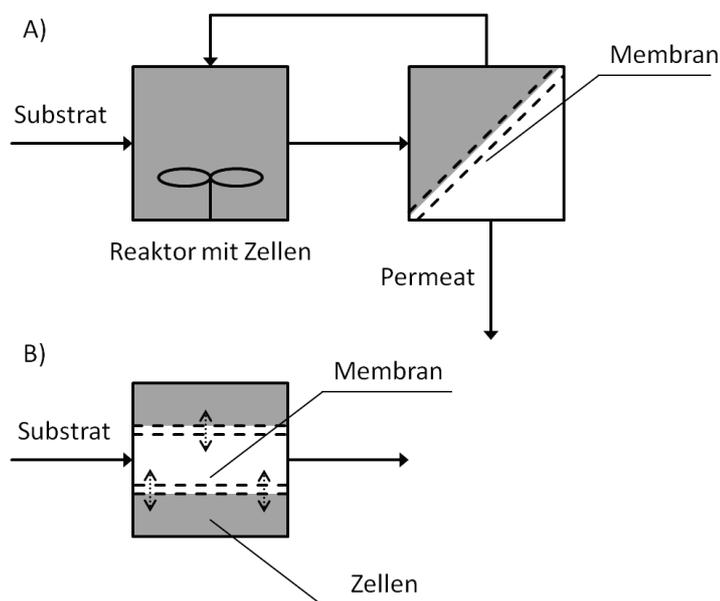


Abbildung 3-2: Grundtypen von Membranbioreaktoren; oben: Kombination vom Reaktor und Membraneinheit; unten: Membraneinheit integriert in Reaktor

Bei der ersten Variante (Abbildung 3-2 A) handelt es sich um eine Kombination aus Reaktor und Membraneinheit (äußerer Filter). Ein typisches Beispiel für diesen Reaktortyp ist die Kombination eines kontinuierlichen Rührkessels mit einem Filtrationsmodul für die Zellrückhaltung. Diese Konfiguration ist bei der industriellen Produktion von

monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen gebräuchlich (Banik und Heath 1995). Auf diese Weise wird eine Entkopplung von Verdünnungsrate und Wachstumsrate erreicht. Eine stationäre Betriebsweise ist so bei Verdünnungsraten möglich, die weit über der maximalen Wachstumsrate liegen.

Der Größenausschluss der Membran ist so gewählt, dass die Zellen zurückgehalten werden, aber der produzierte Antikörper abgeführt werden kann. In einem Perfusionbetrieb wird kontinuierlich frisches Medium zugeführt und zellfreies Medium mit Produkt abgeführt. *Membranfouling* ist bei dieser Betriebsweise ein Problem und stellt eine besondere Herausforderung dar. Die Hydrodynamik des Systems muss sehr präzise ausgelegt sein, um etwa den Scherstress auf die Zellen, die entlang der Membran gepumpt werden, zu minimieren.

Beim zweiten Reaktortyp (Abbildung 3-2 B) ist die Membran im Reaktor (innerer Filter) angebracht. Die Membran trennt den Reaktor in Kompartimente und immobilisiert auf diese Weise Zellen in einem der Reaktionsräume. Auch Bioreaktoren mit tubulären Membranen fallen unter diese Kategorie. Die immobilisierten Zellen werden über die tubulären Membranen mit Medium versorgt.

Weitere Klassifikationen von MBR werden beispielsweise aufgrund der Membranform vorgenommen. Hier gibt es Flachmembranen, Wickelmembranen und tubuläre Membranen. Im Folgenden wird auf tubuläre Membranen genauer eingegangen.

3.3 Tubuläre Membranen

Tubuläre Membranen zeichnen sich im Gegensatz zu Flachmembranen vor allem durch ihr gutes Verhältnis von Membranoberfläche zu Volumen aus. Ihre Form erlaubt hohe Packungsdichten und die meisten tubulären Membranen kommen anders als Flachmembranen ohne zusätzliche Stützstrukturen aus.

Hohlfasern aus polymeren Werkstoffen stellen die größte Gruppe der tubulären Membranen dar (Strathmann 1985). Polypropylene, Zelluloseester und Polyethersulfon gehören zu den gebräuchlichsten Materialien. Die Dominanz der Polymermembranen begründet sich durch ihre geringen Kosten und breiten Anwendungsmöglichkeiten. Demgegenüber stehen Membranen aus anorganischen Materialien wie Zirkondioxid oder beispielsweise Aluminiumoxid. Diese sind zwar teurer als Polymermembranen, bieten dafür aber Vorteile in Bezug auf mechanische und

thermische Belastbarkeit (Lin 2001). Zudem ist es möglich anorganische Membranen rückzuspülen und auf diese Art *fouling* zu vermeiden oder die Membran zu regenerieren.

Eine entscheidende Eigenschaft jeder Membran ist der Größenausschluss oder *cut-off*. Man unterscheidet zwischen Ultrafiltrationsmembranen (UF) mit Porengrößen von 2 - 100 nm und Mikrofiltrationsmembranen (MF) mit Porengrößen von 100 - 500 nm. Nanofiltrationsmembranen (NF) und Membranen für Reverse Osmose (RO) spielen im Bereich der Kultivierung keine Rolle. In Abbildung 3-3 ist eine Übersicht der verschiedenen Typen gegeben (Ulbricht 2006).

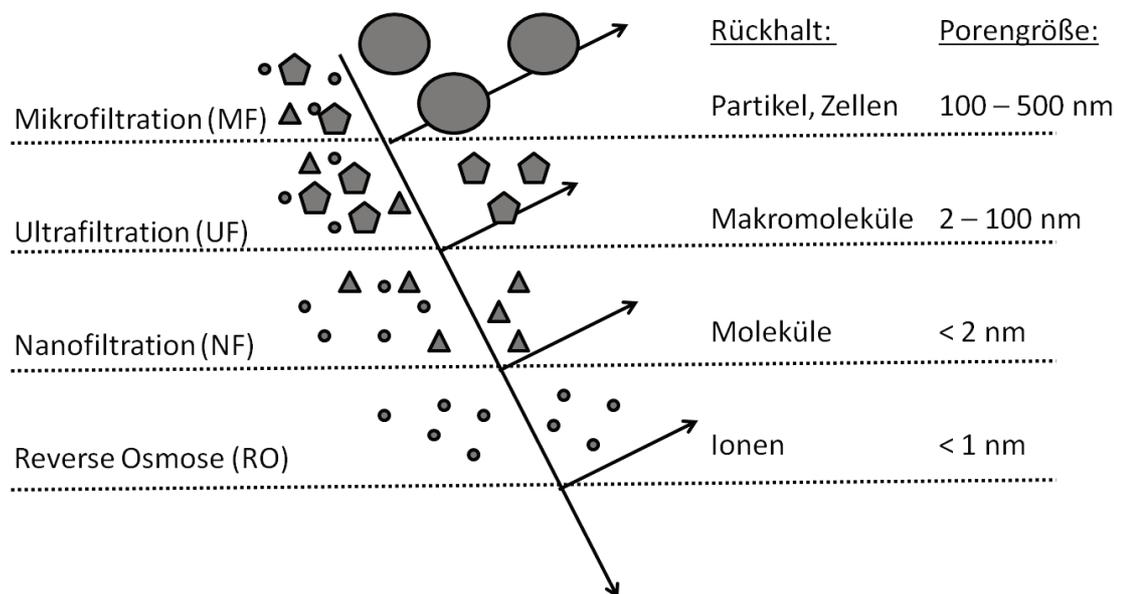


Abbildung 3-3: Übersicht zu Filtrationsmembranen

Unter dem Begriff tubuläre Membran werden verschiedene Membranklassen mit unterschiedlichen Tubusdurchmessern zusammengefasst. Tuben mit einem Außendurchmesser von 0,05 - 0,5 mm werden als Hohlfasern bezeichnet. Bei einem Außendurchmesser von 0,5 - 5 mm spricht man von Kapillaren (Melin und Rautenbach 2007). Eine weitere Unterscheidung erfolgt nach symmetrischen und asymmetrischen Membranen (Nowack et al. 2009). Symmetrische Membranen zeichnen sich durch ihren uniformen Porendurchmesser und eine einheitliche Porenform über die Dicke der Membranwandung aus. Der Vorteil ist eine geringe Wandstärke bei verhältnismäßig hoher mechanischer Stabilität. Zum Einsatz kommt der Membrantyp vorwiegend bei der Separation von Molekülen mit niedrigen Molekulargewichten und unter diffusionsgetriebenen Stofftransportbedingungen.

Die hydraulische Permeabilität symmetrischer Membranen ist niedriger im Vergleich zu asymmetrischen Membranen. Unter hydraulischer Permeabilität versteht man die Durchlässigkeit eines porösen Materials für Flüssigkeiten in Abhängigkeit des Drucks. Die Poren von asymmetrischen Membranen verengen sich über die Membranwandung hinweg. Dies führt zu einer geringeren mechanischen Stabilität der Porenschicht und macht Stützsichten notwendig. Aufgrund der guten hydraulischen Permeabilität der Membranen werden sie vorwiegend unter konvektiven Flussbedingungen über die Membran eingesetzt.

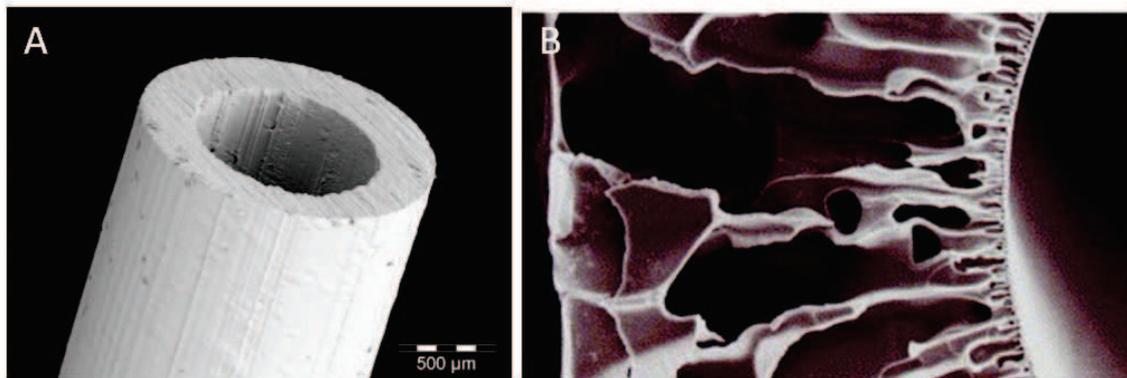


Abbildung 3-4: A: symmetrische Membran (Kroll 2010); B: asymmetrische Membran (Giorono 2000)

3.4 Bioreaktoren mit tubulären Membranen

Es kann praktisch jeder Zelltyp vom niedrigen Prokaryoten über Hefen und Pilze bis hin zu höheren Eukaryoten wie Pflanzen und Säugerzellen in Tubularmembran-Bioreaktoren (TMBR) kultiviert werden. Hohlfaserreaktoren und Kapillarreaktoren fallen beide unter den Begriff TMBR.

3.4.1 Prinzipieller Aufbau eines TMBR

Der typische Aufbau eines TMBR ist in Abbildung 3-5 schematisch dargestellt (Inloes et al. 1983a). Ein Bündel von tubulären Membranen ist in eine Röhre eingeklebt. Die Versiegelung bewirkt, dass ein Fluid, das von den Enden durch den Reaktor geführt werden soll, nur den Weg durch das Faserinnere nehmen kann. Dieser Intrakapillarraum soll im weiteren Verlauf als ICS bezeichnet werden (eng. *intra capillary space*). Der Raum um das Faseräußere wird als ECS (eng. *extra capillary space*) bezeichnet. Dieser ist durch die Verklebung und die Membran vom ICS getrennt. Alternativ zu ECS wird auch der Begriff *shell space* (Hüllraum) und für ICS Lumen verwendet.

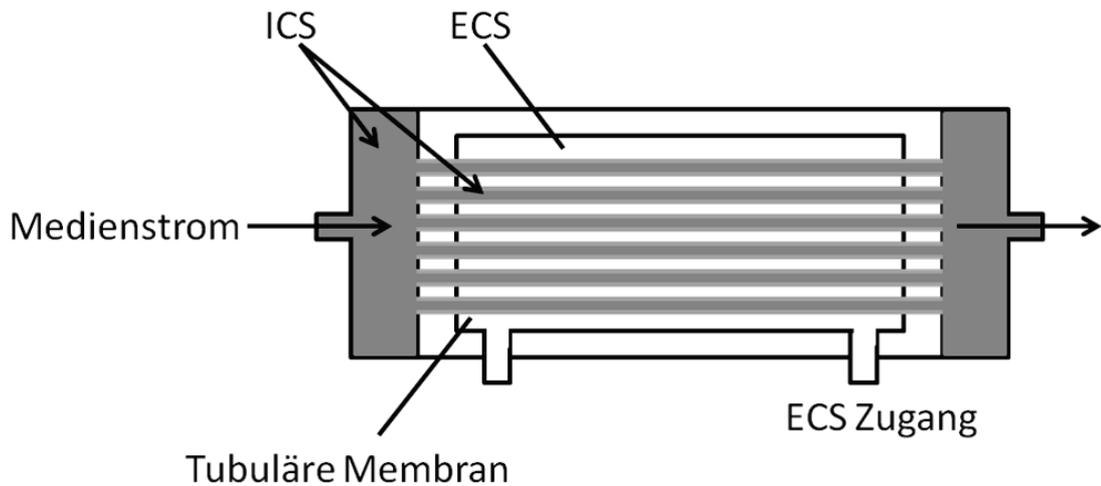


Abbildung 3-5: Schematischer Aufbau eines TMBR

Kultivierungsprozesse in einem TMBR werden meist wie in Abbildung 3-6 gezeigt durchgeführt. (Cadwell 1997). Die Zellen werden im ECS kultiviert. Die Zugänge zum ECS bleiben während der Kultivierung, abgesehen von Probenahmen, geschlossen. Durch den ICS wird das Medium zirkuliert. Ein Mediumsreservoir ist in den Kreislauf integriert. Die Zirkulation erfolgt über eine Pumpe. Nährstoffe, wie Glukose oder gelöster Sauerstoff können die Membran passieren und zu den Zellen im ECS gelangen. Produkte können so abgetrennt und aus dem Medienreservoir geerntet werden. Die Porengröße der Membran bestimmt, welche Substanzen passieren können. Die Sauerstoffversorgung wird meist durch eine lange gasdurchlässige Schlauchstrecke im ICS Kreislauf ermöglicht.

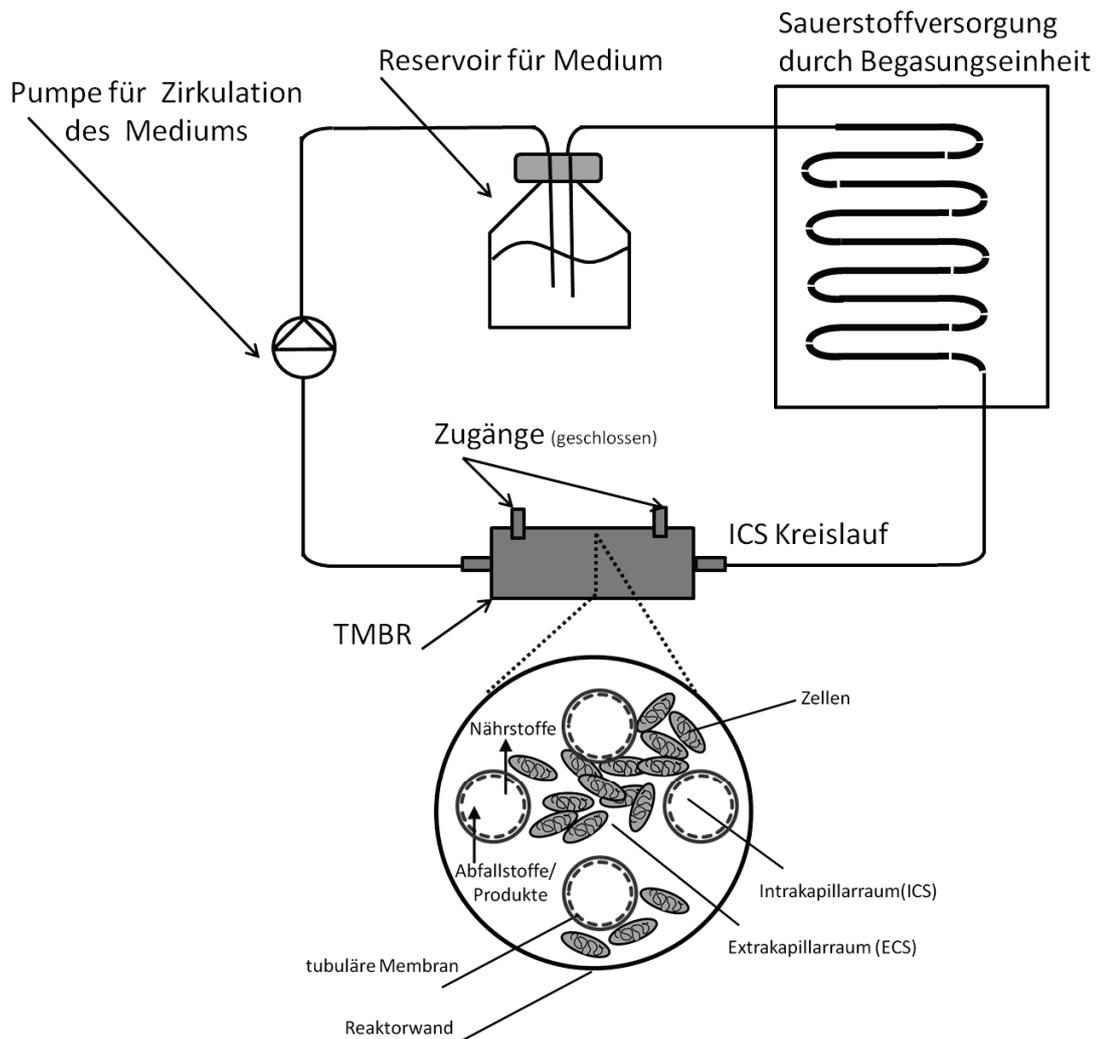


Abbildung 3-6: Typischer Aufbau eines TMBR Systems mit Reaktor und Mediumskreislauf

TMBR sind in verschiedenen Ausführungen von unterschiedlichen Herstellern verfügbar. In Tabelle 3 sind typische Eigenschaften von TMBR Systemen für den Labormaßstab aufgelistet. Das Kulturvolumen liegt in etwa zwischen 1,5 und 160 ml. Die Membranoberflächen, die angeboten werden, sind zwischen 75 und 11000 cm² groß. Die unteren Ausschlußgrenzen für Membranen beginnen bei ca. 5 kDa. Bis zu einer Porengröße von 0,3 µm kann frei gewählt werden. Die Durchmesser für die tubulären Membranen decken den Bereich von Hohlfasern und Kapillaren ab (0,2 – 5 mm).

Tabelle 3-1: Typische Eigenschaften von TMBR

Eigenschaft	Bereich
Kulturvolumen (normalerweise ECS)	1,5 - 160 ml
Membranoberfläche	75 - 11.000 cm ²
Zelldichten	≤ 5×10 ¹¹
Größenausschluss	5 KDa - 0,3 μm
Tubusdurchmesser	0,2 - 5 mm

TMBR sind durch eine ganze Reihe von Vor- und Nachteilen, die in Tabelle 3-2 aufgelistet sind, gekennzeichnet. Für den Einsatz eines TMBR spricht das gute Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, die Erreichbarkeit hoher Zelldichten und die komplette Rückhaltung der Zellen. TMBR bieten den Zellen zudem Schutz gegenüber Scherstress. Eine Vielzahl unterschiedlicher Anwendungen kann realisiert werden. Die Membran erlaubt das Einschließen von Produkten und durch die Membranbarriere sind auch Co-Kultivierungen von zwei Organismen in einem Reaktor denkbar. Demgegenüber stehen auch eine Reihe von Nachteilen. Die Versorgung von schnellwachsenden Organismen mit Sauerstoff gestaltet sich schwierig. Den Reaktoren fehlen meist Sensorik zur Prozessüberwachung und die Möglichkeiten zur Maßstabsvergrößerung sind limitiert. Bei Zellen, die auf der Oberfläche der Membranen wachsen, ist zudem eine repräsentative Probenahme kaum möglich.

Tabelle 3-2: Vor- und Nachteile von TMBR

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • großes Oberflächen-Volumen Verhältnis • hohe Zelldichten • lange Kultivierungsperioden • komplette Zellrückhaltung, kein Auswaschen • Schutz vor Scherstress • Möglichkeit der Aufkonzentration von Produkten bzw. Produktabführung • Möglichkeit der Co-Kultivierung • großes Anwendungsspektrum 	<ul style="list-style-type: none"> • mäßige Sauerstoffversorgung • Schwierigkeiten beim <i>scale-up</i> • fehlende Sensorik • Schwierigkeiten bei Probenahme von Zellen • kleine Volumina (kann auch von Vorteil sein) • komplexe Handhabung

3.4.2 Betriebsmodi von TMBR Systemen

Es ist möglich die Fluide in einen TMBR System auf unterschiedliche Art und Weise zu führen. In Abbildung 3-7 sind drei Optionen dargestellt. Die Kultivierung der Zellen muss zudem nicht unbedingt im ECS erfolgen.

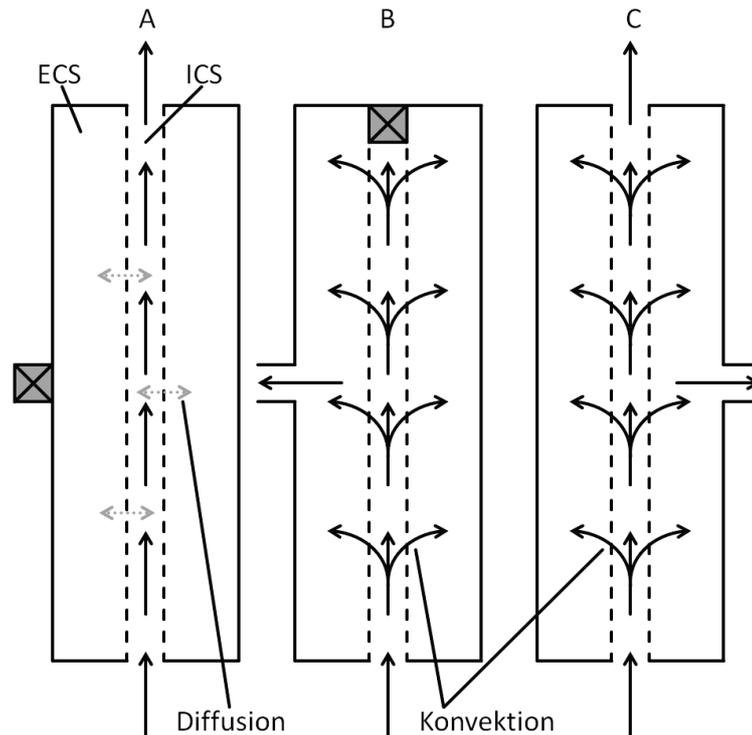


Abbildung 3-7: Darstellung verschiedener Betriebsmodi; A: axialer Fluss durch den ICS, ECS verschlossen, Stoffaustausch diffusionsgetrieben; B: ECS am Ende verschlossen und ICS offen, radialer konvektiver Fluss über die Membran, kontinuierliche Zufütterung von Medium in den ICS und Abzug aus dem ECS; C: Fluss durch den offenen ICS bei ebenfalls geöffnetem ECS, Teil des Volumenstroms fließt konvektiv über die Membran, kontinuierliche Zufütterung von Medium in den ICS und Abzug aus dem ECS

Der bereits vorgestellte TMBR Aufbau (Abbildung 3-6) entspricht der Variante A. Der ECS ist während des Betriebs geschlossen. Man bezeichnet dies auch als *closed shell mode*. Der Medienstrom fließt axial im Inneren der beidseitig geöffneten Tuben entlang. Es gibt keinen konvektiven Medienfluss über die Membran. Die Zellen im ECS sind bei diesem Betrieb optimal vor Scherstress geschützt. Der Stofftransport hängt ausschließlich vom Konzentrationsgefälle zwischen ECS und ICS ab. Reaktoren, die so betrieben werden, bezeichnet man als diffusions-kontrolliert.

In den beiden weiteren Varianten gibt es einen konvektiven Massenstrom von ICS zu ECS über die Membran (Perfusionsbetrieb). Die Zellen sind also abhängig vom Volumenstrom einer bestimmten Scherrate ausgesetzt. In Variante B ist der ICS an einem Ende verschlossen (*dead end*). Der gesamte Flüssigkeitsstrom fließt über die Membran. Zellen können hier beispielsweise als Biofilm auf der Oberfläche der Membranen im ECS wachsen und werden kontinuierlich mit frischem Medium aus dem ICS versorgt. Sekretierte Produkte können mit dem Volumenstrom aus dem ECS abgezogen werden.

Der Fall C beschreibt einen Kreuzstrombetrieb. Der Volumenstrom wird durch den beidseitig geöffneten ICS geführt. Ein Teilstrom wird dabei über die Membran aus dem ECS abgeführt. Zellen können hier im ICS auf der Membran wachsen oder werden in Suspension durch diesen hindurch gepumpt. In beiden Varianten (B und C) erfolgt eine kontinuierliche Zufuhr von Medium in den ICS Kreislauf um dem Volumenstrom aufrecht zu erhalten.

Neben den hier vorgestellten Varianten sind noch weitere denkbar. Zu diesen gehören die Umkehrung der Volumenströme von ECS zu ICS oder auch die konvektive Durchmischung des ECS durch Umwälzung.

3.4.3 Integrierte Produktabtrennung

Durch den Einsatz von Membranen in Bioprocessen kann eine in den Prozess integrierte Aufreinigungsstrategie auch ISPR (*in-situ product removal*) genannt verwirklicht werden (Lye 1999). Eine Möglichkeit ist es die Porengröße der Membran so zu wählen, dass die Zellen in ihrem Reaktorkompartiment immobilisiert bleiben. Gebildete Produkte passieren währenddessen die Membran und können dann abgetrennt werden. Dieser Transport kann über Diffusion oder über Konvektion (Perfusionsbetrieb) erfolgen. Zum Einsatz kommt diese Form des ISPR beispielsweise bei der Produktion von L-Phenylalanin (Rüffer et al. 2004).

Ein weiterer Ansatz für das ISPR ist die Nutzung von modifizierten Membranen. Durch Aufbringung von Affinitätsliganden auf die Membranoberfläche können selektiv Produkte gebunden und damit abgetrennt werden. Ein Beispiel für diesen Ansatz ist die Bindung von Proteinen mit *His-Tag* an Membranen mit IMAC (immobilisierte Metallchelate Chromatografie) Funktionalisierung während der Fermentation.

Eine Auflistung der allgemeinen Vor- und Nachteile von ISPR ist in Tabelle 3-3 aufgeführt (Takors 2004). Vorteilhaft sind die Reduzierung von Aufreinigungsschritten und die Abtrennung toxischer Metabolite. Hinzu kommen der verminderte Abbau von Produkten und die Vermeidung von Produktinhibierung. Gegen den Einsatz von ISPR sprechen die erhöhten Kosten beim Bau und der Komplexität der Anlagen. Weiter stehen regulatorische Hürden und die Gefahr von Kontaminationen dem ISPR im Weg.

Tabelle 3-3: Vor- und Nachteile von ISPR

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • weniger Aufarbeitungsschritte • Entfernung toxischer Metabolite • verminderter Produktabbau • verminderte Produktinhibierung 	<ul style="list-style-type: none"> • erhöhte Komplexität • erhöhte Kosten • Kontaminationsgefahr • Regulatorische Hürden

3.5 Anwendungsbeispiele

3.5.1 Kultivierung von Säugerzellen

Verschiedene TMBR Systeme werden erfolgreich im Bereich der Säugerzellkultivierung eingesetzt. Hier ermöglichen die Reaktoren Perfusionskulturen, das Arbeiten mit scherstress-sensitiven Zellen und die Parallelisierung für *Screeningzwecke* (Kretzmer und Schügerl 1991). In Tabelle 3-4 sind drei Anwendungsfelder von TMBR in der Säugerzellkultivierung aufgeführt. Betrachtet werden Produktion, klinische Anwendung und Screening in TMBR. Anhand von Beispielen werden diese im Weiteren näher erläutert.

Tabelle 3-4: Anwendungsgebiete für TMBR in der Zellkultur

Anwendungsgebiet	Beispiel
Produktion	Antikörper
Klinik	extrakorporale Assistenzsysteme
Screening	Sekretomanalyse Toxikologie

Die Kultivierung von Hybridomazellen für die Produktion von Antikörpern gehörte in den 1970er Jahren zu den frühen Anwendungen von TMBR Systemen (Köhler und Milstein 1975). Dieser Ansatz versprach Vorteile, durch die Möglichkeit Kulturen längerfristige oder sogar kontinuierlich betreiben zu können Vorteile. Außerdem sollten die Antikörper über die Membran im ECS eingeschlossen werden. (Altshuler et al. 1986; Piret 1990). Die erhöhten Produkttiter sollten zu verringerten Aufreinigungskosten führen und die Prozesse somit ökonomischer gestalten.

Letztendlich haben sich TMBR in der industriellen Produktion von Antikörpern nicht durchgesetzt. Heutzutage werden kontinuierliche (perfusion) Rührkessel eingesetzt (Rodrigues et al. 2010), um im industriellen Maßstab zu produzieren. In diesen Systemen wird die Verdünnungsrate vom Wachstum entkoppelt, in dem die Zellen über Filter- oder Sedimentationsvorrichtungen (*settler*) im Reaktor zurückgehalten werden.

Für die Produktion von kleineren Mengen Antikörpern beispielsweise für Forschungszwecke können moderne Einweg-Membranreaktoren durchaus mit Rührkesseln konkurrieren. In einem direkten Vergleich (Vermaasuori und Hurme 2011) zeigte sich, dass es möglich ist, 234 g mAb/Jahr für 6.400 €/g herzustellen während die Produktion in einem herkömmlichen Rührkessel mit 6.900 €/g zu veranschlagen ist. Bei der Produktion von Antikörpern in TMBR ist die Prozessüberwachung und -regelung limitiert, da die meisten Standardsensoren (pH, pO₂) nicht zur Verfügung stehen und die Zellen selbst häufig aufgrund ihrer Immobilisierung nicht betrachtet werden können. Aus diesem Grund wurden Bioprozessmodelle entwickelt die auf Basis von Daten aus der Substrataufnahme und der Metabolitformation eine Vorhersage der Produktbildung erlauben (Handa-Corrigan et al. 1992). Auf diese Weise sind eine gewisse Prozesskontrolle und ein besseres Prozessverständnis möglich.

Im klinischen Anwendungsbereich haben sich TMBR Systeme als Bioreaktor für menschliche Hepatozyten in bioartifiziellen Leberassistenzsystemen (BAL) bewährt (Rozga et al. 1993). Diese extrakorporalen Assistenzsysteme helfen Patienten mit akutem Leberversagen. Die metabolischen Fähigkeiten der Zellen, die im Reaktor immobilisiert sind, werden für die Detoxifikation des Patientenblutes genutzt. Das Blut wird auf der gegenüberliegenden Seite der Membran an den Zellen vorbeigepumpt. Toxine aus dem Blut passieren die Membran und werden durch die Zellen verstoffwechselt. Die Belastung des Patienten wird so verringert.

Die Untersuchung des Sekretoms von Krebszellen ist eine Anwendung aus dem Bereich des *Screenings* mit TMBR (Chang et al. 2009). Die Zellen werden in einer gewebeähnlichen Umgebung in hohen Zelldichten im ECS kultiviert. Das Sekretom kann im ICS analysiert werden, ohne dass die Kultur im ECS davon beeinflusst wird. Dieser Ansatz führte unter anderen zur Identifikation von CLIC1 als potenziellen Biomarker für Krebs.

In der *in vitro* Toxikologie werden ebenfalls TMBR Systeme verwendet um pharmakokinetische und pharmakodynamische *Screenings* durchzuführen. Hier hat es sich als vorteilhaft gegenüber Standardtechniken erwiesen, dass die Interaktion von Zeit- und Dosisabhängigkeit eines Wirkstoffes betrachtet werden kann (Cadwell 2009). Die Resultate stellten sich als klinisch relevant heraus und führten zu einer Vermeidung von Tierversuchen. Beispielsweise wurde der Effekt von 2'-3'-didehydro-3'-deoxythymidin auf HIV (*human immunodeficiency virus*) infizierte Zellen untersucht

(Bilello et al. 1994). Aus den Experimenten konnte die minimale Effektdosis und die Wirkstofftoxizität bei steigender Dosis ermittelt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es für TMBR in der Säugerzellkultur eine Vielzahl von interessanten Anwendungsmöglichkeiten gibt. Sie stellen wertvolle Werkzeuge für die Forschung dar und liefern so neue Erkenntnisse. Unter ökonomischen Gesichtspunkten, die in der Forschung eher zweitrangig sind, konnten sich die Systeme für die Produktion allerdings nicht durchsetzen.

3.5.2 Kultivierung von mikrobiellen Systemen

Die Kultivierung von mikrobiellen Zellen in einem TMBR ist eine Herausforderung. Der hohe Bedarf an Sauerstoff von schnellwachsenden aeroben Organismen führt schnell zu Limitationen. Nichtsdestotrotz gibt es eine ganze Reihe von Beispielen, in denen TMBR Systeme für die Kultivierung von Mikroorganismen wie Bakterien und Hefen verwendet wurden.

Zu den ersten Anwendungen kann hier die Kultivierung von *E.coli* in der porösen Matrix von anisotropen Hohlfasern zur Produktion von β -Laktamase angeführt werden (Inloes et al. 1983a). Für dieses Experiment wurde ein Reaktor mit einer einzelnen Hohlfaser, integriert in einen Glastubus, konstruiert. Die Zellen wurden in den ECS inkuliert und siedelten sich in der Membranmatrix an. Anschließend wurde das Medium abgezogen und der ECS mit angefeuchteter Luft begast, während durch den ICS Medium zirkuliert wurde. Diese Betriebsweise ermöglicht eine direkte Begasung und umgeht die Limitation in der Sauerstoffversorgung, die sonst häufig auftritt. Im Regelfall muss der Sauerstoff aus dem ICS in den ECS zu den Zellen diffundieren. Die Ergebnisse zeigten bis zu 100fach erhöhte volumetrische Produktivität und Zelldichten von bis zu 10^{12} Zellen/ml. Probleme wurden durch das starke Zellwachstum verursacht. Die Membranen verformten sich und rissen teilweise.

Ein alternativer Ansatz, die Sauerstofflimitationen in TMBR Systemen bei der Kultivierung von *E.coli* zu bewältigen, wurde durch die zusätzliche Integration einer zweiten Membranlage in einem Reaktor zur blasenfreien Begasung erprobt (Villain et al. 2008). In diesem wurden zwei Typen von Membranen verbaut. Eine Membranlage bestand aus PES Hohlfasern (hydrophil) und diente der Zirkulation von Medium. Eine zweite Lage aus PVDF Hohlfasern (hydrophob) diente der Begasung des Mediums mit den

Zellen im ECS. Dieser "Dual-Hohlfaser-Bioreaktor" war zudem mit einem magnetischen Rührkern und einem optischen Sauerstoffsensor bestückt. Die Modifikationen erlaubten die sauerstoffintensive Kultivierung des schnellwachsenden *E.coli* Stamms K12, der zudem ein Plasmid für die Produktion von GFP (*green fluorescent protein*) trug. Die Leistungsfähigkeit des Systems kann nicht mit der eines Rührkesselreaktors konkurrieren. Aber es ist ein Beispiel dafür, dass sich TMBR Systeme auf vielfältige Weise modifizieren und damit an Prozessbedürfnisse anpassen lassen.

Gerade die mechanische Stabilität von Membranen stellt bei starkem Zellwachstum ein Problem dar. Hier haben anorganische Membranen einen großen Vorteil gegenüber Polymermembranen. Aus dieser Motivation heraus wurde von Liu *E.coli* in Zirkonium Kapillaren immobilisiert und kultiviert (Liu et al. 2010).

