

Additive Fertigung in der Biotechnologie und Pharmaindustrie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Lukas Raddatz, M. Sc.

geboren am 27.07.1987 in Hannover

2019

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 28.01.2019

Meiner Familie.

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn **Prof. Dr. Thomas Scheper** für sein Vertrauen und dieses interessante Forschungsthema meinen Dank aussprechen. Herrn **PD Dr. Sascha Beutel** danke ich für die fachliche Begleitung in den vergangenen Jahren und für die Hilfe bei vielen Fragestellungen.

Herrn **PD Dr. Ulrich Krings** danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Seitens des Lehrstuhls für Brau- und Getränke Technologie der Technischen Universität München danke ich Herrn **Prof. Dr. Thomas Becker** und **Dominik Geier** für die Betreuung meines Projekts.

Dr. Antonina Lavrentieva und **Dr. Iliyana Pepelanova** gilt mein aufrichtiger Dank auf persönlicher und fachlicher Ebene.

Meinem Kooperationspartner **Dr. Rafael Gentsch** möchte ich für die sehr gute transatlantische Zusammenarbeit in unserem Polymer-Projekt danken.

Ganz besonders Danken möchte ich den *Guten Seelen* des TCI **Martina Weiß, Ulrike Dreschel** und **Cornelia Alic. Dr. Ivo Havlik** und **Dr. Michael Dors** waren bei mehr als ausgefallenen Druckern in IT-Angelegenheiten hilfsbereit zur Stelle.

Thorleif Hentrop und **Kai Patzer** danke ich für allerlei *Verkabelungen* und den Austausch über die neuesten 3D-Druck-Technologien in der Elektronikwerkstatt. **Friedbert Gellermann** und **Thorsten Stempel** danke ich für die unkomplizierte Fertigung des einen oder anderen Bauteils (die man zweifelsohne auch hätte 3D-drucken können ...).

Meinen Masterstudentinnen **Jana Schlaugat** und **Carola Schmitz** danke ich für die Zusammenarbeit und ihrem Interesse am 3D-Druck.

Besonderen Anteil über große Teile meiner TCI-Laufbahn hatten **Dr. Christoph Busse** und **Dr. Tim Lücking**, die mir die Magie der additiven Fertigung nahegebracht haben. **Dr. Christian Ude, Dr. Matthias Danzmann, Dr. Marcel von der Haar, Dr. Patrick Lindner, Dr. Patrick Jonczyk, Florian Aupert** und **Jan König** – danke ich für eine klasse Zeit.

Darüber hinaus möchte ich dem gesamten TCI danken. Ihr seid eine tolle Gemeinschaft, mit der wir das **VE-Brauteam** zu Pokalen geführt und unseren Chef in die Stratosphäre (und wieder zurück) geschickt haben. Ich wünsche Euch alles Gute.

Mein persönlicher Dank gilt des Weiteren **Pia Gellerman, Svenja Bolten, Marline Kirsch** und **Kimia Ekramzadeh**. Die vergangenen Jahre mit euch haben viel Spaß gemacht.

Auch dem *harten Kern*, aus **Dr. Elsa Friehs**, **Jonas Austerjost**, **Bastian Quaas** und **Dr. Ingo de Vries**, der zum Teil schon seit Anfang meines Studiums besteht, möchte ich herzlich danken. Gemeinsam konnten wir das ein oder andere Tal der Tränen überstehen, haben aber auch eine schöne Zeit mit (Dienst-)Reisen und *Supertrips* erlebt.

Auch möchte ich **Rajko Geith**, **Julius Kriebel**, **Gerald Hildebrandt**, **David Wenzel** und **Charlotte Blum** für (mitunter) über 20 Jahre Freundschaft herzlich danken.

Meinen größten Dank möchte ich hier meinen Eltern **Ute** und **Fritz Raddatz** aussprechen. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen. Ihr habt immer die passenden Worte gefunden und mich nach Rückschlägen genauso aufbauen, wie nach Erfolgen mit mir freuen können. Meinem Bruder **Jonas Raddatz** danke ich für seine persönliche Unterstützung und Sicht der Dinge aus der so wichtigen anderen Perspektive.

Zusammenfassung

Die additive Fertigung (3D-Druck) wurde in den frühen 1980er Jahren entwickelt und gewann seitdem durch stetige Verbesserungen an Bedeutung. Gebiete wie die Biotechnologie, die Pharma- und die Chemieindustrie, wo besonders hohe Anforderungen an Materialien und Produkte gestellt werden, können daher erschlossen werden. Anlässlich dieses Trends wurde die vorliegende Dissertation erstellt, um Anwendungsbereiche und Entwicklungsfelder in den Bereichen Biotechnologie und Pharmaindustrie zu evaluieren, Möglichkeiten und Grenzen des 3D-Drucks aufzuzeigen und einen Beitrag zu den aktuellen Entwicklungen der additiven Fertigung in Form verschiedener Produktentwicklungen und korrespondierender Studien beizusteuern.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird ein additiv gefertigter und funktionaler Kolbendeckel präsentiert, welcher zur kontinuierlichen und minimal-invasiven Prozessführung von (Fed-)Batch Prozessen im Schüttelkolbenmaßstab dient. Nach Design und Fertigung wurde er erfolgreich in einer Anwendungsstudie getestet. Verschiedene additive Fertigungsmethoden sind zentraler Gegenstand der Studie und werden neben dem Fallbeispiel als Möglichkeit zur *in-house* Produktion von Verbrauchsmaterialien (Kamm für gelelektrophoretische Analysen) diskutiert.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit Testung und Charakterisierung von additiv verarbeiteten Biopolymeren zur Implantatentwicklung. Auf Grundlage von bildgebenden Verfahren wie MRT oder CT können die digitalen Blaupausen zur Erstellung der Implantate gewonnen werden und mittels 3D-Druck in hoher Auflösung und dem notwendigen Material gefertigt werden. Die vorliegende Arbeit betrachtet verschiedene resorbierbare Materialien hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als Rohstoff für additiv gefertigte Implantate und evaluiert das Zellverhalten (Viabilität, Proliferation, Adhärenz, Differenzierung) verschiedener Zelltypen in Kontakt mit den Materialien. Darüber hinaus wird das Abbauverhalten der biodegradierbaren Materialien unter simulierten *in-vivo* Bedingungen beschrieben.

Der dritte Teil der Arbeit widmet sich dem 3D-Bioprinting. Mit dieser Methode können individuell und präzise 3D-Zellstrukturen erstellt werden. Hier wurde eine neuartige Methode für extrusionsbasiertes Natriumalginat-3D-Bioprinting entwickelt, bei der der Gelationsprozess des Alginats mithilfe einer vernebelten CaCl_2 -Lösung induziert wird. Gegenüber bisherigen Methoden können die Inkubationsdauer und Konzentration des potentiell toxischen CaCl_2 verringert werden.

Über die in den einzelnen Kapiteln präsentierten Ergebnisse hinaus, zeigen die Arbeiten in Summe, welche Möglichkeiten verschiedene additive Fertigungsverfahren bieten und wie sie für biotechnologische Anwendungen genutzt werden können.

Schlagwörter: 3D-Druck, (Fed-)Batch, individuelle Labware, Schüttelkolben, Stereolithographie, Biokompatibilität, resorbierbare Polymere, Bioprinting, Alginat, Zellkulturtechnik, Hydrogele

Abstract

The additive manufacturing (3D printing) as a new tool for creating high quality products was established in the early 1980s and emerged to a relevant production strategy since then. Crucial improvements of both 3D printing methods and material development in the past decade allow its application in highly regulated areas in biotechnology and chemical industry. This thesis relies on this trend and aims to evaluate different fields of applications, possibilities and borders of 3D printing technology.

In the first section, a functional and additively manufactured shake flask lid for continuous and minimal-invasive (fed-) batch processes in shake flask scale is presented. The design and manufacturing process are described and a proof-of-concept is given. Furthermore, the additive manufacturing strategies used are scope of this part - discussing their overall applicability for in-house labware production.

The second part describes with the testing and the characterization of additively manufactured biopolymer structures for implant development. Implants are highly personalized objects and additive manufacturing strategies are an interesting and efficient way to realize fast production yielding both high quality and individual products. Based on high resolution imaging methods (MRT, CT) the needed 3D information about the objects dimensions are often available already and can serve as digital blueprints for the 3D printing of implants. This part evaluates different resorbable materials in sight of their applicability as commodity material for additively manufactured implants. The cell behavior of different cell types is assessed including cell viability, proliferation, adherence and differentiation when in contact with respective material. Furthermore, the *in-vitro* degradation properties of the materials were evaluated under *in-vivo* mimicking conditions.

The third part addresses 3D-bioprinting. With this technique, 3D cell cluster can be designed and manufactured. By providing the cells with an adequate extracellular matrix, this approach enhances the validity of cell assays and improves their transferability to *in-vivo* conditions. Here, a novel method for extrusion-based bioprinting was developed, allowing to gelate the hydrogel with a nebulized CaCl_2 solution, instead of a CaCl_2 solution. With this new approach, the incubation time and the concentration of the possibly cell-toxic CaCl_2 to the generated object can be reduced.

In addition to the research presented in the single chapters, this thesis shows the possibilities of different additive manufacturing methods in biotechnology.

Keywords: 3D printing, Fed batch, individual labware, shake flask, stereolithographie, biocompatibility, resorbable polymeres, bioprinting, alginate, cell culture technology, rapid tooling, hydrogels.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Zielsetzung	11
3	Theoretischer Teil.....	13
3.1	3D-Druck in Biotechnologie und Chemie – ein Überblick	13
4	Experimenteller Teil.....	24
4.1	Entwicklung individualisierbarer und modularer 3D gedruckter Labware	25
4.2	Materialtestung verschiedener additiv gefertigter Polymere zur Implantatentwicklung... 36	
4.3	Entwicklung und Etablierung einer neuartigen 3D-Bioprinting Strategie für Natriumalginat Hydrogele	52
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	68
6	Literatur.....	71
7	Anhang	78
7.1	Genehmigungen zur Nutzung der Publikationen	78
7.2	Kooperationen und betreute Abschlussarbeiten	81
7.3	Publikationsliste	83
7.4	Lebenslauf	87

1 Einleitung

„Stärker noch als das Blei in der Flinte hat das Blei im Setzkasten die Welt verändert.“

Johannes Gutenberg

Als Johannes Gutenberg 1530 den Buchdruck entwickelte, ahnte vermutlich nicht einmal er, dass damit gesellschaftliche Meilensteine wie die Aufklärung und die Reformation ermöglicht wurden und der Buchdruck später als die *Demokratisierung des Wissens* bezeichnet würde. Die Nutzung einzelner, wiederverwendbarer Metalllettern revolutionierte nicht nur die wissenschaftliche und politische Gemeinschaft, die ihre Erkenntnisse und Informationen nun leichter verbreiten konnte, es hatte auch die Alphabetisierung Deutschlands, Europas und der Welt zur Folge.

Die Tragweite dieser disruptiven Erfindung Gutenbergs ist kaum zu überbieten und dennoch wird heute eine neue Technologie in Anlehnung an Gutenberg mit der *Demokratisierung der Produktion* umschrieben: Seit seiner Erfindung in den 1980er Jahren erobert der 3D-Druck, auch als additive Fertigung (*additive manufacturing*, AM) bezeichnet, weite Felder in der Produktion und eröffnet die Möglichkeit der dezentralen Herstellung. Die revolutionäre Idee des Erfinders Chuck W. Hull war das aufbauende (additive) Grundprinzip. Kunststoffe, Metalle, Keramiken und weitere Rohstoffe können mithilfe eines 3D-Druckers (schichtweise) aufgebaut und zum Produkt verarbeitet werden. Die Vorteile gegenüber klassischen Produktionsverfahren wie Schleifen oder Fräsen (abtragend, „subtraktiv“) und formenden, wie Gießen, Pressen oder Biegen liegen auf der Hand: Durch das auftragende Prinzip wird grundsätzlich das gesamte Ausgangsmaterial zum Produkt verarbeitet und unnötige Abfälle werden vermieden.

Mithilfe eines 3D-Druckers lassen sich sehr komplexe Strukturen nicht nur schnell, sondern auch in einem Stück herstellen. Selbst moderne computergesteuerte Fräsmaschinen (CNC-Fräsen) sind hier stark limitiert, sodass die Einzelteile in einem zweiten Produktionsschritt zusammengefügt werden müssen. Die Vorteile zeigen sich bereits jetzt in der Anwendung: Die Einspritzdüsen der Triebwerke des Airbus Mittelstreckenjets A320neo sind aus Keramiken additiv gefertigt und in einem Stück produziert, so werden die Maschinen effizienter und es können Treibstoffeinsparungen von bis zu 15 % gegenüber vergleichbaren Triebwerken erreicht werden. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Fertigung von geringen Stückzahlen bei gleichzeitiger hoher Komplexität der Strukturen die Nische des 3D-Drucks darstellt. Das Zusammenspiel von Freiheit in Design und rascher Fertigung in hoher Qualität sind die essentiellen Vorzüge dieser Technologie.

In der Produktentwicklung wird auch von iterativen Prozessen gesprochen: Mehrere zyklische Testphasen aus Evaluierungs- und Verbesserungsphasen werden durchgeführt an deren Ende das Produkt steht. Additive Fertigungsverfahren bieten die nötige Flexibilität realistische und funktionale Strukturen zum Einen schneller fertigen und zum Anderen umgehend einsetzen zu können. Auf diesem Weg lässt sich der *Try-and-Error*-Zyklus erheblich verkürzen. Konkret bedeutet dies, dass ein Produkt nach dem Design direkt additiv gefertigt werden kann und zeitnah und ohne (Arbeits-)Zeitverlust angewendet oder, falls nötig, weiterentwickelt werden kann. Prototypen lassen sich somit wesentlich schneller bauen, weswegen man im Kontext mit der additiven Fertigung oft auch vom Rapid Prototyping spricht.

In biotechnologischen und chemischen Laboren kann die Additive Fertigung Abläufe verändern, vereinfachen - revolutionieren. In dieser Vision, können hochspezifische Laborutensilien über Nacht in dem laboreigenen 3D-Drucker *just-in-time* gefertigt und am nächsten Morgen verwendet werden („Rapid Tooling“). Die dazu notwendigen Informationen zu den Bauteilen können entweder mithilfe von 3D-Zeichenprogrammen am Computer selbst entwickelt worden sein oder als digitale Blaupause vom Hersteller zur Verfügung gestellt werden. Lieferzeiten und –kosten reduzieren sich auf das Rohmaterial und sichern eine nachhaltige Produktion, womit es für Anbieter und Kunde Vorteile bietet.

Die Anwendungspotenziale gehen jedoch über die bloße Produktion von Laborutensilien hinaus. Alleinstellungsmerkmal der AM ist, unter anderem, der hohe Individualisierungsgrad der Produkte. Dieser Vorteil ist z.B. bei der Produktion von Implantaten von entscheidender Bedeutung: Auf Grundlage von bildgebenden Verfahren wie MRT oder Röntgen-Bildern können 3D-Vorlagen für Implantate erzeugt werden, welche im Anschluss additiv gefertigt werden können. Der Patient hätte damit Zugang zu individuell angepassten Implantaten.

Der 3D-Druck wird die Art wie Produkte geplant und hergestellt werden stark verändern. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass der Markt additiv gefertigter Waren bis 2025 die 100 Mrd. US\$ - Marke überwinden wird und 5-10 % aller relevanten Produkte 3D-gedruckt werden könnten. Dass AM Methoden traditionelle Verfahren jedoch gänzlich ablösen werden, ist unwahrscheinlich. Hybride Prozessketten aus generativen, konventionellen und voll- und teilautomatisierten Prozessen werden die Produktion der Zukunft prägen und alle Vorteile der einzelnen Fertigungstechniken ausspielen. Ob dabei die gesellschaftlichen Auswirkungen der additiven Fertigung jene des Buchdrucks erreichen, bleibt abzuwarten. Die Chancen und Möglichkeiten für Forschung, Industrie und die Anwendung im alltäglichen Leben sind enorm.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen in verschiedenen Bereichen der biotechnologischen und chemischen Forschung und Entwicklung Anwendungsbereiche und Potentiale der additiven Fertigung identifiziert und ausgetestet werden.

Dafür werden adäquate Methoden und entsprechende Materialien identifiziert und charakterisiert. Insbesondere die chemische Stabilität und mögliche toxische Effekte verfügbarer, 3D-druckbarer Materialien müssen evaluiert werden. Die Materialien sollen sowohl für eukaryotische als auch für prokaryotische Modellorganismen biokompatibel sein, um für ein breites Anwendungsspektrum infrage zu kommen. Die Testung von Biopolymeren und Epoxyharzen steht hier im Vordergrund. Diese Stoffklassen sind relevante Rohstoffe für wichtige AM Techniken, wie Schmelzschichtverfahren (*Fused Deposition Modeling*, FDM), Stereolithographie (*Stereolithography*, SLA) und dem *Multi Jet Printing* (MJP), welche in dieser Arbeit genutzt werden und neben dem selektiven Lasersintern (*Selective Laser Sintering*, SLS) als vielversprechend für das biotechnologische Umfeld angesehen werden können. Darüber hinaus, sollen insbesondere bioabbaubare Polymere zur Implantatherstellung auf ihre Anwendbarkeit für die AM charakterisiert werden.

Des Weiteren sollen auf dieser Grundlage Anwendungen gefunden werden, die die Vorteile der additiven Fertigung aufzeigen. Dies soll am Beispiel eines funktionalen und modularisierbaren Kolbendeckels gezeigt werden, der zur Durchführung von Schüttelflaschenkultivierungen im Labormaßstab geeignet ist.

Ebenfalls von Interesse ist das in den vergangenen Jahren intensiv weiterentwickelte 3D-Bioprinting. Komplexe Strukturen (tierischen) Gewebes können *in-vitro* nachgebaut werden und ein 3D-Zellsystem geschaffen werden, dessen Verhalten natürliches Gewebe besser imitiert als bisherige 2D *in-vitro* Kultivierungssysteme es vermögen. Umgesetzt wird dies mit (extrusionsbasierten) 3D-Druckverfahren unter Zuhilfenahme sogenannter Bioinks als Ausgangsmaterial. Das Hydrogel Natriumalginat (Na/Alg) ist ein oft verwendetes Bioink, welches gute (bio-)chemische und physikalische Eigenschaften aufweist. In diesem Kontext soll ein Verfahren entwickelt werden, welches die Qualität von Scaffolds aus Na/Alg verbessert, indem eine neue biokompatible Polymerisationsstrategie entwickelt wird.