Von einigen Bakterien und Pilzen ist bekannt, dass diese den Cytochrom P450 Metabolismus von Säugern imitieren können (Newcomb et al. 2006). Diese Zellen können als Modell für den Säuger-Metabolismus verwendet werden (Smith und Rosazza 1974). Normalerweise nutzt man diese Eigenschaft, um Wirkstoffe in Schüttelkolbenkulturen umzusetzen und anschließend die Metabolite zu analysieren. Alternativ kann man TMBR Systeme verwenden und hat zudem den Vorteil, dass die Wirkstoffkonzentration über Zugabe aus dem ICS gesteuert werden kann und dass dabei inhibitorische Effekte vermieden werden. Im Jahr 2008 wurden auf diese Weise hydroxilierte Metabolite von Diclophenac durch *Actinoplanes sp.* in einem TMBR erzeugt (Osorio-Lozada et al. 2008). Dabei war außerdem eine erneute Verwendung der Kulturen möglich.

Bei der Verwendung von TMBR Systemen besteht die Möglichkeit einer prozessintegrierten Produktabtrennung, auch ISPR (*in-situ product removal*) genannt. Bei diesem Konzept nutzt man eine Membran, die das von den Zellen im ECS gebildete Produkt in den ICS passieren lässt. Anschließend kann das Produkt aus dem zellfreien ICS Medium aufgereinigt werden. Der ICS dient hier also nicht nur der Versorgung mit Nährstoffen, sondern zusätzlich als Transportmedium für das Produkt. Exemplarisch für diesen Ansatz sei hier die Produktion von Ethanol mit *S.cerevisiae* durch Inloes (Inloes et al. 1983b) genannt. Die Produktivität lag bei diesem Experiment 3-4 mal höher verglichen mit Rührkesselreaktoren und es wurden Zelldichten von $3,5 \times 10^9$ Zellen/ml auf der Oberfläche von isotropen tubulären Membranen und 10^{10} Zellen/ml in der Wandmatrix von anisotropen Membranen erreicht. Auch wenn bei der anaeroben

Ethanolproduktion kein Sauerstoffmangel auftreten kann, zeigte sich eine Limitierung bei der Glukoseversorgung. Die Bildung von Kohlendioxid sowie das starke Zellwachstum führten, ähnlich wie bei den Anwendungen mit *E.coli*, zu Defekten in den Membranen.

Zusammenfassend können die Membranintegrität und die Sauerstoffversorgung als Problembereiche bei der Kultivierung aerober Mikroorganismen gesehen werden. Deshalb haben sich TMBR trotz aller Vorteile nicht auf breiter Front durchgesetzt.

3.5.3 Kultivierung von Pilz- und Pflanzenzellen

Bei der Kultivierung von Pilzen in TMBR Systemen treten ähnliche Herausforderungen in Bezug auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung auf. Ein System, das dem bereits beschriebenen Dual-Hohlfaser-Reaktor von Villain ähnelt, wurde von Chung für die Kultivierung von *A.niger* (Chung und Chang 1988) beschrieben. Hydrophile Membranen wurden durch Chung 1988 für die Versorgung der Zellen mit Medium und zum Abführen der gebildeten Zitronensäure eingesetzt. Die zweite Membranlage aus hydrophobem Material wurde zur Begasung verwendet. Die Leistungsfähigkeit war zwölfmal höher als in Schüttelkolben. Auch Chung berichtet über Membranprobleme.

Abseits von Anwendungen in der tierischen Zellkultur sind kommerzielle TMBR Systeme selten. Das "Quorus System" von Synexa (Kapstadt, Südafrika) ist ein kommerziell erhältlicher Einweg-TMBR zur Kultivierung von filamentösen Pilzen. Dieses System verwendet keramische Kapillaren anstelle der weit verbreiteten polymeren Hohlfasern. Der Medienfluss wird durch Druckluft erzeugt und die Kapillaren werden, an einem Ende verschlossen, radial konvektiv durchströmt. Die Zellen wachsen als Biofilm auf der Oberfläche der Membranen, werden auch vom Medium durchströmt und können direkt begast werden. Das Medium wird kontinuierlich aus dem ECS abgezogen. Auf diese Weise können auch von den Pilzen sekretierte Produkte abgeführt werden. Die Inokulation des Reaktors funktioniert umgekehrt zur Betriebsweise. Der ECS wird mit Medium und Zellen gefüllt und anschließend wird durch Unterdruck das Medium zum ICS abgezogen und so die Zellen auf der Membran aufgebracht.

Die Kultivierung von Pflanzenzellen ermöglicht die Produktion von wertvollen sekundären Metaboliten und pharmazeutisch relevanten Substanzen. Diese können häufig nur sehr schwierig oder gar nicht synthetisiert werden (Prenosil und Pedersen 1983).

Die Anforderungen bei der Kultivierung von Pflanzenzellen ähneln denen von Säugerzellen. Die Zellen sind anfällig gegenüber Scherstress, was eine Kultivierung im TMBR nahe legt. Hier können hohe Zelldichten erreicht werden und das Wachstum von der Produktbildung abgekoppelt werden. Phenolische Substanzen wurden von Jose aus *Daucus carota* Zellen, die in einem TMBR kultiviert wurden, gewonnen (Jose et al. 1983). In den ICS Mediumskreislauf war direkt eine Chromatographiesäule für die Aufreinigung integriert.

Im Bereich der Pilz- und Pflanzenzellen Kultivierung sind interessante Anwendungsbeispiele, wie die Produktion wertvoller Metabolite oder organischer Säuren zu finden. Hier zeigt sich, dass gerade speziell angepasste Systeme, die auf die Anforderungen des Prozesses zugeschnitten sind, zum Erfolg führen können.

3.6 Der universelle TMBR

Die Anforderungen an einen universellen TMBR sind bei wechselnden Organismen und Prozessen sehr unterschiedlich. Bakterien benötigen beispielsweise einen hohen Sauerstoffeintrag und eine gute Durchmischung. Eine adhärente Säugerzelllinie hingegen wäre auf eine große biokompatible Membranoberfläche bei minimalem Scherstress angewiesen.

Ein universeller TMBR muss **modular** sein, damit die Membranen, die Membranfläche, das Reaktorvolumen und die Hydrodynamik individuell an die jeweiligen Kultivierungsbedürfnisse optimal angepasst werden können. Außerdem muss ein universeller TMBR bei verschiedenen Betriebsmodi gefahren werden können. Einen TMBR der diesen Forderungen entspricht und damit universell einsetzbar wäre, gibt es bisher nicht.

3.6.1 Membranen

Die Membranen sind für die Rückhaltung der Zellen, die Zufuhr von Substraten und die Abfuhr von Produkten verantwortlich. In einem universellen TMBR werden über die Auswahl der Membranen wichtige Grundeigenschaften des Systems festgelegt. Es kann zwischen anorganischen und polymeren Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen und Oberflächeneigenschaften gewählt werden. Außerdem entscheidet der Tubusdurchmesser über das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Erweitert wird das Auswahlpektrum um symmetrische und asymmetrische Membranen. Daher sind auch modifizierte Membranen mit Affinitätsliganden zur Abtrennung von Produkten denkbar. Soll im späteren Prozess ein Zielprotein die Membran zur Abtrennung passieren können, muss die Porengröße entsprechend ausgewählt werden.

Ein Faktor, der die Auswahl auch bestimmen kann, ist z. B. die notwendige mechanische Stabilität der Membran. Hier ist eine anorganische Membran einer Polymermembran überlegen. Die Auswahl der Membranen hat Einfluss auf die weiteren Module.

3.6.2 Membranoberfläche

Die Oberflächeneigenschaften werden bereits durch die Auswahl des Materials festgelegt. Eine hydrophobe Oberfläche ist von Vorteil, wenn die Membranen zur Begasung eingesetzt werden sollen. Die hydrophobe Oberfläche minimiert den Austrag von

Medium mit dem Gasstrom. Bei der Versorgung der Zellen mit Medium ist hingegen eine hydrophile Membran sinnvoll. Diese unterstützt den Stoffaustausch zwischen zwei flüssigen Phasen.

Für den Stoffaustausch zwischen ICS und ECS ist das Verhältnis von Memranoberfläche zu Volumen entscheidend. Diese wird über die Anzahl an tubulären Membranen und deren Durchmesser festgelegt. Je größer das Verhältnis, desto effektiver ist der Stoffaustausch. Bei adhärennten Zellen bestimmt die Fläche zudem die maximale Anzahl an kultivierbaren Zellen.

3.6.3 Volumen

Abhängig vom Maßstab, in dem gearbeitet werden soll, sind die Volumina von ICS und ECS auszulegen. Das ICS Volumen kann über die Größe des Mediumsreservoirs definiert werden. Das ECS Volumen ist wiederum abhängig von der Anzahl, dem Durchmesser und der Anordnung der Membranen. Die Packungsdichte und der Tubusdurchmesser bestimmen das Verhältnis von Membranoberfläche zu Volumen. Durch Parallelisieren von TMBRs können auch größere ECS Arbeitsvolumina leicht ermöglicht werden. Es ist darüber hinaus möglich Prozessschritte (Wachstum/ Produktion) zu entkoppeln.

3.6.4 Betriebsmodi

In Kapitel 3.4.2 wurden bereits unterschiedliche Möglichkeiten zum Betrieb von TMBR vorgestellt. Um verschiedene Betriebsmodi im TMBR zu ermöglichen, muss das Reaktordesign mit Zu- und Abläufen sowohl zum ICS als auch zum ECS entsprechend ausgelegt sein. Soll ein konvektiver Stofftransport durch die Membran erfolgen, kann ein Perfusionsbetrieb gewählt werden. Bei scherempfindlichen Zellen sollte ein konvektiver Fluss über die Membran dagegen vermieden und unter diffusions-kontrollierten Bedingungen gearbeitet werden.

3.6.5 Hydrodynamik

Die Hydrodynamik des Systems hat Einfluss auf die Durchmischung, die Scherrate und den Stoffübergang im System. Der Betriebsmodus legt bereits fest, ob ein Perfusionsbetrieb vorliegt oder nicht.

Eine turbulente Strömung kann den diffusionsgetriebenen Stofftransport beschleunigen, da die limitierende Grenzschicht minimiert wird. Scherempfindliche Zellen dagegen sollten keiner turbulenten Strömung ausgesetzt sein. Die Strömungseigenschaften können durch erhöhte Volumenströme bzw. Flussgeschwindigkeiten oder Einbauten zur Flüssigkeitsführung (Leitbleche, Strömungsbrecher, statische Mischer) beeinflusst werden. Außerdem können über die Membrangeometrie sekundäre Strömungseffekte, wie Dean Wirbel, induziert werden. So können turbulente Strömungen bei niedrigen Volumenströmen realisiert werden. ICS und ECS sind separat zu betrachten.

4 Praktische Arbeiten

Zunächst wird die Entwicklung des neuen modularen Reaktorsystems beschrieben. Die Eignung neuartiger keramischer Kapillaren für den Einsatz im Reaktorsystem, insbesondere die Biokompatibilität, wird überprüft. Es folgt die eingehende Charakterisierung der reaktionstechnischen Eigenschaften des Reaktorsystems in unterschiedlichen Konfigurationen in Kapitel 4.2. Schließlich wird das Anwendungsspektrum des Reaktors anhand mehrerer Kultivierungen von Modellorganismen aufgezeigt (Abschnitt 4.3). Erweitert wird das Anwendungsspektrum mit einem Nutzungsbeispiel aus der Aufreinigung (4.3.5). In Kapitel 4.4 wird die Nutzung oberflächenmodifizierter keramischer Kapillaren zum Zellaufschluß dargestellt.

Anschließend wird die Integration des Reaktorsystems in eine Mess- und Steuerungsumgebung ebenso beschrieben, wie alternative Fertigungstechniken für Reaktorprototypen.

4.1 Reaktordesign

Basierend auf Erfahrungen mit einem bereits im Institut entwickelten TMBR wurde ein neues Reaktorsystem entwickelt.

4.1.1 Vorhergehendes Reaktorsystem

In den Arbeiten von Kroll (Kroll 2008) und Meyer (Meyer 2008) wurde ein Bioreaktor mit tubulären Membranen entwickelt, charakterisiert und getestet. Das System wurde zur Kultivierung von aeroben Mikroorganismen und für die prozessintegrierte Produktaufreinigung mit modifizierten Membranen entwickelt.

Der Reaktor (Abbildung 4-1) besteht aus Plexiglas und ist mit zwei Typen tubulärer Membranen ausgestattet. Eine Membranlage aus 43 PVDF Hohlfasern dient der blasenfreien Begasung des Systems, die zweite Lage aus 43 PES Hohlfasern der Versorgung des ECS mit Nährstoffen. Die Sauerstoffkonzentration im Reaktor kann mit faseroptischen Sensoren überwacht und der ECS mit einem magnetischen Rührkern durchmischt werden. Im Zuge der Arbeiten wurden Protokolle zur chemischen Sterilisation des Reaktors und zur Fixierung der Membranen mit einem Silikonkleber entwickelt. Das System hat sich in der Kultivierung aerober Mikroorganismen (*E.coli*, *C.glutamicum*) bewährt. Außerdem gelang die Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag

über IMAC (*immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatografie*) modifizierte Membranen.

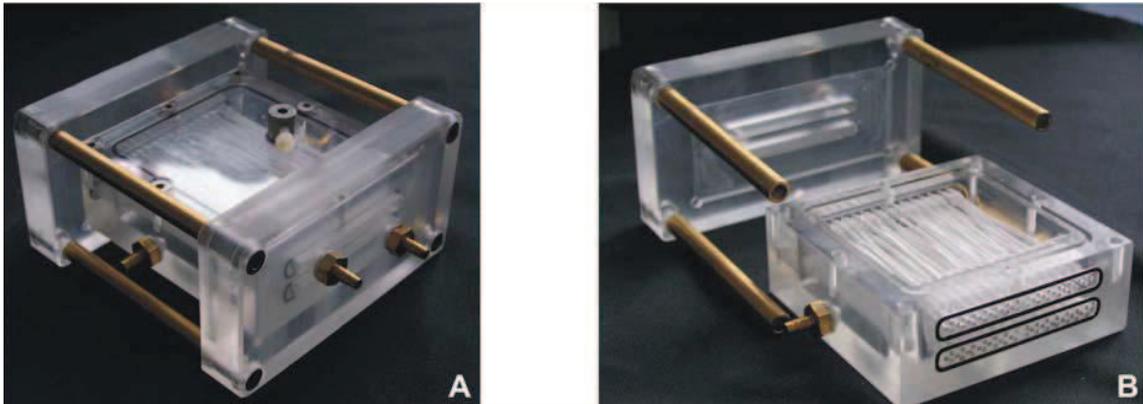


Abbildung 4-1: Dual-Hohlfaserbioreaktor-System in zwei Ansichten (A;B)

Der Reaktor weist allerdings gravierende Schwachstellen auf. Die chemische Sterilisation und die Bestückung mit Membranen sind äußerst zeitaufwendig. Die Integration neuer Membranen ist nur mit großem Aufwand möglich, da das Reaktorgehäuse ausgetauscht werden müsste. Anwendungen im Bereich der Kultivierung blieben auf Bakterien beschränkt. Versuche die Kultivierung von Säugerzellen in dem System zu realisieren verliefen nicht erfolgreich (Schmidt 2007). Die Abdichtung des Reaktors ist aufgrund der Vielzahl an Dichtungen problematisch. Eine Weiternutzung des Reaktorsystems ist daher nicht möglich.

4.1.2 Weiterentwicklung des Reaktorsystems

Ziel der Entwicklung ist ein anpassungsfähiger TMBR (Kapitel 3.6). Das schließt insbesondere die Membranen mit ein, da diese den größten Einfluss auf die Reaktoreigenschaften haben. In Abbildung 4-2 ist das Konzept für den neuen Reaktor dargestellt. Das Reaktorsystem besteht aus einem separaten Haltezyylinder für die tubulären Membranen, zwei Deckeln und einem Reaktorgehäuse, in den der Zylinder eingesetzt wird.

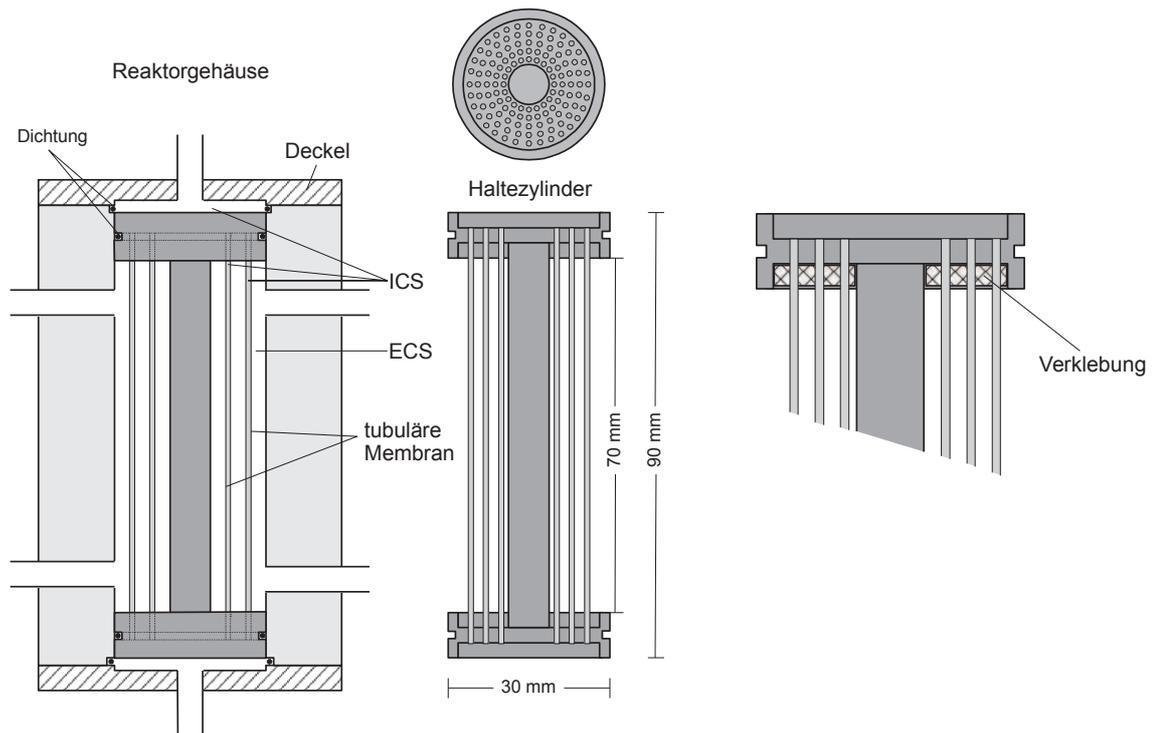


Abbildung 4-2: Reaktorkonzept; links: Haltezylinder im Reaktorgehäuse; mittig: Haltezylinder Ansichten; rechts: Membranverklebung im Haltezylinderkopf

Die notwendige Flexibilität in Hinblick auf die Auswahl, Anzahl und Anordnung der Membranen wird durch den Haltezylinder erreicht (Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3). Dieser entkoppelt das Membranmodul von den übrigen Reaktorkomponenten. So sind für alle Modifikationen, die die Membranen betreffen, lediglich Veränderungen am Haltezylinder notwendig.

Der Haltezylinder selbst besteht aus einem Edelstahlstab mit 8 mm Durchmesser, an dessen Ende runde Stahlscheiben (\varnothing 30 mm) mit den Bohrungen für Membranen angeschweißt sind. Abhängig vom Durchmesser der verwendeten Membran, der Anzahl und Anordnung können die erforderlichen Bohrungen in den Haltezylinder gesetzt werden. Für die Fixierung der Membranen wird auf das von Meyer und Kroll entwickelte Verfahren mit Silikonkleber zurückgegriffen. Der Haltezylinder verfügt über ein Reservoir für den Klebstoff, um eine einheitliche Fixierung zu gewährleisten. Eine weitere Aussparung (Nut) am Ende des Haltezylinders ist für einen Dichtungsring eingearbeitet, so kann ein sicheres und steril abgeschlossenes Einsetzen in das Gehäuse ermöglicht werden.

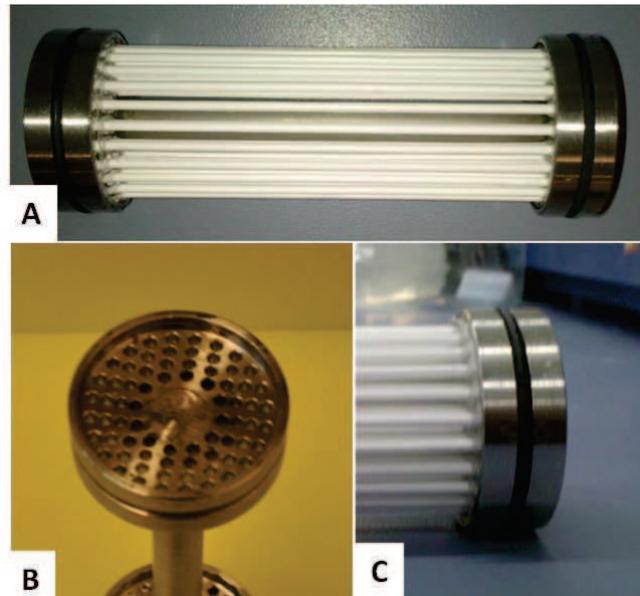


Abbildung 4-3: Fotos des Haltezyinders; A: Haltezylinder bestückt mit 72 keramischen Kapillaren; B: unbestückter Haltezylinder; C: Nahaufnahme von Haltezylinder mit Dichtungsring

Das Reaktorgehäuse hat die Außenmaße 60 x 60 x 90 mm (H x B x T). In dieses wird der Haltezylinder mit den Membranen eingesetzt (Abbildung 4-4). Anschließend werden Dichtungsringe aufgelegt und die Deckel mit den Zugängen zum ICS angeschraubt.

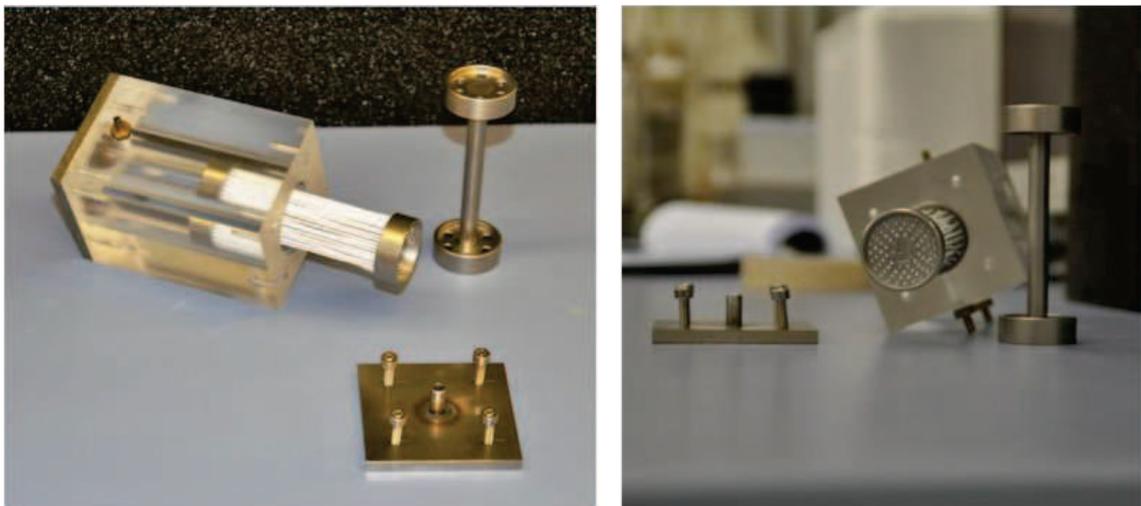


Abbildung 4-4: Fotos vom Reaktorprototyp aus Plexiglas

Das Reaktorgehäuse wurde zunächst aus Plexiglas gefertigt. Dieses Material hat den Vorteil, dass es leicht zu bearbeiten ist und die Integration der faseroptischen Sensorik, wie im Reaktor von Kroll und Meyer, direkt ermöglicht. Außerdem kann der Prozess im Inneren beobachtet werden. Zur Sterilisation des Reaktors wurde auf das von Kroll und

Meyer entwickelte Protokoll zurückgegriffen. Dabei wird der Reaktor im ECS und ICS mit 1 % Natriumhypochlorid Lösung für eine Stunde gespült und anschließend mit sterilem Wasser bzw. Puffer gewaschen. Bei der Erprobung der Reaktoren aus Plexiglas wurden nach kurzem Gebrauch Materialermüdungen an den Gewindebohrungen und dem Reaktorgehäuse beobachtet. Hier hatten sich belastungsbedingt Haarrisse gebildet (Abbildung 4-5). Als Folge dessen traten in einer Reihe von Experimenten Kontaminationen auf. Die chemische Sterilisation war nicht ausreichend.

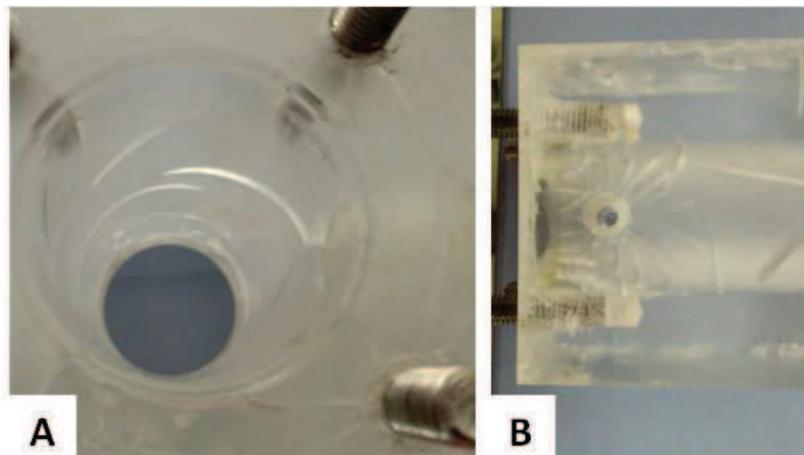


Abbildung 4-5: A: Risse im Inneren des Reaktorgehäuse; B: Risse Zugang zum ECS

Um eine Materialermüdung auszuschließen wurde das Reaktorgehäuse aus Edelstahl gefertigt. Fertigungsdauer, -aufwand und Gewicht wurden so erhöht. Aber die zeit- und arbeitsintensive chemische Sterilisation kann nun durch Autoklavieren ersetzt werden (121°C, 20 min). Edelstahl ist zudem ein etablierter und unbedenklicher Werkstoff in der Reaktortechnik. Für die Implementierung der faseroptischen Sensorik wurden im weiteren Projektverlauf Sichtfenster aus Glas in den Reaktor integriert.

Der endgültige Reaktor und ein schematisches Aufbaubeispiel für einen Kultivierungsprozess ist in dargestellt. Die Kultivierung erfolgt hier im geschlossenen ECS, während das Medium im ICS zirkuliert. Proben können über Septen aus ICS und ECS entnommen werden. Über die beiden zusätzlichen Zugänge kann der ECS mit einer Pumpe umgewälzt werden. Sauerstoff kann über einen Sterilfilter in den Kopfraum des ICS Reservoirs und von dort ins Medium diffundieren. Der gelöste Sauerstoff diffundiert zusammen mit den übrigen Nährstoffen über die Membran vom ICS zu den Zellen im ECS.

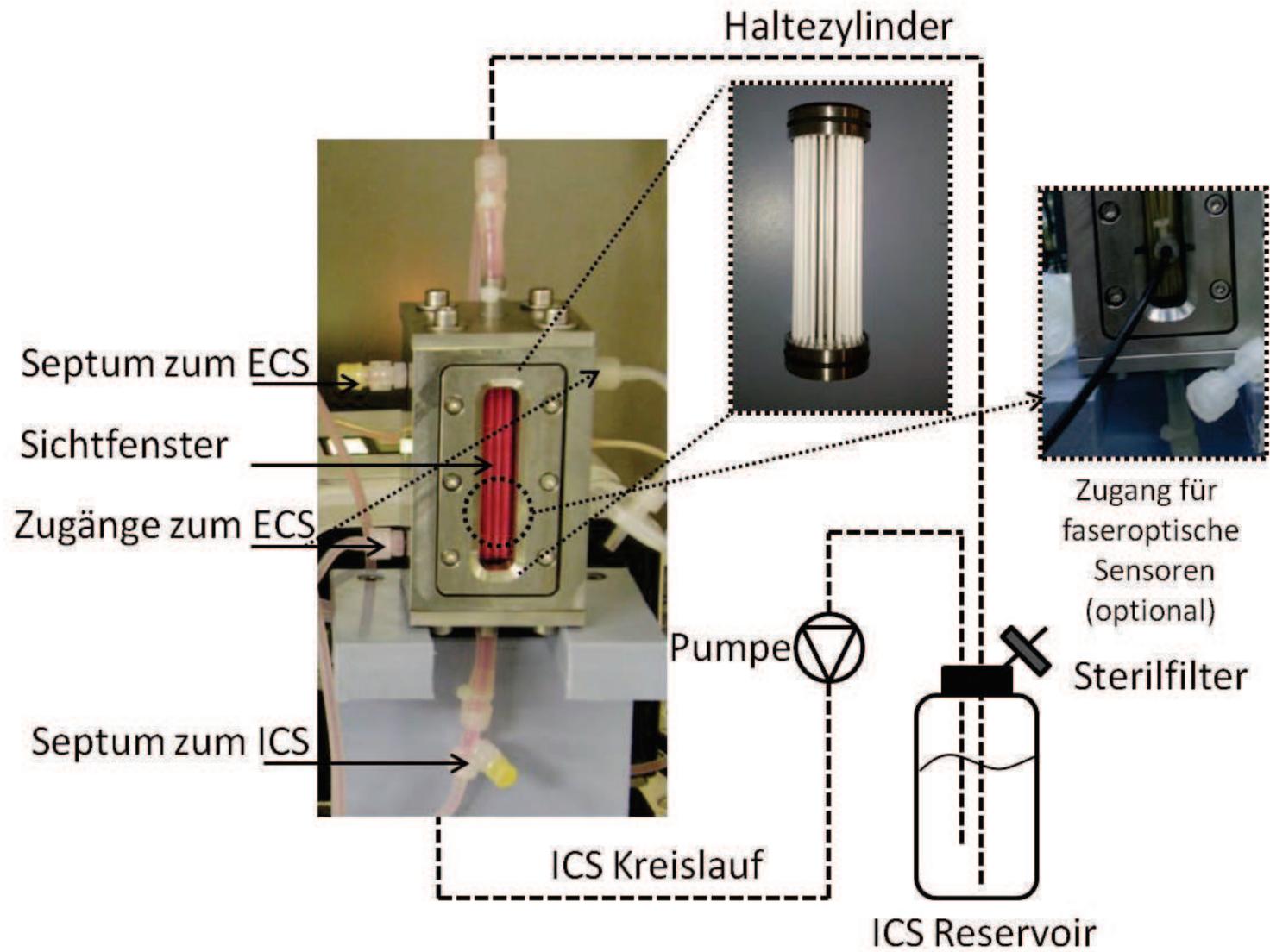


Abbildung 4-6: Endgültiges Reaktorsystem mit den einzelnen Komponenten und Peripherie

Bezogen auf die Anforderungen, die für den universellen TMBR formuliert wurden (siehe Kapitel 3.6), kann dieses System bereits einige Punkte erfüllen. Durch den entwickelten Haltezylinder können Membranen mit unterschiedlichen Durchmessern, in variabler Anzahl, Geometrie und aus gewünschtem Material einfach in den Reaktor integriert werden. In einem gewissen Umfang kann auch Einfluss auf die Anordnung der Membranen, beispielsweise über den Abstand der Bohrungen, genommen werden. Zur weiteren Erprobung wurden Haltezylinder für 72 tubuläre Membranen gefertigt. Dies entspricht der maximalen Anzahl für Membranen mit einem Durchmesser von ca. 1 mm, die bei der Fertigung zu realisieren ist. Der Reaktor verfügt dann bei einer Bestückung mit 72 PES Hohlfasern (80 kDa, Membrana, Wuppertal) über eine Membranfläche (außen) von $158,33 \text{ cm}^2$ und einem ECS Volumen von 46,4 ml. Der ECS verfügt über drei Zugänge, über die unterschiedliche Optionen in der Führung von Fluiden durch das System prinzipiell ermöglicht werden. Das ICS Volumen kann über die Größe des eingesetzten Reservoirs variiert werden. Die veränderte Reaktorvariante aus Edelstahl verkürzt die Vorbereitungszeit und erleichtert den Einsatz im Labor. Auf Möglichkeiten zukünftig angepasste sterile Einweg-Reaktoren aus Kunststoff zum Einsatz zu bringen, wird im Verlauf der Arbeit noch eingegangen (Kapitel 4.6).

4.1.3 Implementierung von anorganischen Membranen

In den entwickelten Reaktor sollten im Verlauf des Projektes neuentwickelte keramische Kapillaren integriert werden. Diese stammen von der Arbeitsgruppe *Advanced Ceramics* (Universität Bremen) und wurden ursprünglich für die Filtration zur Abtrennung von Mikroorganismen entwickelt (Kroll 2010).

Gegenüber den weit verbreiteten polymeren Membranen weisen anorganische Membranen einige Vorteile auf. Sie sind thermisch, mechanisch und chemisch erheblich stabiler. Zudem erlauben Sie eher das Rückspülen, um die Membran zu regenerieren. Unter Umständen können regenerierte Membranen so mehrfach verwendet und die Prozesskosten gesenkt werden. Es ist möglich, keramische Kapillaren in unterschiedlichen Geometrien zu fertigen. Stabile Helices oder mäanderförmige Membranen sind neben linearen Kapillaren denkbar, beispielsweise um die Strömung gezielt zu beeinflussen.

4.1.3.1 Keramischer Kapillaren

Die verwendeten Kapillaren bestehen aus Zirkoniumdioxid (ZrO_2) und werden nach einem Verfahren von Stephen Kroll der Arbeitsgruppe *Advanced Ceramics* (Universität Bremen) hergestellt und analysiert (Kroll 2010). Die Kapillaren werden im Folgenden als AC-K bezeichnet. Die Herausforderung bei der Herstellung von keramischen Kapillaren ist ein defektfreies Resultat. Die AC-K sollten über eine definierte Porengröße und eine hohe offene Porosität bei gleichzeitig ausreichender mechanischer Stabilität verfügen.

Die Herstellung ist ein mehrstufiger Prozess (Abbildung 4-7). Am Anfang steht ein sogenannter keramischer Schlicker. Dieser besteht hier aus organischen Lösemitteln (Dekanol, Hexan), Additiven bzw. Bindemitteln (Stearinsäure, Bienenwachs) und ZrO_2 in Pulverform. Die Mischung wird mittels Ultraschall homogenisiert und anschließend werden die organischen Lösemittel entfernt.

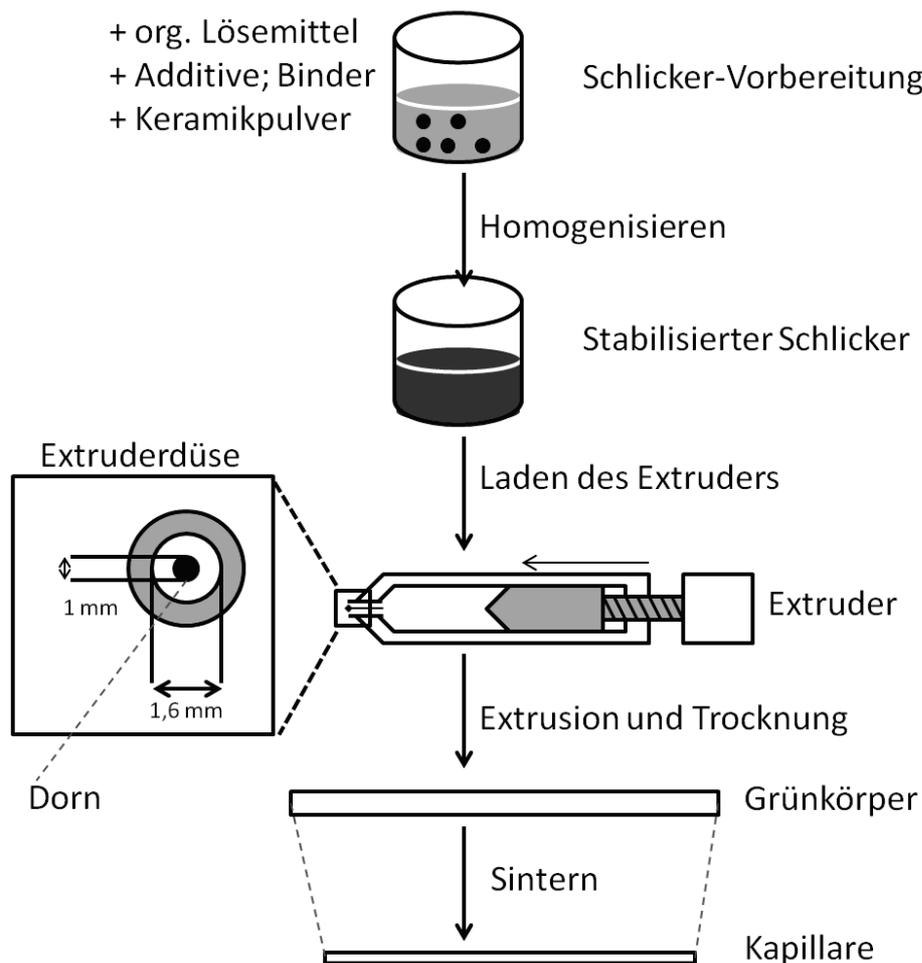


Abbildung 4-7: Darstellung des Herstellungsprozesses von keramischen Kapillaren

Der entstandene Schlicker wird vor der weiteren Verarbeitung getempert, das heißt für ca. 2,5 h auf 40 °C gebracht und in den Extruder geladen. Diese Vorrichtung bringt den Schlicker über eine entsprechende Düse in Form. Der Durchmesser der Düse legt den Außendurchmesser der extrudierten Kapillaren und ein Dorn in der Düse den Innendurchmesser fest. Der entstandene Tubus, der als Grünkörper bezeichnet wird, wird zunächst getrocknet.

Es folgt das Sintern. In diesem Schritt wird der Grünkörper auf eine Temperatur von 1050 °C erhitzt. Alle organischen Additive werden dadurch entfernt. So erhält die Kapillare ihre Stabilität. Beim Sintern schrumpft sie zudem um ca. 7 %. Der Außendurchmesser der Kapillare beträgt anschließend 1,4 mm, der Innendurchmesser 0,84 mm. Die fertigen Kapillaren werden zur Qualitätskontrolle einer Reihe von Analysen unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. Zur Bestimmung der Porosität und Porengröße wird eine Quecksilber-Intrusions-Porosimetrie Messung durchgeführt. Die Porengröße liegt zwischen 50 und 200 nm bei 51 % offener Porosität. Die Porenstruktur ist symmetrisch. Zur Ermittlung der mechanischen Stabilität erfolgt ein Drei-Punkt-Biegetest (57 MPa). Die Oberfläche wird über Brunauer-Emmet-Teller (BET) Stickstoff-Adsorptionsanalyse ermittelt. Mit dieser Methode können Oberflächen von porösen Strukturen ermittelt werden. Sie gibt für die Kapillaren einen Wert von 8 m²/g an.

Tabelle 4-1 Eigenschaften der AC-K

Porengröße	50 - 200 nm; Ø 81 nm
offene Porosität	51 %
Oberfläche BET	8 m²/g
Stabilität (3 Punkt-Biegetest)	57 MPa
Außendurchmesser	1,4 mm
Innendurchmesser	0,84 mm

Diese Eigenschaften gelten für Kapillaren, die bei 1050 °C gesintert wurden. Bei höheren bzw. niedrigeren Temperaturen verändern sich die Werte für die offene Porosität, den Innen- und Außendurchmesser und die Stabilität.

Die AC-K wurden für den Einsatz als Bakterienfilter entwickelt. Für die Verwendung als Sterilbarriere und Besiedlungsoberfläche in einem Bioreaktor waren sie ursprünglich nicht vorgesehen. Vor der weiteren Nutzung wurden daher Untersuchungen zur Oberfläche und zur Biokompatibilität mit den AC-K durchgeführt.

4.1.3.2 Oberflächencharakterisierung

Mit der BET-Methode kann die Fläche, die für eine Besiedlung mit Zellen zur Verfügung steht, nicht bestimmt werden. BET bestimmt die Gesamtoberfläche eines porösen Materials und schließt daher auch die innere Oberfläche der Poren mit ein. Diese steht den Zellen bei einer Kultivierung allerdings nicht zur Besiedlung zur Verfügung. Außerdem unterscheidet die BET Methode nicht zwischen innerer und äußerer Mantelfläche der Kapillare.

In Abbildung 4-8 ist die Aufnahme einer AC-K im Rasterelektronenmikroskop (REM) dargestellt. Hier ist eine Strukturierung der Oberfläche erkennbar. Die Vergrößerung des Bildausschnitts rechts zeigt einen Defekt in der Kapillarwand. Diese Defekte sind allerdings die Ausnahme. Die Oberflächenstrukturierung lässt auf eine vergrößerte Oberfläche gegenüber einer glatten Fläche schließen.

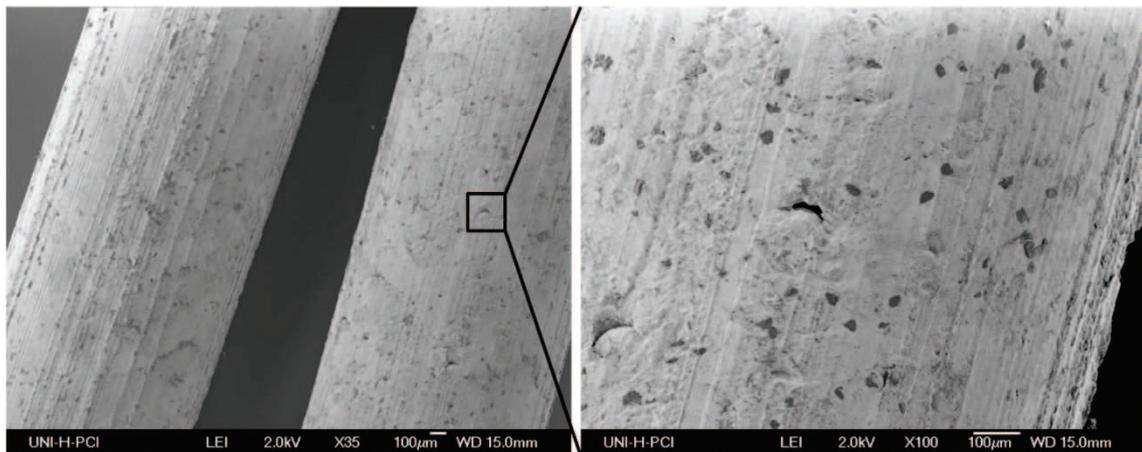


Abbildung 4-8: REM Aufnahme von zwei AC-K ; rechts: Vergrößerung des Bildausschnitts mit Defekt

Um die tatsächliche Oberfläche zu ermitteln, wurde eine Messung der AC-K im Röntgen-Computertomograph (GE Phoenix, Wunstorf) vorgenommen. Die Oberfläche als Zylinder zu berechnen würde den Einfluss der Strukturierung nicht erfassen. Die Röntgencomputertomografie ermöglicht die zerstörungsfreie, hochaufgelöste Volumendarstellung von Proben. Die zu vermessende Probe wird auf einem drehbaren Probenteller montiert. Eine Strahlungsquelle (Röntgenröhre) emittiert einen kegelförmigen Röntgenstrahl, der auf die Probe trifft. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich ein Detektor. Die Beschaffenheit der Probe beeinflusst die Abschwächung des

Röntgenstrahls. Während der Messung wird die Probe gedreht und so eine dreidimensionale Darstellung des Objekts realisiert.

Ein Stück einer AC-K wurde mit einer Auflösung von 983,25 nm vermessen und daraus ein Volumenmodell erstellt (Abbildung 4-9 A, B). Dieses Modell ähnelt den Aufnahmen der Kapillaren aus dem REM. Die Strukturierung der Oberfläche ist zu erkennen. Mit der Software VGStudio Max2.2 (Volume Graphics GmbH, Heidelberg) wurde die Wandstärke der Kapillare bestimmt und die Oberfläche der Kapillare im Inneren und Äußeren berechnet. In den Abbildungen der Querschnitte (C, D) sind deutliche Unterschiede in der Wandstärke der Kapillaren zu erkennen. Die Korrelation zwischen Oberfläche und Wandstärke ist im Histogramm in Abbildung 4-9 E aufgetragen. Die Wandstärke schwankt von etwa 0,17 mm bis 0,37 mm. Die Unterschiede liegen bei über 100 %. Schwankungen in dieser Größenordnung lassen auf eine verschlissene Extruderdüse bei der Herstellung schließen. In wieweit die Schwankungen bei allen Kapillaren auftreten, kann hier nicht ermittelt werden, da die CT Messungen nur für eine Kapillare aufgenommen wurden.

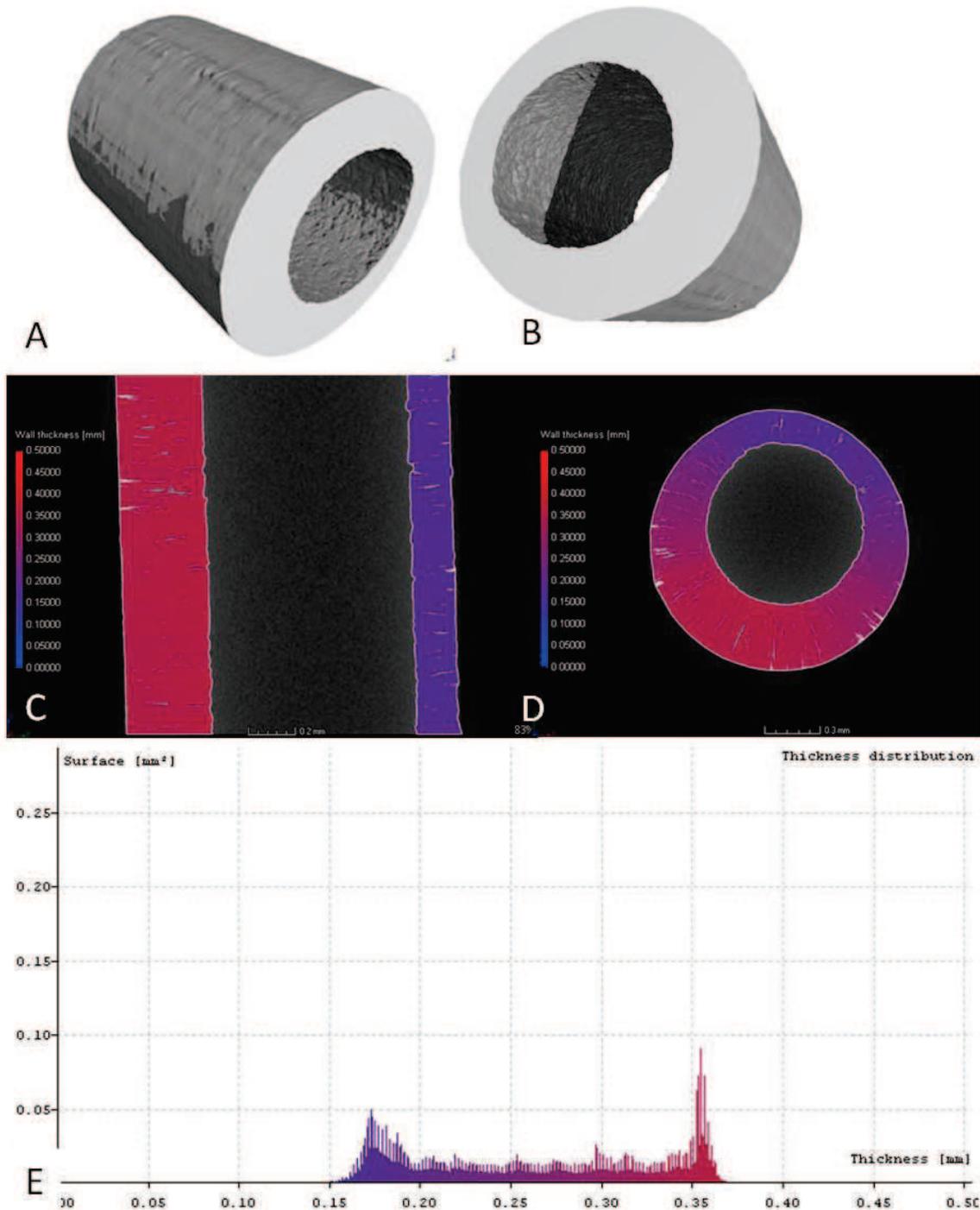


Abbildung 4-9: Ergebnisse der CT Messung; A und B: Volumenmodell der AC-K; C: Querschnitt der Kapillare von der Seite; D: Querschnitt der Kapillare von oben; E: Histogramm der Wandstärke

Die berechnete Innen- und Außenoberfläche aus den CT Daten unterscheidet sich stark von den Werten für eine als einfacher, glatter Zylinder berechnete Kapillare (Geometrieinformationen von der Arbeitsgruppe *Advanced Ceramics*). Dies liegt an der Oberflächenstrukturierung. In Tabelle 4-2 ist dies für ein mit 72 AC-K (je 7 cm) bestücktes Modul zusammengefasst worden. Danach vergrößert sich die Oberfläche der äußeren

Mantelfläche von 221,67 cm² für den Zylinder auf 581,15 cm² (262,17 %) und die Innenfläche von 133 cm² auf 463,34 cm² (348,38 %). Die BET-Oberfläche für dieses Modul beträgt 119.911 cm². Diese Fläche steht den Zellen für die Besiedlung nicht zur Verfügung, da sie die Oberfläche der Poren miteinschließt. Die CT Messungen haben gezeigt wie groß der Einfluss der Strukturierung auf die Oberfläche ist. Sie erlauben außerdem eine differenzierte Betrachtung der Innen- und Außenfläche ohne dabei die innere Fläche der Poren zu erfassen. Die vergrößerte Oberfläche der AC-K ist für die Kultivierung von adhärenenten Zellen von Vorteil. Es könnte so möglich sein mehr Zellen pro Kapillare zu kultivieren als dies auf einer glatten Oberfläche bei gleichem Durchmesser der Fall wäre.

Tabelle 4-2: Berechnung der Membranoberfläche für einen Haltezylinder mit 72 AC-K

Oberfläche	Berechnung der Oberfläche aus CT Daten	Berechnung der Oberfläche als glatter Zylinder	Unterschied
innen	463,34 cm ²	133,00 cm ²	348,38 %
außen	581,15 cm ²	221,67 cm ²	262,17 %

4.1.3.3 Biokompatibilität der AC-K

Wichtig für die Verwendung eines Werkstoffes in einem Bioreaktor ist die Kompatibilität mit Zellen. Das Material sollte inert sein, von den Zellen angenommen werden und auch auf Dauer keine schädlichen Substanzen freisetzen.

Es wurden eine Reihe von Versuchen durchgeführt, um die Eignung der AC-K für die Nutzung im Reaktorsystem zu überprüfen. Zwei adhärenente Zelltypen wurden ausgewählt und zum Vergleich sowohl auf AC-K als auch auf PES Hohlfasern kultiviert. PES ist ein gebräuchliches Material in kommerziell erhältlichen Membranbioreaktoren. Bei den ausgewählten Zellen handelt es sich um Isolate aus Nabelschnurblut (ucMSC) und Fettgewebe (adMSC). Diese Zellen eignen sich als Modellorganismen, da sie als primäre Stammzellen empfindlich und anspruchsvoll in Bezug auf ihre Kultivierung sind.

Für die Versuche wurden jeweils ein Paar sterile 2 cm lange Membranabschnitte mit 140.000 Zellen besiedelt. Nach einem Tag wurden die Abschnitte in neue Platten umgesiedelt. Damit wurde sichergestellt, dass nur Zellen, die sich auf den Membranen befinden, betrachtet werden.

Alle zwei Tage wurden besiedelte Membranen für einen MTT Test entnommen und eine Bestimmung von Glukose und Laktat im Medium vorgenommen.

Der MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-Bromid) Test ist ein colorimetrischer Test zur Bestimmung der Viabilität und Proliferationsfähigkeit von Zellen. MTT ist membrangängig und wird in den Mitochondrien von proliferierenden Zellen durch Dehydrogenasen zu Formazan umgesetzt. Die blauen Formazan-Kristalle akkumulieren in den Zellen. Nach Lyse der Zellen löst sich der Farbstoff im Medium und die Absorption kann photometrisch bei 570 nm bestimmt werden. Im Anschluss an die Kultivierung wurden Bilder im REM aufgenommen. Außerdem wurden die Zellen angefärbt (DAPI) und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Zellen wurden zunächst mit Ethanol fixiert und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt.

4.1.3.4 Ergebnisse der Untersuchungen

Die erfolgreiche Kultivierung der Zellen auf den Membranen ist deutlich im Mikroskop zu erkennen. DAPI bindet vor allem an der DNA. Die Excitation erfolgt bei 358 nm und die Emission bei 461 nm. Abbildung 4-10 zeigt in der linken Spalte Aufnahmen von ucMSC Zellen und in der rechten Spalte adMSC Zellen. In den Teilabbildungen A und B sind dicht besiedelte AC-K zu sehen. C und D zeigen den Bewuchs auf PES Hohlfasern. In Abbildung 4-10 E und F sind histologische Querschnitte von Membranen dargestellt. Die AC-K mit adMSC Zellen ist teilweise zerbrochen. Zellen sind rund um die Membranen auf beiden Bildern erkennbar.

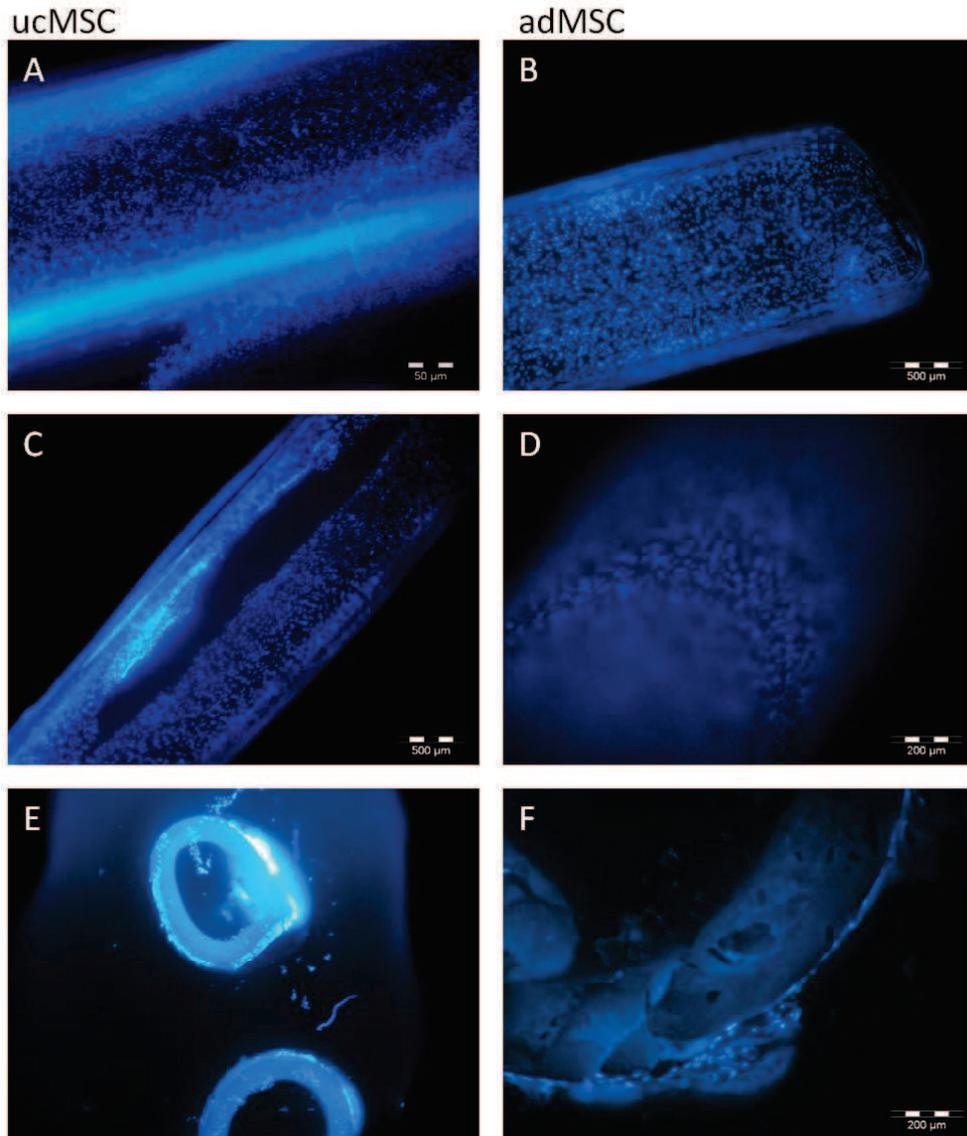


Abbildung 4-10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DAPI gefärbten Zellen; A: ucMSC Zellen auf AC-K; B: adMSC Zellen auf AC-K; C: ucMSC Zellen auf PES Hohlfaser; D: adMSC Zellen auf PES Hohlfaser; E: ucMSC Zellen auf PES Hohlfaserquerschnitt; F: adMSC Zellen auf AC-K Querschnitt

Abbildung 4-11 zeigt REM Aufnahmen von ucMSC Zellen auf einer AC-K. In der Teilabbildung A ist die Oberfläche der AC-K komplett mit Zellen bedeckt. In Teilabbildung B ist zum Vergleich eine unbesiedelte AC-K gezeigt. Auf beiden Abbildungen ist deutlich die Oberflächenstrukturierung zu erkennen. Die Konturen zeichnen sich durch den Zellrasen ab. In den Abbildungen C und D ist jeweils der Übergang von freier Membranfläche zu Zellen gezeigt. Die Oberflächenstrukturierung ist auch hier deutlich zu erkennen. Diese Bilder stützen die Untersuchungen zur Oberflächenbestimmung im CT, die von einer durch Strukturierung vergrößerten Oberfläche der Membranen ausgehen.

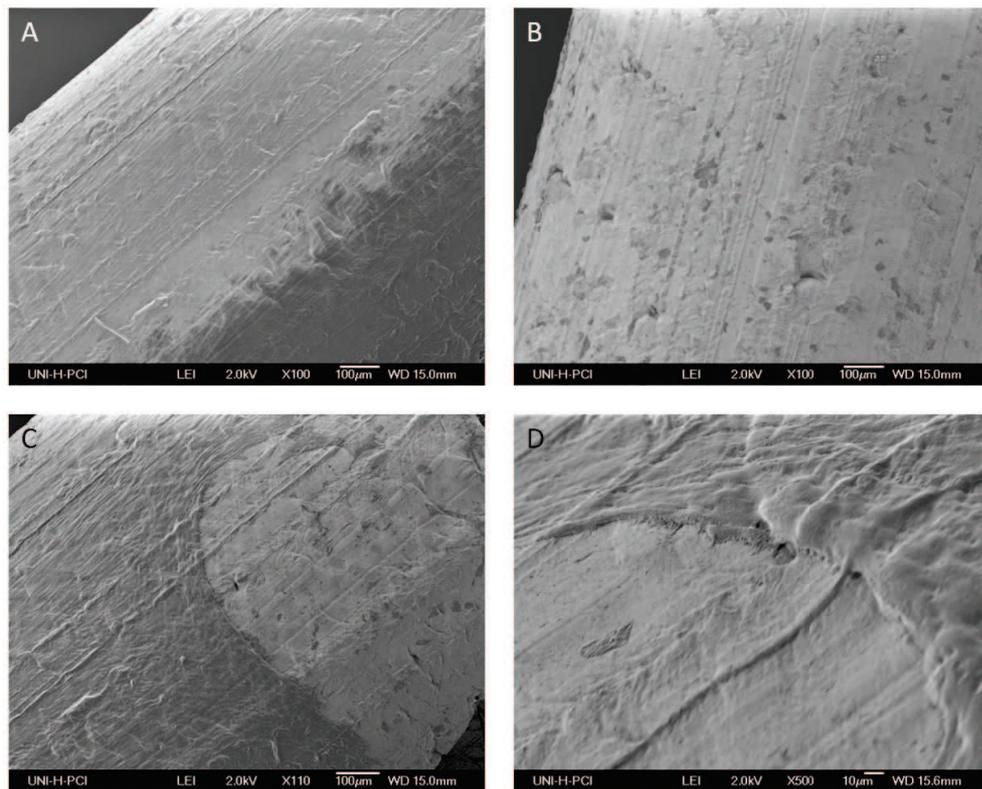


Abbildung 4-11: REM Aufnahmen von AC-K Oberfläche; A: komplett besiedelt; B: teilweise besiedelt; C: unbesiedelt; D: Vergrößerung des Übergangs von besiedelt zu unbesiedelt

In der Abbildung 4-12 ist der akkumulierte Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion der Kultivierungen aufgezeigt. Unabhängig von Zelltyp und Membranmaterial ist ein kontinuierlicher Anstieg über die Kultivierungsdauer von 10 Tagen zu erkennen. Die höchste Stoffwechselaktivität weisen die Zellen auf den AC-K auf. Die Kulturen auf den AC-K sind demnach aktiver als auf den PES Membranen.

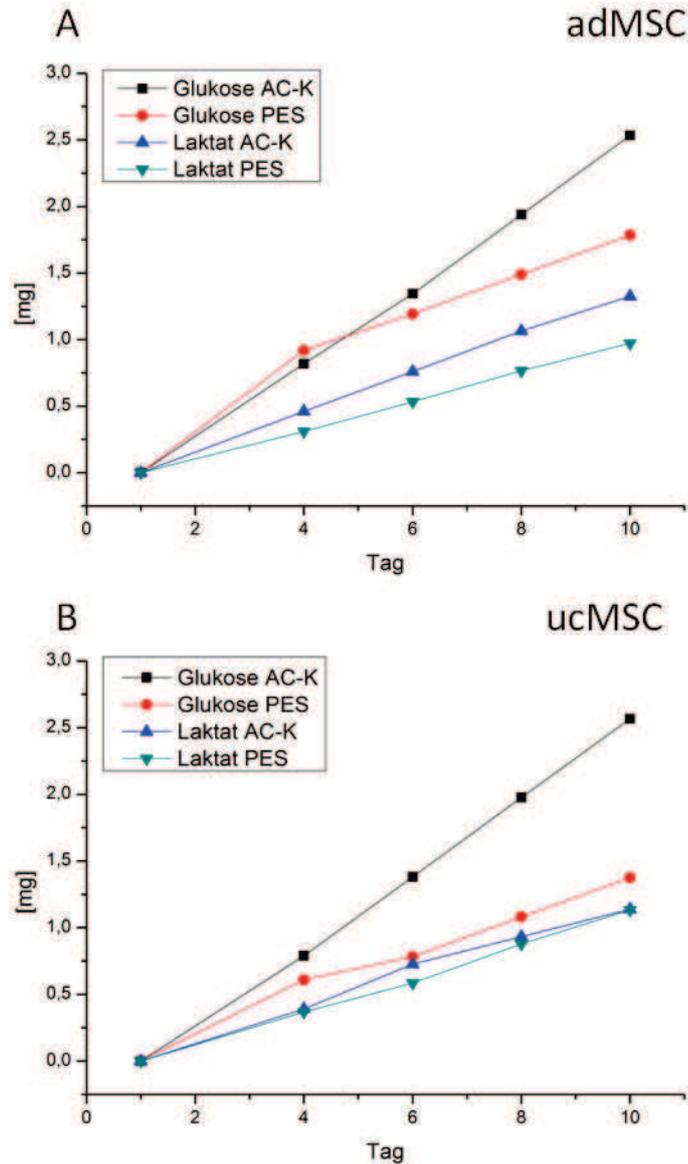


Abbildung 4-12: Akkumulierter Glukoseverbrauch und Laktatproduktion von adMSC und ucMSC Zellen

Die Ergebnisse der MTT Tests sind in Abbildung 4-13 dargestellt. Beinahe für alle Kulturen ist ein Anstieg der proliferierenden Zellen auf allen Materialien über die Kultivierungsdauer hinweg zu beobachten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Zellzahl über die Kultivierungsdauer zugenommen hat. Die ucMSC Zellen, die auf PES Membranen kultiviert wurden, zeigen zunächst eine verminderte Viabilität. Im weiteren Verlauf der Kultivierung ist auch hier ein Anstieg zu beobachten. Zwischen den übrigen Kulturen sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

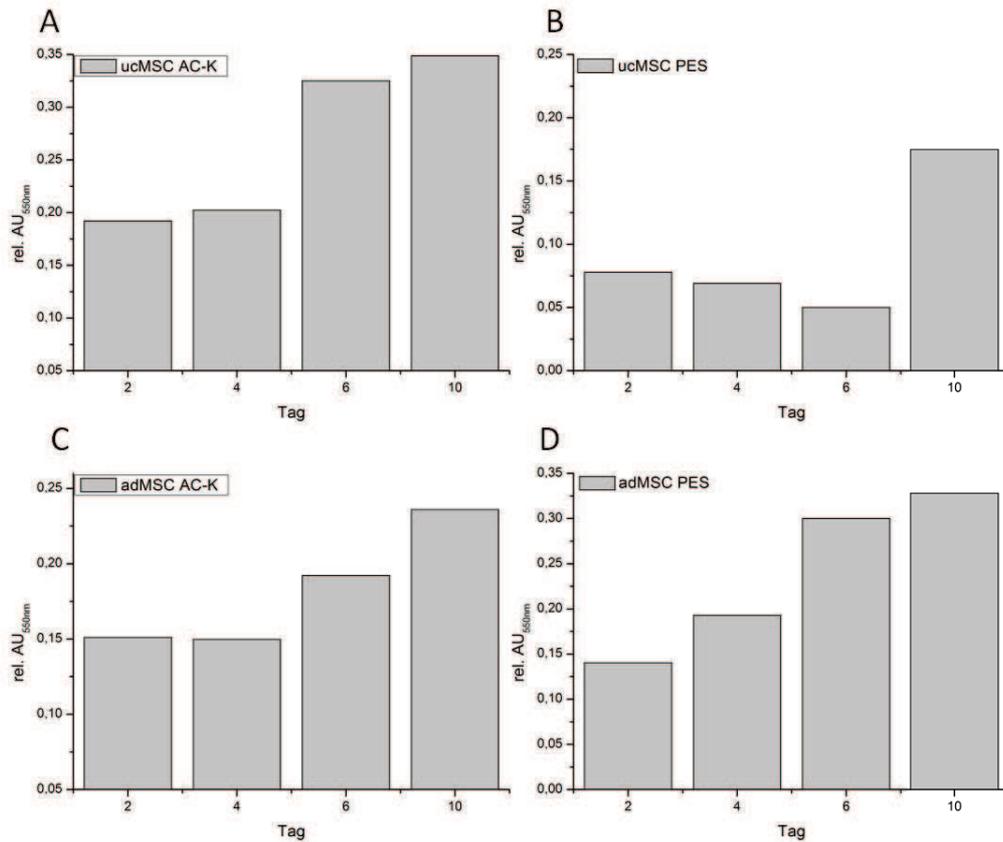


Abbildung 4-13: Ergebnisse der MTT Tests; A: ucMSC Zellen auf AC-K; B: ucMSC Zellen auf PES Hohlfasern; C: adMSC Zellen auf AC-K; D: adMSC Zellen auf PES Hohlfasern

Normalerweise ist es möglich über eine entsprechende Kalibration aus den Werten des MTT Tests auf die Zellzahl zu schließen. Allerdings verbleibt eine unbestimmte Menge Formazan auf den Membranen (Abbildung 4-14) und kann somit nicht detektiert werden. Die Ergebnisse des MTT Tests zeigen also klar die Zunahme der proliferierenden Zellen auf. Tatsächlich müssten die Messwerte höher liegen. Bei Versuchen mit einem alternativen Test (*Cell Titer Blue*) trat derselbe Effekt wie beim MTT Test auf. Die Tendenz wurde aber auch hier bestätigt. Es kann demnach kein hemmender Effekt der AC-K auf die Proliferation der Zellen festgestellt werden.

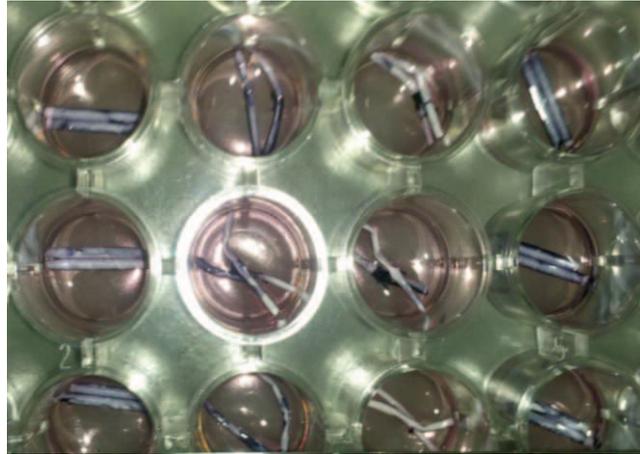


Abbildung 4-14: Kulturplatte mit Membranen nach MTT Test mit Formazan-Kristallen auf der Oberfläche

Die Eignung der AC-K für den Einsatz im Reaktorsystem konnte zweifelsfrei festgestellt werden. Es wurden erfolgreich zwei anspruchsvolle Zelltypen auf dem Material kultiviert. Bei den Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen und den REM Bildern ist die dichte Besiedlung der Oberfläche zu erkennen. Die Zellen nehmen die Oberfläche der Membranen an. Die Oberflächenstrukturierung der Kapillaren zeichnet sich durch die Zellen hindurch ab. Die Kapillaren stellen also vermutlich eine stark vergrößerte Oberfläche für die Zellen zur Verfügung. Die kontinuierlich steigende Stoffwechselaktivität belegt ebenso die Eignung der AC-K für den Einsatz im Reaktorsystem. Weiter wird dies durch die Ergebnisse aus den MTT Tests gestützt. Die Anzahl an proliferationsfähigen Zellen nimmt über die Dauer der Kultivierung kontinuierlich zu. Die MTT Werte müssten tatsächlich noch höher liegen. Darauf lässt der Verbleib von Formazan auf den Membranen schließen. Ein inhibierender Einfluss der AC-K auf die Zellen kann somit ausgeschlossen werden. Die AC-K empfehlen sich daher als biokompatibles Membranmaterial mit großer Oberfläche für den Einsatz im Reaktorsystem.

4.2 Reaktorcharakterisierung

Zur Charakterisierung eines Reaktors gehört neben der Beschreibung des Aufbaus und der genutzten Materialien auch die Bestimmung der reaktionstechnischen Kenngrößen. Dazu zählen das Strömungsverhalten, die Verweilzeit, die Mischzeit, der $k_L a$ -Wert und bei einem TMBR der Stoffübergang zwischen den Kompartimenten.

Die Reaktorcharakterisierung erfolgte für drei verschiedene Konfigurationen (Tabelle 4-3), die sich in Hinblick auf das Membranmaterial oder die Reaktorgeometrie unterscheiden. Die erste Konfiguration verfügt über 72 AC-K Membranen (72-AC-K) mit einem Außendurchmesser von 1,4 mm und einem Innendurchmesser von 0,84 mm. Der Größenausschluss der Membranen beträgt 0,2 μm und das ECS Volumen 44,4 ml. Bei der zweiten Konfiguration (72-PES) werden 72 PES Hohlfasern mit einem Größenausschluss von 80 kDa, einem Außendurchmesser von 1 mm und einem Innendurchmesser von 0,6 mm eingesetzt. Die dritte Reaktorkonfiguration (72-PES-Mod) unterscheidet sich von der Zweiten durch zusätzliche Einbauten (Leitbleche) im ECS. Diese sollen die Strömungseigenschaften signifikant verändern. Das ECS Volumen für den 72-PES Reaktor beträgt 46,4 ml und für die 72-PES-Mod Variante 38,77 ml.