Die generell hohe Auflösung additiv gefertigter Objekte erlaubt mittlerweile die Anwendung der Technologie zur Produktion komplexer Strukturen. Es sollen aus der Vielzahl der vorhandenen Methoden jene gefunden werden, welche sich für die oben genannten hochspezifischen Bereiche eignen. Hohe Relevanz hat hierbei vor allem die physikalische und chemische Qualität und Stabilität der Produkte.

3 Theoretischer Teil

3.1 3D-Druck in Biotechnologie und Chemie – ein Überblick

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit werden die relevanten additiven Fertigungstechnologien diskutiert, der geschichtliche Hintergrund betrachtet und die generelle Relevanz des Themas in einem übergeordneten Kontext besprochen.

Die additive Fertigung wurde in den 1980er Jahren von Chuck W. Hull entwickelt und unterscheidet sich grundlegend von klassischen Herstellungsmethoden wie dem Gießen, Fräsen oder Schmieden. In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine Vielzahl an 3D-Druck-Techniken entwickelt, die auf dem gleichen Prinzip beruhen: Das zu fertigende Objekt wird nach computergestütztem Design (*Computer Aided Design*, CAD) schichtweise aufgebaut. Es können gasförmige, feste und flüssige Verbindungen verarbeitet werden, wobei die Anwendung gasbasierender Methoden zurzeit noch experimentell ist. Ungeachtet dessen haben sich drei AM Strategien etabliert: Schmelzschichtverfahren (*Fused Deposition Modelling*, FDM), Selektives Lasersintern (*Selective Laser Sintering*, SLS) und Stereolithographie (SLA). Diese machen den Großteil aller betriebenen Geräte aus und werden in der vorliegenden Arbeit detailliert erläutert.

Die durch den Prototypenbau und den Heimwerker-Markt populär gewordenen AM-Methoden finden weit darüber hinaus Anwendung und werden beispielsweise im Flugzeug-, Fahrzeug- und Häuserbau eingesetzt. In der aktuellen Literatur wird die Relevanz der additiven Fertigung eingehend diskutiert und als disruptive Technologie beschrieben, die die produzierende Industrie revolutionieren kann. Weiter wird davon ausgegangen, dass sich ihre wirtschaftliche Bedeutung im kommenden Jahrzehnt vervielfachen wird. Der direkte ökonomische Einfluss wird sich demnach auf einen dreistelligen Milliardenbetrag (€) summieren. In diesem Kontext wird erwartet, dass 2025 bereits 5-10 % der relevanten Waren additiv fertigbar sein könnten und die Produktionskosten um 30 % sinken.

Konkrete Möglichkeiten der Anwendung von 3D-Drucktechniken im Bereich Biotechnologie und Chemie sind breit gefächert. Sie liegen sowohl in der Entwicklung und Produktion von individuellen Laborutensilien, Verbrauchsmaterialien oder patientenspezifischen Implantaten als auch in der Grundlagenforschung im Bereich 3D-Bioprinting.

Mit der (Weiter-) Entwicklung der additiven Fertigung geht eine zunehmende Anzahl von Vorteilen gegenüber klassischer Methoden einher. Durch die *just-in-time* Produktion hochspezifischen Laborbedarfs können Abläufe vereinfacht werden und *in-house* stattfinden.

Lieferkosten und –zeit verringern sich signifikant, da sich die Lieferung im besten Fall auf die Rohstoffe begrenzt. Dennoch ist davon auszugehen, dass in Zukunft traditionelle Herstellungsverfahren weiterhin eine große Rolle spielen werden und hybride Prozessketten die Produktion prägen und die Vorteile der Methoden kombinieren.

In dem Artikel „3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken“ (2017) erschienen in Chemie In Unserer Zeit werden diese Zusammenhänge detailliert dargestellt.



Wie eine neue Technologie die Zukunft der Biotechnologie und Chemie prägen könnte

3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken

LUKAS RADDATZ | JONAS AUSTERJOST | SASCHA BEUTEL

„This had better be good!“, waren die Worte von Chuck Hulls Ehefrau, nachdem ihr Mann sie in jener historischen Nacht im November des Jahres 1983 aus dem Schlaf riss, um ihr sein erstes 3D-gedrucktes Objekt zu zeigen. Es stellte sich schnell heraus: Es war gut! [1]

Chuck Hull (Abbildung 1) ist als Pionier und Erfinder in die Geschichte des 3D Drucks eingegangen und noch heute in seiner Position als Vizepräsident und Technikvorstand bei einem der größten Hersteller von 3D-Druckern, 3D Systems (Kalifornien, USA), direkt an aktuellen Entwicklungen beteiligt. Der US-amerikanische Ingenieur forschte in den frühen 1980er Jahren an Möglichkeiten zu neuartigen Verwendungen von UV-Technologien und entwickelte dabei die auch als additive Fertigung bekannte Methode. Für seine Leidenschaft stellte ihm sein Arbeitgeber zunächst nur ein kleines Labor zur Verfügung, in dem er nachts und am Wochenende arbeiten durfte [1]. Ergebnis von Hulls Bemühungen war die Stereolithographie, mittlerweile eines der relevantesten 3D-Druck-Verfahren und nicht weniger als eine Revolution der Fertigungstechnik.

Seit dieser richtungsweisenden Nacht bei Ehepaar Hull wurden viele weitere Druckmethoden, wie das Schmelzschicht- oder Pulverschichtverfahren, entwickelt. Durch die patentrechtlich streng geschützten Erfindungen galt der 3D-Druck jedoch lange als Nischenanwendung.

Durch Auslaufen dieser Patentschutze im aktuellen Jahrtausend wurde der Wettbewerb größer und die Geräte wurden günstiger [2, 3]. Daraus resultierend expandiert der Markt der additiven Fertigung enorm: Zwischen 2007 und 2011 wurden jährlich 200–400% Wachstum im Bereich Kleinanwender-3D-Drucker verzeichnet. Für 2025



Abb. 1 Der US-Amerikaner Chuck (eigentlich Charles. W.) Hull erhielt für seine Erfindung der Stereolithografie 2014 den Europäischen Erfinderprijs in der Kategorie Nicht-europäische Staaten. Hull (*1939) nutzte UV-Licht, um Oberflächenbeschichtungen auszuhärten. 1983 hatte er die Idee, das für die Beschichtung verwendete Kunstharz in dünnen Laminatschichten dreidimensional übereinander aufzutragen. Auf Basis seiner Idee funktioniert heute jeder 3D-Drucker. Hull hat mit seiner Erfindung einen völlig neuen Industriezweig begründet. Von der Automobilindustrie bis zur Medizintechnik – der 3D-Drucker kommt inzwischen fast überall zum Einsatz. [Bild: Europäisches Patentamt]

wird von einer wirtschaftlichen Wirkung von 230 bis 550 Mrd. US Dollar pro Jahr ausgegangen und bereits jetzt wird der 3D-Druck oft in einem Atemzug mit beispielsweise dem „Internet der Dinge“ oder autonomem Fahren als disruptive Technologie bezeichnet [4].

Nach einer Umfrage des Fraunhofer Instituts für Produktionstechnik und Automatisierung (IPA) gehen 43% der befragten Fachleute davon aus, dass in ihrem Unternehmen additive Fertigungstechniken in Zukunft ein etabliertes Verfahren darstellen werden. 22% schätzen ihre Rolle sogar als „herausragend“ ein und bezeichnen sie als „Schlüsseltechnologie“ [5].

Die neue Technologie unterscheidet sich fundamental von subtraktiven Verfahren wie Fräsen oder Schleifen sowie von formenden Verfahren wie Gießen, Pressen oder Biegen. Das herzustellende Objekt wird durch Hinzufügen oder Auftragen neuen Materials, also additiv, aufgebaut. Als elektronischer Bauplan dienen dabei spezielle Dateiformate, welche die räumliche Ausdehnung des Objekts beschreiben. Durch dieses generative Verfahren ergeben sich einige Vorteile gegenüber klassischen Methoden. Vor allem können größere konstruktive Freiheiten erreicht werden und das Modell direkt vom virtuellen Vorbild gefertigt werden. Als Folge fallen umfangreiche Vor- und Nachbearbeitungen zum Teil weg und der Herstellungsprozess wird signifikant verschlankt. Des Weiteren wird durch die *Just-in-time*-Produktion der Bauteile eine Minimierung der Lagerressourcen und -kosten erreicht [6].

Durch die Vielfalt an Materialien, die für die additive Fertigung einsetzbar sind und zum Teil extra entwickelt wurden, erschließen sich stetig neue Anwendungsfelder

und Möglichkeiten. Daraus ergeben sich qualitativ hochwertige Produkte, deren Potential die Verwendung als Prototypen weit übersteigt [7]. Einer der größten Triebwerks hersteller für Flugzeuge der Welt, die General Electric Corporation, stellt seit kurzem Teile der hochkomplexen Maschinen mithilfe additiver Fertigungsmethoden her. Diese im neuen Airbus A320neo verbauten Kraftstoffdüsen sind in einem Stück aus Titanaluminid gesintert. Mit klassischen Methoden mussten bisher 20 Einzelteile miteinander verschweißt werden. Dadurch spart man Zeit und damit einhergehend Kosten [8].

Grundlagen der Additiven Fertigung

Die Entstehung eines Objektes von der Idee bis zum fertigen Produkt lässt sich in drei Schritte einteilen und führt von der Planung des Bauteils über dessen computergestützte Zeichnung bis zur Fertigung per 3D-Drucker (Abbildung 2).

Beim computergestützten Design (*Computer Aided Design, CAD*) wird das Werkstück zunächst geplant und gezeichnet und der dreidimensionale Volumenkörper erstellt. Das computergestützte Design ist eine in der Fertigungstechnik bewährte Methode zur Gestaltung und Simulation von Objekten. Dabei können bereits während der Planungsphase physikalische Eigenschaften durch (Belastungs-) Simulationen bestimmt werden. Es gibt verschiedene, meist kostenpflichtige, CAD-Programme zur Auswahl; am weitesten verbreitet sind Produkte von Autodesk (Autodesk Corporation, San Rafael, USA) und SolidWorks (Dassault Systèmes SolidWorks Corporation, Vélizy-Villacoublay, Frankreich).

Ist das Objekt erstellt, wird es im .stl-Dateiformat (für: STereoLithography) abgespeichert. Dieses Format gilt als

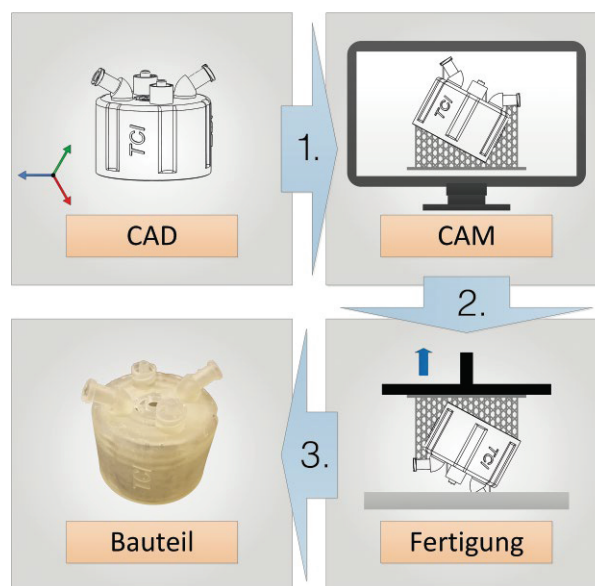
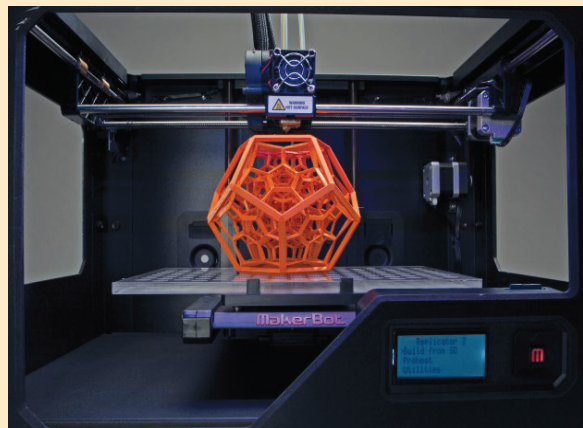


Abb. 2 Die drei Schritte des additiven Fertigungsprozesses anhand eines funktionalisierten Kolbendeckels. 1: Planung, 2: computergestützte Zeichnung, 3: Fertigung durch 3D-Druck (modifiziert nach [24]).

Industriestandard für generative Fertigungsverfahren und stellt die geometrischen Daten des zu fertigenden Werkstückes bereit, beschreibt also die Oberfläche und das Volumen des 3D-Körpers. Die .stl-Datei wird nun in ein für den 3D-Drucker interpretierbares Format umgewandelt. Bei diesem *Computer Aided Manufacturing* (computer-gestützte Fertigung, CAM) genannten Schritt wird das Objekt Modell-spezifisch und in Abhängigkeit von Auflösungseinstellungen in Schichten zerlegt, was auch als *Slicen* bezeichnet wird. Beim *Slicen* werden die exakten Bewegungen des Druckkopfes oder Lasers errechnet und beispielsweise Druckdauer und Materialverbrauch bestimmt.

GLOSSAR



3 D-Drucker erlauben den Druck vielfältiger Formen.
[Bild: Makerbot Industries www.makerbot.com, CC BY 2.0]

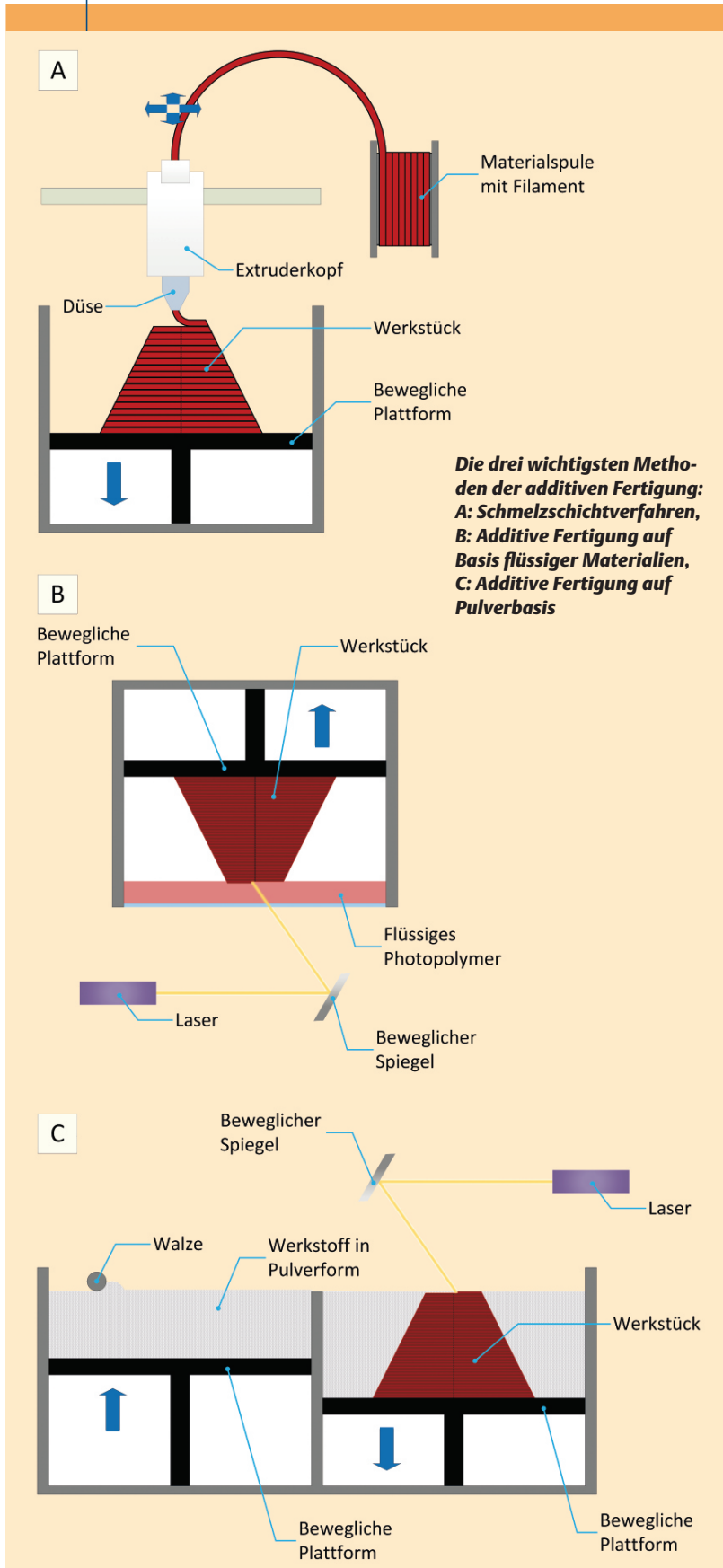
Die 3D-Druck Technologie wird aufgrund ihres auftragenden Prinzips als **additives Fertigungsverfahren** bezeichnet. Diese umfassen verschiedene Methoden, klassifiziert nach Materialien und den Grundprinzipien auf denen sie beruhen. Es können eine Vielzahl von Materialien verwendet werden, die je nach ihren Eigenschaften unterschiedliche Anwendungen im Werkzeugbau, Produktentwicklung oder Maschinenbau eingesetzt werden können.

Kunststoff-, Keramik- und Metallpulver können mit **Sinter- beziehungsweise Schmelzverfahren** (wie dem Selective Laser Sintering, SLS, oder Melting, SLM) verarbeitet werden. Daneben spielen **Schmelzschichtverfahren** (Fused Deposition Modelling, FDM) eine große Rolle, wo Kunststoffe in Filamentform (fadenförmig) verarbeitet werden. Die dritte Prozessklasse ist die **Stereolithographie, STL**, welche flüssige Epoxidharze als Ausgangsstoff verwendet und mittels Licht aushärtet.

Der dreistufige Fertigungsprozess umfasst methodenunabhängig das computergestützte Design des 3D-Körpers (**CAD**), gefolgt von dem computergestützten Fertigen (**CAM**) und dem **3D-Druck** an sich.

Der 3D-Druck wird als **disruptive Technologie** angesehen. Diese haben das Potenzial, bestehende Technologien oder Produkte teilweise oder vollständig zu verdrängen. Beispiele sind das Automobil, das die Pferdekutsche verdrängte oder – aktueller – die Digitalkamera, die analoge Kameras fast zum Verschwinden gebracht hat.