Tabelle 4-3 Reaktorkonfigurationen und Bezeichnung

Bezeichnung	Membranmaterial	Membranzahl	\varnothing innen/außen [mm]	Größenausschluss	ECS Volumen [ml]
72-AC-K	AC-K	72	0,84/1,4	0,2 μm	44,4
72-PES	PES Hohlfasern	72	0,6/1,0	80 kDa	46,4
72-PES-Mod	PES Hohlfasern	72	0,6/1,0	80 kDa	38,77

Die Modifikation wurde in Zusammenarbeit mit dem IMS (TUHH) entwickelt und ist eine Anlehnung an das Prinzip eines Wärmetauschers. Die Flüssigkeit soll kontinuierlich über Leitbleche quer zu den tubulären Membranen geführt werden. Bei gleichem Volumenstrom erhöht sich durch die längere Wegstrecke im Reaktor die Flussgeschwindigkeit im Vergleich zu einem unmodifizierten Reaktor. Die erhöhte Geschwindigkeit führt zu höheren Reynoldszahlen, also zu einer turbulenteren Strömung. Diese reduziert die Dicke der laminaren Grenzschicht, die die Geschwindigkeit des diffusionsgetriebenen Stofftransport über die Membran bestimmt. Der Stoffaustausch zwischen ICS und ECS soll damit verbessert werden.

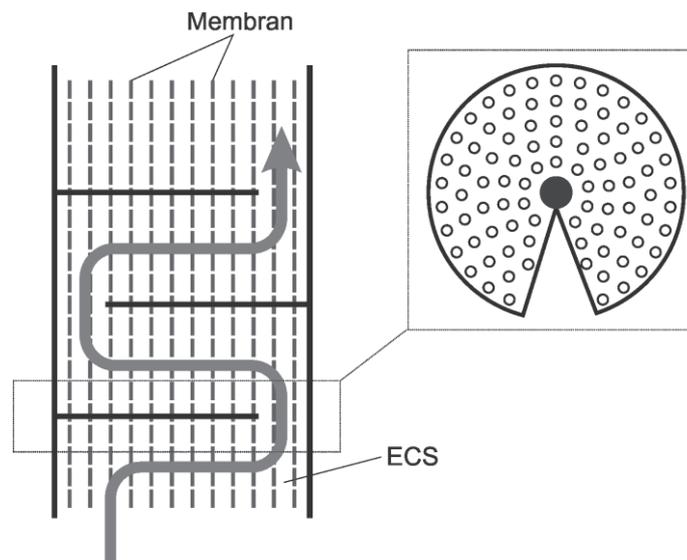


Abbildung 4-15: Schematische Darstellung der Flüssigkeitsführung im modifizierten Reaktor

In den ECS wurden sieben Barrieren eingebaut. Jede dieser Barrieren verfügt über Löcher für die tubulären Membranen und eine keilförmige Aussparung, durch die das Medium ungehindert passieren kann. Die Barrieren sind gleichmäßig über die Höhe des Membranmoduls verteilt. Die Aussparungen sind alternierend einander gegenüberliegend angeordnet. Diese veränderte Reaktorgeometrie ist schematisch in Abbildung 4-15 dargestellt. Abbildung 4-16 zeigt die Modifikationen des Reaktors aus verschiedenen Perspektiven. In Teilabbildung B sind deutlich die alternierenden Aussparungen der Barrieren zu erkennen. In der um 90° gedrehten Perspektive (C) sind keine Aussparungen zu erkennen.



Abbildung 4-16: A,B,C: modifizierter Reaktor mit Einbauten aus unterschiedlichen Perspektiven

4.2.1 Hydrodynamische Charakterisierung des Reaktorsystems

Die hydrodynamische Charakterisierung ist wichtiger Bestandteil jeder Reaktorentwicklung. Dabei werden Kenngrößen bestimmt, die es erlauben die Leistungsfähigkeit eines Systems zu beschreiben und unterschiedliche Systeme miteinander zu vergleichen. Veränderungen am Reaktordesign können so direkt evaluiert werden.

Das Strömungsverhalten im ICS kann über die Berechnung der Reynoldszahlen bei unterschiedlichen Volumenströmen bewertet werden. Eine wichtige Kenngröße zur Charakterisierung der TMBR Konfigurationen ist das Verweilzeitverhalten der Flüssigkeit im ECS. Das Verweilzeitverhalten gibt Aufschluss über die Aufenthaltsdauer von Teilchen im Reaktor und ist abhängig vom Volumenstrom. Eine weitere Kenngröße, die zur Beurteilung der homogenen Verteilung von Substanzen im Reaktor dient, ist die Mischzeit.

Der Stoffübergang vom ICS in den ECS wird anhand eines Spurstoffes betrachtet. Anhand dieses Modellsystems kann die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen beschrieben werden. Neben der Nährstoffversorgung ist die Sauerstoffversorgung ein

kritischer Parameter für aerobe Kultivierungen. Anhand der Strömungsbedingungen, des Verweilzeitverhaltens, der Mischzeit dem Stoffübergang und dem Sauerstofftransport werden die Reaktorkonfigurationen vergleichend beurteilt.

4.2.2 Strömungsverhalten im ICS

Der ICS der Reaktorkonfigurationen kann als ein Verbund aus 72 parallelen Strömungsröhren (je 7 cm) betrachtet werden sofern kein konvektiver Massenstrom über die Membran vorliegt. Der diffusionsgetriebene Stofftransport über die Membran ist durch die Stärke der laminaren Grenzschicht limitiert. Diese wird durch die Strömung beeinflusst.

Die Strömung kann über die Reynoldszahl (Re) beschrieben werden. Die Reynoldszahl ist eine dimensionlose Kennzahl die das Turbulenzverhalten einer Strömung beschreibt. Erreicht die Reynoldszahl einen kritischen Wert von 2320 liegen turbulente Strömungsbedingungen vor und die laminare Grenzschicht kann vernachlässigt werden. Bei Reynoldszahlen von kleiner als 2320 liegt eine laminare Strömung vor.

Für die Berechnung der Reynoldszahlen wird davon ausgegangen, dass sich der Volumenstrom gleichmäßig auf alle 72 Tuben aufteilt. Die Einbauten im ECS des 72-PES-Mod haben keinen Einfluss auf den ICS im Reaktor. Dieser ist identisch zum ICS des 72-PES Reaktor. Nach unten aufgeführter Formel wurden die Reynoldszahlen für den ICS bei Volumenströmen von 5 bis 20 ml/min berechnet.

$$Re = \frac{d * v * \rho}{\eta}$$

$$d = \text{Innendurchmesser [m]}$$

$$v = \frac{\dot{V}}{\pi * r^2} = \text{Strömungsgeschwindigkeit [m}^3/\text{s]} \quad (1)$$

$$\rho = \text{Dichte des Fluids [Kg/m}^3\text{]}$$

$$\eta = \text{dynamische Viskosität des Fluids [Ns/m}^2\text{]}$$

Die Reynoldszahlen (Tabelle 4-4) liegen alle unter der Grenze für turbulente Strömung (2320) und geben damit ein laminares Strömungsverhalten für den ICS an. Die Reynoldszahlen für den ICS der Reaktoren mit PES Hohlfasern liegen aufgrund des geringeren Innendurchmessers und damit verbundenen höheren Strömungsgeschwindigkeiten höher als im Reaktor mit AC-K. Die Strömung ist also turbulenter und die

laminare Grenzschicht in den Reaktoren mit den PES Hohlfasern kleiner. Der Stofftransport ist bei den PES Hohlfasern vermutlich weniger limitiert. Bei Flussraten von etwa 60 ml/min würden in einem Reaktor mit PES Hohlfasern turbulente Strömungen auftreten. In einem Reaktor mit AC-K geschieht dies ab etwa 90 ml/min. Solch hohe Volumenströme sind der Praxis mit den eingesetzten Pumpen nicht umsetzbar und der Druckanstieg am ICS Eingang könnte ebenfalls zu Problemen führen.

Tabelle 4-4: Reynoldszahlen für den ICS der Reaktoren bei unterschiedlichen Volumenströmen

Volumenstrom [ml/min]	Re 72-AC-K (d=0,84 mm)	Re 72-PES & 72-PES-Mod (d=0,6 mm)
5	126,31	176,83
10	252,62	353,67
15	378,94	530,51
20	505,25	707,35

4.2.3 Verweilzeitverhalten im ECS

Durch die komplexe Geometrie im ECS, besonders in der modifizierten Variante, ist eine einfache Berechnung der Reynoldszahlen für den ECS nicht möglich. Im ECS wird die Verweilzeit betrachtet, die für den ICS mit laminarer Strömung im Strömungsrohr trivial ist.

Ein Teilchen kann den Reaktionsraum auf unterschiedlichen Wegen durchlaufen und damit ergeben sich unterschiedliche Verweilzeiten. Jeder Reaktor weist eine charakteristische Verteilung der Teilchen bei unterschiedlichen Volumenströmen auf. Das Spektrum der Verweilzeitverteilung kann mathematisch durch die Verweilzeitdichtefunktion $E(t)$ beschrieben werden. Diese Funktion beschreibt die Wahrscheinlichkeit, wonach ein Teilchen, das zum Zeitpunkt $t=0$ in den Reaktor eingetreten ist, diesen zum Zeitpunkt $t_1=t+dt$ wieder verlassen hat. Bei der Bestimmung der Verweilzeit mittels Dirac-Stoß entspricht das am Ausgang gemessene Antwortsignal $E(t)$.

Die Versuche wurden bei Volumenströmen von 5, 10 und 15 ml/min durchgeführt. Für die Aufnahme der Verweilzeitfunktionen wurde ein Dirac-Stoß mit Methylblau auf das System aufgegeben und am Ausgang des ECS bei 660 nm in einer Durchflussküvette photometrisch detektiert (Abbildung 4-17). Die Berechnung der

mittleren Verweilzeit \bar{t} und der Varianz σ_t^2 erfolgte über die Momentmethode (siehe Anhang 6.5.1).

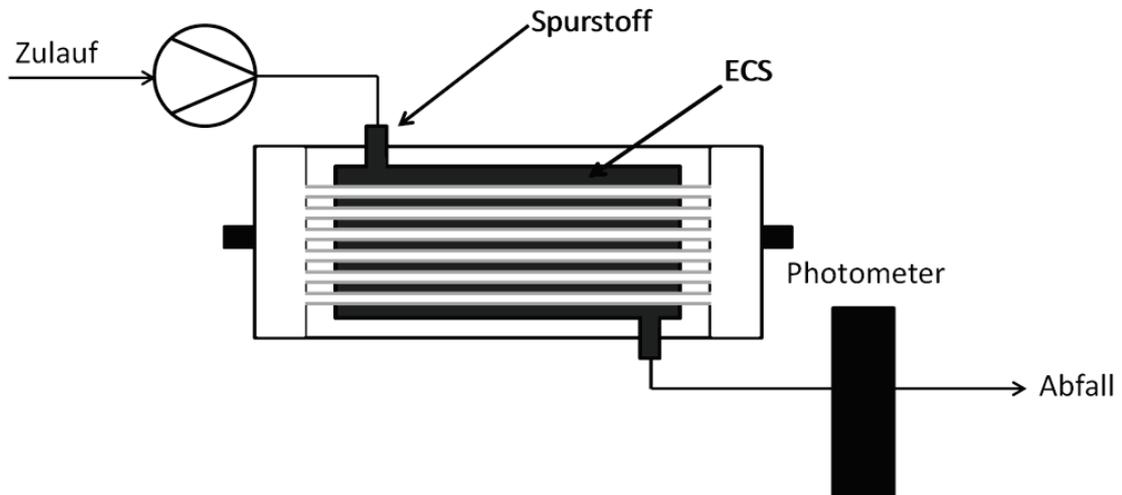


Abbildung 4-17: Versuchsaufbau der Verweilzeitbestimmung im ECS

Exemplarisch ist das Verweilzeitverhalten bei 10 ml/min zweier Reaktoren im Vergleich in Abbildung 4-18 dargestellt. Die Teilabbildung A auf der linken Seite zeigt einen Reaktor 72-AC-K und auf der rechten Seite den 72-PES-Mod Reaktor.

Die mittlere Verweilzeit \bar{t} liegt für 72-AC-K bei 6,93 min und für 72-PES-Mod bei 5,8 min. An den Graphen ist anhand der Breite der Peaks bereits ersichtlich, dass die Varianz σ_t^2 für den 72-AC-K Reaktor mit 51,12 höher liegt als für die 72-PES-Mod Variante mit 17,76. In der Bilderserie Abbildung 4-19 ist zu erkennen, dass sich im Reaktor 72-AC-K eine Totzone ausbildet, während der modifizierte Reaktor verhältnismäßig gleichmäßig durchströmt wird. In Tabelle 4-5 werden die Ergebnisse der Verweilzeitergebnisse zusammengefasst. Generell nimmt die Verweilzeit mit Erhöhung des Volumenstromes in den Reaktoren ab. Auch die Varianz sinkt mit steigendem Volumenstrom. Sie liegt für den nicht modifizierten Reaktor generell höher als in der 72-PES-Mod Variante.

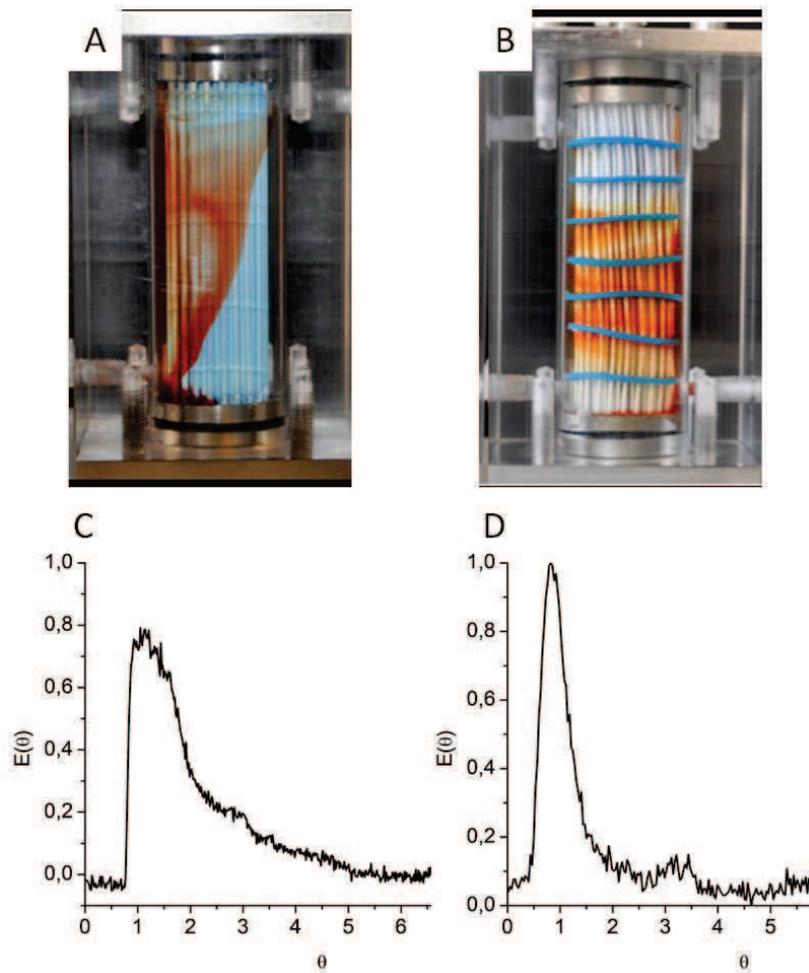


Abbildung 4-18: Verweilzeitverhalten der Reaktoren; A: Reaktor mit 72 AC-K; B: modifizierter Reaktor mit 72 PES Hohlfasern und Einbauten; C: Verweilzeitdichtefunktion des Reaktors mit 72 AC-K bei 10 ml/min; D: Verweilzeitdichtefunktion des modifizierten Reaktors mit 72 PES Hohlfasern bei 10 ml/min

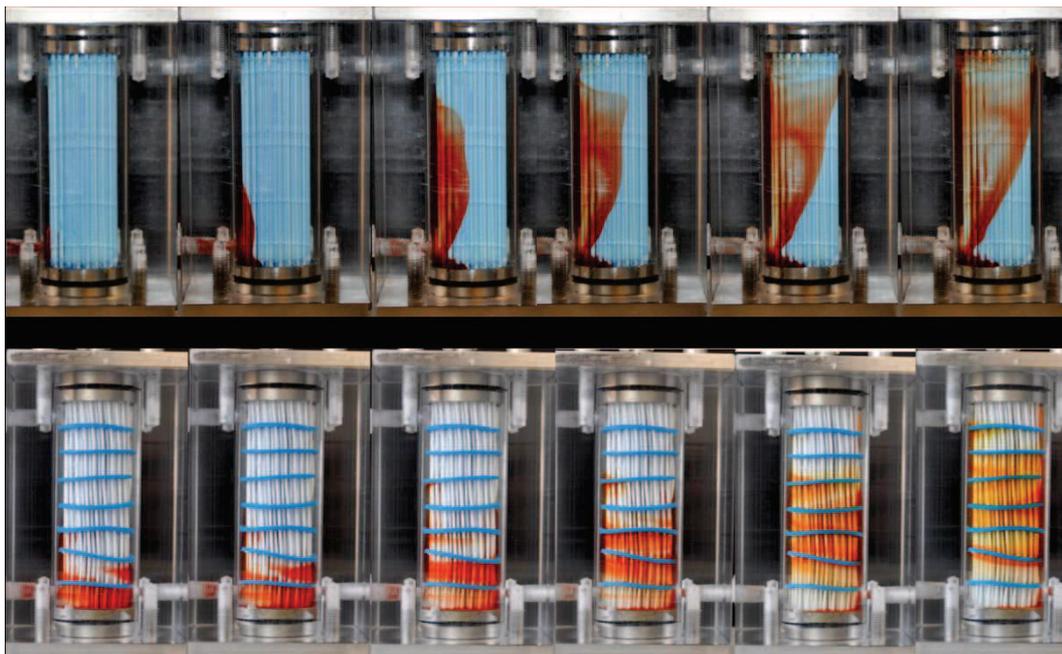


Abbildung 4-19: Vergleichende Bilderserie zum Verweilzeitverhalten; oben: Reaktor mit 72 AC-K; unten: modifizierter Reaktor mit 72 PES Hohlfasern

Tabelle 4-5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Verweilzeitexperimente

Flussrate [ml/min]	72-AC-K		72-PES-Mod	
	\bar{t} [min]	σ_{t^2}	\bar{t} [min]	σ_{t^2}
5	7,73	43,83	10,75	39,47
10	6,93	51,12	5,80	17,76
15	5,85	19,01	4,46	12,12

Die hohen Varianzen der 72-AC-K Variante legen ein Rührkessel ähnliches Verhalten nahe. In der Bilderserie ist allerdings deutlich zu erkennen, dass der Reaktor nicht ideal durchmischt ist. Im Reaktor bildet sich eine Totzone aus, durch die keine Teilchen des Spurstoffes wandern. Zellen in diesem Bereich des Reaktor, unabhängig davon ob sich diese im ICS oder ECS befinden, wären damit nicht optimal versorgt. Die niedrigeren Varianzen in der 72-PES-Mod Variante sprechen für ein Verhalten, das eher einem Strömungsrohr ähnelt. Die Einbauten leiten das Fluid auf geordnetem Weg durch den Reaktor. Axiale Rückvermischung kann, anders als im idealen Strömungsrohr, hier jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4.2.4 Bestimmung der Mischzeit

Eine homogene Durchmischung des Reaktors ist Voraussetzung für eine gleichmäßige Versorgung der Zellen im Reaktor mit Nährstoffen. Eine aktive Durchmischung des Reaktors kann durch Umwälzung des ECS Volumens mit einer Pumpe erreicht werden. Zur Bestimmung der Mischzeiten wurde der ECS der drei Reaktorkonfigurationen bei unterschiedlichen Volumenströmen umgewälzt. In den ECS wurde zu einem definierten Zeitpunkt ein Farbstoff (Methylenblau) in einem Dirac-Stoß in den Reaktor gegeben. Über eine Durchflussmesszelle in einem Spektrophotometer wurde das Antwortsignal aufgenommen (Abbildung 4-20).

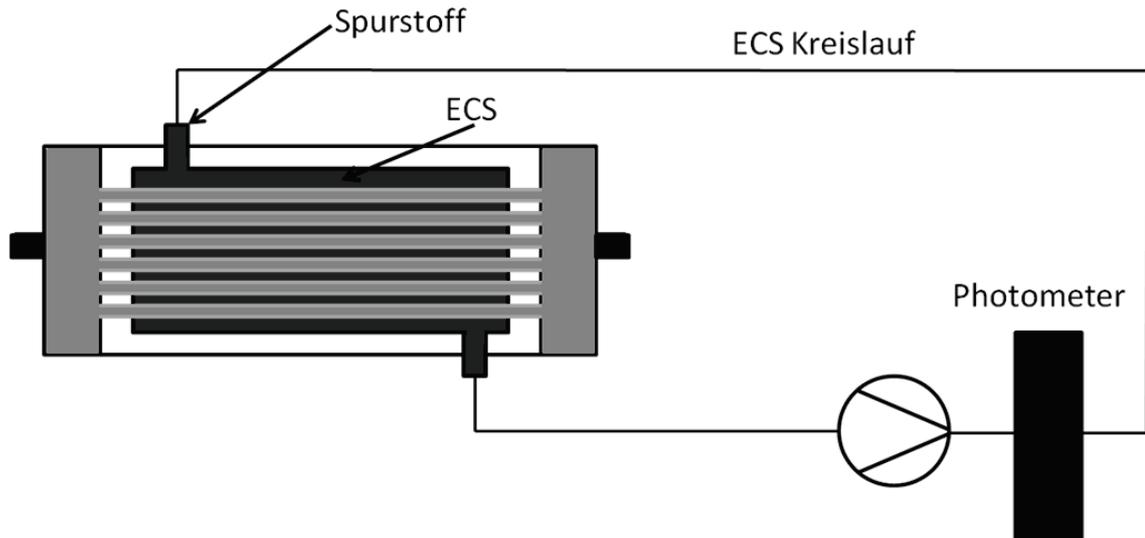


Abbildung 4-20: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Mischzeit

Die Mischzeit wurde definiert als der Zeitpunkt, ab dem das Antwortsignal nicht mehr als 5 % vom Endsignal abweicht und keine undurchmischten Totzonen im Reaktor vorliegen. In Abbildung 4-21 ist die Mischzeitkurve für die Reaktorkonfiguration mit 72 PES Hohlfasern bei 20 ml/min exemplarisch dargestellt.

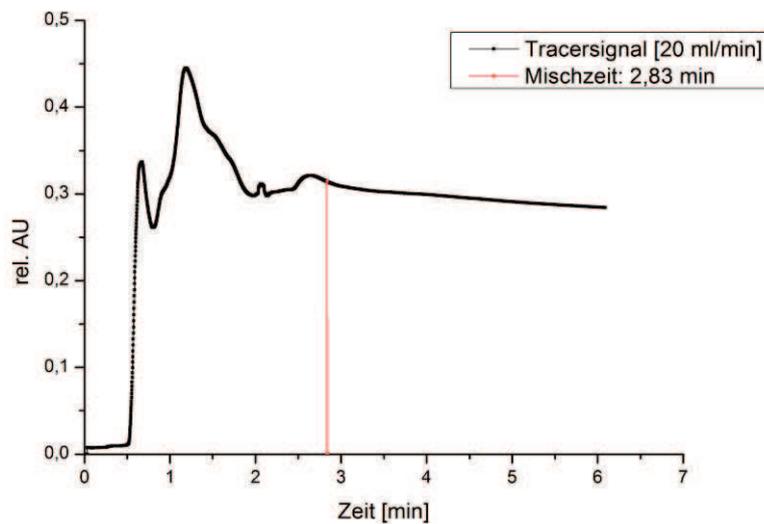


Abbildung 4-21: Mischzeitkurve für einen Reaktor mit 72 PES Hohlfasern bei 20 ml/min

In Tabelle 4-6 sind die Ergebnisse der Mischzeituntersuchung zusammengefasst. Die Mischzeiten verkürzen sich generell mit ansteigendem Volumenstrom. Die beiden Reaktoren ohne Einbauten unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Mischzeiten. Bei niedrigen Volumenströmen (5 ml/min) liegen die Mischzeiten bei 6,6 min für die

72-AC-K Variante und 7,28 min für den 72-PES Reaktor. Die Mischzeiten für die 72-PES-Mod Reaktorvariante liegen im Schnitt deutlich höher. Bei 5 ml/ min beträgt die Mischzeit 11,45 min. Durch die Einbauten liegt eine gleichbleibende kontrollierte Flüssigkeitsführung im System vor und der Farbstoff kann sich nicht, wie bei den anderen Reaktoren, frei im ECS verteilen. Dieser Effekt wurde bereits bei den Verweilzeituntersuchungen beobachtet.

Tabelle 4-6: Übersicht über die mittleren Mischzeiten

Volumenstrom [ml/min]	mittlere Mischzeit [min]		
	72-AC-K	72-PES	72-PES-Mod
5	6,60	7,28	11,45
10	4,31	4,93	7,63
15	3,81	4,15	5,20
20	2,61	2,84	4,13

Die Mischzeiten liegen für die Kultivierung von schnellwachsenden Mikroorganismen im ECS zu hoch. Bei einem schnellen Verbrauch von Substraten würde es zu lokalen Limitierungen kommen. Für langsam wachsende tierische Zellen sollte die langsame Durchmischung dagegen weniger problematisch sein. Für Zellen in Suspension kann allerdings die Durchmischung mit einer Pumpe problematisch sein. Die verwendete Schlauchquetschpumpe übt zusätzlichen Scherstress auf die Zellen auf.

4.2.5 Stoffübergang

Der Stoffübergang wird mit einem Spurstoff (Methylenblau) von ICS zu ECS photometrisch bestimmt (Abbildung 4-22). Das ICS Volumen wurde dem jeweiligen ECS Volumen angeglichen. Die Volumen von ICS und ECS wurden bei denselben Volumenströmen zirkuliert. In den ECS Kreislauf wurde eine Durchflussmesszelle zur Detektion des Spurstoffes integriert. Für den Vergleich der Reaktoren wird die Zeit, die vergeht bis die Hälfte der Tracersubstanz vom ICS in den ECS übergetreten ist, verwendet. In Tabelle 4-7 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst.

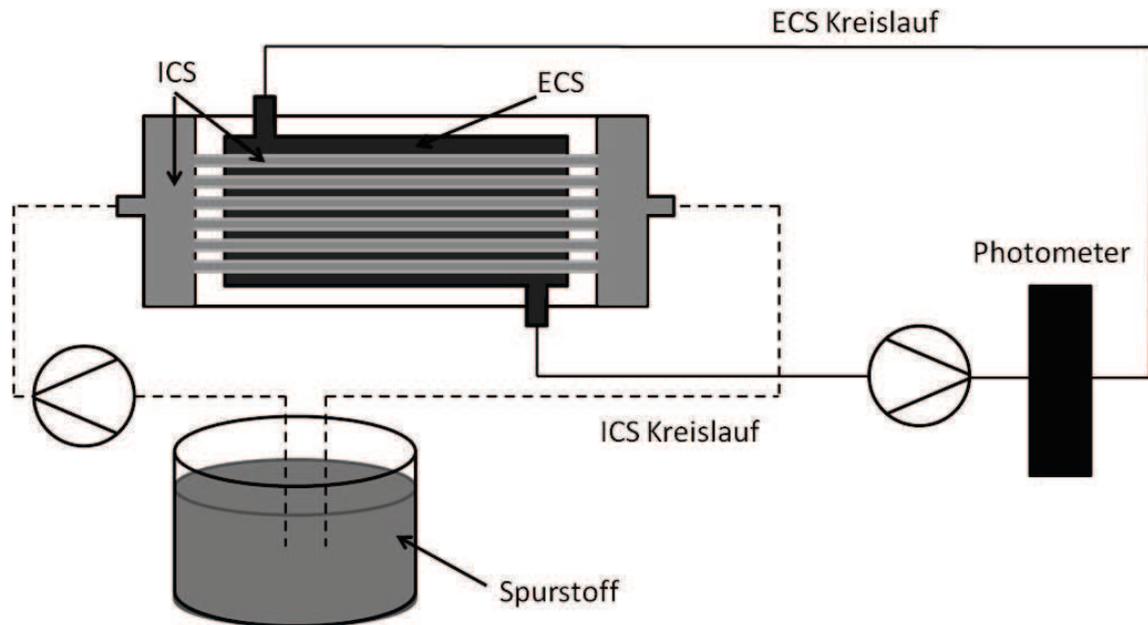


Abbildung 4-22: Versuchsaufbau vom Stoffübergang

Der Stoffübergang beschleunigt sich generell mit ansteigendem Volumenstrom. Der 72 AC-K Reaktor weist bei niedrigen Flussraten (3 ml/min) einen schnelleren Stoffübergang auf als die 72-PES Variante. Die größeren Poren und die größere Membranoberfläche sind der Grund hierfür, auch wenn die Flussgeschwindigkeit im ICS der AC-K Reaktorvariante aufgrund des größeren Innendurchmessers reduziert ist. Mit ansteigendem Volumenstrom (6 ml/min) ist der Stoffübergang im 72-PES Reaktor (75,42 min) schneller als in dem 72-AC-K Reaktor (141,45 min). Die PES Hohlfasern haben einen niedrigeren Innendurchmesser (0,6 mm) als die AC-K (0,84 mm). Mit steigendem Volumenstrom steigen auch die Reynoldszahlen und die turbulenterer Strömung begünstigt den Stofftransport.

Tabelle 4-7: Übersicht über Messungen zum Stofftransport

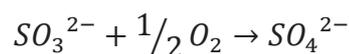
Volumenstrom [ml/min]	Zeit bis 50 % des Massentransfers abgeschlossen sind [min]		
	Reaktor 72 AC-K	Reaktor 72 PES	Reaktor 72 PES (modifiziert)
3	187,28	250,42	57,82
6	141,45	75,42	28,79
12	87,53	73,08	25,95

Die Einbauten im 72-PES-Mod Reaktor zeigen hier, wie auch beim Sauerstoffeintrag, einen starken Einfluss auf den Stoffübergang. Für alle Flussraten ist der Stoffübergang deutlich schneller als bei beiden anderen Varianten. Da sich der Reaktor von der 72-PES Variante nicht von der Strömung im ICS und der Membranoberfläche unterscheidet sind allein die veränderten Strömungsbedingungen im ECS für diese signifikante Verbesserung verantwortlich.

4.2.6 Bestimmung des k_La -Wertes

Der k_La -Wert ermöglicht die Evaluation der Leistungsfähigkeit eines Systems in Bezug auf die Fähigkeit zur Versorgung von Zellen mit Sauerstoff. Die Ermittlung des k_La Wertes erfolgt in der Konfiguration, die später dem Standardaufbau für Kultivierungen entsprechen soll. In diesem Aufbau gelangt Sauerstoff über einen Sterilfilter in den Kopfraum des ICS Mediumsreservoirs und von dort ins Medium selbst. Das Medium zirkuliert mit 10 ml/min und der Sauerstoff kann vom ICS über die Membran in den ECS diffundieren. Der ECS wird mit demselben Volumenstrom wie der ICS umgewälzt. Es kann von einer indirekten oder auch passiven Begasung gesprochen werden.

Die Bestimmung wurde in allen drei Reaktorausführungen mithilfe der stationären Sulfitmethode durchgeführt. Sulfit oxidiert konstant zu Sulfat. Sulfit wird in Anwesenheit von Metallionen (Co^{2+}) sehr schnell zu Sulfat oxidiert. Solange Sulfit im Medium vorhanden ist, liegt die Sauerstoffkonzentration bei null.



Der k_La -Wert kann über den Sulfitverbrauch wie folgt beschrieben werden.

$$\dot{Q} = k_L a (C_S - C)$$

C_S = max. Sauerstoffsättigung [mg/ml]

C = aktuelle Sauerstoffkonzentration [mg/ml]

(2)

Die Messung der Sauerstoffkonzentration erfolgt im ECS über einen faseroptischen Sauerstoffsensor. Bei diesem nicht-invasiven Sensor verändert sich die Signalintensität eines Fluoreszenzfarbstoffes in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration. In Abbildung 4-23 ist exemplarisch der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration im ECS der 72-PES Reaktorvariante dargestellt. Aus der Kurve kann der Zeitpunkt bestimmt werden an dem das gesamte Natriumsulfit oxidiert ist und die Sauerstoffkonzentration wieder ansteigt.

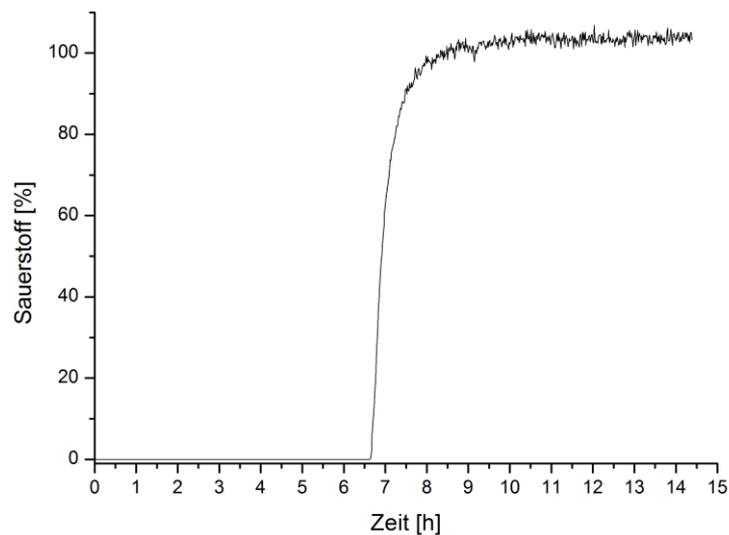


Abbildung 4-23: Verlauf der Sauerstoffkonzentration im ECS während der $k_L a$ -Wert Bestimmung

In der nachfolgenden Tabelle sind die $k_L a$ -Werte für die Reaktoren aufgelistet. Die 72-PES Variante ($15,91 \text{ h}^{-1}$) und der 72-AC-K Reaktor ($15,37 \text{ h}^{-1}$) unterscheiden sich nur minimal voneinander. In der 72-PES-Mod Variante wird durch die neue Flüssigkeitsführung der Wert auf $22,06 \text{ h}^{-1}$ um etwa 38 % im Vergleich zu dem Reaktor mit denselben Membranen verbessert. Die Strömungsbedingungen im ICS sind identisch zum 72-PES Reaktor. Durch die Einbauten im ECS erhöht sich die Flussgeschwindigkeit bei gleichem Volumenstrom im Vergleich zum nicht modifizierten Reaktor. Die laminare Grenzschicht wird auf der ECS Seite dünner und der Stofftransport schneller. Die $k_L a$ -Werte der Reaktoren liegen unter den Werten für Schüttelkolben ($50-100 \text{ h}^{-1}$) und Rührkesselreaktoren ($180-1080 \text{ h}^{-1}$). Sie können allerdings mit dem Vorgängersystem von Kroll und Meyer konkurrieren, das einen Wert von $17,2 \text{ h}^{-1}$ aufweist.

Tabelle 4-8: k_{La} Werte der Reaktoren

Reaktor	k_{La} Wert [h ⁻¹]
72 ZrO ₂	15,37
72 PES	15,91
72 PES (modifiziert)	22,06

4.2.7 Zusammenfassung der Charakterisierung

Für die Charakterisierung wurden das Strömungsverhalten im ICS, das Verweilzeitverhalten im ECS, der Stoffübergang über die Membran und der k_{La} -Wert für die Reaktorvarianten untersucht. Im ICS herrschen laminare Strömungsbedingungen vor. Dies ist unabhängig von den verwendeten Membranen. Der Stofftransport ist demnach durch die laminare Grenzschicht limitiert. Das Verweilzeitverhalten des Reaktors mit Einbauten unterscheidet sich stark von der nicht modifizierten Variante. Es bilden sich keine Totzonen in dem Reaktor mit Einbauten aus. Die Verweilzeit, sowie die Mischzeit verlängern sich. Die Einbauten, die die Strömungsgeschwindigkeiten erhöhen, verbessern den Stoffübergang über die Membran signifikant. Derselbe positive Effekt ist für den k_{La} -Wert zu beobachten.

4.3 Anwendungsbeispiele

Dieser Abschnitt behandelt Experimente zur möglichen Nutzung des Systems für Kultivierungen. Der Schwerpunkt der Arbeiten liegt auf der Kultivierung von Säugerzellen. Darüber hinaus wird ein Beispiel aus dem Bereich Mikroalgenkultivierung und Versuche mit filamentösen Pilzen geschildert. Abschließend wird das Reaktorsystem für ein Aufreinigungsbeispiel eingesetzt.

4.3.1 Kultivierung von adhärenenten ucMSC-27141 Zellen

TMBR bieten sich für die Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen vor allem wegen der großen Oberflächen, die den Zellen zu Verfügung stehen an. Die Möglichkeit zur scherstressarmen Kultivierung bei kontinuierlicher Versorgung mit Medium macht die Reaktoren außerdem für die Kultivierung von anspruchsvollen Stammzellen für das *Tissue Engineering* interessant. Über die Membranen können kontrolliert Wachstumsfaktoren zur Differenzierung der Stammzellen in bestimmte Gewebetypen zugegeben werden.

Als Weiterführung der Biokompatibilitätsversuche wurden Kultivierungen im Reaktorsystem mit adhärenenten ucMSC Zellen durchgeführt. Adhärenente Zellen können in einem TMBR prinzipiell auf der Außenseite oder auf der Innenseite der Membranen kultiviert werden. Die Versuche wurden daher in zwei unterschiedlichen Aufbauten in jeweils zwei Reaktorkonfigurationen durchgeführt. In Abbildung 4-24 sind beide Aufbauten schematisch dargestellt. Bei den beiden Reaktorkonfigurationen handelt es sich zum einen um den Reaktor mit 72 AC-K Membranen (0,2 μm) und einem maximalen ECS Volumen von 44,4 ml. Und zum Anderen um den Reaktor mit 72 PES Hohlfasern (80 kDa) und einem maximalen ECS Volumen von 46,4 ml.

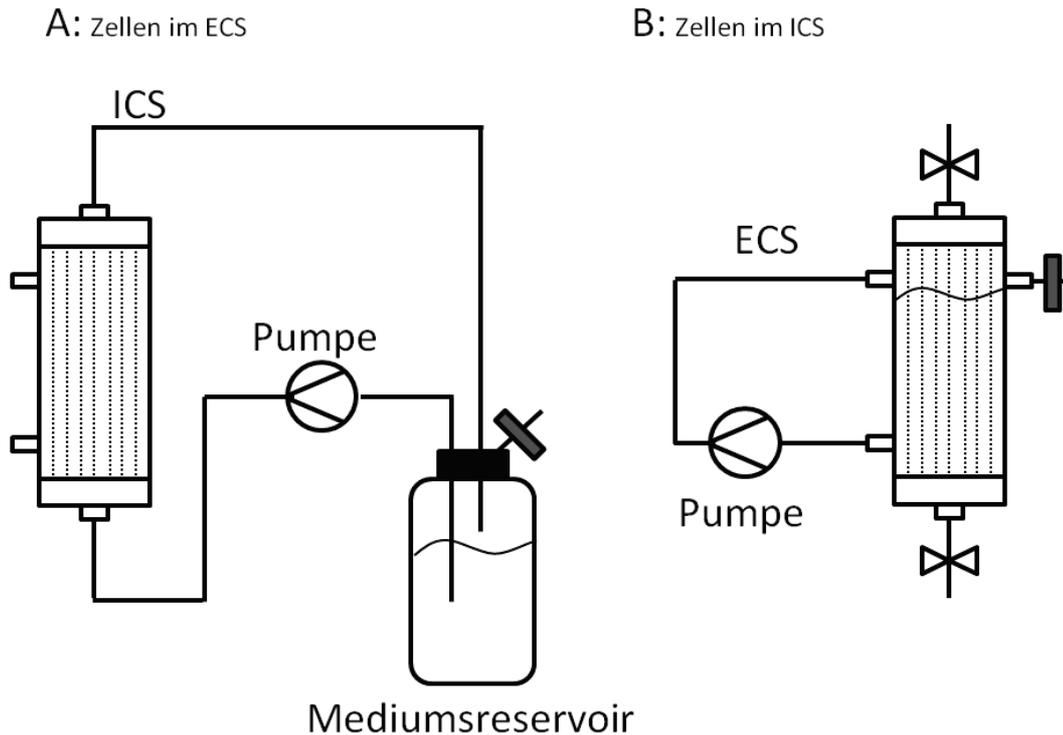


Abbildung 4-24: Versuchsaufbau der Kultivierung von ucMSC; A: Aufbau für die Kultivierung der Zellen im ECS; B: Aufbau der Kultivierung der Zellen im ICS

Abbildung 4-24 A zeigt den ersten Versuchsaufbau. Die Zellen werden im ECS auf den Membranen kultiviert. Der ECS wird mit 43 ml α -MEM (+ 5% Humanserum) und den Zellen ($\sim 10^7$) gefüllt. An den ICS ist ein Reservoir mit 50 ml Medium angeschlossen. Das Medium zirkuliert mit 5 ml/min. Das Reservoir verfügt über einen Sterilfilter zum Gasaustausch mit der Atmosphäre im CO_2 -Inkubator (37 °C, 5 % CO_2). Die tägliche Probennahme zur Bestimmung der Laktat- und Glukosekonzentration erfolgt aus dem ICS Kreislauf über ein Septum.

Der zweite experimentelle Aufbau ist in Abbildung 4-24 B dargestellt. Es wurden $\sim 10^7$ Zellen im ICS (5 ml) auf der Innenseite der tubulären Membranen kultiviert und aus dem ECS mit Nährstoffen versorgt. Der ECS ist mit 35 ml Medium (α -MEM + 5% Humanserum) gefüllt. Zur besseren Durchmischung kann der ECS mit einer Pumpe umgewälzt werden. Da der ECS nicht vollständig mit Medium gefüllt ist, erfolgt über einen Sterilfilter ein Gasaustausch mit der Atmosphäre im Inkubator (37 °C, 5 % CO_2). Die Probennahme zur Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentration erfolgte aus dem ECS.

Die Kultivierungen dauerten zwischen 18 und 21 Tagen. Der akkumulierte Glukoseverbrauch und die Laktatkonzentration im Medium sind in Abbildung 4-25 dargestellt. Während jeder Kultivierung wurden zwei Medienwechsel durchgeführt. Das Medium wurde dabei in dem Kompartiment ausgetauscht, in dem sich nicht die Zellen befanden. Am Verlauf der Laktatkonzentration ist der Medienwechsel zu erkennen. Nach Zugabe des frischen Mediums kommt es zunächst zu einer Verdünnung des verbliebenen Laktats im Kompartiment mit den Zellen, das über die Zeit wieder ansteigt. Glukose wird durchgehend in allen Reaktoren verbraucht. Der größte Glukoseverbrauch liegt bei der Kultivierung der Zellen im ECS im Reaktor mit 72 PES Hohlfasern vor (143,82 mg). Diesem folgt die Kultivierung der Zellen im ECS in der Reaktorvariante mit 72 AC-K (93,82 mg). Bei den Kultivierungen der Zellen im ICS liegt der Glukoseverbrauch niedriger. Im Reaktor mit 72 PES Hohlfasern werden 44,48 mg Glukose verbraucht und im Reaktor mit 72 AC-K 33,56 mg.

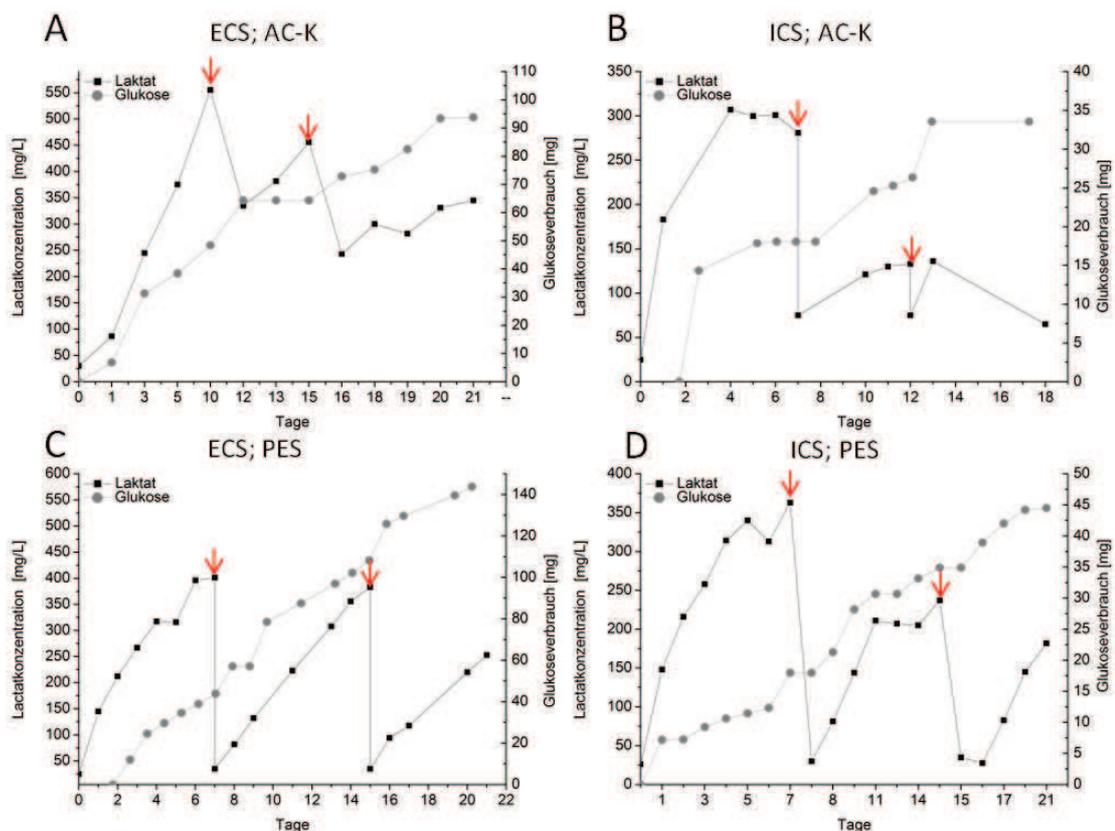


Abbildung 4-25: Verlauf von akkumuliertem Glukoseverbrauch und Laktatkonzentration; A: Reaktor mit 72 AC-K und ucMSC Zellen im ECS; B: Reaktor mit 72 AC-K und ucMSC Zellen im ICS; C: Reaktor mit 72

PES Hohlfasern und ucMSC Zellen im ECS; D: Reaktor mit 72 PES Hohlfasern und ucMSC Zellen im ICS; die roten Pfeile markieren den Zeitpunkt der Medienwechsel

Im Anschluss an die Kultivierung wurden Hohlfasern bzw. AC-K aus den Reaktoren entnommen und mit DAPI für die Fluoreszenzmikroskopie gefärbt. Abbildung 4-26 und Abbildung 4-27 zeigen die Aufnahmen.

Die Bilder der Kultivierungen im ECS zeigen in keinem der beiden Reaktoren auf der äußeren Mantelfläche der Membranen eine durchgängige Besiedlung. Dies lässt darauf schließen, dass die Adhäsion der Zellen nicht effektiv verlaufen ist. Bilder vom Silikonkleber aus dem Reaktor mit 72 AC-K (Abbildung 4-26 C), der die Membranen fixiert, zeigen dagegen eine dichte Besiedelung. Es ist zudem denkbar, dass sich Zellen auf der Reaktorwandung angesiedelt haben. Dies konnte allerdings nicht überprüft werden. Die Bilder der Kultivierungen im ICS zeigen eine dichte Besiedlung an den jeweiligen Tubusausgängen in beiden Reaktortypen. Hier kann allerdings keine Aussage über die Verteilung im gesamten Innenraum getroffen werden.

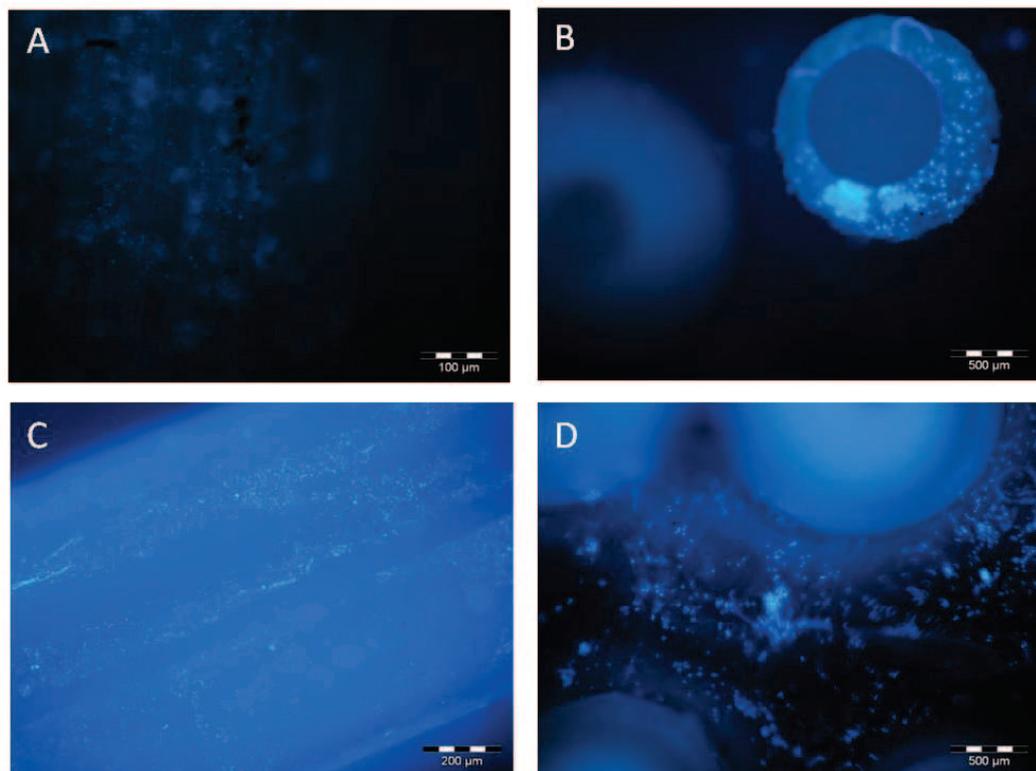


Abbildung 4-26: Aufnahmen mit Fluoreszenzmikroskop; A: AC-K Oberfläche mit ucMSC; B: AC-K Eingang mit ucMSC; C: Silikonkleber im ECS vom AC-K Reaktor mit ucMSC; AC-K Eingang mit ucMSC

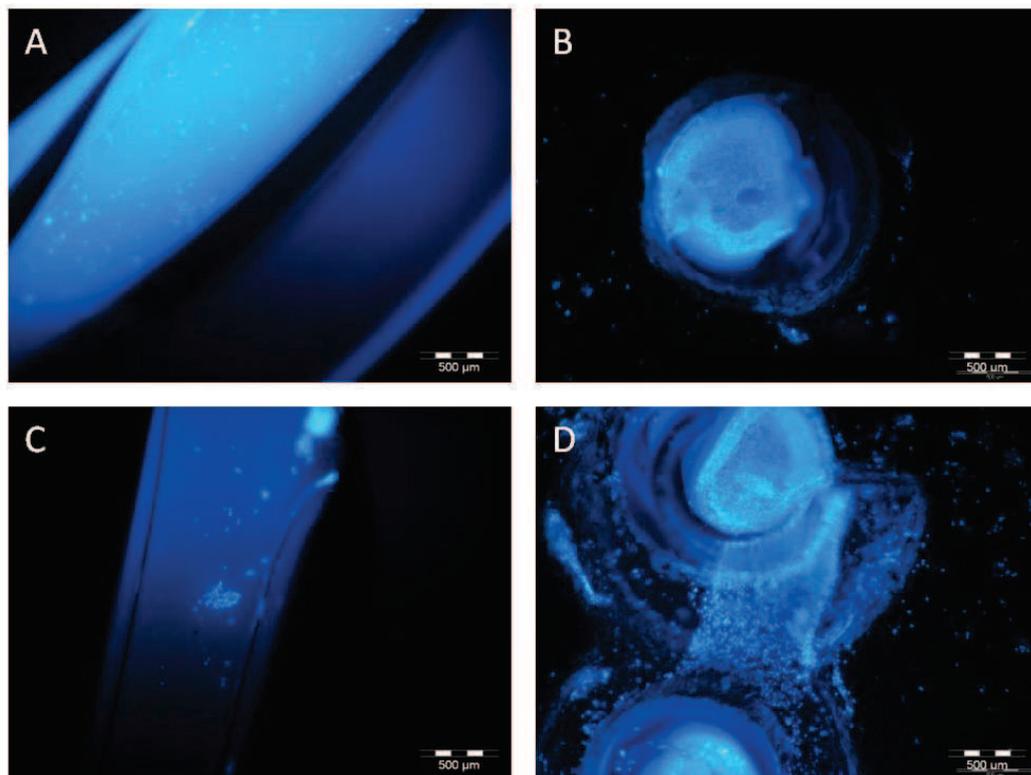


Abbildung 4-27: Aufnahmen mit Fluoreszenzmikroskop; A: PES Hohlfaseroberfläche mit ucMSC; B: PES Hohlfasereingang mit ucMSC; C: PES Hohlfaseroberfläche mit ucMSC; D: PES Hohlfasereingang mit ucMSC

Möglicherweise ist die Besiedlung der Oberfläche im ICS aufgrund des besseren Verhältnisses von Membranoberfläche zu Medienvolumen effektiver. Im ECS stehen 43 ml Medium einer Membranfläche von $158,33 \text{ cm}^2$ (72-PES Reaktor) bzw. $221,67 \text{ cm}^2$ (72-AC-K Reaktor) gegenüber. Dies führt zu einem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen von $3,68 \text{ cm}^2/\text{ml}$ für den Reaktor mit 72 PES Hohlfasern und $5,15 \text{ cm}^2/\text{ml}$ im Reaktor mit 72 AC-K. Bei der Kultivierung im ICS stehen 5 ml Medium einer Membranfläche von $95,00 \text{ cm}^2$ (72 PES Reaktor) und $133,00 \text{ cm}^2$ (72 AC-K Reaktor) gegenüber. Dies führt zu einem Verhältnis von Oberfläche zu Volumen von $19,00 \text{ cm}^2/\text{ml}$ im Reaktor mit 72 PES Hohlfasern und $26,6 \text{ cm}^2/\text{ml}$ im Reaktor mit 72 AC-K. Nichtsdestotrotz ist der Glukoseverbrauch bei den Kultivierungen im ECS insgesamt höher, was wiederum auf eine größere Anzahl an lebenden Zellen im Reaktor schließen lässt. Die Reaktoren mit PES Hohlfasern weisen zudem einen höheren Glukoseverbrauch auf als die Reaktoren mit AC-K.

Versuche, die Zellen im Anschluss an die Kultivierung mittels Trypsin zu lösen und aus dem Reaktor zu entnehmen, schlugen fehl. Ebenso wie Versuche mittels *Cell Titer Blue*

Assay, einem schonenden Zellproliferationstest, während der Kultivierung über die Stoffwechselaktivität indirekt auf die Zellzahl zu schließen.

Das Reaktorsystem ist für die Kultivierung von anspruchsvollen adhärennten Zellen geeignet. Die Kultivierung kann sowohl im ECS als auch im ICS durchgeführt werden. Die Zellzahl im Reaktorsystem konnte allerdings nicht bestimmt werden. Aus dem ansteigenden Glukoseverbrauch und der Bildung von Laktat kann allerdings auf eine erfolgreiche Kultivierung geschlossen werden. Für die Kultivierung im ECS sollte die Packungsdichte der Membranen erhöht werden um das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen zu erhöhen. Dies könnte zu einer effektiveren Adhäsion der Zellen an die Membranen führen.

Um das System für die Expansion von Zellen und zur Generierung von Zellmasse nutzen zu können, müssen noch Wege gefunden werden, die Zellen schonend von den Membranen zu lösen und aus dem System abzuführen. Eine Bestimmung der Zellzahl wäre dann ebenfalls möglich. Vielversprechend erscheint die Nutzung für langandauernde Kultivierungsanwendungen. Über die Kompartimentierung im Reaktor können einfach und ohne Beeinflussung der Zellen, regelmäßige Medienwechsel durchgeführt und damit eine stabile Kultivierungsumgebung geschaffen werden. Die Konzentration von inhibierenden Substanzen wie Laktat kann so auf einem niedrigen Niveau gehalten werden und neue Nährstoff den Zellen zugeführt werden.

4.3.2 Kultivierung von eukaryotischen Suspensionszellen

Eukaryotische Suspensionszellen werden für die Produktion vieler wichtiger Therapeutika und zur Produktion von Antikörpern eingesetzt (Chu und Robinson 2001). Im Folgenden wird die Eignung des Reaktorsystems zur Kultivierung einer Säugerzelllinie in Suspensionskultur untersucht. Als Modell für eine Kultivierung von Suspensionszellen dient die Hybridomazelllinie SC-71.

Für die Kultivierung kamen die beiden Reaktorkonfigurationen mit 72 PES Hohlfasern und 72 AC-K (siehe 4.3.1) zum Einsatz. Der Versuchsaufbau entspricht dem für Kultivierung von ucMSC Zellen im ECS und ist schematisch in Abbildung 4-24 A dargestellt. Der Unterschied besteht darin, dass die Zellen im ECS in Suspension kultiviert werden und nicht adhärennt auf der Membranoberfläche.

Die Zellen wachsen im ECS in einem Volumen von 43 ml und im ICS zirkuliert 150 ml DMEM Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS). Das Mediumreservoir des ICS verfügt über einen Sterilfilter zum Gasaustausch mit der Atmosphäre im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂). Dies ist sowohl für den Hydrogencarbonatpuffer im Medium zur pH-Regulation als auch für die Sauerstoffversorgung der Zellen notwendig. Die Pumpe zur Medienzirkulation fördert 5 ml/min. Auf eine konvektive Durchmischung des ECS wird verzichtet, um die Zellen nicht durch Scherstress zu belasten. Der gesamte Versuchsaufbau befindet sich in einen CO₂-Inkubator und ist in Abbildung 4-28 dargestellt.

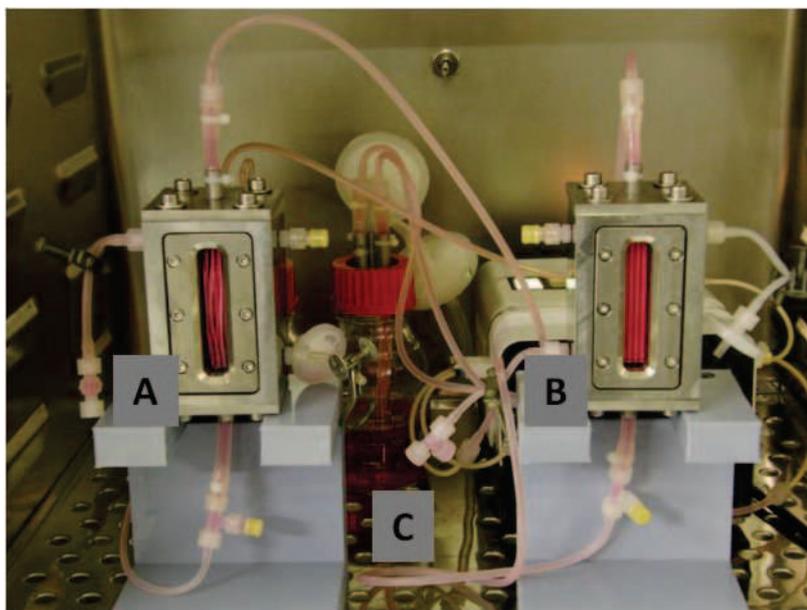


Abbildung 4-28: Bioreaktorsystem im CO₂-Inkubator; A: Reaktor mit 72 PES Hohlfasern; B: Reaktor mit 72 AC-K; C: Mediumsreservoir

Der Verlauf von Gesamtzellzahl, Glukoseverbrauch und Laktatkonzentration der Kultivierung ist in Abbildung 4-29 für beide Reaktorkonfigurationen aufgeführt. Der Glukoseverbrauch steigt über die gesamte Kultivierungsdauer in beiden Reaktortypen kontinuierlich an. Im Reaktor mit 72 PES Hohlfasern werden insgesamt 731 mg Glukose verbraucht und 570 mg im Reaktor mit 72 AC-K. Die Laktatkonzentration steigt ebenfalls. Es werden dabei in beiden Reaktoren Werte von mehr als 2 g/l erreicht. Diese Konzentration gilt als Grenze für eine Hemmung des Wachstums (Cruz et al. 2000; Hassel et al. 1991). Da das Kulturvolumen nicht konvektiv durchmischt wurde, um die Zellen zu schonen, wurde vor der Probenahme der Reaktor leicht geschüttelt. Die Durchmischung war nicht ausreichend, um eine repräsentative Probenahme zu

gewährleisten. Dies ist am ungleichmäßigen Verlauf der Zellzahlen zu erkennen. Ein genereller Anstieg der Zellzahl über die Kultivierungsdauer von 10 bis 14 Tagen ist dennoch in beiden Reaktoren zu beobachten. Im 72 AC-K Reaktor wurden Zelldichten von maximal $2,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und im Reaktor mit 72 PES Hohlfasern $2,8 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht. Normalerweise werden diese Zellen lediglich 5 Tage kultiviert. Geklärt werden sollte, ob sich Zellen auch auf den Membranen anlagern und so die Bestimmung der Zellzahl noch weiter verfälschen.

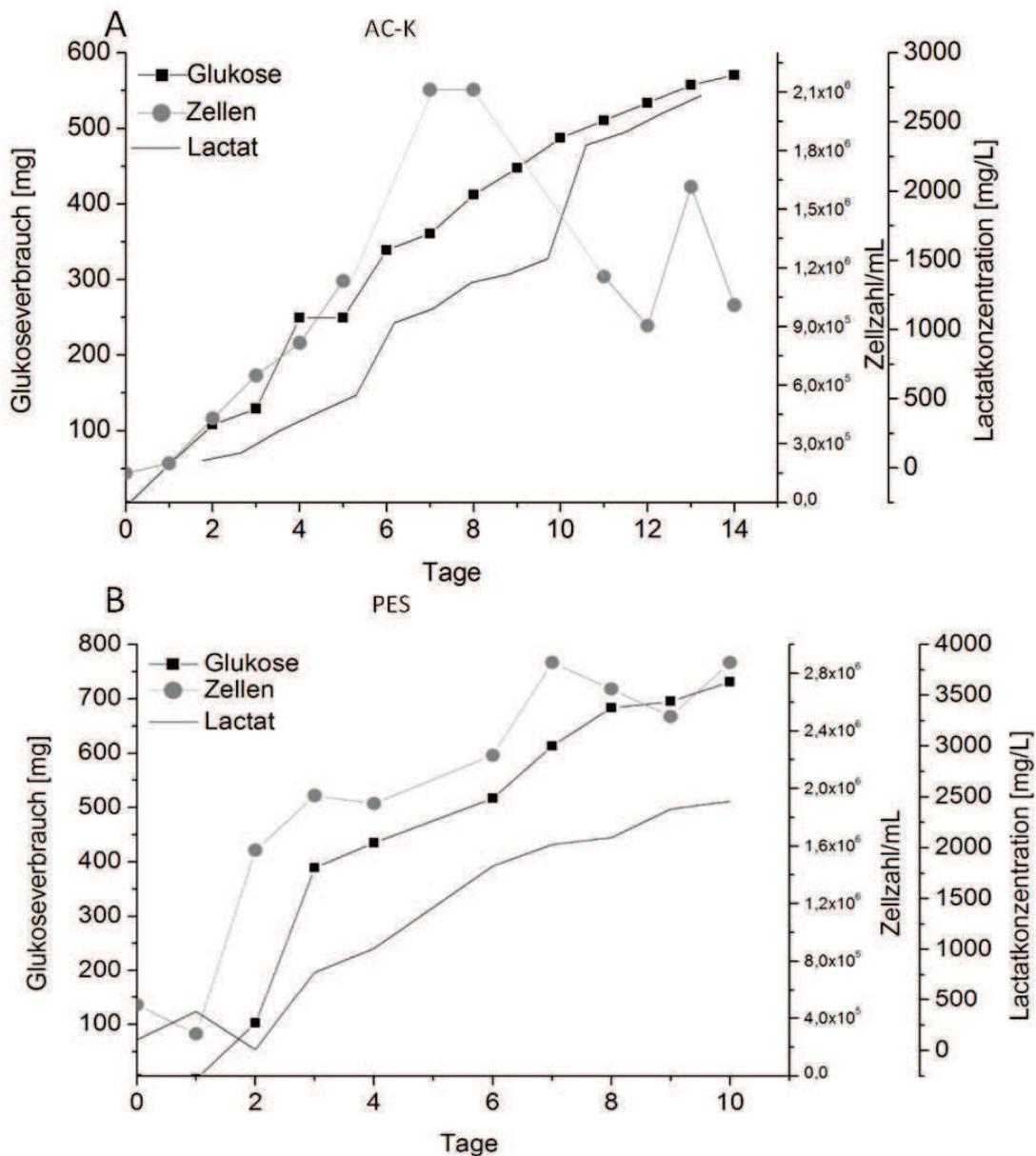


Abbildung 4-29: Verlauf von Glukoseverbrauch, Laktatkonzentration und Zellzahl der Kultivierung von SC-71 in A: Reaktor mit 72 AC-K und B: Reaktor mit 72 PES Hohlfasern

In Abbildung 4-30 ist exemplarisch der Verlauf der Gelöstsaurestoffkonzentration im ECS für die Kultivierung im Reaktor mit 72 AC-K dargestellt. Eine Sauerstofflimitierung liegt nicht vor. Die Konzentration sinkt bis etwa 20 % Sättigung ab und steigt ab Tag acht wieder an. Zu diesem Zeitpunkt ist auch ein absinken der Zellzahl zu beobachten gewesen. Die Ausschläge in der Kurve hängen vermutlich mit den Probennahmen zusammen, die die Messung über den Lichtleiter beeinflusst haben.

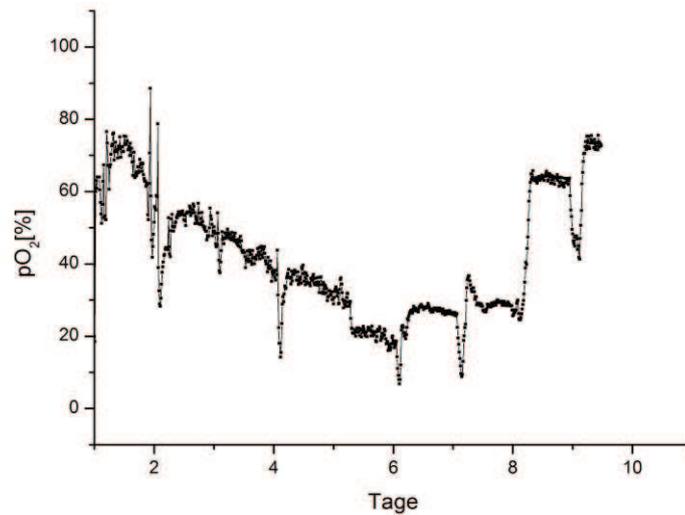


Abbildung 4-30: Verlauf der Gelöstsaurestoffkonzentration im ECS des Reaktors mit 72 AC-K

Das Reaktorsystem erscheint grundsätzlich geeignet für die Kultivierung von eukaryotischen Suspensionszellen. Durch regelmäßige Wechsel des Mediums im ICS sind noch längere Kultivierungsperioden oder sogar kontinuierliche Kulturen denkbar. Dabei würde die Laktatkonzentration sowie andere inhibierender Metabolite verdünnt werden. Außerdem könnte neues Substrat zur Verfügung gestellt werden. Für eine repräsentative Probenahme muss noch ein Weg zur schonenden Durchmischung des Systems gefunden werden. Nicht betrachtet wurde bisher die Möglichkeit der Prozess-integrierten Produktabtrennung (ISPR). Sekretierte Produkte, wie der Antikörper der kultivierten Hybridomzelllinie könnten nach Diffusion vom ECS in den ICS bei einem Wechsel des Mediums geerntet werden.

4.3.3 Mikroalgenkultivierung

Die Kultivierung von Mikroalgen gewinnt derzeit eine immer größere Bedeutung (McKendry 2002). Zum Beispiel in Bezug auf die Gewinnung von Biomasse für die Erzeugung von Bio-Treibstoffen und bei der Nutzung von Kohlenstoffdioxid aus Produktionsprozessen zur Verbesserung der Klimabilanz.

Eine Möglichkeit der Versorgung einer Algenkultur mit CO₂ ist die Begasung über Membranen mit Druckluft. Als Modellkultivierung wurde die Mikroalge *C.reinhardtii* in dem Reaktorsystem kultiviert. Es sollte überprüft werden, ob sich das System auch als Testplattform für Algenkultivierungen bzw. Membranbegasungen eignet. Hierfür musste die Möglichkeit der Versorgung einer Algenkultur mit Licht für die Photosynthese durch die Sichtfenster des Reaktors erprobt werden.

Abbildung 4-31 und Abbildung 4-32 zeigen den Versuchsaufbau des Experiments. Im ECS liegt das Medium (TAP, 43 ml) vor, in dem die Algen in Suspension kultiviert werden. Der Reaktor verfügt über Sichtfenster aus Glas, durch die eine Halogenlampe dauerhaft gleichmäßig Licht für die Photosynthese bereitstellt. Die Begasung erfolgt mittels Druckluft über den ICS. Der Gasfluss wird über einen Massendurchflussregler kontrolliert (0,5 l/min). Der Gastrom wird in einer Waschflasche angefeuchtet, um das Austragen des Mediums aus dem Reaktor zu minimieren. Zudem ist ein Sterilfilter in die Begasung integriert. Die Kultivierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und die Temperatur täglich protokolliert.

Die Probenahme erfolgte über ein Septum aus dem ECS zur Bestimmung der optischen Dichte bei 750 nm. Die Versuche wurden sowohl mit Reaktoren mit 72 PES Hohlfasern als auch mit 72 AC-K durchgeführt. Bei der Begasung über die keramischen Kapillaren war der Flüssigkeitsverlust so groß, dass die Versuche abgebrochen wurden.