ABB. 3 | ADDITIVE FERTIGUNG



Weiter werden Parameter festgelegt, welche sich zuweilen stark zwischen den vielen Technologien der additiven Fertigung unterscheiden. So ist beispielsweise bei Schmelzschichtverfahren (s. u.) die Extrudertemperatur entscheidend, beim Pulversintern hingegen sind die Einstellungen des Lasers relevant. Die erstellte Datei mit allen Parametern wird im Folgenden an das Gerät übermittelt. Mittlerweile sind viele 3D-Drucker LAN oder WLAN-fähig, alternativ lassen sich die Dateien per USB Datenverbindung oder USB-Stick übertragen.

Es folgt die additive Fertigung des Objekts an sich. Dabei müssen einige 3D-Drucker justiert und kalibriert werden, um eine hohe Produktqualität bzw. Fertigungsgenauigkeit gewährleisten zu können. Die Dauer eines Druckvorgangs ist sehr vom gewählten Verfahren, dem Gerät und von der gewünschten Qualität des Produkts abhängig.

Additive Fertigungsmethoden

Die US-amerikanische Standardisierungsorganisation ASTM (American Society for Testing and Materials) definierte 2012 Prozesskategorien der additiven Fertigung und legte damit erstmals konkrete Vokabeln fest. Die Kategorien (*Binder Jetting, Directed Energy Deposition, Material Extrusion, Material Jetting, Powder Bed Fusion, Sheet Bed Fusion, Sheet Lamination* und *Vat Photopolymerization*) sollen dabei helfen, aktuelle und zukünftige Techniken zu organisieren und zu strukturieren [9].

Die Einordnungen können der Übersichtlichkeit halber in drei übergeordnete Prozessklassen unterteilt werden: Additive Fertigung mit dem Schmelzschichtverfahren, auf Pulverbasis sowie auf Basis flüssiger und gasförmiger Materialien (Abbildung 3).

Das Schmelzschichtverfahren

Schmelzschichtverfahren (Abbildung 3A) sind die beliebtesten additiven Fertigungsverfahren unter den Heim- und Kleinanwendern. Mit ein wenig Geschick lassen sich die zum Teil als Bausatz verfügbaren Geräte mit handelsüblichem Werkzeug zu Hause aufbauen. Zunächst lagen die relevanten Patente jedoch lange bei seinen Erfindern und der Stratasys Ltd., wodurch ein freier Wettbewerb bis 2005 *de facto* unterbunden war und die Geräte entsprechend teuer waren. Erst durch Auslaufen des Schutzes bildeten sich Organisationen wie Replicating Rapid-prototyper (RepRap), die den 3D-Druck einer breiten Öffentlichkeit zugänglich machten, indem der Initiator Adrian Bowyer seine Entwicklung unter eine allgemeine Veröffentlichungslizenz (GNU General Public License) stellte. Das Alleinstellungsmerkmal war, dass das Gerät alle Kunststoffteile von sich selbst fertigen kann. Durch diese Fähigkeit der Selbstreplikation seines Druckers und mit sehr niedrigen Preisen (ab 500 €) verfolgt Bowyer seine Vision eines 3D-Druckers in jedem Haushalt [10].

Der „RepRap“, aber auch viele weitere Geräte, die mit dem Schmelzschichtverfahren arbeiten, beruhen auf der Fused-Deposition-Modelling (FDM)-Technologie. Dabei

wird der als Filament vorliegende Kunststoff durch einen erhitzten Druckkopf (Extruder) gefördert und zum Schmelzen gebracht.

Der Extruder enthält (je nach Bauart des Modells) eine Heizspule zum Erhitzen des zu verarbeitenden Polymers, einen Temperaturfühler sowie einen Elektromotor zur Förderung des Materials. In der Horizontalen ist er frei beweglich; nach Auftragen der ersten Schicht wird die Bauplattform nach unten bewegt und es kann das Auftragen der folgenden Schicht auf die vorherige beginnen [11].

Die Auflösung von FDM-Druckern beträgt ca. 100 µm, was etwa der Dicke eines Blatt Papiers entspricht. Damit ist diese Technik geeignet für grobe Anwendungen, wie den Prototypenbau. Durch gute mechanische Eigenschaften der Bauteile bietet es sich auch für *Rapid Tooling*, also die schnelle Fertigung von Werkzeugen, an [12].

Handelsübliche FDM-3D-Drucker haben ein bis drei Extruder verbaut, sodass sie die Möglichkeit bieten, mit mehreren Materialien oder verschiedenen Farben gleichzeitig zu arbeiten. Hier können zum Beispiel die Rohstoffe Polymilchsäure (Polylactide, PLA) und das als Lego®-Kunststoff bekannte Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) gewinnbringend kombiniert werden: PLA wird unter sauren Bedingungen zersetzt, ABS hingegen bleibt stabil. Oft wird aus diesem Grund PLA als Stützmaterial verwendet, welches im Anschluss an den Druck in einem Säurebad aufgelöst werden kann. Auf diesem Weg wird umständliches manuelles Entfernen des überschüssigen Materials vermieden und die Oberflächenqualität an der Kontaktstelle zwischen Objekt und Stützmaterial verbessert.

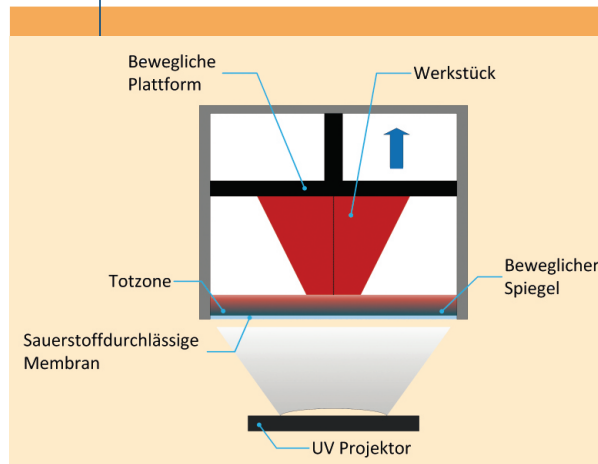
Fertigung auf Basis gasförmiger und flüssiger Materialien

Verfahren mit flüssigem Werkstoff bilden den historischen Grundstein der additiven Fertigung und gehören auch heute noch zu den zuverlässigsten und präzisesten Methoden (Abbildung 3B). Vielfach angewandt wird die Stereolithographie (SLA), bei der ein Kunststoff durch UV-Bestrahlung ausgehärtet wird.

Die dafür verwendeten Epoxidharze haben die Eigenschaft, bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zu polymerisieren und feste Strukturen zu bilden. Diese Photopolymere befinden sich hierbei in einem Bad, an dessen Unterseite ein lichtdurchlässiges Fenster platziert ist. Unterhalb davon befindet sich ein hochpräziser Laser und belichtet das Harz. Das Objekt entsteht dabei an einer von oben in das Bad eintauchenden Druckplattform. Diese befindet sich im Fokus des Lasers, sodass die erste Schicht an der Plattform polymerisiert und dort anhaftet. In den folgenden Schritten wird die Plattform angehoben, sodass die neue Schicht an der vorherigen entsteht. Das Schrittweise anheben der Bauplattform ist gleichzeitig Stellglied für die Schichtdicke im entstehenden Modell.

Im Anschluss an den Druckprozess muss das Objekt sorgfältig nachbearbeitet werden. Überschüssiges Harz wird mithilfe von Lösemitteln wie Isopropanol abgewa-

ABB. 4 FUNKTIONSPRINZIP DES CLIP-VERFAHRENS



Durch Sauerstoff in der „Totzone“ wird die Polymerisation unterdrückt und ermöglicht einen kontinuierlichen Fertigungsprozess.

schen und Stützmaterial muss entfernt werden. Die Auflösung der gängigen SLA-Geräte liegt bei etwa 25 µm und ist damit im Vergleich zu anderen Verfahren sehr genau.

Noch präzisere Ergebnisse lassen sich durch gasbasierte Verfahren erreichen, die seit den 1990er Jahren entwickelt werden, aber durch ihren komplexen Aufbau noch keinen kommerziellen Durchbruch erlebt haben. Die *Laser-Chemical-Vapor-Deposition* (LCVD) beispielsweise ist eine deutsche Entwicklung der Max-Planck-Gesellschaft in Göttingen. Durch Kreuzen zweier Laserstrahlen in einem Aluminium-Sauerstoff-Gasgemisch werden in einem chemischen Prozess Aluminiumkristalle erzeugt. Auf diese Weise gelingen filigrane Konstrukte mit Auflösungen ab 5 µm [6], was einem Zehntel des Durchmessers eines Haars entspricht.

Fertigung auf Pulverbasis

Bei dieser Drucktechnologie wird pulverförmiger Rohstoff verwendet und sie umfasst sowohl Sinter- als auch *Binder-Jetting*-Verfahren (Abbildung 3C). Dabei wird das Pulver in einem Druckbett auf unterschiedliche Art zu einem Objekt verklebt (*Binder-Jetting*) beziehungsweise verschmolzen (Sinter-Verfahren).

Beim Selektiven Lasersintern (SLS) handelt es sich um ein sehr vielseitiges generatives Fertigungsverfahren. Von Metallen über Keramiken bis zu Kunststoffen sind viele Materialien verfügbar, die sich mit diesem Verfahren „verarbeiten“ lassen. Daraus resultiert eine große Bandbreite an Möglichkeiten der Anwendung.

Der als Pulver vorliegende Rohstoff befindet sich in einem absenkenden Behälter innerhalb des Druckraums. Das Pulver wird durch einen oberhalb davon installierten Laser aufgeschmolzen (gesintert) und die erste Schicht entsteht. Während des Sinterprozesses wird das Pulver punktuell verdichtet, wobei die einzelnen Partikel miteinander verschmelzen und so eine formgebende Struktur ausbilden. Nach jedem Layer senkt sich das Pulverbett ab und durch einen Rakel oder eine Walze wird neues Rohmaterial aufgetragen. Es folgt der Sintervorgang der nächsten Schicht, welche mit der vorherigen verbackt und das Objekt vertikal entstehen lässt.



Abb. 5 Der im James-Bond-Film „Skyfall“ zu sehende Aston Martin DB3 wurde für die Dreharbeiten im Maßstab 1:3 aus Polymethylmethacrylat (PMM) nachgebaut, damit im Film kein echter zerstört werden musste. [Bild: voxeljet AG]

Aktuelle Entwicklungen und Ausblick

Auf dem Markt für 3D-Drucker ist nach wie vor sehr viel Bewegung. Neue Technologien werden entwickelt und bringen Verbesserungen für vorhandene Anwendungen und ermöglichen durch präziseres Fertigen weitere.

Zurzeit wird an der HAW Zürich ein 3D-Drucker-Prototyp mit beweglicher Bauplattform entwickelt. Mit dem sechsschsig arbeitenden FDM-Drucker ist es möglich, Geometrien mit starken Überhängen herzustellen. Die Bauplattform kippt mit ihrer Bewegung das Objekt, sodass Überhänge bis zu einem gewissen Grad ausgeglichen werden und Stützmaterial nicht benötigt wird. Insbesondere Objekte, deren Oberflächenqualität von Bedeutung ist, bieten sich für die neue Technik an, da späteres Entfernen von Stützmaterial immer mit einer Verminderung der Oberflächenqualität einhergeht [13].

Eine weitere vielversprechende Technik ist die *Continuous-Light-Interface-Production*-Technologie (CLIP), welche Anfang 2015 vom US-amerikanischen Unternehmen Carbon3D Ltd. präsentiert wurde. CLIP kann zur Stereolithographie gezählt werden, weist jedoch als Neuerung im Vergleich zu allen bisherigen generativen Fertigungsverfahren keine sichtbare Schichtstruktur auf (Abbildung 4).

Das Objekt entsteht durch eine ausgeklügelte Wechselwirkung von Materialhärtung durch UV-Licht und Unterbindung dieser Reaktion durch Sauerstoff. Am optischen Fenster unterhalb des Druckobjekts wird durch UV-Licht einerseits und Sauerstoff andererseits die Polymerisation des Harzes geregelt. Prinzipiell funktioniert dies durch gleichzeitiges Bestrahlen des Harzes und Diffusion von Sauerstoff in die Flüssigkeit durch das optische Fenster. Dadurch entsteht zwischen dem Fenster und polymerisierendem Material ein Spalt, in dem ausreichend Sauerstoff vorhanden ist, um die Reaktion vollständig zu unterdrücken. Wenn durch (kontinuierliches) Anheben der Bauplattform diese Grenze überschritten wird, beginnt das Harz zu vernetzen und damit auszuhärten [14].

Vor einigen Monaten erregte Carbon3D Aufmerksamkeit, als ihr Mitgründer und Vorstandsvorsitzender Joseph M. DeSimone während eines TED-Talks* das neue Verfahren vorstellte. Im Hintergrund lief der Drucker und fertigte in Rekordzeit eine komplexe Geometrie, was die neue Technologie in Szene setzte [15]. Es bleibt abzuwarten, ob das Unternehmen es vermag ihre Entwicklung ähn-

lich erfolgreich zu vermarkten, wie es ihnen in der Präsentation gelungen ist. Zurzeit sind die Geräte nur per Leasing erhältlich und preislich im Profi-Segment angesiedelt. (Link zum Video: https://www.ted.com/talks/joe_desimone_what_if_3d_printing_was_25x_faster)

Anwendungsgebiete der Additiven Fertigung Allgemeine Anwendungen

Ebenso explosiv wie die additiven Fertigungstechnologien weiterentwickelt wurden, werden auch Ideen neuer Anwendungen publiziert. Von Filmrequisiten im James-Bond-Film „Skyfall“ (Abbildung 5) über gedruckte Häuser in China, bis zu Stationen auf dem Mars wird über Anwendungen philosophiert [16]–[18].

Besondere Aufmerksamkeit erregte Anfang 2015 die Geschichte von Tukan-Dame „Grecia“. Der in Costa Rica heimische Vogel war von Jugendlichen schwer verletzt worden, sodass ihr Oberschnabel zur Hälfte abbrach. Das imposant bunte Organ ist nicht nur zur Kommunikation des Vogels wichtig, sondern auch für den Gleichgewichtssinn und zum Knacken seiner Nahrung relevant. Der verstümmelte Tukan wäre zweifelsohne verhungert, hätte sich nicht die Tierschutzorganisation ZooAve ihrer angenommen. Mithilfe von 3D-Scans der Wunde und Rekonstruktion des Schnabels durch 3D-Drucker konnte eine voll funktionale Prothese gefertigt werden (Abbildung 6). Mittlerweile bewohnt „Grecia“ ein Tierschutzzentrum in der Nähe von Costas Hauptstadt San José und erfreut sich bester Gesundheit [19].



Abb. 6 Tukandame Grecia wurde ein neuer Oberschnabel 3D-gedruckt. Heute lebt sie in einem Tierreservat in Costa Rica. [Bild: Rescate Animal ZooAve, Costa Rica]

* Hier geht es zum TED-Talk mit 3D-Druck:



Dieses anschauliche Beispiel zeigt, wie additive Fertigung in Zukunft gewinnbringend in der Medizin eingesetzt werden kann. Das Herstellen patientenspezifischer Pro- und Orthesen, welche durch präzises 3D-Scannen der betroffenen Extremitäten und anschließendes 3D-Drucken der Hilfsmittel erzeugt werden, wird damit demonstriert.

Trotz dieser friedlichen Anwendungen der additiven Fertigung, seien es bereits etablierte oder noch visionäre, muss sie wie jede neue Technologie auch mit Vorsicht genossen werden. Insbesondere seit dem 03. Mai 2013, als der Amerikaner Cody Wilson die erste 3D-gedruckte Handfeuerwaffe abfeuerte. 15 der 16 Bauteile der Pistole stammen aus einem 3D-Drucker, Nummer 16 war ein handelsüblicher Metallnagel. Die libertäre Organisation „Defense Distributed“, der er angehört, stellte nach dem Test die Konstruktionspläne online und ermöglichte damit theoretisch jedermann seine eigene Pistole zu fertigen. Noch bevor die US-Behörden die Verbreitung der Daten untersagten, wurden die Pläne bereits über 100.000-mal heruntergeladen [20].

Anwendungen in der Biotechnologie

Durch die beschriebenen Verfahren und Materialien bieten sich Anwendungen in der Biotechnologie und des Tissue Engineering (Gewebezüchtung) für additiv gefertigte Konstrukte an. Die Möglichkeiten erstrecken sich von individuellen Laborutensilien über gedruckte Gerüststrukturen (Scaffolds) für bestimmte Zelllinien bis hin zur Anwendung als (resorbierbare) patientenspezifische Implantate, die sich nach einer definierten Zeit im Körper auflösen und damit einen zweiten Eingriff unnötig machen.

Die Implementierung additiver Fertigungsverfahren in den Laboralltag ist Gegenstand vieler aktueller Forschungsarbeiten. Arbeitsgruppen in Deutschland und der Welt forschen anwendungs- und endnutzerorientiert an Möglichkeiten, diese neuen Technologien gewinnbringend einzusetzen. Im Folgenden soll beispielhaft gezeigt werden, an welchen Punkten eines Bioprozesses und dessen experimentellen Designs eine nützliche Verwendung möglich sein kann. Von individualisierbaren Kultivierungsgefäßen über Rührer für Bioprozesse bis hin zu Laborbedarf in der Proteinanalytik spannt sich ein weites Feld der (potenziellen) Anwendungsmöglichkeiten auf.

In der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie ist die Kultivierung von Mikroorganismen zur Gewinnung von medizinisch relevanten Naturstoffen ein Kerngebiet. Bevor Unternehmen wie Roche, Novartis oder Bayer jedoch im industriellen Maßstab von einigen tausend Litern die Produktion solcher Stoffe durchführen, muss die Entwicklungsabteilung zunächst viele Vorexperimente durchführen, um Qualität, Eignung und Produktivität zu prüfen. Dazu wird der Prozess zunächst in wesentlich kleinerem Maßstab und parallel in Screenings durchgeführt. Durch die Parallelisierung einer Vielzahl von Experimenten innerhalb kleiner Volumina können kosteneffizient Infor-

mationen über Organismen und physikalische Parameter für die Kultivierung gewonnen werden. Die dabei verwendeten Mikrotiterplatten (Abbildung 7) sind ein wichtiges Instrument beim Screening, also der Selektion, genmodifizierter Mikroorganismen wie *E. coli* oder *P. pastoris* und vor der Maßstabsvergrößerung (*Scale Up*) eines Prozesses ein relevanter Schritt.

Dabei werden (Bakterien-) Stämme nach bestimmten Merkmalen durchsucht, um im weiteren Verlauf den Organismus mit den besten Eigenschaften zu erhalten und die höchsten Ausbeuten zu erzielen (zum Beispiel in Hinblick auf die Produktion eines bestimmten Wirkstoffes). In Inkubatoren werden die Platten bei entsprechender Temperatur gehalten und stetig geschüttelt, um eine Durchmischung der Kultivierungsflüssigkeit in den Kavitäten (1–5 mL) der Mikrotiterplatte zu realisieren. Durch zu hohe Rotationsgeschwindigkeiten des Schüttlers können die Zellen jedoch beschädigt werden. Sobald die Schüttelrate zu gering ist, können sie sich am Boden ablagern und der Sauerstoffein-



Abb. 7 Additiv gefertigte Kultivierungsgefäße wie diese modulare Mikrotiterplatte aus Polymilchsäure können für jedes Experiment individuell gefertigt und auf die Ansprüche der verwendeten Organismen angepasst werden werden.



Abb. 8 Mit harzverarbeitenden SLA-3D-Druckern können funktionalisierte Kolbendeckel gefertigt werden. [Bild und Design Abb. 7 und 8: Lukas Raddatz]

trag nicht zum Überleben der Zellen ausreichen. Es muss also ein Optimum dieser wechselseitigen Beeinflussung gefunden werden.

In den letzten Jahren war die Entwicklung neuer Geometrien für solche Kultivierungsgefäße von Interesse, um den Sauerstoffeintrag zu verbessern. Funke *et. al.* testeten diverse Geometrien und untersuchten sie in Hinblick auf den Sauerstoffeintrag. Sie stellten fest, dass sich dieser im Vergleich zu klassischen runden Geometrien mehr als verdoppeln ließ, worauf sie in der Folge eine höhere Zelldichte erhielten [21]. Lücking *et. al.* entwickelten den Prozess in der Folgezeit dahingehend weiter, dass die gesamte Mikrotiterplatte mit veränderten Geometrien additiv gefertigt wurde. Dadurch lässt sich eine personalisierte Mikrotiterplatte erstellen, die genau den Anforderungen des Experiments und den zu kultivierenden Zellen entspricht [22].

Im nächsten Schritt auf dem Weg zum Pharmaprodukt steht die Kultivierung in einem größeren Maßstab. Dabei wird mit 50–1000 mL Medium kultiviert und in der Regel auf Schüttelflaschen zurückgegriffen.

Um genauere Informationen über die im Schüttelkolben befindlichen Organismen zu sammeln, muss stets ein physischer Zugriff möglich sein. Dazu oder beispielsweise auch zur Zugabe von Nährlösungen muss die Kultivierung unterbrochen werden, und eine homogene Durchmischung sowie eine konstante Temperatur der Zellsuspension können nicht weiter gewährleistet werden. Um das Kultivierungsgefäß öffnen zu können, muss unter einer sterilen Werkbank gearbeitet werden, damit Kontamina-

tionen vermieden werden. Durch diese Eingriffe in den Ablauf eines Kultivierungsprozesses können die Zellen Schaden nehmen und sowohl die Ergebnisse als auch die Reproduzierbarkeit des Experiments beeinträchtigt werden.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde mithilfe der Technologie der additiven Fertigung ein Kolbendeckel entwickelt, der es ermöglicht, ohne Unterbrechung des Kultivierungsprozesses und ohne Öffnen des Kolbens Proben zu entnehmen oder Zusätze zuzugeben (Abbildung 8). Großer Wert bei Design und Umsetzung des Deckels wurde auf die Verwendung standardisierter Komponenten gelegt, um die Implementierung in den Laboralltag möglichst simpel zu gestalten.

Der Kolbendeckel basiert auf handelsüblichen Schüttelkolben-Deckeln, die in (fast) jedem biotechnologisch oder chemisch ausgerichtetem Labor verwendet werden [24]. Die Zugabe und Entnahme verläuft über *Luer-Lock*-Anschlüsse, welche ebenfalls einen Standard-Anschluss darstellen und auf der Oberseite des Deckels platziert sind. Durch Verwendung von Spritzenvorfiltern kann beispielsweise die sterile Zugabe einer *Feed-Lösung* während des laufenden Bioprozesses durchgeführt werden. Die Probenahme erfolgt über einen innenseitig liegenden Schlauchadapter, welcher in die Kulturbrühe ragt.

Die grundlegende Besonderheit dieses 3D-gedruckten Deckels ist die Möglichkeit der Individualisierung für spezifische Experimente. Die Komponenten (zum Beispiel *Luer-Lock*-Anschlüsse, Schlauchadapter und Gewinde) sind beliebig kombinierbar, modifizierbar und mithilfe additiver Fertigung zeitnah realisierbar und auch in geringen Stückzahlen verfügbar. Hierzu ist schlicht der entsprechende CAD-Bauplan anzupassen.

Darüber hinaus wurde mithilfe der SLS-Technologie ein Modul entwickelt, mit dem der pH-Wert in Schüttelkolben geregelt werden kann [23].

Wird der Bioprozess weiterentwickelt und werden Volumina von mehreren Litern erreicht, genügt die oben beschriebene orbitale Schüttelbewegung eines Inkubators meist nicht mehr aus und es muss auf eine andere Mischtechnik zurückgegriffen werden. Die Vermischung erfolgt jetzt über an einer Welle montierte Rührer. Das Design dieser Rührelemente variiert und muss für jeden Bioprozess individuell überdacht werden. Auch hier spielen die Scherbeanspruchung bei zu hoher Rührgeschwindigkeit und ein zu geringer Sauerstoffeintrag bei zu niedriger Geschwindigkeit entscheidende Rollen. Mithilfe additiver Fertigung können die Rührer im eigenen Labor *just-in-time* hergestellt und verwendet werden (Abbildung 9).

Die bisher beschriebenen Möglichkeiten der Anwendung in der Biotechnologie waren im Bereich des „Upstream“ (Prozessentwicklung). Dieses Gebiet umfasst die Kultivierung der Zellen und die Herstellung des gewünschten Produkts durch diese. Im Folgenden muss das Zielmolekül jedoch noch aufgereinigt und analysiert werden. Auch hier bietet sich die 3D-Drucktechnologie an.

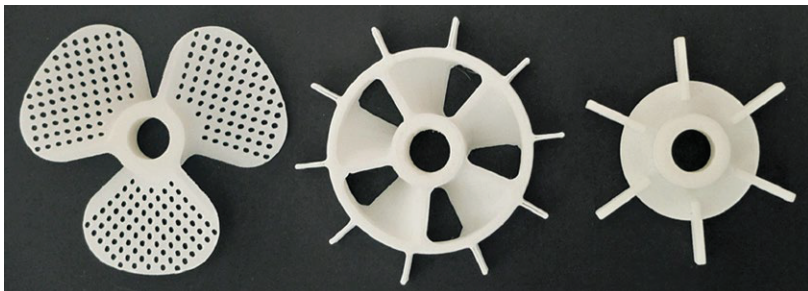


Abb. 9 Durch hohe Freiheitsgrade in Design und Fertigung können neue Formen erdacht und realisiert zu werden. Beispielhaft sind modifizierte Marine-Type-, hybride und Rushton-Rührer für Bioprozesse gezeigt. [Bild und Design: Lukas Raddatz]

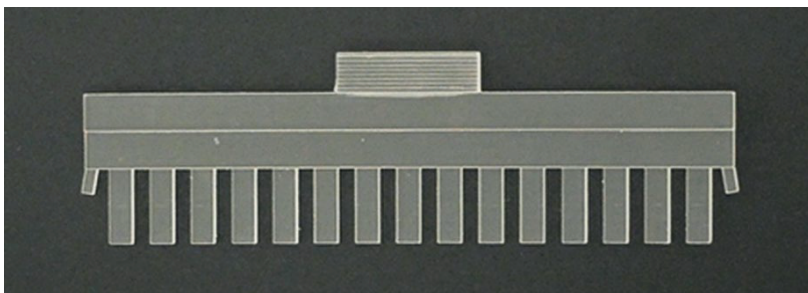


Abb. 10 Labware wie ein zur Proteinanalytik verwendeter SDS-PAGE-Gelkamm, kann mithilfe eines 3D Druckers *just-in-time* für den Eigenbedarf produziert werden. [Bild und Design: Lukas Raddatz, nach [24]].

Bei der Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), eine Standardmethode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe, wird ein Gel-Kamm benötigt, der „Geltaschen“ erzeugt (Abbildung 10). Durch Kontakt mit den Chemikalien und hochfrequentierten Gebrauch wird der Verschleiß des Kamms beschleunigt, was wiederum den Misserfolg oder Erfolg des Experiments beeinflussen kann.

An dieser Stelle bietet sich die wesentlich kostengünstigere und darüber hinaus schnellere Fertigung geringer Stückzahlen mithilfe eines 3D-Druckers bei Bedarf an. In der gezeigten Anwendung wurde auf die SLA-Technologie zurückgegriffen, bei der Epoxidharze verdrückt werden, dessen Eigenschaften (Lösemittel-, und Temperaturbeständigkeit) die notwendigen Kriterien hierfür erfüllen. Durch die Flexibilität des polymerisierten Harzes ist der gedruckte Kamm bruchunempfindlich und kann problemlos im Laboralltag implementiert werden. Auch in dieser Anwendung ist die hohen Individualisierbarkeit von Nutzen. Die Anzahl und das Volumen der Geltaschen kann individuell gewählt werden. Auf diesem Weg kann in einem Experiment mit unterschiedlichen Probenvolumina gearbeitet werden [24].

Anwendungen im Bereich „Rapid Prototyping“ und „Rapid Tooling“

Die Additive Fertigung kann auch im Bereich des schnellen Prototypenbaus („Rapid Prototyping“) und schnellen Werkzeugbaus („Rapid Tooling“) von Nutzen sein. Viele Bauteile, deren Fertigung bisher nur mithilfe gut ausgestatteter Mechanikwerkstätten möglich war, können wesentlich unkomplizierter 3D-gedruckt werden, da zum Beispiel nicht lineare Strukturen direkt eingefügt werden können.

Ausblick

Die mit der additiven Fertigung einhergehenden revolutionären Vorteile gegenüber klassischen Fertigungsverfahren sind unbestritten und werden die Zukunft der Fertigungstechnik und Produktionstechnik nachhaltig beeinflussen. In diesem Zusammenhang wird analog zur Erfindung des Buchdrucks durch Johannes Gutenberg und der folgenden „Demokratisierung des Wissens“ von der „Demokratisierung der Fertigung“ gesprochen. Ersatzteile, Werkzeuge oder „Gadgets“ könnten im heimischen Wohnzimmer gefertigt werden und den Gang zum Baumarkt überflüssig machen.

Noch größere Folgen kann man in der Industrie erwarten, wenn hochwertige Lasersinter-3D-Drucker die Zulieferung von (Metall-)Bauteilen überflüssig machen. Ökonomisch wie ökologisch wird die Gesellschaft davon profitieren. Lagerkosten werden reduziert, da *just-in-time* gefertigt werden kann und Unsicherheitsfaktoren wie Lieferung entfallen. Daraus resultiert direkt der ökologische Nutzen. Der ökologische Fußabdruck des Rohmaterials ist wesentlich geringer als jener von fertigen, verpackten und unhandlicheren Fertigwaren.

Dass additive Fertigungsverfahren traditionelle komplett ablösen werden, gilt jedoch als unwahrscheinlich. In absehbarer Zeit werden eher hybride Prozessketten aus generativen, konventionellen und voll- und teilautomatisierten Prozessen die Produktion prägen und die Vorteile beider Verfahren nutzen [5].

Ein weiteres, sich derzeit entwickelndes Forschungsgebiet ist das Bioprinting, bei dem lebende Zellen direkt zu 3D-Konstrukten gedruckt werden. Mithilfe dieser Technologie erhofft man sich, in Zukunft tierisches Zellgewebe besser simulieren zu können und damit Tierversuche zum Teil überflüssig zu machen und zudem funktionale Organe nachbilden zu können.

Sicher ist, dass durch das große gesellschaftliche Interesse verbunden mit hohem Forschungs- und Entwicklungsaufwand in Industrie und Academia die additive Fertigung schnell in unseren Alltag einziehen wird.

Zusammenfassung

Der 3D-Druck wird als disruptive Technologie eingeschätzt, der die Art, wie Produkte hergestellt werden, stark verändern wird. Die neue Technologie unterscheidet sich fundamental von subtraktiven Verfahren, wie Fräsen, Schleifen oder formenden Verfahren wie Gießen, Pressen oder Biegen. Das herzustellende Objekt wird durch Hinzufügen oder Auftragen

WAS MAN WISSEN MUSS

- Das auftragende Prinzip des 3D-Drucks verleiht der Technologie konstruktive Freiheiten, die über jene konventioneller Fertigungsstrategien hinausgehen.
- Durch Entwicklung neuer Materialien eröffnen sich stetig neue Anwendungsmöglichkeiten, die über eine Verwendung als Prototypen hinausgehen.
- In chemischen und biotechnologischen Forschungslaboratorien werden häufig hochspezialisierte Bauteile und „Labware“ benötigt. Per 3D-Druck sind diese schneller und günstiger verfügbar als bisher.
- Durch die maßgeschneiderte Herstellung benötigter Teile entfallen Lieferzeiten und –kosten: Bauteile stehen sofort zur Verfügung.
- Hybride Prozessketten aus generativen, konventionellen sowie voll- und teilautomatisierten Prozessen werden die Zukunft der Produktion prägen.
- Der 3D-Druck lebender Zellen, das Bioprinting, ermöglicht das Drucken 3-dimensionaler Zellkonstrukte.

TAKE-HOME MESSAGES

- Due to its generative principle, 3D printing provides higher degrees of freedom compared to conventional manufacturing strategies.
- Continuous material development leads to new applications beyond prototyping.
- In chemical and biotechnological research laboratories, highly specific labware is used. With 3D printing technologies, these parts can be provided faster and at lower costs.
- Custom-made 3D printing building parts decrease shipping costs and are available faster if printed in house.
- Hybrid process chains containing generative, conventional and fully and partly automatic processes will shape future production.
- 3D printing of living cells, the so called bioprinting, enables the construction of 3 dimensional cell cultures.

neuen Materials, also additiv, aufgebaut. Durch dieses generative Verfahren ergeben sich einige Vorteile gegenüber klassischen Methoden. Eine Reihe von Methoden und Materialien wurden entwickelt, andere stehen kurz vor der Marktreife.

Summary

3D printing unquestionably can be described as a disruptive technology, that will shape our future and the way products are manufactured. The generative process is based on a layer-by-layer manufacturing principle of the product and fundamentally differs from conventional manufacturing techniques like cutting, casting or other subtractive procedures. A plenty of techniques and corresponding materials are developed and ready to conquer the markets. Especially in the field of chemistry and biotechnology the regulatory hurdles are high in order to ensure both product quality and security - yet due to well developed 3D printing materials, applications are already possible. It can be a major asset in experimental design and conduction.

Schlagwörter

Additive Fertigung, 3D-Druck, Biotechnologie

Literatur

- [1] M. Ponsford and N. Glass, *The night I invented 3D printing*, CNN, Atlanta, GA, 2014; <http://edition.cnn.com/2014/02/13/tech/innovation/the-night-i-invented-3d-printing-chuck-hall/index.html>.
- [2] D. R. Smalley, T. J. Vorgitch, C. R. Manners, C. W. Hull und S. L. VanDorin, Simultaneous Multiple Layer curing in Stereolithography, US Patent 5,597, 520, 1997.
- [3] C. Deckard, Apparatus for producing parts by selective sintering, US Patent 4,863, 538, 1997.
- [4] J. Manyika, M. Chui, J. Bughin, R. Dobbs, P. Bisson und M. Marrs, *Disruptive technologies: Advances that will transform life, business, and the global economy*, McKinsey Global Institute, New York, NY, 2013, S. 163.
- [5] F. G. Müller, M. Bressner, D. Görzig und T. Röber, *Industrie 4.0: Entwicklungsfelder für den Mittelstand – Aktuelle Hemmnisse und konkrete Bedarfe*, (Hrsg.: T. Bauernhansl), IPA, Stuttgart, 2016, S. 76.
- [6] M. Grund, *Implementierung von schichtadditiven Fertigungsverfahren*, Vol. 4, Springer Berlin, Heidelberg, 2015.
- [7] B. Berman, *Business Horizons* 2012, 55, 155–162.
- [8] T. Kellner, *Jet Engines With 3D-Printed Parts Power Next-Gen Airbus Passenger Jet*, GE Reports, 2015; <http://www.ge.com/reports/post/119370423770/jet-engines-with-3d-printed-parts-power-next-gen/>.
- [9] ASTM International, *ASTM F2792-12a - Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies*, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013, S. 1–3; <http://web.mit.edu/2.810/www/files/readings/AdditiveManufacturingTerminology.pdf>.
- [10] A. Bowyer, R. Jones, P. Haufe, E. Sells, P. Irvani, V. Olliver und C. Palmer, *Robotica* 2011, 29, 177–191.
- [11] T. A. Almqvist, B. J. L. Bedal, J. M. Earl, R. P. Fedchenko, C. W. Santa Clarita Hull, T. A. Kerekes, R. N. Leyden, M. S. Lockard, C. M. Merot, T. H. Pang, D. R. Smalley, T. Dinh That und J. S. Thayer, Modelling by Selective Deposition of Material to Form Three-Dimensional Objects, DE1996634921, 1996.
- [12] W. König und F. Klocke, *Fertigungsverfahren 3 Abtragen und Generieren*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1997.
- [13] W. J. Elspass, M. Kleefoot und P. Relations, *ZHAW-Masterstudenten entwickeln neuartigen 3D-Drucker*, ZHAW School of Engineering, Winterthur, 2016; <https://www.zhaw.ch/de/engineering/ueber-uns/news/news-single/zhaw-masterstudenten-entwickeln-neuartigen-3d-drucker/>.
- [14] J. R. Tumbleston, D. Shirvanyants, N. Ermoshkin, R. Januszewicz, A. R. Johnson, D. Kelly, K. Chen, R. Pincus, J. P. Rolland, A. Ermoshkin, E. T. Samulski und J. M. DeSimone, *Science* 2015, 347, 1349–1352.
- [15] J. DeSimone, *What if 3D printing was 100x faster?* TED.com, 2015.
- [16] Voxeljet AG, *Voxeljet Baut Aston Martin Modelle für Skyfall*, Voxeljet AG, Augsburg, 2012.
- [17] M. Morris, C. Ciardullo, K. Lents, J. Montes, O. Rudakevych, M. Sono, Y. Sono und Melodie Yashar, *Martian Ice Habitats: Approaches to Additive Manufacturing with H 2 O Beyond Mars Ice House*, AIAA SPACE 2016, Long Beach, CA, 2016.
- [18] M.-A. Russon, *China: Recycled Concrete Houses 3D-Printed in 24 Hours*, International Business Times, New York City, NY, 24-Apr-2014, 2014; <http://www.ibtimes.co.uk/china-recycled-concrete-houses-3d-printed-24-hours-1445981>.