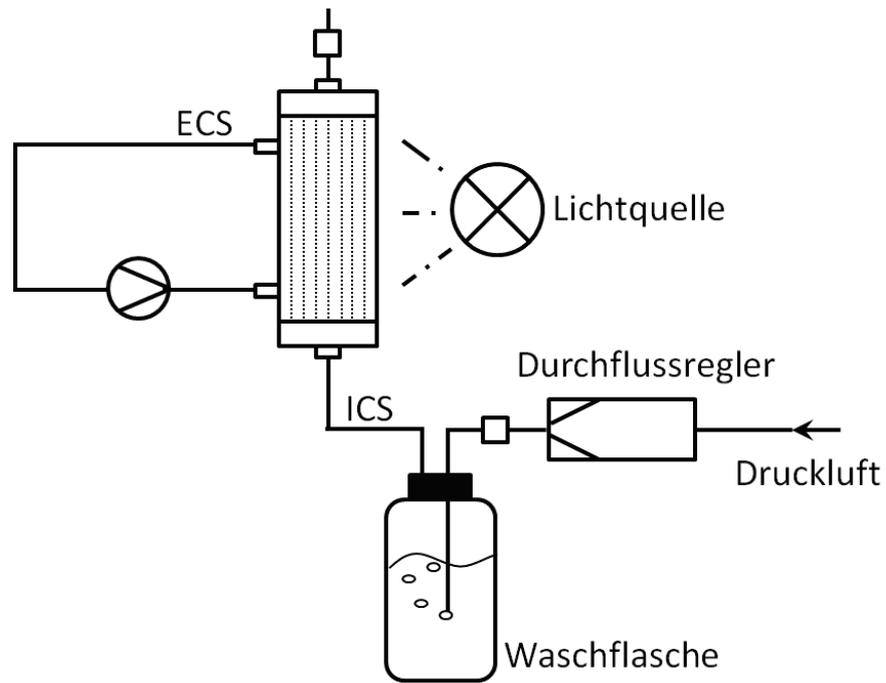


Abbildung 4-31: Versuchsaufbau der Kultivierung von *C.reinhardtii*

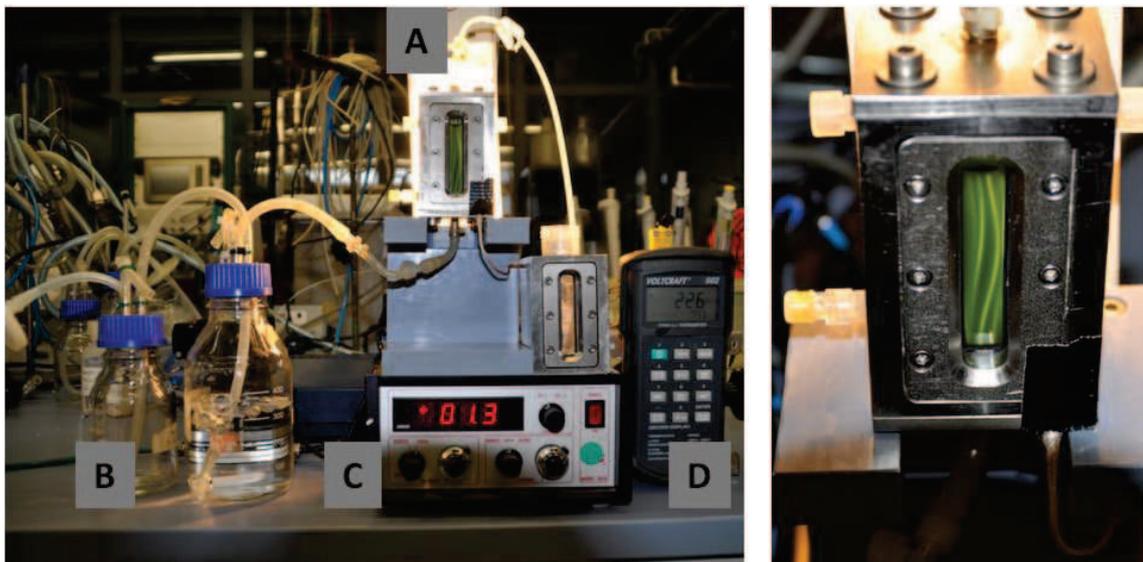


Abbildung 4-32: Aufbau der Kultivierung; A: Bioreaktor vor Halogenleuchte, B: Waschflasche zur Befeuchtung des Gastroms, C: Durchflussmassenregler, D: Thermometer; rechtes Bild: Nahaufnahme Bioreaktor mit grüner Algensuspension

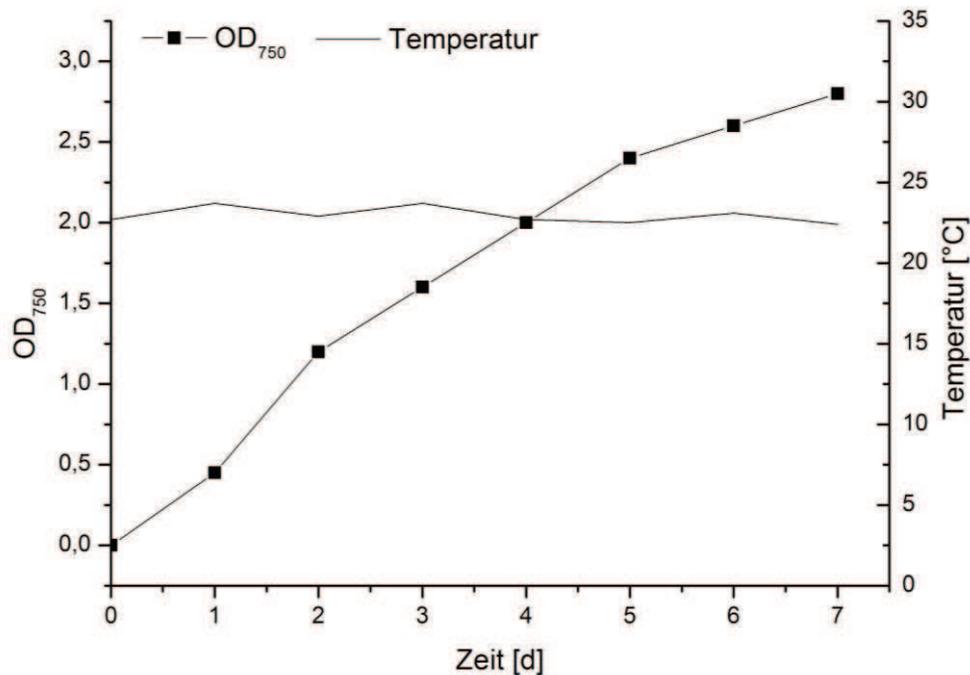


Abbildung 4-33: Verlauf der optischen Dichte der Algenkultur im Reaktor und der Temperatur

Der Graph in Abbildung 4-33 zeigt den Verlauf der optischen Dichte der Algenkultur. Diese Werte spiegeln das kontinuierliche Wachstum der Kultur wider. Dieses ist zudem an der grünen Färbung der Suspension erkennbar. Die Kultur erreicht nach sieben Tagen eine OD₇₅₀ von 2,8. Dies ist vergleichbar mit Kultivierungen der Mikroalge im Schüttelkolben. Die Temperatur liegt relativ konstant bei etwa 22 °C.

Die Versorgung einer Mikroalgenkultur mit CO₂ über Membranbegasung mit Druckluft und Licht über die Sichtfenster im Reaktorsystem ist somit prinzipiell möglich. Für die Kultivierung von photoautotrophen Organismen könnte ein Reaktorgehäuse aus Glas eine bessere Versorgung mit Licht ermöglichen. Aber auch die Integration von zwei weiteren Sichtfenstern ist denkbar. Für eine noch effektivere Beleuchtung könnten Leuchtdioden (LED) direkt auf den Sichtfenstern platziert werden. Es ist zudem denkbar anstelle von Druckluft mit CO₂ zu begasen. In den bisherigen Anwendungsbeispielen lagen im ICS und ECS immer wässrige Phasen vor. In diesem Fall liegt im ECS eine wässrige und im ICS eine Gasphase vor. Das Anwendungsbeispiel demonstriert also auch die Variabilität des Reaktorsystems in Bezug auf alternative Betriebsführungen. Um AC-K für die Begasung des Reaktors einsetzen zu können, ist eine hydrophobe

Oberflächenmodifikation der Membranen notwendig, um den Flüssigkeitsverlust zu minimieren.

4.3.4 Kultivierung von filamentösen Pilzen

Filamentöse Pilze können für die Produktion von Enzymen eingesetzt werden (Dunn-Coleman et al. 1991). Die Pilze sekretieren die produzierten Enzyme häufig in das Medium. Im Reaktorsystem wurden filamentöse Pilze im ECS kultiviert und die sekretierten Produkte sollten über die Membran in den ICS abgetrennt werden. Die prozessintegrierte Aufreinigung (ISPR) sollte für die Produktion von Laccasen durch *P.sapidus* im Reaktorsystem demonstriert werden (Linke et al. 2005).

Der Versuchsaufbau entspricht der Kultivierung von eukaryotischen Säugerzellen (siehe 4.3.2). Es kamen ebenfalls die Reaktoren mit 72 PES Hohlfasern und 72 AC-K zum Einsatz, wobei der Pilz im ECS in 43 ml Medium kultiviert wurde. Der ICS ist an ein Mediumsreservoir angeschlossen indem 150 ml Medium mit 5 ml/min zirkulieren. Das Mediumsreservoir verfügt über einen Sterilfilter für den Gasaustausch zur Sauerstoffversorgung des Mediums. Anders als bei Kultivierung von eukaryotischen Säugerzellen sind die Reaktoren nicht in einem Inkubator aufgebaut sondern werden bei Raumtemperatur kultiviert. Täglich wurden Proben aus ICS und ECS zur Bestimmung der Enzymaktivität der Laccasen entnommen.

Im Verlauf der Kultivierungen zeigte sich zwischen Tag 4 und 10 eine Trübung des Mediumsreservoirs des ICS Kreislaufes. Hierbei handelte es sich um einen Durchbruch der Sterilbarriere (Membran) des Pilzes von ECS zum ICS. In Abbildung 4-34 A und B ist die Biomasse des Pilzes aus dem ECS auf den AC-K und den PES Membranen zu sehen. In Abbildung 4-34 C ist der Zugang zum ICS einer der Reaktoren zusehen, aus dem der Pilz hinauswächst nachdem die Sterilbarriere überwunden wurde. Die Zirkulation des Mediums wurde durch den Pilz im ICS nicht sichtbar beeinflusst und die Biomasse wies eine schwammartige Konsistenz auf.

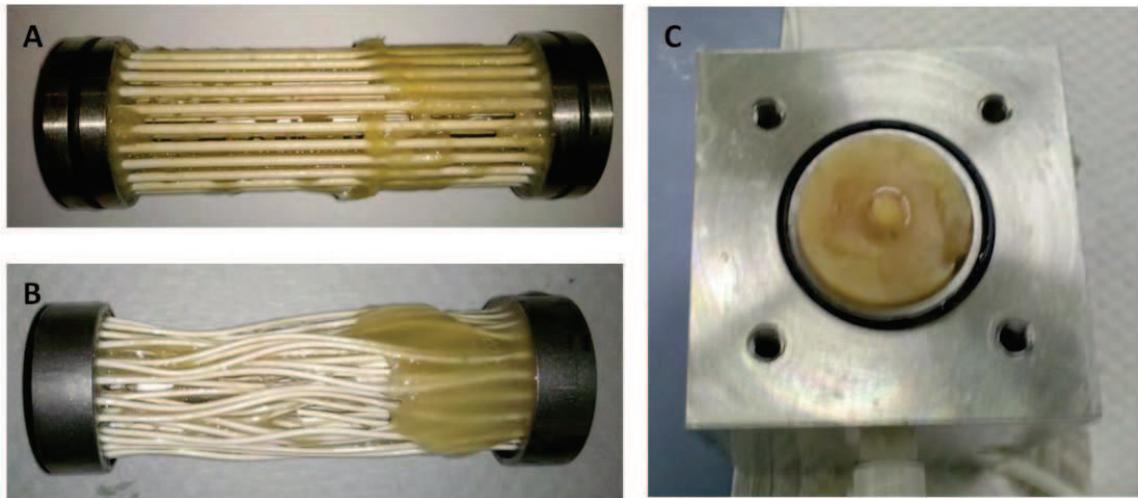


Abbildung 4-34: *P.sapidus*; A: Biomasse auf AC-K; B: Biomasse auf PES Hohlfasern; C: Biomasse die aus dem ICS herauswächst

Beide Membranen sind nicht in der Lage den Pilz vom ICS abzutrennen und die Sterilbarriere aufrecht zu halten. Der Durchbruch des Pilzes in den ICS macht Aussagen zur Abtrennung von Enzymen hinfällig, da die Ergebnisse durch die Biomasse im ICS verfälscht werden.

Eine Kultivierung von filamentösen Pilzen erscheint im verwendeten Aufbau als nicht durchführbar. Um eine Kultivierung zu realisieren müsste die Betriebsweise des Reaktors angepasst werden. Eine Möglichkeit wäre, ähnlich wie im Quorus System (Synexa, Südafrika) filamentöse Pilze als Biofilm auf den Membranen im ECS in einem Perforationsbetrieb zu kultivieren (Endres 2010). Ein konvektiver Medienstrom von ICS zu ECS würde einer Überwindung der Sterilbarriere entgegenwirken und sekretierte Produkte könnten mit dem Medienstrom entnommen werden. In Abbildung 4-35 ist dieses Konzept schematisch dargestellt. Ein weiterer Vorteil dieser Betriebsführung ist, dass der ECS direkt begast werden kann. Eine gute Versorgung der Zellen mit Sauerstoff könnte so gewährleistet werden.

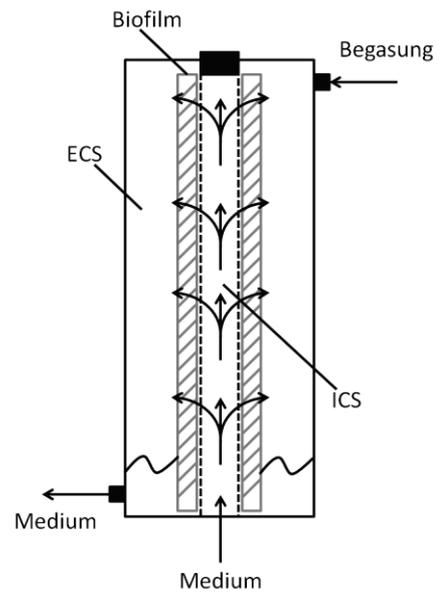


Abbildung 4-35 Schema für alternative Betriebsweise des Reaktorsystems

4.3.5 Alternative Nutzung des Bioreaktorsystems: Aufreinigung

Neben dem Einsatz in der Kultivierung kommen Membranen für Trenn- oder Extraktionsprozesse in der Aufarbeitung von biotechnologischen Prozessen zum Einsatz. Das entwickelte Reaktorkonzept kann alternativ zur Kultivierung auch als Testplattform für membranbasierte Aufreinigungsverfahren eingesetzt werden.

In der Arbeit von Grünert wurde das System für Vorversuche zur Aufreinigung von Phloretin aus einer Fermentationsbrühe eingesetzt (Grünert 2012). Phloretin ist ein Flavonoid, das durch enzymatische Umsetzung aus Narginin entsteht.

Die Umsetzung wird im Bioreaktor im Anschluss an die Kultivierung eines *E.coli*, der die notwendigen Enzyme (Chalkonisomerase, Enoat-Reduktase) für die Umsetzung rekombinant, exprimiert. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-36 und Abbildung 4-37 dargestellt. In den Reaktor wird das Substrat Narginin gegeben. Die rekombinant produzierten Enzyme setzen dieses zu Phloretin um. Die Fermentationsbrühe wird durch den ECS des TMBR gepumpt. Durch den ICS wird gleichzeitig ein organisches Lösemittel z.B. 2-Butanol gepumpt, um über die bessere Löslichkeit Phloretin zu extrahieren. Die Flussrate beider Kreisläufe betrug 10 ml/min.

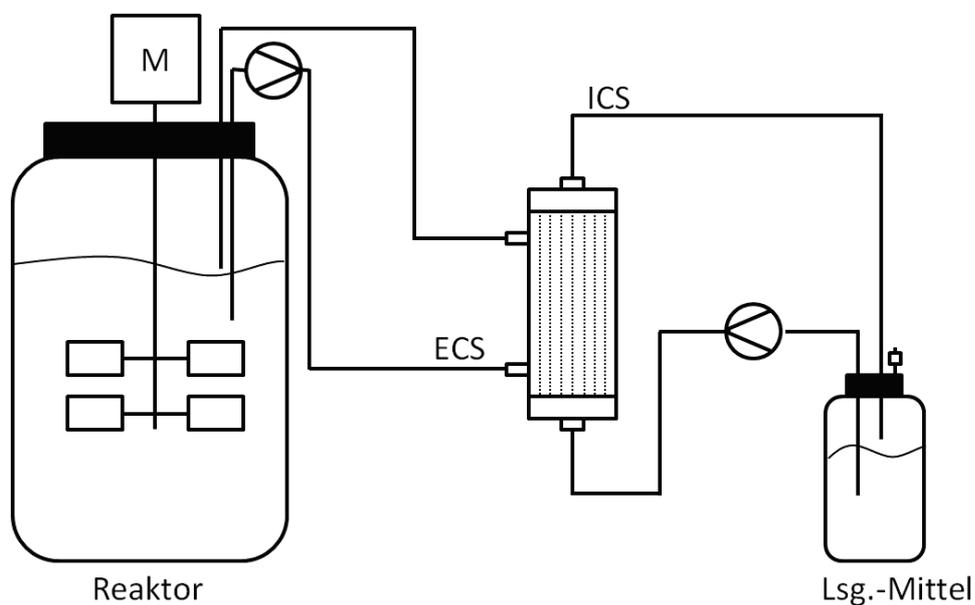


Abbildung 4-36: Schematischer Aufbau der Extraktion



Abbildung 4-37: Versuchsaufbau der Extraktion von Phloretin aus dem Fermenter

Die prinzipielle Machbarkeit eines Extraktionsprozesses von Phloretin konnte so gezeigt werden. Beim Einsatz von 2-Butanol zur Extraktion konnten 88 % der Flavonoide aus dem Fermenter extrahiert werden. Probleme gab es in der Lösemittelbeständigkeit der Membranverklebung insbesondere bei der Extraktion mit Ethylacetat und bei den Membranen selbst. In der Arbeit von Grünert sind alle Versuchsergebnisse zu finden. Das System ist für Kultivierungen entwickelt und optimiert worden. Die Anforderungen an das Material in einem Extraktionsprozess setzten andere Schwerpunkte.

Für eine weiterführende Nutzung des Systems sollte also die Auswahl an Membranen erweitert und eine lösemittelbeständige Verklebung gefunden werden. Dann steht einer Nutzung des Systems als Plattform für Aufarbeitungsstrategien nichts im Wege.

4.4 Nutzung von modifizierten tubulären keramischen Membranen zum Zellaufschluss

Im Laufe des Projekts wurden weitere Anwendungsmöglichkeiten von keramischen Kapillaren neben der Nutzung als Sterilbarriere in der Kultivierung erarbeitet. Wie bereits erwähnt wurden die AC-K für die Filtration von Bakterien entwickelt. Im Zuge dieser Entwicklung wurde außerdem an Strategien gearbeitet die Membranen vor *fouling* bzw. Verblockung zu schützen. Die Membranoberfläche der AC-K wurde zu diesem Zweck mit Lysozym funktionalisiert (Kroll et al. 2012).

Eine alternative Nutzungsstrategie dieser Modifikation wurde im Laufe dieser Dissertation entwickelt. Anstatt *fouling* zu verhindern, sollten die Kapillaren als enzymatischer Durchflussreaktor für den Zellaufschluss eingesetzt werden. Dieses Konzept ist in Abbildung: 4-38 skizziert. Intakte Zellen, die durch die Kapillare gepumpt werden, kommen mit dem Lysozym in Kontakt. Das Enzym degradiert Peptidoglykane auf der bakteriellen Zellwand und zerstört somit die Zellen. Am Ende verlassen die lysierten Zellen die Kapillare. Lysozym hat als Aufschlussmethode den Vorteil, dass es relativ schonend ist. Bei immobilisiertem Lysozym kommt hinzu, dass keine weitere Verunreinigung in die Probe gelangt.

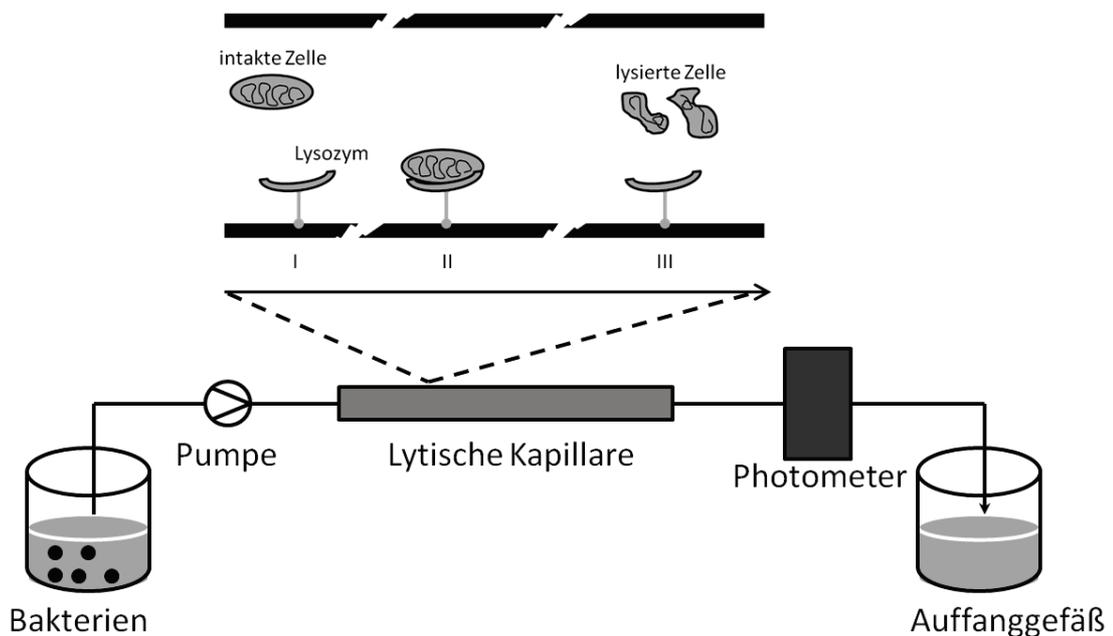


Abbildung: 4-38: Versuchsaufbau und Funktionsprinzip der lytischen Kapillaren

Die Modifikation der Kapillaroberfläche ist ein mehrstufiger Prozess. Zunächst muss das ZrO_2 aktiviert werden. Dafür werden mit konz. Schwefelsäure und

Wasserstoffperoxid Hydroxylgruppen auf der Membranoberfläche erzeugt. Im nächsten Schritt wird eine Aminogruppe aufgebracht. An diese Aminogruppe wird die Säurefunktion des Enzyms nach Aktivierung gekoppelt.

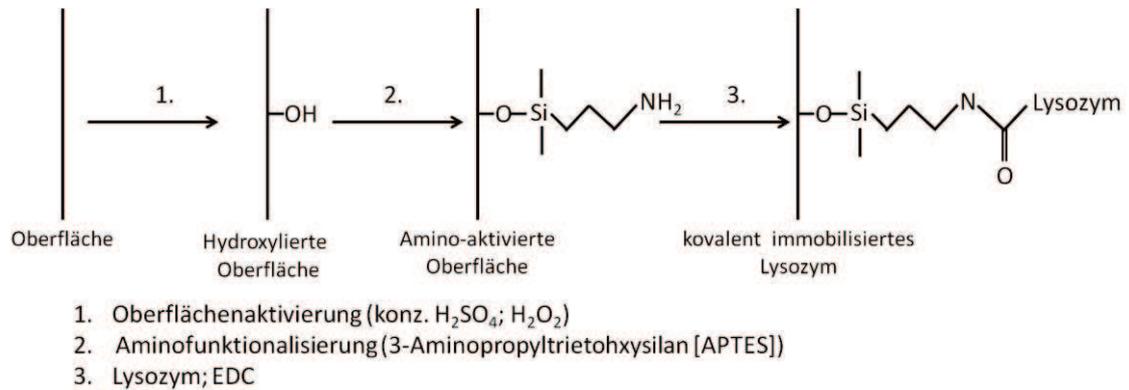


Abbildung 4-39: Schema der Oberflächenmodifikation

Die prinzipielle Machbarkeit wurde in ersten Messungen gezeigt. Bei diesen Experimenten wird eine Zellsuspension vom *M. luteus* mit definierter optischer Dichte (450 nm) bei konstantem Volumenstrom durch die Kapillare geführt. Über ein Photometer wird die Veränderung der optischen Dichte (450 nm) und dadurch der Zellaufschluss evaluiert. Die Beladung der Kapillaren, die Stabilität und die optimalen Betriebsparameter müssen in weiteren Arbeiten ermittelt und verbessert werden. Die genaue Leistungsfähigkeit einer einzelnen Kapillare muss ebenso geprüft werden. Mit diesen Daten soll dann ein Mehrkanalmodul ausgelegt werden, um größere Volumina zu prozessieren. In weiterführenden Arbeiten ist außerdem geplant durch den Einsatz von Silberionen oder Lyticase (Enzym zum Aufschluss von Hefen) das Anwendungsspektrum zu erweitern. Diese Arbeiten sind Teil eines neuen Projektes, das vom BMBF gefördert wird.

Das Potential der keramischen Kapillare ist mit der Nutzung als Sterilbarriere nicht erschöpft. Die Oberfläche im Inneren kann für Reaktionen im Durchfluss funktionalisiert, die Kapillaren als eine Art μPFR genutzt werden. Die denkbaren Anwendungen bleiben dabei nicht auf den Zellaufschluss beschränkt.

4.5 Integration des Reaktorsystems in Mess- und Steuerungstechnik

Ein Bioreaktorsystem besteht aus verschiedenen Komponenten, die aufeinander abgestimmt werden müssen, um einen reibungslosen Verlauf der Kultivierung zu ermöglichen. Die Temperatur im Inkubator muss beispielsweise überwacht werden und die Pumpen müssen gesteuert werden.

Im Folgenden wird die Integration der verschiedenen Komponenten des entwickelten Reaktorsystems in eine Mess- und Steuerungsumgebung beschrieben. Über die Schnittstelle *Expert Key* (Delphin, Bergisch Gladbach) und die dazugehörige Software *ProfiSignal* (Delphin, Bergisch Gladbach) ist es möglich die einzelnen Komponenten eines Versuchsaufbaus zu verbinden, anzusteuern und Messdaten zu erfassen. Die meisten Laborgeräte verfügen über standardisierte Anschlüsse (z.B. RS 232), die über *Expert Key* ausgelesen oder auch angesprochen werden können. Abbildung 4-40 A zeigt eine *Expert Key* Einheit, die für den Laborgebrauch in ein spritzwassergeschütztes Gehäuse montiert wurde. Die Geräte werden über einen Netzwerkanschluss mit einem Server verbunden.

Die Software *Profi Signal* dient der Archivierung und Visualisierung der Signale aus dem *Expert Key*. Geräte, die eingebunden wurden, können zudem angesteuert werden. Alle Messdaten werden kontinuierlich aufgezeichnet und auf einem zentralen Server gespeichert. Der Zugriff kann von jedem Rechner mit entsprechender Software und Zugriffsrechten durchgeführt werden. Die Integration des Bioreaktorsystems in diese Mess- und Steuerungsumgebung wird exemplarisch am Beispiel einer *E.coli* Kultivierung im ECS eines Reaktors mit 72 PES Hohlfasern erläutert.

Abbildung 4-40 B zeigt den Versuchsaufbau und Abbildung 4-41 schematisch die Integration der Komponenten in die Mess- und Steuerungsumgebung. Der Versuchsaufbau befindet sich in einem Inkubator, dessen Temperatur ausgelesen wird. Der Sauerstoff im ECS wird über einen faseroptischen Sensor (Presens, Regensburg) gemessen und ebenfalls erfasst. Die Pumpe, die das Medium in ICS und ECS zirkuliert, kann kontrolliert werden.

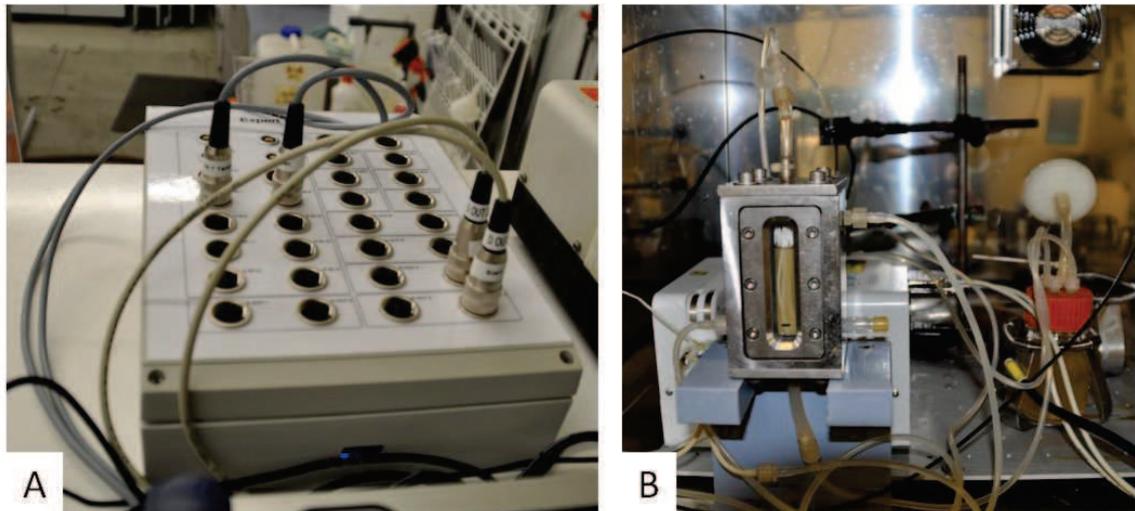


Abbildung 4-40: A: *Expert Key Box* in spritzwassergeschütztem Gehäuse; B: Versuchsaufbau im Inkubator

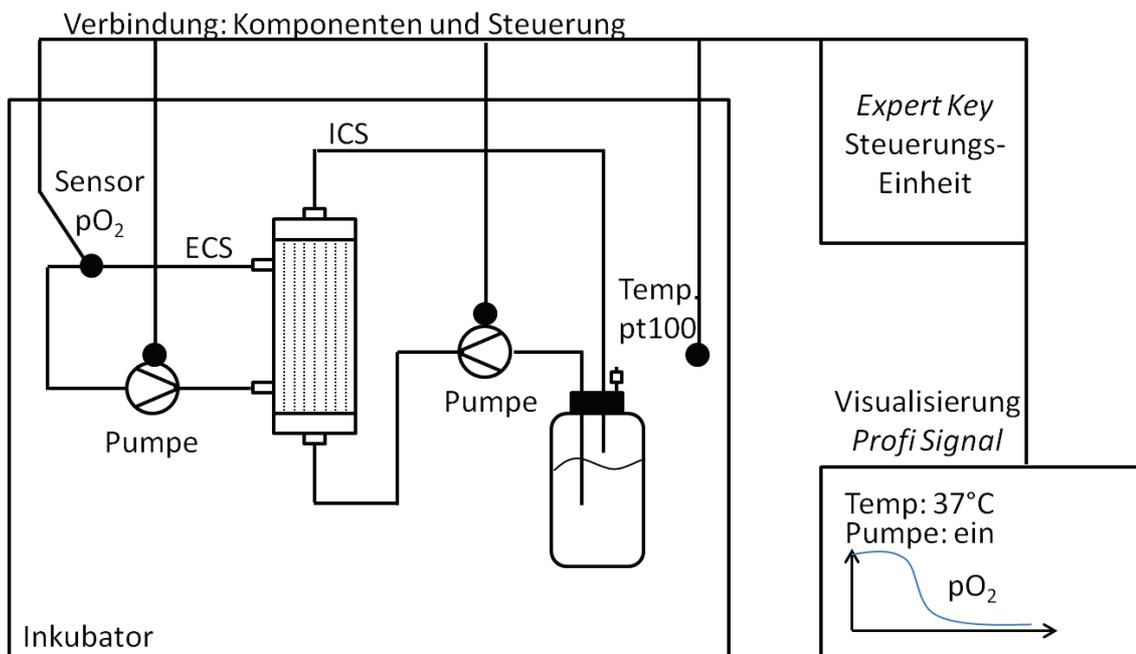


Abbildung 4-41: Schematischer Versuchsaufbau mit Einzelkomponenten und Einbindung über *Expert Key* und die Visualisierung über *Profi Signal*

In Abbildung 4-42 sind die Daten des Versuches zusammengefasst. An den kleinen Veränderungen in der Temperaturkurve sind die Zeitpunkte der Probennahme gut zu erkennen, da die Temperatur im Inkubator leicht abfällt, sobald die Tür des Inkubators geöffnet wird. Auch die zweimalige Veränderung der Inkubator-temperatur wird dokumentiert.

Die Kurve für den Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration zeigt zwei Ausschläge. An diesem Zeitpunkt wurde über die Software jeweils die Pumprichtung umgekehrt und

kurzfristig Luftblasen am Sensor vorbeigeführt. Die Daten für die optische Dichte der Kultur wurden manuell in die Software eingeben und konnten mit den übrigen Messdaten zu der hier gezeigten Visualisierung exportiert werden. Die Wachstumskurve steigt während der Kultivierung bis zu einem Wert von 1,8 (OD_{600}) an. Die Veränderung der Inkubatortemperatur und der Wechsel der Pumprichtung dienen der Funktionsüberprüfung des Versuchsaufbaus.

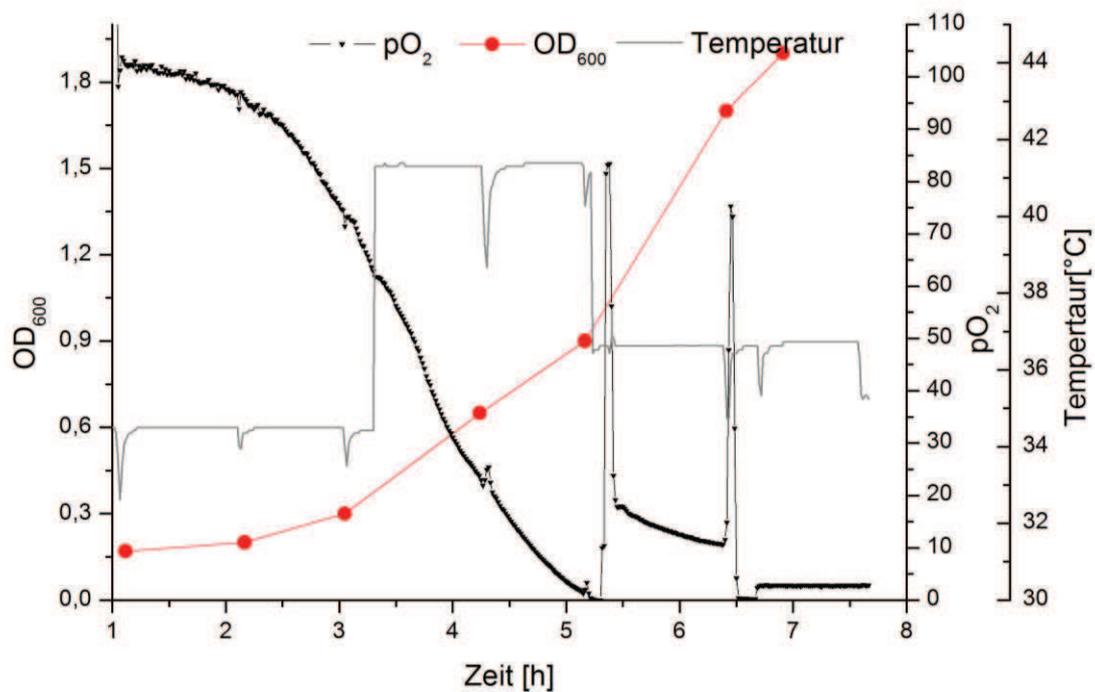


Abbildung 4-42: Verlauf der Messdaten der *E. coli* Kultivierung aus *Profi Signal*

Der hier gezeigte Aufbau vermittelt einen ersten Eindruck der Möglichkeiten, die sich mit der Nutzung des Systems ergeben. Das Zusammenführen von Messwerten verschiedener Geräte bei gleichzeitiger Visualisierung und Archivierung stellt eine deutliche Steigerung der Effektivität dar. Bisher wurde jedes Gerät, wenn überhaupt, einzeln erfasst und die Messdaten mussten manuell zusammengefügt werden. Für den parallelen Betrieb von mehreren Reaktorsystemen ist die Zusammenfassung der Komponenten aufgrund der immer größer werdenden Komplexität essentiell.

Die kontinuierliche Messdatenerfassung und deren Archivierung leisten einen wichtigen Beitrag zur Qualitätssicherung im Laboralltag, da alle Daten automatisch zentral gesichert werden. Eine lückenlose Dokumentation wird so möglich. Zusätzlich zu den automatisch aufgenommen Werten stellt die Möglichkeit Kommentare einzufügen,

wie beispielsweise Daten aus zusätzlichen Analysen (Zellzahl, Glukosekonzentration etc.) oder Störfälle eine weitere wertvolle Funktion dar.

In Zukunft ist es denkbar, dass die aufgenommenen Daten so prozessiert werden, dass über die Steuerung auch eine Regelung von Prozessparametern ermöglicht wird. Der pH-Wert könnte zum Beispiel überwacht und geregelt werden.

4.6 Evaluation neuer Fertigungstechniken für den Bau von Reaktorprototypen

Bei der Entwicklung von Bioreaktoren wird eine Vielzahl von Prototypen konstruiert und gebaut. Dieser Prozess ist zeit- und kostenintensiv, aber unverzichtbar, um möglichst früh in der Entwicklungsphase funktionale Muster testen zu können. Eine Möglichkeit diesen Prozess effizienter zu gestalten bietet der Einsatz von *Rapid Prototyping* (RPT) bzw. *Digital Direct Manufacturing* (DDM). Hinter diesen Ausdrücken verbirgt sich eine Vielzahl von Technologien, die man vereinfacht als „3D-Drucker“ bezeichnet und mit denen es möglich ist aus digitalen Modellen, die am Computer erzeugt wurden, dreidimensionale funktionale Werkstücke zu erzeugen.