- [19] S. Simon, *After Losing Half A Beak, Grecia The Toucan Becomes A Symbol Against Abuse*, National Public Radio, Washington, DC, 2016; <http://www.npr.org/sections/parallels/2016/08/27/491372643/after-losing-half-a-beak-grecia-the-toucan-becomes-a-symbol-against-abuse>.
- [20] M. Fey, *Waffen aus dem 3D-Drucker: Additives Fertigen als sicherheitspolitisches Risiko?*, Leibnitz-Institut Hessische Stiftung Friedens- und Konfliktforschung (HSFK), Frankfurt am Main, 2016.
- [21] M. Funke, S. Diederichs, F. Kesy, C. Müller und J. Büchs, *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 103, 1118–1128.
- [22] T. H. Lücking, F. Sambale, S. Beutel und T. Scheper, *Eng. Life Sci.* 2015, 15, 51–56.
- [23] C. Ude, T. Hentrop, P. Lindner, T. H. Lücking, T. Scheper und S. Beutel, *Sens. Actuators B* 2015, 221, 1035–1043.
- [24] L. Raddatz, I. Vries, J. Austerjost, A. Lavrentieva et al., Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes in *Eng. Life Sci* 2017.

Die Autoren



Lukas Raddatz, Jahrgang 1987, studierte in Hannover und Boston Life Science und erlangte 2014 seinen Masterabschluss an der Leibniz Universität Hannover.



Jonas Austerjost, Jahrgang 1989, studierte in Hannover und Stanford Life Science und erlangte 2014 seinen Masterabschluss an der Leibniz Universität Hannover.

Seitdem promovieren sie in einer Kooperation am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover bei Prof. Thomas Scheper und am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie bei Prof. Thomas Becker an der Technischen Universität München. Innerhalb ihrer Promotionsprojekte beschäftigen sie sich mit neuartigen Automationslösungen für die Laborumgebung und der Evaluierung von 3D-Drucktechnologien für Anwendungen im Bereich der Chemie und Biotechnologie.



Sascha Beutel, Jahrgang 1971, studierte Chemie an der Leibniz-Universität Hannover und promovierte dort im Jahr 2000 am Institut für Technische Chemie. Heute leitet er eine eigene Forschungsgruppe und forscht sowohl an enzymtechnologischen Verfahren, Methoden zur Aufarbeitung biotechnologischer Produkte, an neuen Sensorkomponenten sowie daran, neue Technologien für das Labor zu adaptieren, wie z. B. den 3D-Druck oder den LabGlasses, einer Kombination von Laborschutzbrille mit innovativer Datenbrillenfunktion.

Korrespondenzadresse:

Dr. Sascha Beutel
Leibniz Universität Hannover
Institut für Technische Chemie
Callinstr. 5
30167 Hannover
E-Mail: beutel@iftc.uni-hannover.de

4 Experimenteller Teil

Dieses Kapitel setzt sich aus drei wissenschaftlichen Publikationen zusammen, die sich mit verschiedenen Gebieten der additiven Fertigung im Bereich der Biotechnologie und der Chemie beschäftigen.

Die Schwerpunkte liegen bei der Entwicklung innovativer Laborutensilien, der Testung und Charakterisierung verschiedener Biopolymere zur Implantatentwicklung und -produktion und neuer Methoden des 3D-Bioprinting. Dabei werden zunächst Möglichkeiten der Entwicklung und Fertigung von Laborutensilien diskutiert und Beispiele vorgestellt. Es folgt eine Studie über die Anwendbarkeit verschiedener Polymere zur additiven Fertigung von resorbierbaren Implantaten. Des Weiteren beschäftigt sich das letzte Kapitel mit dem 3D-Bioprinting von Natriumalginat basierten Hydrogelen. Dafür wurde ein innovatives Setup entwickelt, mit dem vernebeltes Calciumchlorid-Lösung als Induktor zur Polymerisation des Alginats verwendet werden kann.

Darüber hinaus wurde sich im Rahmen von Kooperationen (Kapitel 7.2) mit weiteren Fragestellungen beschäftigt:

Im Zuge der Digitalisierung wird sich auch die Infrastruktur biotechnologisch und chemisch orientierter Laboratorien verändern. Prozesse werden automatisiert und Laborgeräte zunehmend vernetzt werden. Um diese Entwicklung aktiv mitzugestalten wurde auf mehreren Ebenen, analog zum Zukunftsprojekt „Industrie 4.0“ des Bundes, am sogenannten „Labor 4.0“ geforscht. In diesem Kontext wurde ein Laborpraktikum entwickelt, das die Studierende auf den Gebieten innovativer Technologien (Additive Fertigung, *Augmented Reality*) schulen soll, welche in Zukunft eine wichtige Rolle spielen werden. Der eintägige Praktikumsversuch ist im Sommersemester 2017 in das Curriculum der Studiengänge Life Science und Chemie der Leibniz Universität Hannover sowie des Studiengangs Technologie Nachwachsender Rohstoffe der Hochschule Hannover aufgenommen worden.

Neben den hier präsentierten Entwicklungen im Bereich Laborbedarf, wurden verschiedene Kultivierungssysteme entworfen und aus Polylaktid FDM-3D-gedruckt. 6-Wellplates wurden mit dem Ziel einer reduzierten Mischzeit und optimierten Sauerstoffeintrags neu designt und die Mischzeiten, mithilfe eines Algorithmus auf Grundlage von Hochgeschwindigkeitskameraaufnahmen, ermittelt.

Teile dieser Forschungsarbeiten wurden auf der Biotechnologie- und Automatisierungs- Messe „LabVolution“ 2015 und 2017 im Rahmen des „smartLAB“ präsentiert an deren Realisierung der Autor aktiv mitgewirkt hat.

4.1 Entwicklung individualisierbarer und modularer 3D gedruckter Labware

Additive Fertigungsmethoden und die damit einhergehenden neuen Möglichkeiten im Design und in der Produktion selbst komplexer Geometrien werden, sowohl in Fachkreisen als auch der Gesellschaft, viel und kontrovers diskutiert. Bedingt durch auslaufenden Patentschutz, sind heute zunehmend hochqualitative 3D-Druck-Verfahren und Materialien allgemein verfügbar. Die Qualität der Erzeugnisse hinsichtlich ihrer physikalischen (wie Form- und Hitzestabilität) und (bio)chemischen (Lösemittelbeständigkeit, Biokompatibilität) Eigenschaften eröffnen heute Anwendungsbereiche, die über reinen Prototypenbau weit hinaus gehen.

Im Rahmen des ersten Teils der beschriebenen Arbeiten wurden zwei 3D-Druck-Verfahren und entsprechende Materialien untersucht. Es wurde ein neuartiger Kolbendeckel designt und getestet und ein Probenauftrags-Kamm für gelelektrophoretische Analysemethoden gefertigt. Beide Produkte wurden aus verschiedenen Photopolymeren 3D-gedruckt.

Der SLA gefertigte Kolbendeckel ist modular aufgebaut, sodass er für Anwendungen modifizierbar und individualisierbar ist. Es wird ein Anwendungsbeispiel für einen Fed-Batch-Prozess präsentiert. Mithilfe des Kolbendeckels wird die unterbrechungsfreie Probenahme und Zugabe (Nährmedium, Induktionslösungen o.Ä.) während biotechnologischer Prozesse im Schüttelkolbenmaßstab (20-500 mL) ermöglicht wodurch Kontaminationsrisiken minimiert und der Prozess kontinuierlich betrieben werden kann.

Um die Implementierung des Deckels in der bestehenden Laborumgebung umzusetzen, wurde beim Design auf die Verwendung von Laborstandards (Luer-Konnektoren, Schlauchadapter, Gewinde) geachtet. Die dem Kolbendeckel zugrundeliegenden „digitalen Blaupausen“ (.ipt- beziehungsweise .stl-Dateien) enthalten alle Informationen über die Geometrie der Bestandteile und zeichnen sich durch ihren modularen Aufbau aus: Bereits in der *in-silico* Planungsphase wurde bei Platzierung und Design der Elemente auf Flexibilität geachtet, was die Möglichkeit der bedarfsweisen Anpassung der Anzahl, Größe und Platzierung der Elemente (Schlauchadapter, Luer-Konnektoren, Sauerstoffmembran) erlaubt.

In der hier präsentierten Arbeit wird ein *proof-of-concept* für die generelle Anwendbarkeit des Kolbendeckels und des 3D-Druckverfahrens anhand eines *Escherichia coli* (*E. coli*) Fed-Batch-Bioprozesses gebracht. Der Modellprozess lief über einen Zeitraum von 12 h bei 37 °C in definiertem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Bei Prozessbeginn wurde eine sehr geringe Zufütterungsrate von 0,25 mL/h eingestellt, um eine Glukoseakkumulation zu vermeiden. Nach 5 h Kultivierungsdauer wurde die Rate auf 0,5 mL/h erhöht. In dem Prozess konnte eine maximale Wachstumsrate von unter 0,5 h⁻¹ erreicht werden.

Die zweite Anwendung demonstriert wie einfache und doch individualisierbare Laborgegenstände additiv gefertigt werden können. Es wurde ein SDS-PAGE-Gelkamm designt und mit einem MJP-3D-Drucker gefertigt. Fokus lag hierbei auf der Demonstration der Möglichkeiten von *in-house* gefertigter *Labware*. Lieferkosten und –zeiten können minimiert und die Utensilien *just-in-time* nach Bedarf gefertigt werden.

Darüber hinaus wurden die zum Druck verwendeten Photopolymere (Epoxyharze) auf ihren Einfluss auf pro- und eukaryotische Modellorganismen evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass keins der Materialien einen negativen Effekt auf die Zellviabilität der Organismen hat. Die Viabilitäten beziehungsweise Wachstumsraten lagen dabei über jenen der Vergleichsproben. L-929 Fibroblasten zeigen hier eine um 6,2 % erhöhte Viabilität, NIH-3T3-Zellen um 5,1 %. Zur Bewertung des Einflusses des Materials auf prokaryotische Zellen, wurde das Zellwachstum von *E. coli* ermittelt. Dieses lag bei 6,7 % über der Kontrolle.

Im folgenden Artikel „Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes“ (2017) erschienen in *Engineering in Life Sciences* sind die weiterführenden Experimente und Ergebnisse dargestellt.

Lukas Raddatz^{1,2}Ingo de Vries¹Jonas Austerjost^{1,2}Antonina Lavrentieva¹Dominik Geier²Thomas Becker²Sascha Beutel¹Thomas Scheper¹

Research Article

Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes

Yet already developed in the 1980s, the rise of 3D printing technology did not start until the beginning of this millennium as important patents expired, which opened the technology to a whole new group of potential users. One of the first who used this manufacturing tool in biotechnology was Lücking et al. in 2012, demonstrating potential uses [1,2]. This study shows applications of custom-built 3D-printed parts for biotechnological experiments. It gives an overview about the objects' computer-aided design (CAD) followed by its manufacturing process and basic studies on the used printing material in terms of biocompatibility and manageability. Using the stereolithographic (SLA) 3D-printing technology, a customizable shake flask lid was developed, which was successfully used to perform a bacterial fed-batch shake flask cultivation. The lid provides Luer connectors and tube adapters, allowing both sampling and feeding without interrupting the process. In addition, the digital blueprint the lid is based on, is designed for a modular use and can be modified to fit specific needs. All connectors can be changed and substituted in this CAD software-based file. Hence, the lid can be used for other applications, as well. The used printing material was tested for biocompatibility and showed no toxic effects neither on mammalian, nor on bacteria cells. Furthermore an SDS-PAGE-comb was drawn and printed and its usability evaluated to demonstrate the usefulness of 3D printing for everyday labware. The used manufacturing technique for the comb (multi jet printing, MJP) generates highly smooth surfaces, allowing this application.

Keywords: 3D-printing / Fed-batch / Individual labware / Shake flask / Stereolithography

Received: March 7, 2017; *revised:* May 9, 2017; *accepted:* July 13, 2017

DOI: 10.1002/elsc.201700055

¹Institute of Technical Chemistry, Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover, Germany

²Institute of Brewing and Beverage Technology, Forschungszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, Germany

1 Introduction

1.1 3D-printing technology for biotechnological applications

In the early 1980s, the US American engineer Chuck W. Hull invented a new manufacturing method, which was based on a layer-by-layer deposition of 3D geometries using laser technology to solidify a special liquid photopolymer. This so-called stereolithography (SLA) approach is nowadays known to be one of the most competitive 3D-manufacturing technologies in terms of quality and price of its products [3]. Within the past decade

plenty of 3D-printing techniques and corresponding materials were developed [4]. In other fields this technology is an established prototyping method and already used for actually construction parts, e.g. for plane engines.

The technology, also known as additive manufacturing (AM) can be divided into three main branches according to their functional principle: AM on powder basis, AM with fused filament fabrication and AM on liquid or gaseous basis [5].

Those methods differ in set-up, printing material and technique, but are based on the same generative layer-by-layer manufacturing principle. They fundamentally differ from conventional manufacturing techniques like cutting, casting or other subtractive procedures such as subtractive computerized numerical control (CNC) milling [6].

The main advantage of AM is the construction of complex compounds without tools in a short time. Processing from a virtual model to the finished device can be accomplished much easier and even contorted parts like flow-channels, inlets etc. can be integrated as needed. Furthermore, modification of existing

Correspondence: Dr. Sascha Beutel (beutel@ifc.uni-hannover.de), Institut für Technische Chemie, Gottfried-Wilhelm-Leibniz Universität Hannover, Hannover, Germany

Abbreviations: AM, additive manufacturing; CAD, computer-aided design; CAM, computer-aided manufacturing; MJP, multi jet printing; PES, polyether sulfone; SLA, stereolithography

elements by reprinting accelerates the developing process [6]. AM also could enable mass customization of goods in a larger scale [7].

Even in the field of biotechnology and chemistry, where regulatory hurdles are high in order to ensure both product quality and security, the use of 3D-printing techniques is feasible and can be an asset. A wide range of printing techniques with corresponding high quality materials enable this. Within the past decade the supply of materials increased significantly and subsequently new fields of application are within reach [7].

Lücking et al. showed the general applicability of 3D-printing and accomplished to manufacture individual labware for the use in biotechnological contexts. Therefore, the printing material has to fulfill several characteristics: mandatory demands like biocompatibility and nonleaching behavior and optional properties as steam sterilization [2]. In addition to that, physical properties are important for a straightforward implementation in the laboratory daily routine (e.g. tensile strength and chemical inertness).

Highly specific labware, if purchasable at all, often comes with high costs in acquisition and risk of long production and shipping times. The labware shown in this study is based on standardized elements, which can all be combined and 3D-printed. This allows just-in-time manufacturing of highly specific labware at low-cost on demand.

1.2 Fed-batch processes

Cultivation conditions within biotechnological production can be divided into three main groups (batch, fed-batch, and continuous cultivation). Batch processes provide easy handling as all media components are filled in the bioreactor before inoculation. However, in many cases a dynamic pH adjustment and an active aeration is performed [8]. In fed-batch processes one or more media components are supplied during the cultivation process and all liquid remains in the bioreactor until the end of the cultivation [8,9]. During continuous cultivation processes media is constantly brought into the bioreactor, while at the same rate reactor content is removed, as the liquid volume inside the bioreactor is constant [8]. For industrial production, fed-batch processes are well accepted, especially if a high cell concentration is needed [9]. Nevertheless most screening experiments are performed in shake flasks in batch mode without active pH-control [8–10]. Thus, information gained in shake flasks in batch mode cannot be directly used for the prediction of the future production process in fed-batch mode. Therefore different fed-batch techniques in shake flasks have been developed. In previous studies fed-batch processes in shake flasks have been accomplished by feeding media compounds through a special shake flask lid, a pH-stat titration dosage module, an enzyme controlled glucose auto-delivery or a nutrient release out of silicone elastomer discs [9,11–14].

This study aims at the use of a customized, 3D-printed parts for the application within biotechnological experiments and the toxicological assessment of the used material. With a customized shake flask lid the possibility of an easy noninterrupted fed-batch process in a shake flask should be shown. The use of a 3D-printed SDS-PAGE comb should show that the properties of the

manufactured parts can already compete with the quality of conventional labware. After design and construction of the shake flask lid, materials' biocompatibility was tested and the lid was used in a model process using *Escherichia coli* K1 in a fed-batch process with substrate limitation in a shake flask. The manufactured SDS-PAGE comb was tested with a handcast polyacrylamide gel. Furthermore, chemical stability was investigated.

2 Materials and methods

2.1 CAD modeling and 3D-printer technology

The manufactured shake flask lid, the SDS-PAGE comb and the objects used to perform the biocompatibility assay were constructed with the computer-aided design (CAD) software Autodesk Inventor Professional 2015 (Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA). For the lid's manufacturing, SLA 3D-printer Form 2 (Formlabs Inc., Boston, MA, USA) was used. Formlabs' High-Temp (HTAM01) was used as printing material (printing time 9 hours at printers' highest resolution). The material is stable, both chemically and physically to high temperatures and pressures, which allows steam sterilization [15]. The biocompatibility was tested and is described in Section 2.4.

The z-axis (vertical dimension) resolution of the 3D-printed products was set to 25 μm . The resin temperature during the 3D-print was 30°C. Before removing the supporting material, the 3D-printed objects were rinsed with water, dried, cleaned with pressurized air and postcured for 60 min with ultraviolet (UV) light. Preceding the heat steam sterilization and the usage for the fed-batch process, a polyether sulfone (PES) membrane was glued to the inside top of the lid, in order to assure a sterile oxygen transfer.

For manufacturing the SDS-PAGE comb, the multi jet printing (MJP) ProJet 2500 (3D Systems, Rock Hill, South Carolina, USA) 3D-printer was used. Printing material was Visi-Jet M2-RCL [16] (printing time 30 min). Postprocessing included freezing the build plate including the printed objects (−18°C, 5 min) removal of support material with heat steam and incubation in oil bath (50°C, 15 min). Objects were then rinsed with water.

Chemical stability was tested and is described in Section 2.5.

2.2 Chemicals

Used bulk chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Corp. (Taufkirchen, Germany). Deionized water was prepared with Arium® (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany).