In der Automobilindustrie ist RPT mittlerweile Standard (Bak 2003; Gordon und Bieman 1995) und selbst beim US Militär werden Ersatzteile vor Ort in Krisengebieten in mobilen RPT Werkstätten produziert.

Das RPT kann in zwei Teilschritte gegliedert werden:

- 1: Erzeugung der mathematischen Modellinformation am Computer
- 2: Erzeugung des physikalischen Modells im Drucker

Die Grundlagen des RPT und die gebräuchlichsten Verfahren werden im Folgenden erläutert. Zudem werden die Ergebnisse der ersten Tests von RPT Werkstücken beschrieben.

4.6.1 Modellerzeugung

Die Erstellung der digitalen Geometrieinformation für den Druck wird normalerweise über eine CAD Software vorgenommen. CAD steht für *computer aided design* und ist in der Erstellung von technischen Zeichnungen allgemein verbreitet (Jacobs 1992).

Es ist aber auch möglich Daten aus der Computer Tomografie (CT) oder Magnetresonanztomografie (MRT) zu verwenden sowie aus 3D-Laserscannern. In jedem Fall wird ein dreidimensionales Volumenmodell erzeugt.

Diesem Schritt schließt sich die Konvertierung in ein allgemein verständliches Dateiformat an, das von jedem 3D-Drucker interpretiert werden kann. Hier hat sich das sogenannte STL Format durchgesetzt. Dies ist von Stereolithografie abgeleitet. Dabei handelt es sich um eine der ersten RPT Techniken.

STL kann von jedem 3D-Drucker interpretiert werden. Vor der Umsetzung der digitalen Information in das physikalische Modell werden von der Druckersoftware allerdings noch Anpassungen vorgenommen. Dabei werden Hilfsgeometrien und Stützelemente erzeugt. STL eignet sich nicht für die erneute Bearbeitung in einer CAD Software, da die Datei lediglich Informationen zur Objektoberfläche enthält. Technische Informationen wie Gewindetypen und Toleranzen gehen verloren. Die Oberfläche wird mit Dreiecken dargestellt. Eine einfache Form wie ein Würfel kann mit 12 Dreiecken dargestellt werden, komplexere Formen erfordern entsprechend mehr. Dies bedeutet auch, dass die Dateien mit steigendem Detailgrad auch immer größer werden.

4.6.2 RPT Verfahren

Es existiert eine Vielzahl an Technologien für das RPT und diese entwickeln sich laufend weiter. Tabelle 4-9 fasst drei der gebräuchlichsten Verfahren zusammen. Die Verfahren werden als generative bzw. additive Verfahren bezeichnet. Verfahren wie Fräsen, Bohren oder Schleifen fallen unter die Kategorie subtraktive Verfahren.

Tabelle 4-9: Namen und Übersetzungen von RPT Technologien

Bezeichnung	eng.	Abk.
selektives Laser-Sintern	<i>Selective Laser Sintering</i>	SLS
Schmelzschichtung	<i>Fused Deposition Modelling</i>	FDM
Stereolithografie	<i>Stereolithography</i>	SLA/STL

SLS: *Selective Laser Sintering*

In diesem Verfahren wird das Werkstück aus einem Substratpulver (Metall/ Plastik) hergestellt. Ein Laser verschmilzt das Pulver zu einer Schicht. Die Schicht wird erneut mit Substratpulver überschichtet und der Vorgang wiederholt sich (Abbildung 4-43 A). SLS gehört zu den günstigeren RPT Verfahren. Die Substrate sind Plastik oder Metallpulver und nicht benötigtes Substrat kann einfach wiederverwendet werden. Die Genauigkeit wird in diesem Verfahren durch die Partikelgröße des Substrats bestimmt. Ein Vorteil von SLS ist, dass auf Stützmaterialien verzichtet werden kann, da das umgebende Substratpulver diese Funktion einnimmt. Je nach Material sind die Werkstücke thermisch und mechanisch belastbar. Das Werkstück hat immer eine poröse Struktur.

Um ein gas- oder wasserdichtes Objekt herzustellen muss das Werkstück nachbehandelt werden. Es ist zum Beispiel möglich mit Epoxidharzen zu infiltrieren.

FDM: Fused Deposition Modelling

FDM ähnelt prinzipiell konventionellen Tintenstrahldruckern (Abbildung 4-43 B). Das Material zur Erzeugung des Werkstücks wird in einer Düse bis zum Schmelzpunkt erhitzt und dann Schicht für Schicht aufgetragen. Auf diese selbe Art wird auch ein Stützmaterial aufgetragen, um überhängende Strukturen zu ermöglichen. Die Materialien sind drahtförmig und auf Spulen aufgezogen. Moderne Geräte können so mehrfarbige Objekte herstellen. Das Stützmaterial ist häufig wasserlöslich und wird im Anschluss an den Druck durch einen Waschvorgang entfernt.

Eine große Auswahl an Materialien wie Polycarbonat oder Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) für FDM sind verfügbar. Diese unterscheiden sich stark in ihren Eigenschaften (Schmelzpunkt, Elastizität, Festigkeit) und im Preis.

SLA: Stereolithography

Beim SLA wird ein Photopolymer (z.B. Epoxid- oder Acrylharz) mittels eines Lasers Schicht für Schicht zu einem Modell verhärtet (Abbildung 4-43 C). Mit diesem Verfahren ist es möglich sehr feine Strukturen zu erzeugen. Die Druckauflösung in X- und Y-Richtung wird durch die Fokussierung des Lasers bestimmt. Die Auflösung in Z-Richtung wird durch die Dicke der polymerisierten Schicht bestimmt. Moderne Systeme erreichen Auflösungen von 600 dpi (X-,Y-Richtung) bei Schichtdicken von 16 µm.

Es ist möglich Hohlräume herzustellen. Hier muss sichergestellt werden, dass Drainageöffnungen zum Abfließen des nicht ausgehärteten Polymers vorhanden sind.

SLA benötigt wie FDM Stützen. Diese müssen im Anschluss an die Herstellung entfernt werden. Die Werkstücke müssen häufig nach dem Druck durch Tempern verhärtet werden.

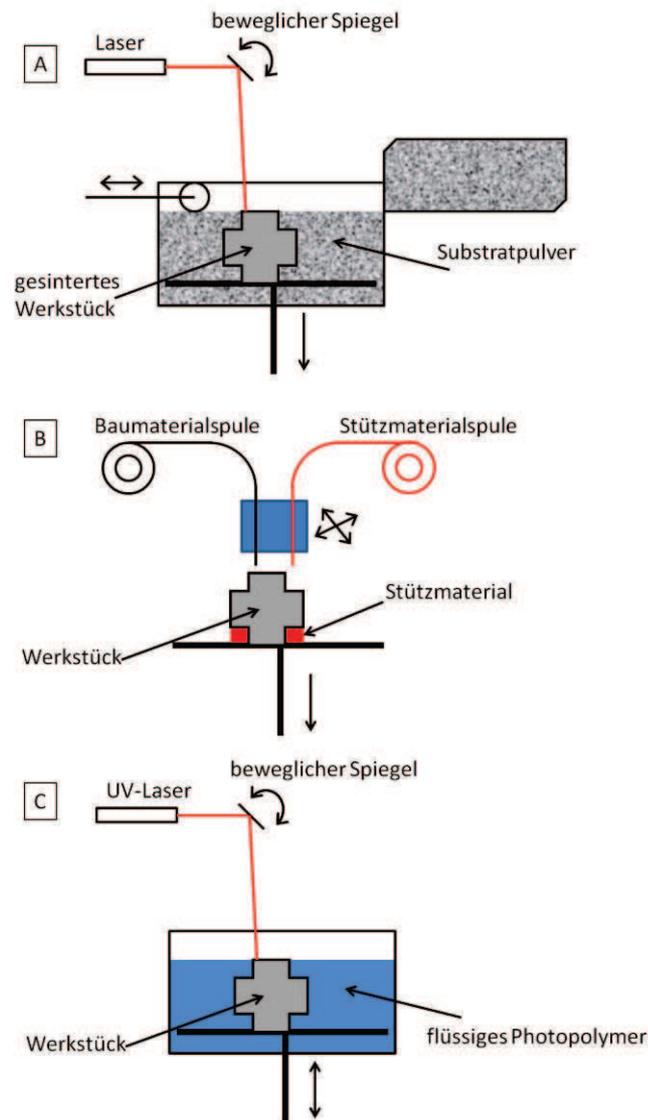


Abbildung 4-43: RPT Verfahren; A: SLS; B: FDM; C: STL

4.6.3 Testung von RPT Werkstücken

Wichtig für die Evaluation ist die funktionale Form des Werkstückes, die Möglichkeit das Objekt für sterile Anwendungen zu autoklavieren und die Beständigkeit gegenüber organischen Lösemitteln, beispielsweise für die Verwendung in Extraktionsprozessen. Die Modelle wurden in *Autodesk Inventor* (Autodesk Inc, USA) erstellt, in STL konvertiert und anschließend durch unterschiedliche Hersteller mit verschiedenen Verfahren und Materialien hergestellt.

Der Haltezyylinder für die tubulären Membranen aus dem Reaktorsystem wurde als erstes Werkstück ausgewählt, das mit RPT hergestellt und getestet werden sollte. Abbildung 4-44 zeigt die fünf Halterungen und die konventionell hergestellte Halterung aus Edelstahl (Feinmechanikwerkstatt TCI).

Die Werkstücke wurden gewogen, autoklaviert und mit Lösemittel (Isopropanol; Aceton) in Kontakt gebracht. Zudem wurden sie durch die Feinmechanikwerkstatt des TCI auf die Möglichkeit zur nachträglichen Bearbeitung hin evaluiert. Dies ist mit allen Materialien möglich, so dass im Nachhinein z.B. Gewinde in das Werkstück geschnitten werden können.

Die Werkstücke B, E und F entsprechen in ihrer Form dem funktionalen Haltezylinder. Bei Werkstück A sind die Löcher für die Membranen, aufgrund eines schlechten Detailgrades, nicht vorhanden. Für Werkstück C wurde eine andere Datei als Vorlage verwendet, die weniger detailreich war und dementsprechend grob ist hier das Druckergebnis.

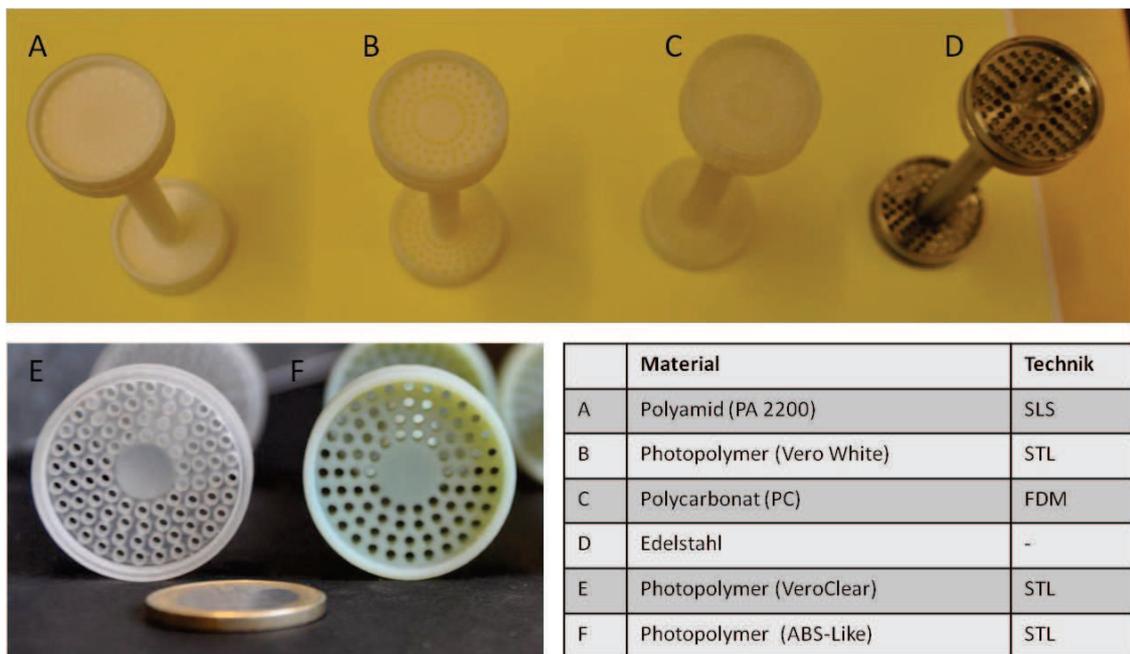


Abbildung 4-44: Bilder des Haltezylinders in unterschiedlichen Ausführungen

Alle hergestellten Objekte überstanden den Vorgang der Heißdampfsterilisation. Hier sei angemerkt, dass bei den Werkstücken B, E und F die Schmelztemperatur der Materialien unter 121°C liegt. Die Festigkeit während des Autoklavierens sinkt durch Aufweichen, Verformungen können die Folge sein.

Keines der Werkstücke hat die Behandlung mit Aceton überstanden. Eine Beständigkeit gegenüber Isopropanol zeigen die Werkstücke B, C und E.

Keiner der hergestellten Haltezyylinder wiegt mehr als 12 g. Das Gewicht des Edelstahlzylinders beträgt 75 g. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4-10 zu finden.

Tabelle 4-10: Übersicht der Testung des RPT Werkstücke

Werkstück	Autoklavierbarkeit	Gewicht [g]	Lösemittelbeständigkeit	
			Isopropanol	Aceton
A	ja	9,80	nein	nein
B	ja*	11,70	ja	nein
C	ja	11,27	ja	nein
D	ja	75,00	ja	ja
E	ja*	11,71	ja	nein
F	ja*	11,13	nein	nein

*mit Einschränkung

Es wurde zudem ein zweites Werkstück getestet. Dabei handelt es sich um einen modifizierten Deckel für einen Schüttelkolben (Abbildung 4-45). Dieser verfügt über 4 Luer-Lock-Anschlüsse. Über diese kann beispielsweise ein Septum zur Probennahme, Zuläufe für eine Nährlösung oder aber Säure bzw. Base für die pH-Regulierung angeschlossen werden. Es können auch Sterilfilter für eine Kopfraumbegasung verwendet werden.

Die Prototypen wurden aus *VeroClear*, *ABS-like* und *VeroWhite* hergestellt. Alle Modelle lieferten funktionale Luer-Lock-Anschlüsse. Die Wandstärke für den weiblichen Luer-Lock war allerdings zu dünn gewählt, so dass es hier zu ersten Brüchen kam. Das Gewinde im Deckel eignete sich zur Verbindung mit dem Schüttelkolben. Hier konnte allerdings ein Abrieb von Material nach mehrmaliger Verwendung festgestellt werden. Keines der Werkstücke überstand das Autoklavieren unbeschadet. Der Deckel aus *VeroWhite* brach komplett auseinander. Alle Deckel waren nach dem Autoklavieren deutlich weicher und verzogen sich beim Erkalten und dem damit verbundenen Aushärten.

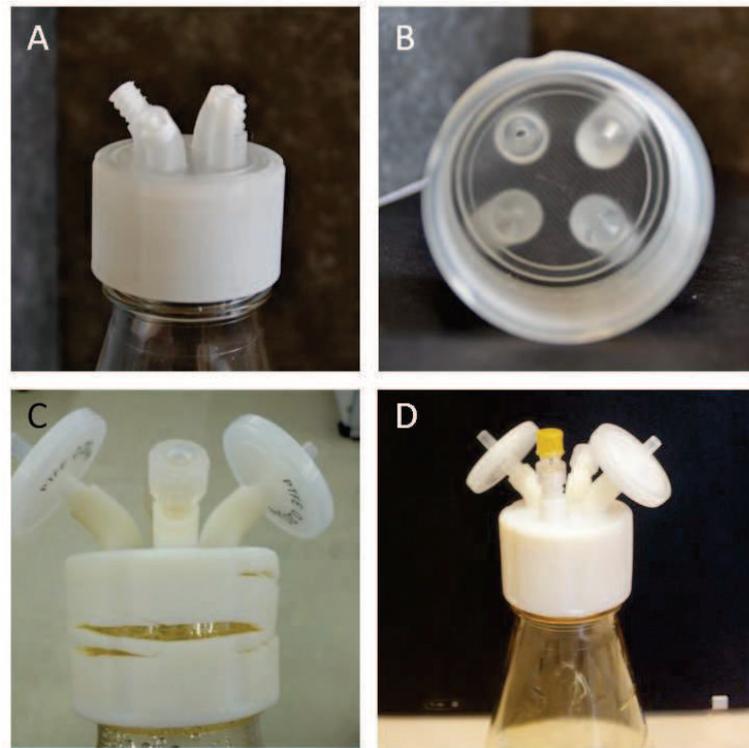


Abbildung 4-45: Schüttelkolbendeckel; A: Deckel aus *Veroclear* auf Kolben; B: Deckel Ansicht von unten; C: Deckel aus *VeroWhite* nach dem Autoklavieren; D: Deckel mit Septum und Luftfiltern auf Schüttelkolben

4.6.4 Kosten

Die Kosten für RPT Werkstücke schwanken stark. Bei Auftragsfertigung liegen die Preise je nach Material und Qualität zwischen 1 und 20 €/cm³ (*Shapeways*, Eindhoven, Stand 2012). Die gefertigte Membranhalterung hat ein Volumen von ca. 10 cm³. Bei spezialisierten Herstellern (*Alphacam*, Erlenwiesen) liegen die Kosten in der Regel höher (ca. 400 €). Bei der Herstellung einer Halterung durch die Feinmechanikwerkstatt des TCI wird mit ca. 100 € kalkuliert.

Bei Betrieb eines eigenen Druckers steht am Anfang die Entscheidung für eine der Fertigungstechniken und die Investition in das Gerät. FDM Drucker mit ABS-Plastik sind für etwa 8000 € erhältlich (z.B. *Hewlett Packard*, *Designjet*), professionelle FDM Drucker (z.B. *Stratasys*, *Fortus 400mc*) für funktionale Werkstücke kosten das zehnfache. Drucker für STL (z.B. *Objet*, *Connex 500*) sind meist noch teuer. Mittelklasse Modelle (*Stratasys*, *Elite*) kosten ca. 35.000 € oder lassen sich für ca. 700 €/Monat mieten.

Beim Betrieb eines eigenen Druckers entstehen Kosten für das Bau- und Stützmaterial. Für *VeroWhite* und *Veroclear* kann man z.B. mit 275 €/kg bzw. 295 €/kg rechnen. Dazu kommt das Stützmaterial mit 100 €/kg. Für die Entfernung des Stützmaterials oder die

nachträgliche Bearbeitung (Infiltration, Tempern) werden zusätzliche Gerätschaften benötigt.

Der Druck einer Membranhalterung und eines Deckels dauert auf einem Connex500 abhängig von Druckmodus, Orientierung der Werkstücke und Schichtdicke zwischen 2 und 21 Stunden. Die Bestellung eines Werkstückes bei einem Auftragsfertiger dauert in der Regel 1-2 Wochen.

4.6.5 RPT: Zusammenfassung und Ausblick

RPT ist ein vielversprechendes Verfahren für den Bau von funktionalen Bioreaktor-Prototypen und Werkstücken in der Biotechnologie. Es ist allerdings notwendig eine Kompetenz in Hinblick auf Materialien und Fertigungstechniken aufzubauen. Nicht alle Materialien werden allen Anforderungen gerecht und nicht alle Verfahren liefern befriedigende Ergebnisse.

Die Resultate der Testwerkstücke zeigen, wie unterschiedlich die Qualität der Ergebnisse aus verschiedenen Systemen sein kann. Eine uneingeschränkte Nutzung scheint mit keinem der Werkstücke möglich.

Nichtsdestotrotz hat das RPT ein großes Potential für die Herstellung von Prototypen. Die verfügbaren Materialien vervielfachen sich laufend. Einige Hersteller liefern bereits zertifizierte Materialien für die Verwendung im biomedizinischen Bereich.

Der Anspruch, der an das Reaktorsystem in Hinblick auf eine flexible Anpassung gestellt wird, ließe sich mit der Nutzung von RPT noch einfacher realisieren. Um Anzahl oder Anordnung der Bohrungen im Haltezylinder zu verändern, müsste lediglich die digitale Vorlage bearbeitet werden.

Bei einem weiteren Absinken der Preise für RPT ist es sogar denkbar ganze Reaktoren mit individuellen Anforderungen für den Einwegbrauch zu drucken. Ein wichtiger Punkt, der bei den bisherigen Tests unberücksichtigt blieb, ist die Verträglichkeit der Materialien mit Zellen. Dies muss vor einen Einsatz in Kultivierungen evaluiert werden.

4.7 Erkenntnisse aus den Arbeiten der Projektpartner

Parallel zu den hier präsentierten Arbeiten wurde an enzymatischen Anwendungen und an der hydrodynamischen Beschreibung von TMBR Systemen gearbeitet. Die Erkenntnisse dieser Arbeiten haben einen Einfluss auf den Ausblick dieser Dissertation und werden daher kurz zusammengefasst. Alternativ zu dem bereits vorgestellten Ansatz, die Strömung im ECS durch Leitbleche zu beeinflussen, wurden Sekundärströmungen im ICS induziert, um die Eigenschaften des Systems zu verbessern.

Normalerweise liegt im ICS eine laminare Strömung vor. Dies hat zur Folge, dass die Vermischung des Fluids im ICS diffusionsgetrieben erfolgt und dementsprechend langsam ist. Dieser Umstand wirkt sich negativ auf die Stofftransportleistungen aus.

Der Lösungsansatz, der von den Projektpartnern am IMS und ITB verfolgt wurde, sieht die Induktion von sekundären Strömungseffekten (Kopf et al. 2011) vor. Damit ist die Erzeugung turbulenter Strömung im ICS über Veränderung der Membrangeometrie gemeint. Dies führt zu einer besseren Vermischung im ICS und steigert so die Stofftransportleistungsfähigkeit. Dieses Konzept ist seit längerem in der Filtration bekannt (Mallubhotla und Belfort 1997; Gabelman und Hwang 1999) und sollte nun auf Bioreaktoren übertragen werden.

Die sekundären Strömungseffekte sollen in Form von *Dean Wirbeln* erzeugt werden. Dazu wird die Geometrie der Membran von linear zu helikal bzw. mäanderförmig verändert.

Dean Wirbel bilden sich in gewundenen Tuben aus. Die äußere Kurve ist länger als die innere. Die maximale Flussgeschwindigkeit ist dagegen im Zentrum lokalisiert. Dies führt dazu, dass sich das Fluid radial zur äußeren und tangential zur inneren Kurve bewegt. Es entstehen Wirbel und damit eine turbulente Strömung, die für eine konvektive Durchmischung im ICS sorgen.

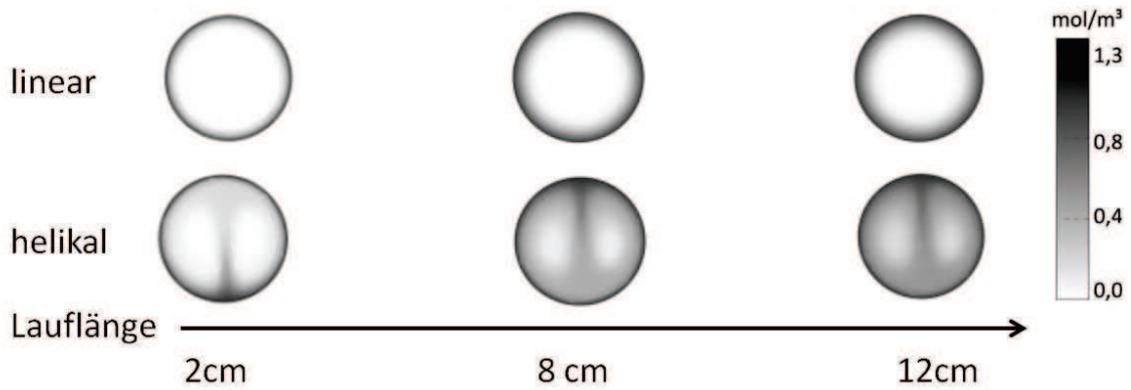


Abbildung 4-46: Vergleich des Sauerstoffeintrags in eine lineare und eine helikale Membran

Kaufhold konnte die verbesserte Leistungsfähigkeit von geometrisch veränderten Membranen anhand des Sauerstoffeintrags an einzelnen Tuben demonstrieren (Kaufhold et al. 2012). Eine Verbesserung um den Faktor 2,4 ist möglich. Numerische Simulationen des Phänomens wurden von Kopf durchgeführt. Die Abbildung 4-46 illustriert dies. Gezeigt wird der Sauerstoffeintrag aus der Gasphase über die Membran in die Flüssigphase über die Länge einer linearen und einer helikalen Membran. In der linearen Membran reichert sich der Sauerstoff lediglich in der Peripherie an, da eine Vermischung nur über Diffusion erfolgt. Ganz anders ist es in der helikalen Membran. Hier wird durch die turbulente Strömung kontinuierlich Sauerstoff aus der Peripherie in die Mitte transportiert.

Abbildung 4-47 zeigt den Prototypen einer helikalen keramischen Kapillare. Eine Herausforderung wird die Übertragung dieses Konzeptes auf einen Reaktor sein. Die bisherigen Messungen wurden alle an einzelnen Kapillaren durchgeführt.



Abbildung 4-47: Prototypen helikaler AC-K

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der Forschung ergeben sich immer wieder neue Fragestellungen, die individuelle Lösungsansätze verlangen. Systeme, die flexibel an wechselnde Bedürfnisse angepasst werden können, stellen daher wertvolle Werkzeuge dar. Ziel dieser Arbeiten war die Entwicklung und Testung eines Reaktorsystems mit tubulären Membranen. Dieses sollte weitestgehend flexibel konfiguriert werden können und für ein breites Anwendungsspektrum im Bereich der Kultivierung einsetzbar sein.

Am Anfang stand die Entwicklung des modularen Reaktorsystems. Dabei konnte auf die Erfahrung vorangegangener Arbeiten zurückgegriffen werden. Das Ergebnis ist ein System, bei dem die Integration der tubulären Membranen über ein separates Bauteil realisiert wird. Dieser Haltezylinder kann einfach an neue Membranen mit beliebigem Durchmesser, in variabler Anzahl und Anordnung angepasst werden. Außerdem sind alternative Geometrien, wie Helices oder mäanderförmige Membranen, denkbar.

Der Reaktor verfügt über drei Zugänge zum ECS. Dies ermöglicht verschiedene Betriebsführungen. Durch die Verwendung von Edelstahl kann der Reaktor einfach und schnell mittels Heißdampf autoklaviert werden. Sichtfenster aus Glas ermöglichen die Nutzung von faseroptischer Sensorik und die Versorgung photoautotropher Organismen mit Licht. Zwei Standardkonfigurationen des Systems mit jeweils 72 PES Hohlfasern bzw. 72 keramischen Kapillaren wurden für die weiteren Arbeiten ausgewählt.

Zudem wurde eine modifizierte Reaktorvariante mit Einbauten zur Veränderung der Hydrodynamik gebaut. Neuartige keramische Kapillaren wurden weitergehend charakterisiert, wobei eine erhöhte Oberfläche durch Mikrostrukturierung festgestellt wurde. Die Biokompatibilität des Materials wurde nachgewiesen und damit die Eignung des Materials für den Einsatz im Reaktor demonstriert.

Das System wurde zunächst reaktionstechnisch charakterisiert, indem für die unterschiedlichen Konfigurationen das Strömungsverhalten, das Verweilzeitverhalten, die Mischzeit, der Stofftransport über die Membran und der $k_L a$ -Wert nach einem zuvor festgelegten Schema bestimmt wurden. Hier zeigte sich, dass bei der modifizierten Variante, durch die Veränderung der Flüssigkeitsführung, deutliche Verbesserungen beim Stofftransport über die Membran und beim $k_L a$ -Wert erreicht wurden. Diese Veränderungen waren für die weitere praktische Anwendung zu aufwendig, aber sie demonstrieren das Optimierungspotenzial des Reaktorsystems.

Es wurden mehrere Anwendungen in dem System erprobt. Dabei wurden zunächst adhärenz Zellen (ucMSC) im ICS und ECS des entwickelten Reaktorsystems mit PES Hohlfasern und keramischen Kapillaren kultiviert. Es folgte die Kultivierung von eukaryotischen Suspensionszellen (SC-71). Als drittes Anwendungsbeispiel wurde die Kultivierung der Mikroalge *C.reinhardtii* gewählt. In diesem Versuch wurden die Membranbegasung und die Versorgung einer photoautotrophen Algenkultur mit Licht demonstriert. Bei der Kultivierung von filamentösen Pilzen traten in dem verwendeten Versuchsaufbau Schwierigkeiten mit der Stabilität der Sterilbarriere auf. Zur Lösung wurde eine alternative Betriebsweise des Reaktors diskutiert. Zudem wurde das System in der Aufarbeitung zur Extraktion eines Aromastoffes aus einer Fermentationsbrühe eingesetzt.

Das Reaktorsystem wurde in eine Mess- und Steuerungsumgebung integriert. Auf diese Weise gelang eine Zusammenfassung der Einzelkomponenten zu einem Gesamtsystem. Dies ist die Grundlage für eine erfolgreiche Parallelisierung des Reaktorsystems für zukünftige Anwendungen.

Für eine effizientere Reaktorentwicklung wurde die Nutzung von neuen Technologien für die Fertigung von Prototypen mittels *Rapid Prototyping* evaluiert. Diese Technologie kann die Anpassung des Reaktorsystems an wechselnde Anforderungen unterstützen. Modifikationen lassen sich so einfacher umsetzen und schneller testen. Über die eigentliche Fragestellung hinaus wurde die Nutzung von mit Lysozym funktionalisierten keramischen Kapillaren als enzymatischer Durchflussreaktor zum Zellaufschluss getestet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein funktionales und breit einsetzbares Reaktorsystem realisiert werden konnte. Die geforderte Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Anforderungen wird durch das modifizierbare Reaktordesign gewährleistet. Die aufgeführten Anwendungsbeispiele, die über den Bereich der Kultivierung hinausgehen, untermauern diesen Anspruch. Das System kann in Teilbereichen weiter optimiert werden und damit möglicherweise in Zukunft für weitere Anwendungen, wie die enzymatische Biokatalyse, eingesetzt werden. Interessant erscheint außerdem die Möglichkeit Co-Kultivierungen von zwei unterschiedlichen Organismen bzw. Zelltypen im Reaktorsystem zu erproben. Im ECS eines Reaktormoduls könnten beispielsweise CHO Zellen, die einen Wachstumsfaktor produzieren, kultiviert werden. In einem

weiteren Reaktor könnten im ECS Stammzellen wachsen. Die ICS beider Reaktoren werden verbunden, der Wachstumsfaktor vom ECS der CHO Zellen kann zum ECS der Stammzellen gelangen und dort wirken. Die prozessintegrierte Aufreinigung von Produkten sollte zudem weiter verfolgt werden. Der Einsatz von Protein A modifizierten Membranen für die gezielte Abtrennung von produzierten Antikörpern könnte getestet werden.