2.3 Bacterial strains, cell lines, and stock cultures

Escherichia coli (*E. coli*) B2032/82 serotype K1 (wild-type strain, clinical isolate [17]) was used for bacterial biocompatibility testing and the shake flask fed-batch cultivation process. *E. coli* stock cultures were stored at −80°C in 50% v/v glycerol. For mammalian cell biocompatibility testing fibroblast cell lines L-929

and NIH-3T3 (Cell Line Service GmbH, Eppelheim, Germany) were used.

2.4 In vitro biocompatibility assays

Cell lines and culture conditions: the biocompatibility assays were conducted with three different organisms mentioned in Section 2.3. For biocompatibility testing, 3D-printed constructs ($5 \times 5 \times 5$ mm cubes) were sterilized with ultra violet (UV) light for 1 h and afterwards incubated with the respective cell suspension.

2.4.1 In vitro biocompatibility testing with mammalian cells

2.4.1.1 Cell culture preparation. Fibroblast cell lines L-929 and NIH-3T3 were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Aldrich Corp., Taufkirchen, Germany) supplemented with 10% v/v fetal calf serum (FCS) (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) and 1% v/v Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) and subcultured until required for assay treatment. Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% v/v CO₂ in air. Cell number and viability in the trypsinized cell suspension were determined using trypan blue exclusion method in a haemocytometer.

2.4.1.2 Sample preparation and viability assay. In order to evaluate the potential toxicity of leachables from material after 3D-printing the extract preparation was performed according to ISO 10993–12:2012. Extraction samples were prepared by incubation of printed constructs at 37°C for 72 h with an extraction ratio (surface area/volume) of 3 cm²/mL. After extraction, 100 µL of extract samples were transferred to 96-well plates containing the respective cells (8000 cells/well, four wells per extract sample). Cell culture medium incubated for 72 h at 37°C without 3D-printed constructs was used as control. For in vitro cytotoxicity evaluation cells with extract samples were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% v/v CO₂ in air for approximately 24 h. After 24 h of treatment, the Cell Titer Blue® (CTB) assay was conducted using a kit purchased at Promega Corp., (Madison, Wisconsin, USA) according to manufacturer conditions.

2.4.2 In vitro biocompatibility testing with bacterial culture

Additionally to the mammalian cell biocompatibility, microbial biocompatibility was evaluated. *E. coli* K1 cultures for biocompatibility assay were conducted in defined media as described in Section 2.4.2.1.

2.4.2.1 Cell growth determination (bacterial cells). *E. coli* K1 was pre-cultured in 500 mL baffled shake flasks with 100 mL complex medium consisting of yeast extract (10 g/L), tryptone (10 g/L) and NaCl (5 g/L) at pH 7.3. For *E. coli* K1 cultivation a rotary shaker was used at 180 min⁻¹ and 37°C for 8 h.

Pre-preculture cell suspension (20 µL) was used to inoculate defined media consisting of K₂PO₄ (9.3 g/L), KH₂PO₄ (2.03 g/L), Glucose (20 g/L), (NH₄)₂SO₄ (10 g/L), NaCl (1.2 g/L), K₂SO₄ (1.1 g/L), CaCl₂ (0.013 g/L) and 1 mL trace elements [MgSO₄ × 7 H₂O (150 g/L), FeSO₄ × 7 H₂O (1 g/L) and CuSO₄ × 5 H₂O (1 g/L)] at pH 7.5 in a 500 mL baffled shake flask with 100 mL cultivation volume (37°C, 180 min⁻¹, 15 h). With the resulting cell suspension 2 mL of defined media were inoculated to an OD₆₀₀ 0.46 in the cavities of a six well plate, each a triplet with printed constructs and without (control triplet). After 5 h cultivation (37°C, 250 min⁻¹) the OD₆₀₀ was measured. The surface/volume ratio was 3 cm²/mL of culture.

2.5 Chemical stability testing and surface analysis on SDS-PAGE comb printing material

To ensure proper chemical stability, $5 \times 5 \times 5$ mm cubes of printing material (see Section 2.1) were incubated for 2 h in isopropyl (70% v/v) and acetone at RT. In advance to that, the material was dried (70°C, 60 min) and weighed. Afterwards the weight was determined in the same manner. After incubation the mass difference was determined.

The microscopy images and surface studies were performed using a VHX-5000 (Keyence Corp., Osaka, Japan).

2.6 Model fed-batch cultivation

2.6.1 Pre-preculture and preculture

Pre-preculture and preculture were prepared as described in Section 2.4.2.1. Precultures' cell suspension (10 mL) was spun down, the cell pellet resuspended in 5 mL batch medium (defined medium as described in Section 2.4.2.1 without glucose at pH 7.9) and used to inoculate the fed-batch process.

2.6.2 Fed-batch cultivation in a shake flask

The fed-batch process was carried out using a 500 mL baffled shake flask with a starting volume of 90 mL defined batch medium (defined medium as described in Section 2.4.2.1 without glucose, set to a pH of 7.9). Feeding solution was stored in a 50 mL Omnifix® syringe (B. Braun AG, Melsungen, Germany) outside the incubator and connected via a Rotilabo®-silicone tube (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) with an internal diameter of 1 mm and an external diameter of 3 mm to the 3D-printed lid. The feeding solution provided glucose as carbon source (defined medium as described in Section 2.4.2.1 with glucose (100 g/L), set to a pH of 10.5). The pump volume rate was set to 0.25 mL/h for the first five hours of cultivation and was then raised to 0.5 mL/h. For feeding a syringe pump (Aladdin Programmable Syringe Pump, World Precision Instruments Germany GmbH, Berlin, Germany) was used.

2.6.3 Offline sampling

Sample acquisition was performed using a Luer activated valve, which allowed a fast and direct sampling of the cell broth via a

tube inside the shake flask. Hourly 1.5 mL sample was taken with a 5 mL syringe.

2.6.3.1 Optical density. The optical density was measured at 600 nm with a photometer (Libra S80, Biochrom, Cambridge, UK).

2.6.3.2 Cell dry weight. The cell dry weight was measured by weight difference after centrifugation (13 000 rpm, 5 min), the supernatant was removed and the biomass dried for 48 h at 80°C.

2.6.3.3 Glucose concentration. The glucose concentration within the supernatant was measured using a YSI 2900 STAT Glucose & Lactate Analyzer (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA).

2.6.3.4 pH-measurement. The pH of the supernatant was determined using a pH-meter (Metrohm AG, Herisau, Schweiz).

3 Results and discussion

Prior to making use of the 3D-printed objects, a three-step procedure needs to be performed, as shown in Fig. 1. First, by CAD software the lid is designed three-dimensionally. Following, the file containing the surface geometry of the object is converted into a device-specific format and processed, using computer-aided manufacturing (CAM). In the last step the part is manufactured with a stereolithographic 3D-printer.

In the following the results regarding both applicability of the 3D-printing technology and its raw materials and a model fed-batch process are shown.

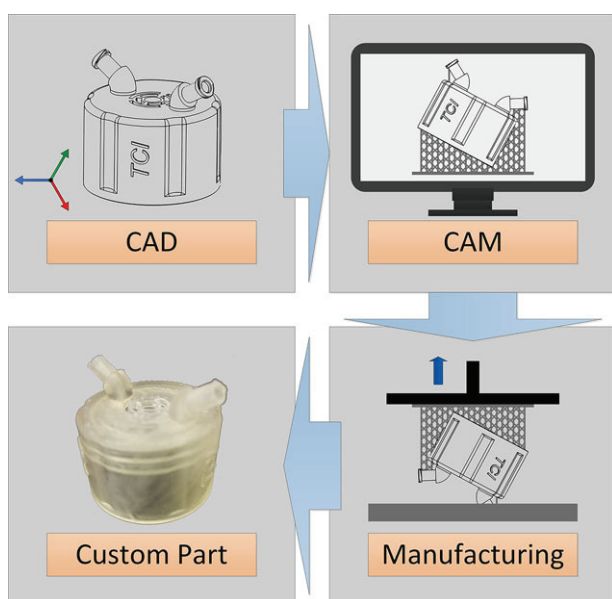


Figure 1. Manufacturing process of the developed shake flask lid. In computer-aided design (CAD) software the lid was drawn and in computer-aided manufacturing (CAM) prepared for 3D print. The printing result is a heat steam sterilizable customized part.

3.1 Usage and behavior of the additive manufactured shake flask lid

The additive manufactured shake flask lid was printed using stereolithography 3D printing technology. In total five lids were printed and the resulting parts were stable before and after steam sterilization.

The lid consists of three main parts, namely the lid itself, which functions as the scaffold for other elements, the hose adapters inside the flask and the (Luer) connectors at the outside. All elements were manufactured together as one single part. Due to this production in one piece and the watertight material, any risk of leakage could be eliminated.

The thread was designed to fit on common standardized shake flasks, so that it can be used with a manifold of flasks. The lid provides space to place the mandatory oxygen membrane (PES) for aeration, which was added to the lid postprint and represents the lids' only non-3D-printed element. Again, the size and place of these elements could be arranged freely and adapted for the specified demand. The most frequently used adapters on top of the lid are the Luer connectors. Two connections, one for sampling, one for feeding were integrated.

The internal hose adapters were the smallest geometries within the lid. Along with the Luer connectors they depicted the most complex geometries of the lid. Their fabrication was the most challenging part of the 3D-printing process and crucial for proper functionality of the lid.

With its resolution of 25 μm , the SLA apparatus, managed to manufacture the lid without complication. A critical point was to remove the entity of nonpolymerized resin sticking to the printed object, to avoid clogged adapters. Nevertheless, the adapters were stable enough to withstand damages caused by several uses and autoclaving cycles.

A main goal of this study was to show how 3D-printing technology can be implemented into the laboratory routine. In addition to the main part of this kit-like set- the 3D-printed lid- also surrounding elements needed to be established to conduct the presented fed-batch process besides working ports and connectors at the lid, also an adequate liquid flow from and to the cell broth needed to be ensured to allow high process control. To enable this, proper sampling and feeding must be guaranteed. Therefore, each silicone hose for sampling and feeding was placed inside the shake flask (Fig. 2). In order to minimize the tubes' influence on the bioprocess, they were held in place by magnetic stainless steel (AISI 440 B) guides. This steel is suitable for surgical applications and recommended for use in food industry [18, 19]. At the flasks' outside neodymium magnets were attached with silicone glue, to hold the magnetic stainless steel tube guides inside at its position. As feeding system a commonly used syringe pump was set-up next to the incubator. Another tube led the feeding solution from the syringe to the lid, where the solution reached the cultivation directly by passing another silicone Luer hose as shown in Fig. 2.

With these elements, a fed-batch process could be accomplished without any interruption caused by sampling and feeding actions. The Luer activated sample port (also connected to the lid via Luer) could be used during active shaking. Despite the lid itself, only commonly used laboratory equipment is needed for this set-up.

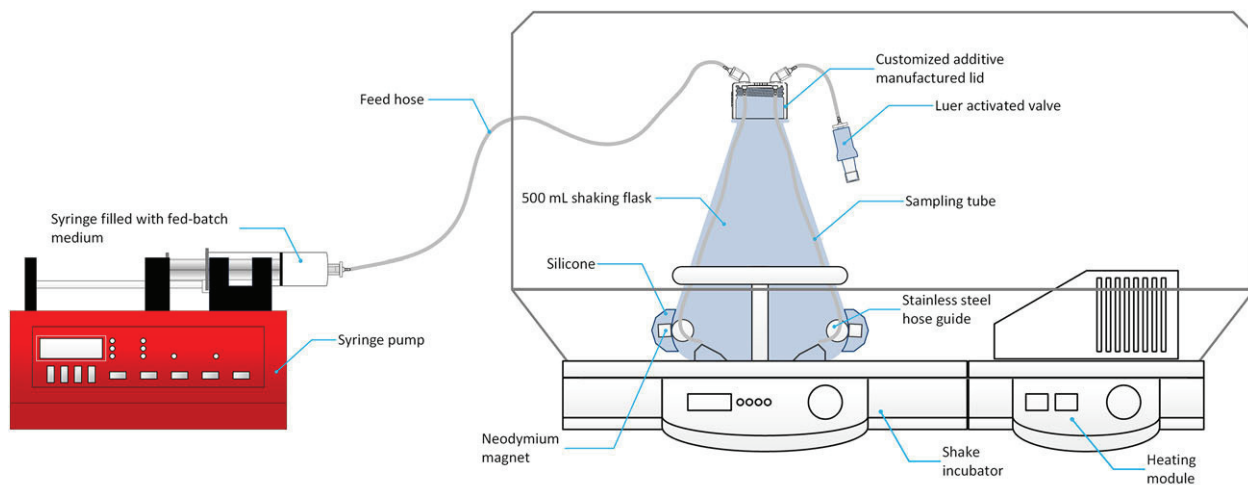


Figure 2. Experimental set-up for fed-batch process. The customized additive manufactured shake flask lid represents the center of the system.

3.2 In vitro biocompatibility assay

All materials that come into contact with biological compounds as microbial organisms need to provide chemical stability and must not affect the cell behavior. Since constructing material used in this study was not previously evaluated for its biocompatibility, in vitro cytotoxicity experiments were performed. During sampling and feeding, liquid flows across the lid and comes in direct contact with the material. Due to this, potential leaching properties of the cured resin needed to be investigated. Therefore, cell viability assays with mammalian and prokaryotic cells were performed. For mammalian cell culture experiments, extract samples were prepared, according to ISO-10993-12:2012 [20]. As it can be seen from Fig. 3, the cell viability of both cell lines (L-929 and NIH-3T3) treated with material extracts was equal to control cultures. This allows the assumption that no critical amount of toxic compounds leached out of the resin.

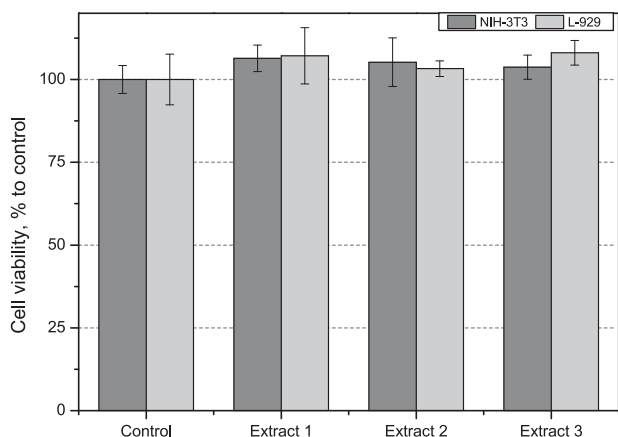


Figure 3. Cell viabilities (Cell Titer Blue®) after incubation in extraction media compared to a native medium control.

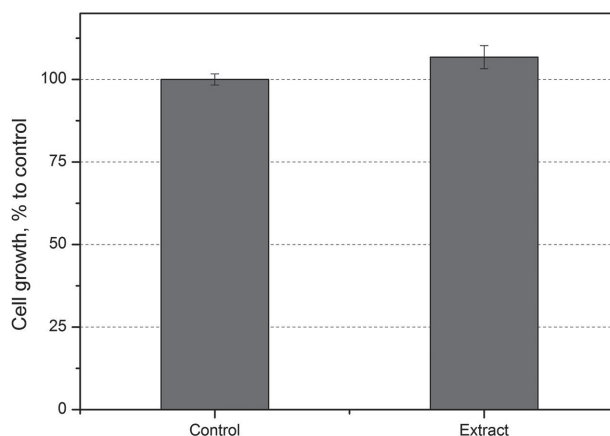


Figure 4. Cell growth after *E. coli* cultivation with 5 × 5 × 5 mm cubes printing material compared to a control.

For the assay with *E. coli* cultures, cells were incubated with printed materials and their growth was determined via OD₆₀₀ measurement and compared to a control. The results of the microbial biocompatibility also did not reveal cytotoxicity as shown in Fig. 4.

Taken together, these data show that printed material does not have toxic effects on both, mammalian and microbial cell cultures.

3.3 Model fed-batch process

To show possible applications of the lid a model process was performed. The 3D-printed shake flask lid was used in a cultivation process with substrate limitation. A scheme of the experiment is shown in Fig. 2. The cultivation was performed in fed-batch mode. During the cultivation process the carbon source should be limiting for the bacteria growth. *E. coli* K1, commonly used for the production of the polysaccharide polysialic acid was used

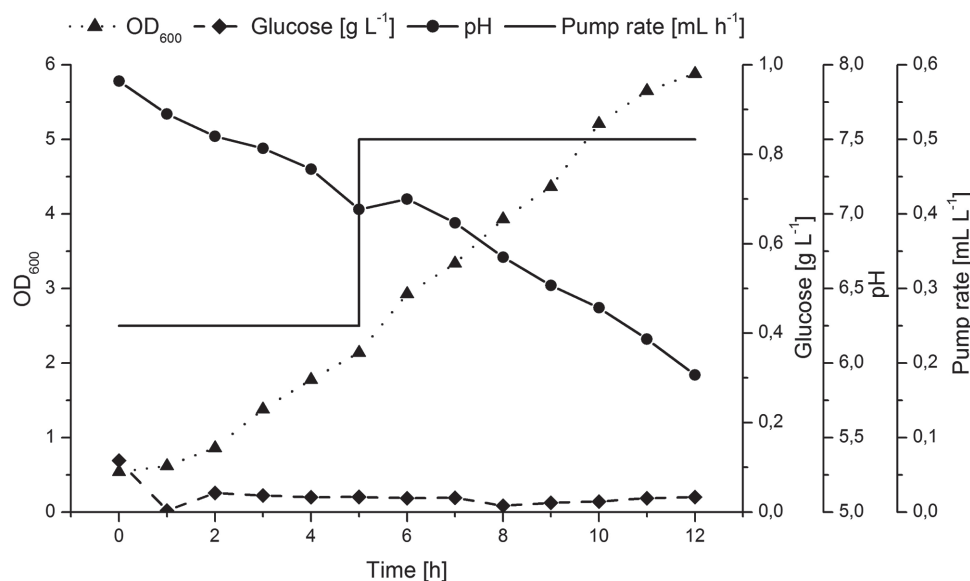


Figure 5. Cultivation data of model process. During the process carbon source (glucose, dashed line) was constantly limitation for cell growth measured by OD₆₀₀ (dotted line). The pH (straight line) was declining during the cultivation process due to metabolic activity of the microorganisms.

as model organism [9, 10, 21, 22]. Preculture was prepared in basic defined salt medium with an initial glucose concentration of 20 g/L. Before inoculation the cells of the preculture were spun down and resuspended in batch medium without glucose to avoid glucose uptake out of the preculture into the main cultivation. For the main cultivation medium with no initial glucose was used. Directly after inoculation feeding was started with a flow rate of 0.25 mL/h. The flow rate was set relatively low at the beginning of the cultivation to avoid glucose accumulation during the lag phase. After 5 h the flow rate was set to 0.5 mL/h due to increased bacteria concentration. Nevertheless, during the whole cultivation process the carbon source (glucose) was limited and below 0.1 g/L as shown in the data of the cultivation in Fig. 5. The maximal growth rate was below 0.5 h⁻¹ throughout the cultivation process. The pH was decreasing during the cultivation due to metabolic activity of the microorganisms. The used sample port with Luer activated valve, enabled sampling directly in place. Thus, the culture was both shaken and kept on temperature (37°C) throughout the cultivation process without interruption.