Die Steigerung der Leistungsfähigkeit in Bezug auf einen besseren Massentransport durch Veränderung der Membrangeometrie erscheint auf Basis der Arbeiten der Projektpartner vielversprechend. In Kombination mit den ECS Modifikationen, die in dieser Arbeit präsentiert wurden, können womöglich in Zukunft Prozesse realisiert werden, die besonders schnelle Stofftransportraten verlangen. Schnell wachsende Mikroorganismen oder enzymatische Oxidationen könnten so im System durchgeführt werden. Für die Integration von geometrisch angepassten Membranen in das Reaktorsystem könnte sich das RPT als wertvoll erweisen.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Strategien zur Immobilisierung von Zellen; A: Immobilisierung auf Oberflächen; B: Immobilisierung in einer porösen Matrix; C: Immobilisierung mittels einer Barriere	4
Abbildung 3-2: Grundtypen von Membranbioreaktoren; oben: Kombination vom Reaktor und Membraneinheit; unten: Membraneinheit integriert in Reaktor	5
Abbildung 3-3: Übersicht zu Filtrationsmembranen	7
Abbildung 3-4: A: symmetrische Membran (Kroll 2010); B: asymmetrische Membran (Giorono 2000)	8
Abbildung 3-5: Schematischer Aufbau eines TMBR	9
Abbildung 3-6: Typischer Aufbau eines TMBR Systems mit Reaktor und Mediumskreislauf.....	10
Abbildung 3-7: Darstellung verschiedener Betriebsmodi; A: axialer Fluss durch den ICS, ECS verschlossen, Stoffaustausch diffusionsgetrieben; B: ECS am Ende verschlossen und ICS offen, radialer konvektiver Fluss über die Membran, kontinuierliche Zufütterung von Medium in den ICS und Abzug aus dem ECS C: Fluss durch den offenen ICS bei ebenfalls geöffnetem ECS, Teil des Volumenstroms fließt konvektiv über die Membran, kontinuierliche Zufütterung von Medium in den ICS und Abzug aus dem ECS	12
Abbildung 4-1: Dual-Hohlfaserbioreaktor-System in zwei Ansichten (A;B)	24
Abbildung 4-2: Reaktorkonzept; links: Haltezyylinder im Reaktorgehäuse; mittig: Haltezyylinder Ansichten; rechts: Membranverklebung im Haltezyylinderkopf ...	25
Abbildung 4-3: Fotos des Haltezyinders; A: Haltezyylinder bestückt mit 72 keramischen Kapillaren; B: unbestückter Haltezyylinder; C: Nahaufnahme von Haltezyylinder mit Dichtungsring.....	26
Abbildung 4-4: Fotos vom Reaktorprototyp aus Plexiglas.....	26
Abbildung 4-5: A: Risse im Inneren des Reaktorgehäuse; B: Risse Zugang zum ECS	27
Abbildung 4-6: Endgültiges Reaktorsystem mit den einzelnen Komponenten und Peripherie.....	28
Abbildung 4-7: Darstellung des Herstellungsprozesses von keramischen Kapillaren	30
Abbildung 4-8: REM Aufnahme von zwei AC-K ; rechts: Vergrößerung des Bildausschnitts mit Defekt	32
Abbildung 4-9: Ergebnisse der CT Messung; A und B: Volumenmodell der AC-K; C: Querschnitt der Kapillare von der Seite; D: Querschnitt der Kapillare von oben; E: Histogramm der Wandstärke	34
Abbildung 4-10: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von DAPI gefärbten Zellen; A: ucMSC Zellen auf AC-K; B: adMSC Zellen auf AC-K; C: ucMSC Zellen auf PES Hohlfaser; D: adMSC Zellen auf PES Hohlfaser; E: ucMSC Zellen auf PES Hohlfaserquerschnitt; F: adMSC Zellen auf AC-K Querschnitt	37

Abbildung 4-11: REM Aufnahmen von AC-K Oberfläche; A: komplett besiedelt; B: teilweise besiedelt; C: unbesiedelt; D: Vergrößerung des Übergangs von besiedelt zu unbesiedelt	38
Abbildung 4-12: Akkumulierter Glukoseverbrauch und Laktatproduktion von adMSC und ucMSC Zellen.....	39
Abbildung 4-13: Ergebnisse der MTT Tests; A: ucMSC Zellen auf AC-K; B: ucMSC Zellen auf PES Hohlfasern; C: adMSC Zellen auf AC-K; D: adMSC Zellen auf PES Hohlfasern	40
Abbildung 4-14: Kulturplatte mit Membranen nach MTT Test mit Formazan-Kristallen auf der Oberfläche	41
Abbildung 4-15: Schematische Darstellung der Flüssigkeitsführung im modifizierten Reaktor	43
Abbildung 4-16: A,B,C: modifizierter Reaktor mit Einbauten aus unterschiedlichen Perspektiven.....	44
Abbildung 4-17: Versuchsaufbau der Verweilzeitbestimmung im ECS	47
Abbildung 4-18: Verweilzeitverhalten der Reaktoren; A: Reaktor mit 72 AC-K; B: modifizierter Reaktor mit 72 PES Hohlfasern und Einbauten; C: Verweilzeitdichtefunktion des Reaktors mit 72 AC-K bei 10 ml/min; D: Verweilzeitdichtefunktion des modifizierten Reaktors mit 72 PES Hohlfasern bei 10 ml/min	48
Abbildung 4-19: Vergleichende Bilderserie zum Verweilzeitverhalten; oben: Reaktor mit 72 AC-K; unten: modifizierter Reaktor mit 72 PES Hohlfasern.....	48
Abbildung 4-20: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Mischzeit	50
Abbildung 4-21: Mischzeitkurve für einen Reaktor mit 72 PES Hohlfasern bei 20 ml/min.....	50
Abbildung 4-22: Versuchsaufbau vom Stoffübergang.....	52
Abbildung 4-23: Verlauf der Sauerstoffkonzentration im ECS während der k_{La} -Wert Bestimmung	54
Abbildung 4-24: Versuchsaufbau der Kultivierung von ucMSC; A: Aufbau für die Kultivierung der Zellen im ECS; B: Aufbau der Kultivierung der Zellen im ICS ...	57
Abbildung 4-25: Verlauf von akkumuliertem Glukoseverbrauch und Laktatkonzentration; A: Reaktor mit 72 AC-K und ucMSC Zellen im ECS; B: Reaktor mit 72 AC-K und ucMSC Zellen im ICS; C: Reaktor mit 72 PES Hohlfasern und ucMSC Zellen im ECS; D: Reaktor mit 72 PES Hohlfasern und ucMSC Zellen im ICS; die roten Pfeile markieren den Zeitpunkt der Medienwechsel	58
Abbildung 4-26: Aufnahmen mit Fluoreszenzmikroskop; A: AC-K Oberfläche mit ucMSC; B: AC-K Eingang mit ucMSC; C: Silikonkleber im ECS vom AC-K Reaktor mit ucMSC; AC-K Eingang mit ucMSC.....	59
Abbildung 4-27: Aufnahmen mit Fluoreszenzmikroskop; A: PES Hohlfaseroberfläche mit ucMSC; B: PES Hohlfasereingang mit ucMSC; C: PES Hohlfaseroberfläche mit ucMSC; D: PES Hohlfasereingang mit ucMSC	60
Abbildung 4-28: Bioreaktorsystem im CO ₂ -Inkubator; A: Reaktor mit 72 PES Hohlfasern; B: Reaktor mit 72 AC-K; C: Mediumsreservoir	62

Abbildung 4-29: Verlauf von Glukoseverbrauch, Laktatkonzentration und Zellzahl der Kultivierung von SC-71 in A: Reaktor mit 72 AC-K und B: Reaktor mit 72 PES Hohlfasern	63
Abbildung 4-30: Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration im ECS des Reaktors mit 72 AC-K.....	64
Abbildung 4-31: Versuchsaufbau der Kultivierung von <i>C.reinhardtii</i>	66
Abbildung 4-32: Aufbau der Kultivierung; A: Bioreaktor vor Halogenleuchte, B: Waschflasche zur Befeuchtung des Gasstroms, C: Durchflussmassenregler, D. Thermometer; rechtes Bild: Nahaufnahme Bioreaktor mit grüner Algensuspension	66
Abbildung 4-33:Verlauf der optischen Dichte der Algenkultur im Reaktor und der Temperatur	67
Abbildung 4-34: <i>P.sapidus</i> ; A: Biomasse auf AC-K; B: Biomasse auf PES Hohlfasern; C: Biomasse die aus dem ICS herauswächst	69
Abbildung 4-35 Schema für alternative Betriebsweise des Reaktorsystems	70
Abbildung 4-36: Schematischer Aufbau der Extraktion	71
Abbildung 4-37: Versuchsaufbau der Extraktion von Phloretin aus dem Fermenter	72
Abbildung: 4-38: Versuchsaufbau und Funktionsprinzip der lytischen Kapillaren.....	73
Abbildung 4-39: Schema der Oberflächenmodifikation	74
Abbildung 4-40: A: <i>Expert Key Box</i> in spritzwassergeschütztem Gehäuse; B: Versuchsaufbau im Inkubator	76
Abbildung 4-41: Schematischer Versuchsaufbau mit Einzelkomponenten und Einbindung über <i>Expert Key</i> und die Visualisierung über <i>Profi Signal</i>	76
Abbildung 4-42:Verlauf der Messdaten der <i>E. coli</i> Kultivierung aus <i>Profi Signal</i>	77
Abbildung 4-43: RPT Verfahren; A: SLS; B: FDM; C:STL	82
Abbildung 4-44:Bilder des Haltezyinders in unterschiedlichen Ausführungen	83
Abbildung 4-45: Schüttelkolbendeckel; A: Deckel aus <i>VeroClear</i> auf Kolben; B: Deckel Ansicht von unten; C: Deckel aus <i>VeroWhite</i> nach dem Autoklavieren; D: Deckel mit Septum und Luftfiltern auf Schüttelkolben	85
Abbildung 4-46: Vergleich des Sauerstoffeintrags in eine lineare und eine helikale Membran.....	88
Abbildung 4-47: Prototypen helikaler AC-K.....	88
Abbildung 6-1: Versuchsaufbau der Verweilzeitbestimmung	99
Abbildung 6-2: Versuchsaufbau zur Bestimmung des Stoffübergangs	101
Abbildung 6-3: Explosionszeichnung des entwickelten TMBR	103
Abbildung 6-4: TMBR in der Seitenansicht mit integriertem Membranhaltezyinder .	103
Abbildung 6-5: Membranhaltezyinder für den TMBR	104
Abbildung 6-6: CAD Zeichnung des Membranhaltezyinders für RPT	105
Abbildung 6-7: CAD Zeichnung des modifizierten Schüttelkolbendeckels für RPT.....	105

6.2 Verwendete Chemikalien und Materialien

6.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von Sigma Aldrich bezogen.

Acetat

Ammoniumchlorid

Ammoniumsulfat

Calciumchlorid

DAPI

Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe

Dikaliumhydrogenphosphat

Essigsäure

Ethanol

Glukose

Hefeextract

Isopropanol

Kaliumdihydrogenphosphat

Kalziumchlorid

Magnesiumsulfat

Malzextrakt

Methylenblau

MTT

Natriumchlorid

Natriumdihydrogenphosphat

Natronlauge

Phenolrot

Salzsäure

Sojapepton

Sojaprotein

Tris

Trypton

6.2.2 Materialien

24-Well Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht
6-Well Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht
Durchflussküvette	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Einmalhandschuhe Latex	Semperguard, Semperit AG Holding, Wien
Einmalküvetten	Ratiolab, Dreieich-Buschlag
Einmalpipetten	Corning inc., Corning, New York
Einmalspritzen	Chriana-Preme Deutschland, Aachen
optische Sauerstoffsensoren	Presens GmbH, Regensburg
PES Hohlfasern	Membrana, Wuppertahl
Pipettenspitzen (versch.)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Pumpenschläuche	VWR, Darmstadt
Reagiergefäße (versch.)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Schläuche (Silikon)	VWR, Darmstadt
Silikonkleber Elastosil RT 601	Wacker Silicone, Ottobrunn
Skalpelle	Braun Aesculap AG & CO KG, Tuttlingen
Sterilfilter Minisart 2000	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturflaschen (T 75, T 175)	Sarstedt AG, Nümbrecht

6.3 Lösungen

6.3.1 Medien

6.3.2 Kultivierungsmedium für ucMSC und adMSC

α -MEM

10,08 g α -MEM Pulver und 2,2 g Natriumbicarbonat gelöst in 1 l Wasser, sterilfiltriert

6.3.3 Kultivierungsmedium für Hybridomzellen SC-71

DMEM

DMEM Pulver und 3,7 g Natriumbicarbonat in 1 l Wasser, sterilfiltriert

6.3.4 Kultivierungsmedium *C.reinhardtii*

TAP

TAP Salzlösung: 15 g NH_4Cl , 4 g $\text{MgSO}_4(6\text{H}_2\text{O})$, 2 g $\text{CaCl}(2 \text{H}_2\text{O})$ gelöst in 1 l Wasser

Phosphat Lösung: 28,8 g K_2HPO_4 , 14,4 g KH_2HPO_4 gelöst in 1 l Wasser

Spurenelemente: Hutner Lösung (Kropat et al. 2011)

TAP Medium: 2,42 g Tris, 25 ml TAP Salzlösung, 0,375 ml Phosphatlösung, 1 ml Spurenelemente, 1 ml Essigsäure aufgefüllt auf 1 l mit Wasser

6.3.5 Kultivierungsmedium für *P.sapidus*

DSMZ Medium 90

30 g Malzextrakt, 3 g Sojapepton, 20 g Glukose gelöst in 1 l Wasser

6.3.6 Kultivierungsmedium für *E.coli*

LB (Bertani 1951)

5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 5 g NaCl gelöst in 1 l Wasser

6.4 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Analysator	YSI 2700 Select	YSI Incorporated, Ohio, USA
Computer Tomograph	nanoCT	GE Healthcare, Solingen
Feinwaage	MC 1	Sartorius AG, Göttingen
Inkubator	Hera Cell 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inkubator	Certomat BS-I	Sartorius AG, Göttingen
Mikroskop	IX 50	Olympus, Hamburg
Mikroskop Kamera	Camedia C-4040	Olympus, Hamburg
Peristaltikpumpe	IPC-4	Ismatec, Wertheim
Plattenlesegerät	Model 680	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rasterelektronenmikroskop	JSM-6700F	JEOL GmbH, München
Sauerstoffsensor	Oxy-4	Presens GmbH, Regensburg
Sauerstoffsensor	Fibox	Presens GmbH, Regensburg
Spectrophotometer	Cary50 Scan	Varian Inc., Palo Alto, USA
Sterilbank	Technoflow 2F150.II GS	Integra Biosciences AG, Zürich, Schweiz
Wasseraufbereitungsanlage	Arium 611	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	WNB	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach
Zellzähler	TC-10	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifuge	Biofuge pico	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

6.5 Methoden

6.5.1 Reaktorcharakterisierung

6.5.1.1 Verweilzeit

Für die Bestimmung der Verweilzeit wird der Versuchsaufbau, wie in Abbildung 6-1 dargestellt, verwendet. Von einem Vorratsgefäß wird der Volumenstrom bei unterschiedlichen Flussraten durch den ECS geführt. Ein Dirac-Stoß mit dem Spurstoff Methylenblau wird am ECS Eingang injiziert und das Antwortsignal über eine Durchflussküvette in einem Spektrophotometer bei 660 nm aufgezeichnet.

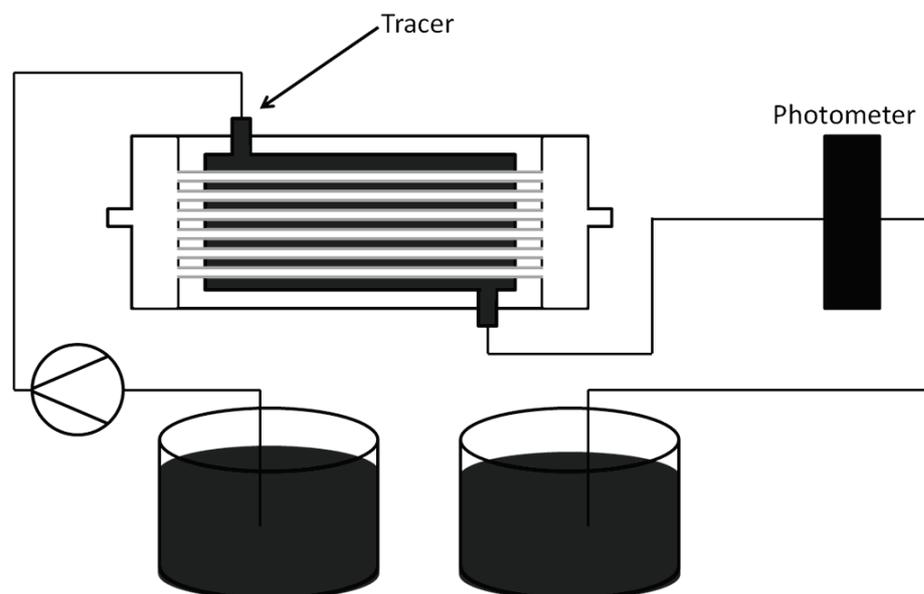


Abbildung 6-1: Versuchsaufbau der Verweilzeitbestimmung

Das Verweilzeitverhalten gibt Aufschluss über die Aufenthaltsdauer von Teilchen im Reaktionsraum. Die mittlere Verweilzeit τ wird aus dem Reaktorvolumen (V_R) und dem Volumenstrom (\dot{V}) bestimmt.

$$\tau = \frac{V_R}{\dot{V}} \quad (3)$$

Der Wert für τ gibt damit den Mittelwert der Verweilzeit aller Teilchen, die den Reaktor durchströmt haben, an. Sie gibt keinen Aufschluss darüber wie stark die Streuung um diesen Mittelwert aussieht.

Das Spektrum der Verweilzeitverteilung wird durch die Verweilzeitdichtefunktion $E(t)$ beschrieben.

Die Verweilzeitsummenfunktion $F(t)$ beschreibt den Anteil an Teilchen, die zu einem definierten Zeitpunkt t_1 den Reaktor verlassen haben. Bedingung für diese Annahme ist, dass alle Teilchen zum Zeitpunkt $t=0$ in den Reaktor eingetreten sind.

Für den Vergleich von verschiedenen Reaktoren können $E(t)$ und $F(t)$ normiert werden. Dazu wird die dimensionslose Kennzahl θ eingeführt.

θ wird wie folgt berechnet:

$$\theta = \frac{t}{\tau} \quad (4)$$

6.5.1.2 Momentmethode

Bei der Aufnahme des Verweilzeitverhaltens mittels Dirac-Stoß entspricht die Antwortfunktion $E(t)$. Durch Anwendung der Momentmethode kann die mittlere Verweilzeit \bar{t} und die Varianz σ_t^2 aus den experimentellen Daten ermittelt werden.

Allgemein gilt für das k . Moment:

$$\mu_k = \int_{-\infty}^{\infty} t^k E(t) dt \quad (5)$$

Aus dem 0. Moment kann $F(t)$ und aus dem 1. Moment die mittlere Verweilzeit \bar{t} wie folgt berechnet werden:

$$\bar{t} = \mu_1 = \int_{t=0}^{\infty} t E(t) dt \quad (6)$$

Die Varianz σ_t^2 ergibt sich aus dem 3. Moment:

$$\sigma_t^2 = \mu_2 = \int_{t=0}^{\infty} (t - \bar{t})^2 E(t) dt \quad (7)$$

Hohe Werte für σ_t^2 legen ein rührkesselähnliches Verhalten des Reaktors nahe, während niedrige Werte für σ_t^2 dem Verhalten nach für ein Strömungsrohr sprechen.

6.5.1.3 Mischzeitbestimmung

Für die Bestimmung der Mischzeit wird der ECS des Reaktorsystems mit Wasser gefüllt und bei unterschiedlichen Flussraten im Kreislauf geführt. In den Kreislauf wird eine Durchflussküvette in einem Spektrophotometer integriert. In den ECS wird Methylenblau als Spurstoff in einem Dirac-Stoß aufgegeben. Das Antwortsignal wird mit dem Photometer (660 nm) aufgenommen.

6.5.1.4 Stoffübergang

Die Messungen zum Stoffübergang vom ICS in den ECS wurden, wie im Versuchsaufbau in Abbildung 6-2 dargestellt, durchgeführt. Das Volumen des ICS wird durch ein Ausgleichsgefäß an das Volumen des ECS angepasst. Durch beide Räume wird Wasser bei verschiedenen Flussraten zirkuliert. In den ECS Kreislauf ist eine Durchflussküvette in einem Spektrophotometer integriert. In den ICS Kreislauf wird Methylenblau als Spurstoff injiziert. Der Spurstoff diffundiert vom ICS in den ECS und dieser Stofftransport kann über die Küvette (660 nm) im ECS aufgezeichnet werden.

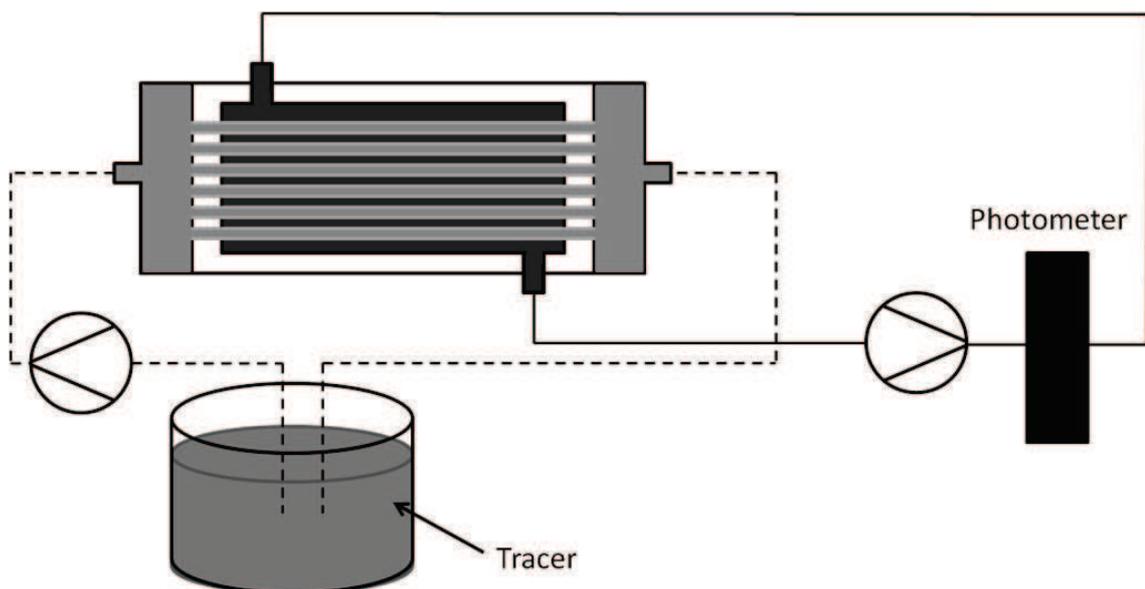


Abbildung 6-2: Versuchsaufbau zur Bestimmung des Stoffübergangs

6.5.1.5 k_{La} Wertbestimmung

Für die Bestimmung des k_{La} Wertes wurde die Sauerstoffkonzentration im ECS mit einem faseroptischen Sauerstoffsensoren verfolgt. Der ECS wurde zuvor mit 1-2 %iger Natriumsulfitlösung gefüllt und mit 10 ml/min umgewälzt. Durch den ICS wird Wasser mit demselben Volumen des ECS zirkuliert (10 ml/min). In den ICS Kreislauf ist ein Ausgleichsgefäß mit Sterilfilter zur Sauerstoffversorgung integriert. Aus dem Verlauf der Sauerstoffkonzentration im ECS wird der k_{La} Wert berechnet.

6.5.2 DAPI Färbung

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) können AT-reiche Regionen der DNA von Zellen angefärbt werden. Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei 358 nm. Die Emission der Fluoreszenz liegt bei 461 nm. Die Zellen werden vor der Färbung mit Ethanol (-20°C) fixiert, mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen erfolgt mit DAPI Färbelösung für 15 min bei 37 °C. Vor der Betrachtung der Zellen im Mikroskop werden die Membranen mit PBS gewaschen.

6.5.3 MTT Test

Der MTT Test dient der Bestimmung der Zellviabilität. Auf die besiedelten Membranen wurde 27,5 µl MTT und 247,5 µl Medium gegeben. Diese wurden für 4 Stunden bei 37°C im Inkubator inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden 300 µl SDS zugegeben. Die Platten wurden weiter über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben in Dreifachbestimmung mit einem Plattenlesegerät vermessen.

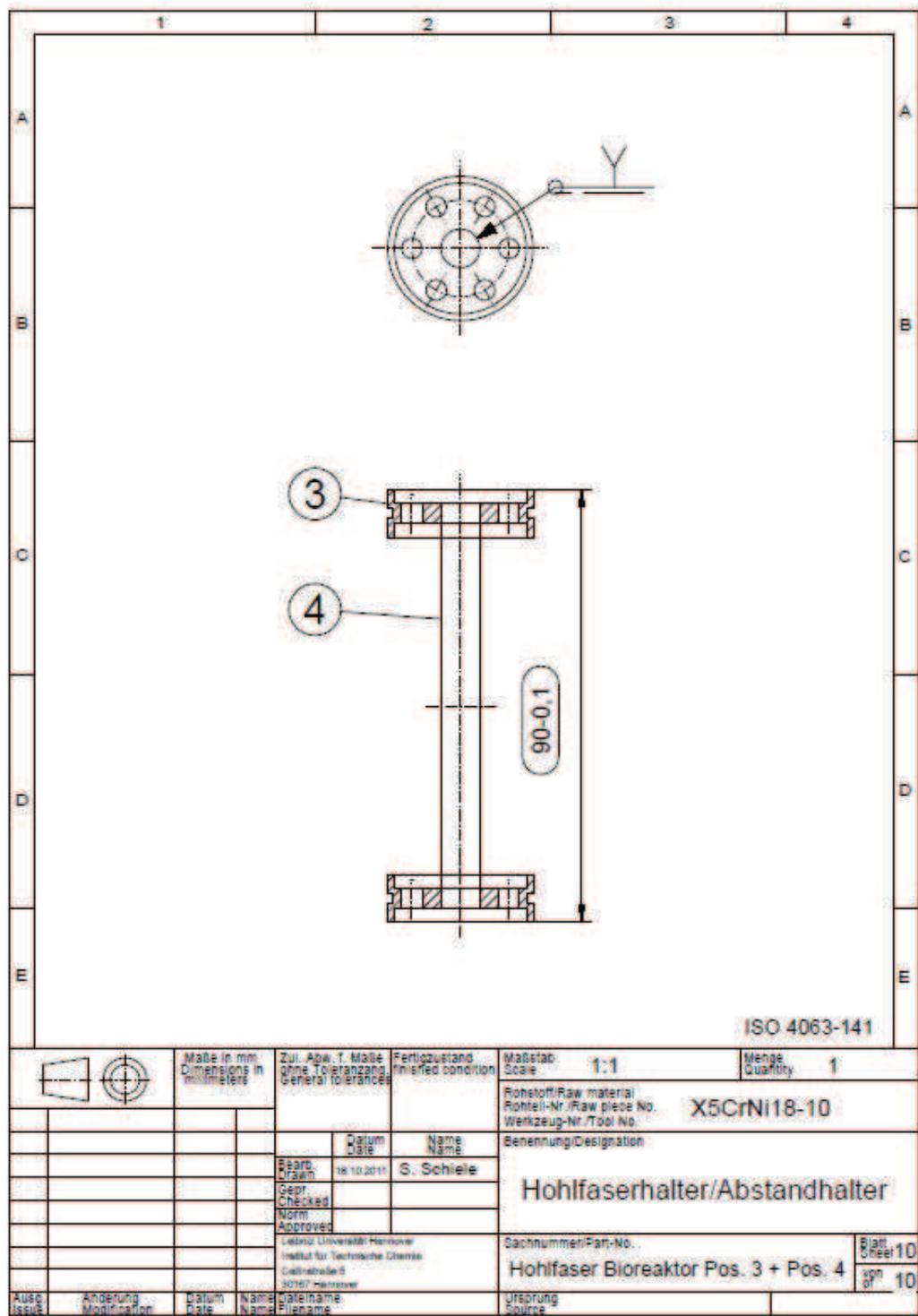


Abbildung 6-5: Membranhaltezyylinder für den TMBR

6.7 Abkürzungen

μ	mikro
AC-K	<i>Advanced Ceramics</i> Kapillare
adMSC	<i>adipose derived Mesenchymal stemcell</i>
BET	Brunauer, Emmet, Teller
bzw.	beziehungsweise
<i>C.reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
ca.	circa
CAD	<i>Computer aided Design</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECS	Extrakapillarraum
Em	Emissionswellenlänge
Ex	Exzitationswellenlänge
FDM	<i>Fused Deposition Modelling</i>
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HS	Humanserum
ICS	Intrakapillarraum
k	kilo
Kap.	Kapitel
l	Liter
LED	Leuchtdiode
m	milli
MBR	Membranbioreaktor
MF	Mikrofiltration
min	Minute(n)
NF	Nanofiltration
OD	optische Dichte
<i>P.sapidus</i>	<i>Pleurotus sapidus</i>

PA	Polyamid
PC	Polycarbonat
PES	Polyethersulfon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Re	Reynoldszahl
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RPT	Rapid Prototyping
s	Sekunde(n)
SLA	Stereolithography
SLS	<i>Selective Laser Sintering</i>
Tab.	Tabelle
TMBR	Tubularmembran Bioreaktor
ucMSC	<i>umbilical cord mesenchymal stemcell</i>
UF	Ultrafiltration
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- Altshuler**, G. L.; **Dziewulski**, D. M.; **Sowek**, J. A.; **Belfort**, G. (1986): Continuous hybridoma growth and monoclonal antibody production in hollow fiber reactors-separators. In: *Biotechnol. Bioeng* 28 (5), S. 646–658
- Bak**, D. (2003): Rapid prototyping or rapid production? 3D printing processes move industry towards the latter. In: *Assembly Automation*, Vol. 23 (4), S. 340-345
- Banik**, G. G.; **Heath**, C. A. (1995): Partial and total cell retention in a filtration-based homogeneous perfusion reactor. In: *Biotechnol. Prog* 11 (5), S. 584–588
- Belfort**, G. (1989): Membranes and bioreactors: a technical challenge in biotechnology. In: *Biotechnol. Bioeng* 33 (8), S. 1047–1066
- Bertani**, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* 62, S. 293-300
- Bilello**, J. A.; **Bauer**, G.; **Dudley**, M. N.; **Cole**, G. A.; **Drusano**, G. L. (1994): Effect of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine in an in vitro hollow-fiber pharmacodynamic model system correlates with results of dose-ranging clinical studies. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* (38), S. 1386-1391
- Cadwell**, J. J. S. (1997): New Developments in Hollow-Fiber Cell Culture. In: *Methods Mol. Biol* 75, S. 77–89
- Cadwell**, J. J. S. (2009): In Vitro Toxicology and Hollow Fiber Bioreactors, <http://www.fibercellsystems.com/documents/In%20vitro%20Toxicology%20and%20Hollow%20Fiber%20Bioreactors.pdf>, abgerufen am 20.11.2009
- Chang**, Y.-W.; **Wu**, C.-C.; **Chang**, K.-P.; **Yu**, J.-S.; **Chang**, Y.-C.; **Liao**, P.-C. (2009): Cell Secretome Analysis Using Hollow Fiber Culture System Leads to the Discovery of CLIC1 Protein as a Novel Plasma Marker for Nasopharyngeal Carcinoma. In: *J. Proteome Res* 8 (12), S. 5465–5474
- Chu**, L.; **Robinson**, D. K. (2001): Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. In: *Current Opinion in Biotechnology* 12, S. 180-187
- Chung**, B. H.; **Chang**, H. N. (1988): Aerobic fungal cell immobilization in a dual hollow-fiber bioreactor: Continuous production of a citric acid. In: *Biotechnol. Bioeng* 32 (2), S. 205–212

- Cruz, H. J.; Freitas, C. M.; Alves, P.M; Moreira, J. L.; Carrondo, M. J. T. (2000):** Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells. In: *Enzyme and Microbial Technology* 27 (1-2), S. 43–52
- Dunn-Coleman, N. S.; Bloebaum, P.; Berka, R. M.; Bodie, E.; Robinson, N.; Armstrong, G. et al. (1991):** Commercial Levels of Chymosin Production by *Aspergillus*. In: *Nature Biotechnology* 9, S. 976-981
- Endres, C. (2010):** Evaluation, characterization and development of innovative reactor systems in biotechnology (Dissertation)
- Gabelman, A.; Hwang, S.-T. (1999):** Hollow fiber membrane contactors. In: *Journal of Membrane Science* 159, S. 61-106
- Giorno, L.; Drioli, E. (2000):** Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. In: *Trends in Biotechnology* 18 (8), S. 339–349
- Gordon, V.S; Bieman, J.M (1995):** Rapid prototyping: lessons learned. In: *IEEE Software* 12 (1), S. 85-95
- Grünert, P. (2012):** Entwicklung eines Bioprozesses zur Flavonoid Transformation (Masterarbeit)
- Haar, K. von der (2011):** Charakterisierung eines modularen Hohlfaserreaktors (Bachelorarbeit)
- Handa-Corrigan, A.; Nikolay, S.; Jeffery, D.; Heffernan, B.; Young, A. (1992):** Controlling and predicting monoclonal antibody production in hollow-fiber bioreactors. In: *Enzyme and Microbial Technology* 14 (1), S. 58–63
- Hassell, T.; Gleave, S.; Butler, M. (1991):** Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. In: *Appl. Biochem. Biotechnol* 30 (1), S. 29–41
- Inloes, D. S.; Smith, W. J.; Taylor, D. P.; Cohen, S. N.; Michaels, A. S.; Robertson, C. R. (1983a):** Hollow-fiber membrane bioreactors using immobilized *E. coli* for protein synthesis. In: *Biotechnol. Bioeng* 25 (11), S. 2653–2681
- Inloes, D. S.; Taylor, D. P.; Cohen, S. N.; Michaels, A. S.; Robertson, C. R. (1983b):** Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in Hollow-Fiber Membrane Bioreactors. In: *Appl. Environ. Microbiol* 46 (1), S. 264–278
- Jacobs, P. F., (1992):** Fundamentals of Stereo Lithography. (5), CASA/SME, USA
- Jose, W.; Pedersen, H.; Chin, C.-K. (1983):** Immobilization of Plant Cells in a Hollow-Fiber Reactor. In: *Ann NY Acad Sci* 413 (1 Biochemical E), S. 409–412

- Kaufhold, D.;** Kopf, F.; Wolff, C.; Beutel, S.; Hilterhaus, L.; Hoffmann, M. et al. (2012): Generation of Dean vortices and enhancement of oxygen transfer rates in membrane contactors for different hollow fiber geometries. In: *Journal of Membrane Science*, S. 342-347
- Köhler, G.;** Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* 256 (5517), S. 495–497
- Kopf, F.;** Schlüter, M.; Kaufhold, D.; Hilterhaus, L.; Liese, A.; Wolff, C. et al. (2011): Laminares Mischen in Miniatur-Hohlfasermembranreaktoren durch Ausnutzung von Sekundärströmungen (Teil 1). In: *Chemie Ingenieur Technik* 83 (7), S. 1066–1073
- Kretzmer, G.;** Schügerl, K. (1991): Response of mammalian cells to shear stress. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 34 (5), S. 613–616
- Kroll, S.** (2008): Entwicklung eines Mikro-Hohlfaserreaktors zur Anwendung in den Bereichen Kultivierung und Downstream Processing (Dissertation)
- Kroll, S.;** Brandes, C.; Wehling, J.; Treccani, L.; Grathwohl, G.; Rezwan, K. (2012): Highly Efficient Enzyme-Functionalized Porous Zirconia Microtubes for Bacteria Filtration. In: *Environ. Sci. Technol* 46 (16), S. 8739–8747
- Kroll, S.;** Treccani, L.; Rezwan, K.; Grathwohl, G. (2010): Development and characterisation of functionalised ceramic microtubes for bacteria filtration. In: *Journal of Membrane Science* 365 (1-2), S. 447–455
- Kropat, J.;** Hong-Hermesdorf, A.; Casero, D.; Ent, P.; Castruita, M.; Pellegrini, M. et al. (2011): A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *The Plant Journal* 66, S. 770-780
- Lin, Y. S.** (2001): Microporous and dense inorganic membranes: current status and prospective. In: *Separation and Purification Technology* 25, S. 39-55
- Linke, D.;** Bouws, H.; Peters, T.; Nimtz, M.; Berger, R. G.; Zorn, H. (2005): Laccases of *Pleurotus sapidus*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, S. 9498-9505
- Liu, L.;** Liu, S.; Tan, X. (2010): Zirconia microbial hollow fibre bioreactor for *Escherichia coli* culture. In: *Ceramics International* 36 (7), S. 2087–2093
- Lye, G.** (1999): Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes. In: *Trends in Biotechnology* 17, S. 395-402
- Mallubhotla, H.;** Belfort, G. (1997): Flux enhancement during Dean vortex microfiltration. 8. Further diagnostics. In: *Journal of Membrane Science* 125, S. 75-91

- McKendry, P.** (2002): Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. In: *Bioresource Technology* 83, S. 37-46
- Melin, T.; Rautenbach, R.** (Hg.) (2007): *Membranverfahren. Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung*. 3. Aufl., Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Meyer, L.** (2008): *Aufbau eines modularen Mikro-Hohlfaserreaktorsystems zum Screening von Verfahrensparametern im Bereich der mikrobiellen Produktion (Dissertation)*
- Newcomb, M.; Zhang, R.; Chandrasena, R. E. P.; Halgrimson, J. A.; Horner, J. H.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.** (2006): Cytochrome P450 Compound I. In: *Journal of American Chemical Society* 128 (14), S. 4580–4581
- Nowack, R.; Birck, R.; Weinreich, T.** (2009): *Dialyse und Nephrologie für Fachpersonal*. 3. Aufl., Springer Medizin Verlag Heidelberg
- Osorio-Lozada, A.; Surapaneni, S.; Skiles, G. L.; Subramanian, R.** (2008): Biosynthesis of Drug Metabolites Using Microbes in Hollow Fiber Cartridge Reactors: Case Study of Diclofenac Metabolism by *Actinoplanes* Species. In: *Drug Metabolism and Disposition* 36 (2), S. 234–240
- Piret, J.** (1990): Immobilized mammalian cell cultivation in hollow fiber bioreactors. In: *Biotechnology Advances* 8 (4), S. 763–784
- Prenosil, J. E.; Pedersen, H.** (1983): Immobilized plant cell reactors. In: *Enzyme and Microbial Technology* 5, S. 323-331
- Rodrigues, M. E.; Costa, A. R.; Henriques, M.; Azeredo, J.; Oliveira, R.** (2010): Technological progresses in monoclonal antibody production systems. In: *Biotechnol Progress* 26 (2), S. 332-351
- Rozga, J.; Williams, F.; Ro, M.-S.; Neuzil, D. F.; Giorgio, T. D.; Backfisch, G. et al.** (1993): Development of a bioartificial liver: Properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. In: *Hepatology* 17, S. 258-265
- Rüffer, N.; Heidersdorf, U.; Kretzers, I.; Sprenger, G. A.; Raeven, L.; Takors, R.** (2004): Fully integrated L-phenylalanine separation and concentration using reactive-extraction with liquid-liquid centrifuges in a fed-batch process with *E. coli*. In: *Bioprocess and biosystems engineering* 26, S. 239-248
- Schmidt, A.** (2007): *Grundlegende Untersuchungen zum Einsatz von Mikrohohlfaserreaktoren in der Säugerzellkultur (Masterarbeit)*

- Smith, R.;** Rosazza, J. (1974): Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. In: Archives of Biochemistry and Biophysics 161, S. 551-558
- Strathmann, H.** (1985): Membranes and membrane processes in biotechnology. In: Trends in Biotechnology 3, S. 112-118
- Takors, R.** (2004): Ganzzell-ISPR-Prozessentwicklung: Chancen und Risiken. In: Chemie Ingenieur Technik 76, S. 1857-1864
- Ulbricht, M.** (2006): Advanced functional polymer membranes. In: Polymer 47, 2217–2262
- Vermasvuori, R.;** Hurme, M. (2011): Economic comparison of diagnostic antibody production in perfusion stirred tank and in hollow fiber bioreactor processes. In: Biotechnol Progress 27 (6), S. 1588–1598
- Villain, L.;** Meyer, L.; Kroll, S.; Beutel, S.; Scheper, T. (2008): Development of a Novel Membrane Aerated Hollow-Fiber Microbioreactor. In: Biotechnology Progress 24 (2), S. 367–371

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christoph Berend Wolff
Geburtsdatum: 15.05.1984 in Hannover
Familienstand: verheiratet

Ausbildung

Schule: 1994 – 2003 Abschluss: Abitur
Studium: 2004 – 2007 Life Science BSc. an der Leibniz Universität Hannover
2007 – 2009 Life Science MSc. an der Leibniz Universität Hannover
seit 2010 Promotionstudium an der Leibniz Universität Hannover

Zivildienst

Zivildienst: 2003 – 2004 in der Niedersachsenklinik, Bad Nenndorf