The process shows that a cultivation of *E. coli* K1 with substrate limitation is possible with an additive manufactured, customized, and biocompatible shake flask lid. Other possible applications of the shown shake flask lid could be pH-control in system with pH measurement (e.g. SFR vario, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany) or even a continuous cultivation in a shake flask due to different connection possibilities.

3.4 Further application studies: 3D-printed SDS-PAGE comb

Exemplary a standard 15 well SDS-PAGE comb was drawn and printed to demonstrate how standard labware can be manufactured using 3D-printing technology. The comb was manufactured using a multi jet printing (MJP) 3D-printer with

both, a high definition resolution and high surface quality. The surface structure was investigated using 3D microscopy. Figure 6 shows the comb and its top layer surface structure. Orthogonal to the printing direction (Fig. 6B, left to right), the material shows a wavy formation with a height difference of about 10 μm (Fig. 6A), reasoned by the manufacturing method. Nevertheless, these artifacts didn't have any negative influence on the combs' usability.

SDS-PAGE combs are highly reusable labware. Therefore, they need to be cleaned frequently with standard chemicals as isopropyl or acetone. Printed objects were incubated in the respective chemical and potential solvency was analyzed gravimetrically. After incubation at RT no solubility was measurable. The material was characterized as chemically stable on these solutions.

This approach could be a strategy to simplify labware production and reduce costs. Comparable SDS-PAGE combs come with high costs (15€/piece, supplier list price). The here described and 3D-printed comb consumed less than 2 mL printing material, equal to about 2€ including supporting material, a cost reduction of more than 80%. Of course, taking investment costs into consideration, the savings decrease. Nevertheless, thinking long term, in-house manufacturing is financially advantageous. In addition to that, the digital blueprint is easily modifiable. The size and amount of wells could be rearranged in order to perform, e.g. preparative gel electrophoreses.

4 Concluding remarks

This study shows the development of a customized, additive manufactured shake flask lid. The shake flask lid was tested for biotechnological application and biocompatibility. The material used for manufacturing was stable during steam sterilization. Also biocompatibility testing showed no negative effect on cell growth and viability, neither in mammalian cell culture (organisms: mouse fibroblasts L-929 and NIH-3T3) nor for

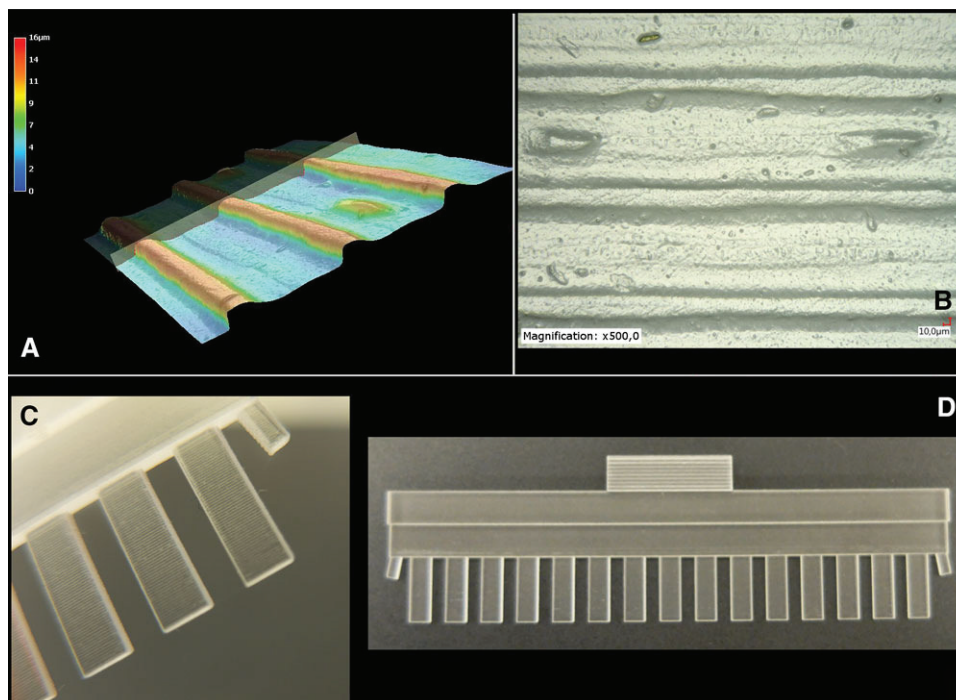


Figure 6. Functional multi jet printed SDS-PAGE comb. (A) Surface profile—the height differences are below $11\ \mu\text{m}$; (B) Microscopic surface of the printed material ($500\times$); (C and D) Photographs of the comb.

bacterial cultivation (organism: *E. coli* K1). Thus, materials and used methods (SLA and MJP) for additive manufacturing are suitable to produce elements for different biotechnological applications. Lid's fabrication time, depending on quality setting, is about 9 hours. Starting the printing process at night, will result in a ready to use lid in the following day including postprocessing steps. Due to its biocompatibility, chemical resistance, and steam sterilizable properties, the potential use for other processes and methods can be considered. Standard labware such as microtiter plates, stirrers, microfluidic devices, or optical compounds could come into consideration, to mention a few [1].

Other already established 3D-printed materials used for biotechnological processes are polyamides (PA). Ude et al. successfully used this material and the according selective laser sintering 3D-printing method for their shake flask pH-control system [14].

The developed shake flask lid was furthermore used in a model process. Therefore, *E. coli* K1 was used as model organism in a fed-batch process with cell growth limitation due to substrate limitation. Fed-batch processes in shake flasks are of specific interest while numerous production processes are performed as a fed-batch. Previous studies describe fed-batch processes in shake flasks using special shake flask lids for feeding, enzyme controlled substrate release, or substrate release out of special discs [11–13,23].

Nevertheless, most screening experiments are carried out in shake flasks in batch mode due to the easy preparation and handling properties. Thus, the opportunity of a fed-batch process in a shake flask brings more reliable results for further upscale of a process [11]. The used shake flask lid in this study has the advantages of easy in-house manufacturing and customization for the desired application. The shown process is only one application example for the use of such a lid.

Other possible applications could be the continuous cultivation in a shake flask with additional pH control or promotor induction.

The SDS-PAGE comb could be developed further as described above. Changing the combs' appearance and printing it, can be accomplished within less than 90 min. This makes both, spontaneous experimental design, and customized conduction possible.

Despite that the experiments turned out successfully, it has to be mentioned, that the SLA printed material prone to get slightly brittle after some time and change their color. The latter may be reasoned by natural UV radiation and further material curing.

Overall, it can be stated that 3D-printing technologies offer new possibilities and can be considered as an advantageous new technique [24]. New materials and printing methods are published frequently and the device prices decrease constantly [4]. This, again, makes the technology more and more interesting for customers.

The basic idea that every research lab owns a 3D-printer that provides the opportunity to manufacture its own individual labware gets within touching distance. This in-house and just-in-time self-supply on demand can make the lab more independent from distributors and producers.

Platforms like GrabCAD, Thingiverse, and others already offer the opportunity to download CAD files that were made freely available by scientists and engineers all over the world. Most of the offered files can be modified as needed what helps to develop custom-tailored solutions to even complex problems in a relatively short period. This open-source idea opens the door to an inexpensive and fast development of individual labware. Considering the short innovation cycles of new 3D-printing techniques it might be just a matter of time until 3D-printed labware

can meet the same standards as conventionally manufactured labware [25].

Despite the here discussed 3D-printing application as a manufacturing tool for labware and functional devices, there are other fields, where the use of 3D-printing technology is emerging [4]. In tissue engineering, the fabrication of soft tissues has high value but often comes with complex, lengthy, and tedious protocols [26]. The opportunity to produce synthetic tissues or even organs utilizing a so called bioprinter, could help to overcome the organ transplantation crisis. Bioprinters are able to print viable cells in hydrogels or biodegradable scaffolds onto which cells adhere and grow [4, 27].

Also the field of chemistry encounters a substantial impact by 3D-printing. Especially in microfluidics and lab-on-a-chip technology, it could be a benefit [28]. Traditionally those devices are constructed using PDMS molding. 3D-printing may help to overcome some aspects like poor comparability between laboratories due to standardization issues [4, 29].

Yet increasingly focused sooner or later 3D-printing will become part of our everyday life, both at home and in professional context.

Practical application

The vision of a three-dimensional (3D) printer in every biotechnological laboratory seems far away, yet the technology is ready to be used in this context and could be a remarkable asset to scientists and helpful in experimental design and conduction. In order to simplify the realization of a shake flask fed-batch process, a newly developed method was established, which allows a better performance and a much more convenient handling in regard to experimental conduction. At the top of this kit-like system stands a 3D-printed customizable shake flask lid with implemented off-the-shelf connectors, oxygen membrane and tube adapters. The bioprocess can be performed without interruptions during interactions like sampling or feeding. The computer file the lid is based on is highly customizable in shape and composition. The used stereolithographic printing method (SLA) fabricates high quality and biocompatible products. This enables application as reusable compounds in biotechnology, such as the mentioned lid. The shown SDS-PAGE comb was printed using high definition multi jet printing (MJP) technology, which offers both high surface quality and solvent stable printing material.

We acknowledge all associates for helpful discussions and technical support.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Lücking, T. H., Sambale, F., Beutel, S., Scheper, T., 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: a proof of principle. *Eng. Life Sci.* 2015, 15, 51–56.
- [2] Lücking, T. H., Sambale, F., Schnaars, B., Bulnes-Abundis, D. et al., 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. *Eng. Life Sci.* 2015, 15, 57–64.
- [3] Hull, C.W., Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. EP0171069A2, 1986.
- [4] Gross, B. C., Erkal, J. L., Lockwood, S. Y., Chen, C. et al., Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Anal. Chem.* 2014, 86, 3240–3253.
- [5] Kellner, T., Jet engines with 3D-printed parts power next-gen airbus passenger jet. 2015. <http://www.ge.com/reports/post/119370423770/jet-engines-with-3d-printed-parts-power-next-gen/>
- [6] Berman, B., 3-D printing: the new industrial revolution. *Bus. Horiz.* 2012, 55, 155–162.
- [7] Schubert, C., van Langeveld, M. C., Donoso, L.A., Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *Br. J. Ophthalmol.* 2014, 98, 159–161.
- [8] Yamané, T., Shimizu, S., Fed-batch techniques in microbial processes. *Adv. Biochem. Eng.* 1984, 30, 147–194.
- [9] Weuster-Botz, D., Altenbach-Rehm, J., Arnold, M., Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochem. Eng. J.* 2001, 7, 163–170.
- [10] Büchs, J., Introduction to advantages and problems of shaken cultures, in: *Biochem. Eng. J.* 2001, 7, 91–98.
- [11] Jeude, M., Dittrich, B., Niederschulte, H., Anderlei, T. et al., Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 95, 433–445.
- [12] Scheidle, M., Jeude, M., Dittrich, B., Denter, S. et al., High-throughput screening of *Hansenula polymorpha* clones in the batch compared with the controlled-release fed-batch mode on a small scale. *FEMS Yeast Res.* 2010, 10, 83–92.
- [13] Panula-Perälä, J., Šiurkus, J., Vasala, A., Wilmanowski, R. et al., Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microb. Cell Fact.* 2008, 7, 31.
- [14] Ude, C., Hentrop, T., Lindner, P., Lücking, T. H. et al., New perspectives in shake flask pH control using a 3D-printed control unit based on pH online measurement. *Sensors Actuators B Chem.* 2015, 221, 1035–1043.
- [15] Formlabs Inc., High Temp Photopolymer Resin for Form 1+ and Form 2 FLHTAM01 Material Properties. Safety data sheet. 2016.
- [16] 3D Systems Inc., VisiJet® M2-RCL. Safety data sheet. 2012, revised 2015.
- [17] Rode, B., Endres, C., Ran, C., Stahl, F. et al., Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1. *J. Biotechnol.* 2008, 135, 202–209.
- [18] NSF International, *Food Equipment Materials (ANSI/NSF 51–1997)*, Ann Arbor, MI, USA 1997.
- [19] Clement, H., Zopf, C., Brandner, M., Tesch, N. P. et al., Performance test of different 3.5 mm drill bits and consequences for orthopaedic surgery. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2015, 135, 1675–1682.

- [20] DIN EN ISO 10993-12:2012-10. Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials (ISO 10993-12:2012).
- [21] Bähr, C., Leuchtle, B., Lehmann, C., Becker, J. et al., Dialysis shake flask for effective screening in fed-batch mode. *Biochem. Eng. J.* 2012, 69, 182–195.
- [22] de Vries, I., Busse, C., Kopatz, J., Neumann, H. et al., Polysialic acid production using *Escherichia coli* K1 in a disposable bag reactor. *Eng. Life Sci.* 2017, 17, 723–731.
- [23] Scheidle, M., Dittrich, B., Klinger, J., Ikeda, H. et al., Controlling pH in shake flasks using polymer-based controlled-release discs with pre-determined release kinetics. *BMC Biotechnol.* 2011, 11, 25.
- [24] Tumbleston, J. R., Shirvanyants, D., Ermoshkin, N., Januszewicz, R. et al., Continuous liquid interface production of 3D objects. *Science* 2015, 347, 1349–1352.
- [25] Brennan, M., Bokhari, F., Eddington, D., Open design 3D-printable adjustable micropipette that meets ISO standard for accuracy. *bioRxiv* 2017. <https://doi.org/10.1101/109231>
- [26] Guan, J., Fujimoto, K. L., Sacks, M. S., Wagner, W. R., Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials* 2005, 26, 3961–3971.
- [27] Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. et al., Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2003, 21, 157–161.
- [28] Kane, R. S., Takayama, S., Ostuni, E., Ingber, D. E. et al., Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999, 20, 2363–2376.
- [29] Waldbaur, A., Rapp, H., Länge, K., Rapp, B. E., Let there be chip—towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes. *Anal. Methods* 2011, 3, 2681–2716.

4.2 Materialtestung verschiedener additiv gefertigter Polymere zur Implantatentwicklung

Bioabbaubare Materialien erlauben die Realisierung resorbierbarer Implantate, welche sich im Laufe des Heilungsprozesses und nach der Erfüllung ihrer Funktion im Körper zurückbilden. Dadurch wird ein zweiter Eingriff, zum Beispiel zur Entfernung des körperfremden Materials, überflüssig, es werden jedoch hohe Anforderungen an die dafür verwendeten Materialien gestellt. Sie müssen sowohl biokompatibel sein als auch keine toxischen Effekte auf benachbartes Gewebe haben. Eine Besonderheit ist zudem, dass das Resorptionsverhalten die Funktion des Implantats nicht beeinflussen darf. Es muss solange chemisch und physikalisch stabil sein, bis es seine Aufgabe im Körper erfüllt hat.

Bei Implantaten im Allgemeinen handelt sich um hochspezifische, für jeden Empfänger designte und gefertigte Objekte. Kombiniert man hier die Materialentwicklung und -forschung mit additiver Fertigung, eröffnet sich die Möglichkeit personalisierte (Festkörper-) Implantate zu fertigen. Große Freiheitsgrade im Design des Implantats mithilfe des 3D-Drucks und enorme Fortschritte in diesem Bereich erlauben diese innovative Anwendung. Dieser Ansatz könnte aktuelle Herausforderungen, wie die Produktion hoch-präziser und hoch-aufgelöster Strukturen, meistern, ohne auf Gussformen oder subtraktive Verfahren zurückgreifen zu müssen, welche mit hohen Kosten einhergehen. Auf Grundlage von bildgebenden Verfahren, wie Magnetresonanztomographie oder Computertomographie des betroffenen Gewebes, kann die digitale Blaupause für den additiven Fertigungsprozess erstellt und schließlich 3D-gedruckt werden. Hochqualitative resorbierbare Materialien in Verbindung mit modernen additiven Fertigungsstrategien können die Produktion von hochwertigen Implantaten erlauben und die Lebensqualität vieler Betroffener signifikant steigern. Aktuelle Studien beschreiben ein Marktvolumen von deutlich über hundert Mrd. € pro Jahr für *low-volume* und *high-value* Produkte, wie beispielsweise Implantate.

In diesem Arbeitsteil werden vier verschiedene resorbierbare Biopolymere auf ihre Anwendbarkeit als Material für den Druck von Implantaten getestet, verglichen und charakterisiert. *In-vitro*-Biokompatibilität, *in-vitro* Abbaurate, Zelladhärenz und Zellverhalten auf den jeweiligen Materialien wurden untersucht. Des Weiteren wurde die osteogene Differenzierung von auf den Materialien kultivierten humanen adipogenen mesenchymalen Stammzellen (hAd-MSCs) induziert und evaluiert.

Bei den untersuchten Polymeren handelt es sich um vier verschiedene Materialien: Poly-L-lactid (L210S), Poly(L-lactid-co-D/L-lactid) (LR706S), Polycaprolacton (C212), und Poly-dioxanon (X206S). Diese unterscheiden sich neben ihrer chemischen Zusammensetzung insbesondere in ihrer Schmelztemperatur und mechanischer Elastizität. Sie eignen sich auf Grundlage dieser


Eigenschaften für die Verarbeitung mit extrusionsbasierten 3D-Druckverfahren (FDM) und kommen für unterschiedliche Anwendungen infrage.


Es konnte gezeigt werden, dass keines der 4 untersuchten Polymere einen signifikant negativen Einfluss auf die Zellviabilität (murine Fibroblasten, L-929; humane Stammzellen, hAd-MS-C) hat und daher als nicht-toxisch angesehen werden können. Die Zellviabilitäten lagen im Bereich von 86-120 % im Vergleich zur Kontrolle, erst ab einer Reduktion von mehr als 30 % der Viabilität gilt ein Material als zell-toxisch (ISO 10993-5:2009). Zudem bieten sie eine adäquate Oberflächenstruktur für Proliferation und Adhärenz bieten. Beides ist von hoher Bedeutung, um entzündliche Prozesse während der Wundheilung an der Gewebe/Implantat-Schnittstelle zu vermeiden und diesen vorzubeugen.

Es kann festgestellt werden, dass sich additive Fertigung zur Implantatentwicklung eignet und aufgrund ihrer hohen Flexibilität von Nutzen sein kann. Komplexe, hoch-aufgelöste und personalisierte Geometrien können bei kurzer Produktionsdauer realisiert werden. Die additive Verarbeitung von resorbierbaren Biopolymeren ist noch nicht ausgereift und weitere Arbeiten müssen die bisherigen Ergebnisse in *in-vivo* (Tier-)Modellen und durch Testung der mechanischen Eigenschaften bestätigen.

Im Artikel „Comparison of different three dimensional-printed resorbable materials: In vitro biocompatibility in vitro degradation rate, and cell differentiation support“ (2018) im Journal of Biomaterial Applications sind die Ergebnisse detailliert beschrieben.

Comparison of different three dimensional-printed resorbable materials: *In vitro* biocompatibility, *In vitro* degradation rate, and cell differentiation support

Journal of Biomaterials Applications
0(0) 1–14
© The Author(s) 2018
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0885328218787219
journals.sagepub.com/home/jba


Lukas Raddatz^{1,2} , Marline Kirsch¹, Dominik Geier²,
Jörn Schaeske³, Kevin Acreman⁴, Rafael Gentsch⁴, Scott Jones⁴,
Andreas Karau⁵, Tommy Washington⁴, Meike Stiesch³,
Thomas Becker², Sascha Beutel¹, Thomas Scheper¹ and
Antonina Lavrentieva¹

Abstract

Biodegradable materials play a crucial role in both material and medical sciences and are frequently used as a primary commodity for implants generation. Due to their material inherent properties, they are supposed to be entirely resorbed by the patients' body after fulfilling their task as a scaffold. This makes a second intervention (e.g. for implant removal) redundant and significantly enhances a patient's post-operative life quality. At the moment, materials for resorbable and biodegradable implants (e.g. polylactic acid or poly-caprolactone polymers) are still intensively studied. They are able to provide mandatory demands such as mechanical strength and attributes needed for high-quality implants. Implants, however, not only need to be made of adequate material, but must also to be personalized in order to meet the customers' needs. Combining three dimensional-printing and high-resolution imaging technologies a new age of implant production comes into sight. Three dimensional images (e.g. magnetic resonance imaging or computed tomography) of tissue defects can be utilized as digital blueprints for personalized implants. Modern additive manufacturing devices are able to use a variety of materials to fabricate custom parts within short periods of time. The combination of high-quality resorbable materials and personalized three dimensional-printing for the custom application will provide the patients with the best suitable and sustainable implants. In this study, we evaluated and compared four resorbable and three dimensional printable materials for their *in vitro* biocompatibility, *in vitro* rate of degradation, cell adherence and behavior on these materials as well as support of osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. The tests were conducted with model constructs of 1 cm² surface area fabricated with fused deposition modeling three dimensional-printing technology.

Keywords

Additive manufacturing, *in vitro* biocompatibility, *in vitro* degradation, mesenchymal stem cells, non-permanent implants, osteogenic differentiation, RESOMERS[®], resorbable polymers

Introduction

The history of implants goes way back to the sixth century BC finding its roots in ancient Italy. Excavations revealed that Etruscan emperors were treated with dental implants made of gold held in place by metallic wires.¹ Another prominent case of regenerative medicine history is the story of the German imperial knight Götz "iron hand"

¹Institute of Technical Chemistry, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Germany

²Institute of Brewing and Beverage Technology, Forschungszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, Germany

³Department of Prosthetic Dentistry and Biomedical Materials, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany

⁴Evonik Corporation, Birmingham, USA

⁵Evonik Nutrition and Care GmbH, Darmstadt, Germany

Corresponding author:

Antonina Lavrentieva, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany.
Email: lavrentieva@iftc.uni-hannover.de

von Berlichingen. He lost his right hand during a skirmish and got a functional prosthesis in 1504, enabling him to conduct simple hand moves again.² Since these first attempts, advances in mechanical engineering, material sciences and medical sciences have created high-quality materials, laying the cornerstone for today's high-end implants.³ A variety of materials have emerged, enhancing the *in situ* implants' performance and increasing life quality of not only noble men, but entire mankind significantly.

Implants are devices or tissues that are placed inside or on the surface of the body. They can be placed permanently, removed when they are no longer needed, or degrade due to their material properties *in vivo*.⁴ In general, implants ought to fulfill requirements for replacing, functioning, and assisting the natural organs.³ Subsequently, the requirements of the implant and respectively the material are as diverse as the applications themselves. Plenty of materials were developed, which range from ceramics⁵ over polymers⁶ and composites to metal alloys.⁷ Implants can be associated with permanent and non-permanent applications. Materials designated to degrade or to be resorbed inside the body after their function is fulfilled are referred to as non-permanent implants.³

Healing process, e.g. mineralizing process of bone fractures to populate the cavity at the injury site and connect broken bone parts and the degrading process of the non-permanent implant must happen in the same time frame. The implant must be stable long enough to enable patient's own regeneration, but should not stay stable too long to allow the regeneration and repopulation of bone defect.

The possible application of resorbable materials for non-permanent implants in clinical surgery plays a crucial role, since it reduces the risk of possible post-surgical infection by making a second intervention redundant.⁸ Frequently used synthetic materials for non-permanent implants are polylactic acid (PLA), polyglycolic acid, poly(lactide-co-glycolide), polydioxanone, poly(ethylene carbonate), poly(glycolide-co-trimethylene carbonate), poly-caprolactone (PCA), and poly(hydroxybutyrate).^{3,9} These materials degrade *in vivo* by esterase activity and organic physiological acids like lactic and pyruvic acids to their monomers,⁸ which can be further metabolized or transported away by blood flow.

Conventional fabrication methods for medical implants (depending on the materials used) are injection molding or machining.¹⁰ Large quantities of implants can be produced by these methods in a short period of time yielding standardized products.

This production strategy, however, does not meet the needs for desired highly individualized customizable products. Every implant needs to be

individually fitted after production to the respective patient, subsequently resulting in the need of an individualized production strategy.

At this moment the cutting-edge technology of three dimensional (3D) printing can ideally come into play. This manufacturing tool is already used in fields of research,^{11–15} production,¹¹ art, and even constructional and mechanical engineering.^{16,17} First introduced in the 1980s, this technology brings the essential attributes to revolutionize production industry.¹⁸ By manufacturing in-house, the needed parts can be produced just-in-time cutting out long shipping and ordering times.¹² The further core advantages of additive manufacturing (AM) lay in its fast and high-quality production of small to medium quantities and reduction of waste by non-abrasive fabrication.^{19,20}

The medical product (implant) industry is a perfect field of application for this new manufacturing strategy.^{19,21} We suggest the possibility of intra-operative implant design via fast creation of 3D models with the help of 3D imaging and computer aided design (CAD), and fabrication utilizing AM would be the best strategy to produce the personalized implants. Within the past decade, plenty of AM techniques with high-quality materials were developed. AM techniques can be divided into three main branches: (1) AM with fused deposition, (2) AM on powder basis, and (3) AM on liquid or gaseous basis.¹¹ The emerging object is fabricated layer by layer, allowing a high degree of freedom in design.²²

Thinking of geometrically complex implants, this fabrication technique is of interest for customized products. Due to sophisticated imaging techniques like magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), or x-ray, 3D models of the implants are handy to gather.¹⁰ Using 3D printing technology, complex customized prosthetic limbs and surgical implants were already fabricated within 24 h.^{11,12,23–25} However, the mentioned 3D-printed implants were permanent constructs made of metal alloys. One of the examples where the resorbable, non-permanent materials are more advantageous than stable materials is the *Cranio-Maxillo-Facial* surgery in infants. Here, the bone defects could be fixed with resorbable implants without need of additional surgery to remove these implants from the growing organism. Used materials are slowly resorbed in the body during the healing process and can be replaced with the patient's own growing tissues. Another application of resorbable non-permanent metal implants are magnesium-based screws, studies showed no difference in post-operative wound healing compared to permanent titanium screws.²⁶

The above described resorbable implants made of thermoplastics or metal alloys are still manufactured

traditionally by injection molding or machining.¹⁰ The combination of the use of resorbable materials for implants with 3D printing technology will give the opportunity to create highly individualized implants which can be replaced with the patient's own growing tissues by predictable implant degradation.

A major challenge here is the selection of the right material. Implant material properties such as biodegradability, porosity, and bioactivity as well as size and shape of the construct influence the reaction of the surrounding tissue, which will have an impact on integration of the implant *in vivo*.²⁷ Implant/tissue contact area is of high importance to wound or bone healing. The group of La used a bone demineralized and decellularized extracellular matrix (ECM) as a coating material for 3D-printed scaffolds made of a PLA-based polymer composite. The coating led to an induction of osteogenic activity *in vitro* and *in vivo* bone defect healing.²⁸

Furthermore, current 3D printing techniques have limitations both with regard to available materials and resolution.²⁹ Another point is the successful vascularization of the printed constructs. Therefore, a dual 3D printing platform was used to overcome this problem and manufacture complex vascularized bone constructs. Here PLA and cell-laden bioinks (gelatin-based hydrogels) were used.³⁰

Physical and chemical properties of resorbable materials may allow their processing using the 3D printing method fused deposition modeling (FDM). This way, advantages of AM meet the high-quality materials with certain stability, desirable/adjustable durability, and mechanical properties.¹⁰ The essential question for the application of such materials as 3D-printed implants is, however, their biocompatibility. Material processing during the printing (e.g. heating to the melting/glass temperatures) should not cause the production of the toxic components one the one hand and, should retain the initial material properties (resorbability and mechanical stability) on the other hand.

In the present work, four different RESOMER[®]-based resorbable materials were studied: poly-L-lactide (L210S), poly(L-lactide-co-D/L-lactide) (LR706S), polycaprolactone (C212), and poly-dioxanone (X206S). The materials were 3D-printed using FDM technology and evaluated on their *in vitro* biocompatibility, *in vitro* rate of degradation as well as support of *in vitro* osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs). Furthermore, scanning electron microscopy (SEM) imaging and live cell time lapse imaging of cells cultivated on the materials were taken to evaluate cell behavior, shape, adhesion, and migration on 3D-printed constructs.

Material and methods

Evaluated materials, computer aided design, and 3D printing technology

All tested materials (L210S (poly-L-lactide, PLA), LR706S (copolymer poly(L-lactide-co-D,L-lactide 70:30, PLcoDLA), C212 (poly-caprolactone, PCL), X206S (poly-dioxanone, PDO) were provided as pure 1.75 mm diameter filament by Evonik Industries AG (Essen, Germany). The thermoplastics were processed further using the AM technology FDM after printing parameters were optimized (Table 1). Therefore a 3NTR (Oleggio, Italy) was used. 3D-printed platelet model constructs (10 × 10 × 1 mm; height × width × depth) were used. The design of the constructs was conducted using CAD software Autodesk Inventor Professional 2015 (Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA) establishing the mandatory digital blueprints (.stl). The .stl-files were translated into device specific data files using the Kisslicer slicing software. Layer height for all model constructs is 0.3 mm.

All unprocessed and processed material samples were stored in the freezer at −20°C. All constructs were incubated for 30 min at 37°C in 70% EtOH for sterilization, and subsequently washed for 30 min at 37°C in sterile phosphate buffered saline (PBS).

Cell culture

Murine (*Mus musculus*) fibroblasts (L-929, DMSZ No.: ACC 2) were purchased from Cell Line Service GmbH (Eppelheim, Germany). L-929 cells were maintained in Dulbacco's Modified Eagle medium (DMEM) (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biochrom, Germany) and 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) and subcultured twice per week. hAD-MSCs were isolated from the adipose tissues of patients after abdominoplastic surgery. Informed consent was obtained from all donors and the process was approved by the ethics committee of Hannover Medical School. hAD-MSCs were maintained in alpha-MEM (ThermoFisher Corporation, Waltham (Massachusetts), USA) supplemented with

Table 1. Relevant printing parameters used for model construct manufacturing.

Material	Nozzle temp. (°C)	Build plate temp. (°C)
C212	78–90	50–55
L210S	230–240	90
LR706S	220–230	85
X206S	150–160	90

10% human serum (HS) (CC Pro GmbH, Oberdorla, Germany) and 0.5% Gentamycin (Biochrom GmbH, Berlin, Germany).

All cells were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere of $5 \pm 1\%$ (v/v) CO_2 in air. The cell number in the trypsinized cell suspension was determined using a haemocytometer. Only cells up to ten passages were used in all experiments.

In vitro biocompatibility

Extract preparation. For the evaluation of *in vitro* toxicity of possible leachables, extracts from the 3D-printed constructs were prepared according to ISO 10993-12:2012 (Biological evaluation of medical devices—Part 12: Sample preparation and reference materials). The following extraction conditions were used: $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 72 ± 2 h, with extraction ratio (surface of printed construct area/media volume) of $3 \text{ cm}^2/\text{ml}$. The 3D-printed model constructs were used for all tested materials and cell lines. After extraction, extract samples were transferred to 96-well-cell culture plates with L-929 cells, or AD-MSCs (100 μl per well, 8000 cells/well). All plates were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere of $5 \pm 1\%$ (v/v) CO_2 in air for approximately 24 h. Cell culture medium (without constructs) incubated for 72 ± 2 h in $37 \pm 1^\circ\text{C}$ and $5 \pm 1\%$ (v/v) CO_2 served as control. Cell viability after treatment with extracts was evaluated with CellTiter-Blue[®] viability assay.

Direct cell growth on the printed constructs. For further *in vitro* biocompatibility studies, 4000 cells/ cm^2 surface were seeded on the 3D-printed model constructs and cultivated in 1 ml medium (L-929 in DMEM; hAD-MSC in alpha-MEM) in 24-well plates. At least three printed constructs were used for all tested materials. Plates were incubated for 24 h and 72 h at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere of $5 \pm 1\%$ (v/v) CO_2 in air.

For cell viability/cell proliferation assays, constructs were transferred to a new 24-well plate and an indirect estimation of cell proliferation was performed using CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay (Promega Corporation, Fitchberg, WI, USA) according to the manufacturer instructions. Briefly, working solution of CellTiter-Blue[®]-reagent in DMEM/alpha-MEM without antibiotics and serum was prepared: 10% CellTiterBlue[®]-reagent in DMEM or alpha-MEM. Four hundred microlitres of CTB[®]-working solution were added into each well. Additionally, two wells without cells were filled with CellTiter-Blue[®] working solution for the blank measurement. Plates were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere of $5 \pm 1\%$ (v/v) CO_2 in air for 240 min. Fluorescence was measured with a microplate fluorometer (579Ex/584Em) (Fluoroskan

Ascent, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).

Degradation studies

Degradation studies were carried out in two different experimental set-ups: (1) static degradation and (2) dynamic degradation as described in the following.

Static degradation. Static material degradation study was performed in PBS and, additionally in Kirkland's Biocorrosion Media (KBM: 5.4 g/l NaCl, 0.9 g/l D-Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 0.38 g/l KCl, 0.28 g/l CaCl_2 , 0.122 g/l Na_2HPO_4 (Anhydrous), 0.06 g/l MgSO_4 , 2.2 g/l NaHCO_3).³¹ Therefore, 3D-printed constructs were stored in 3 ml PBS or KBM in air-tight glass vessels at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in an incubator, pH was adjusted to pH 7.4. Degradation was evaluated gravimetrically: dry constructs were weighed before incubation to gain starting weight and after 1, 4, 8, and 12 weeks as end point measurements. Before weighing, constructs were washed in ddH₂O to lose residual salts and dried in a desiccator at room temperature (RT) until weight consistency for 24 h.

PBS/KBM solutions were changed every two weeks to avoid pH shift and keep physiological conditions. All vessels and buffers were sterilized using heat steam sterilization prior to the experiment.

Dynamic degradation. For the dynamic degradation study, flow chambers were fabricated using high performance and inert material polyether ether ketone (PEEK). PEEK was purchased at KTK Kunststofftechnik Vertriebs GmbH (Germering, Germany) and the custom chambers were manufactured by the institute's mechanical workshop. Each chamber contained 12 3D-printed constructs made of the same material, four chambers were used in total. The media reservoir (50 ml of total KBM volume in circuit) and flow chambers were placed at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere of $5 \pm 1\%$ (v/v) CO_2 in air. A constant flow rate of 0.25 ml/min of media was provided by a peristaltic pump (Ismatec IPN, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Germany) located outside of the humidifier. Evaluation of the degradation was conducted as described above. All tubes, adapters, connectors, and flow chambers were sterilized prior to the experiment using heat stem sterilization.

Osteogenic differentiation, Alizarin red staining and quantification of the mineralization

In order to analyze the support of hAD-MSCs' osteogenic differentiation on the respective materials, cells were cultivated in differentiation media for 21 days. Four thousand cells per square centimeter were

seeded on the printed constructs in 24-well cell culture plates using 1 ml alpha-MEM media supplemented with 10% HS and 0.5% Gentamycin. Cells were cultivated until confluence was reached, and the media was replaced by osteogenic differentiation media (5 mM beta-Glycerolphosphate, 0.1 μ M Dexamethasone, 0.2 mM L-Ascorbat-2-phosphate, 0.5% Gentamycin in alpha-MEM with 2.5% human platelet lysate) to induce differentiation. 3D-printed constructs with cells cultivated in proliferation medium served as control. Cells were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere of $5 \pm 1\%$ (v/v) CO_2 in air. The media were changed twice a week. After a total of 21 days of the differentiation the cells were washed with warm PBS, fixed using 90% ethanol in ddH₂O for 15 min at RT and again washed with PBS. Three replicates per material were used and each replicate's differentiation was quantified threefold. For the evaluation of the osteogenic differentiation Alizarin red staining was performed: The anthrachinone in Alizarin red reacts with calcium in the ECM by building red chelate complexes, which can be detected microscopically.

The following staining protocol was used: 200 μ l of Alizarin red solution (1% Alizarin Red S in 2% EtOH (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, WI, USA)) was added to each well and construct for 15 min at RT followed by washing with ddH₂O until no residual dye was visible in the washing fraction. For the quantification of differentiation, Alizarin red chelate complexes bound to the ECM were extracted by incubating in 10% hexadecylpyridinium chloride monohydrate (Sigma Aldrich, St. Louis, WI, USA) in PBS for 20 min at 37°C . Afterwards, the amount of extracted dye was determined by measuring the absorption at 550 nm (100 μ l/Well, 96-Well plate) using an Epoch Microplate Photospectrometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). In order to relate the absorption with Alizarin Red concentration, a serial dilution was prepared. The Alizarin red concentration was determined by using a calibration curve ($y = 0.0506x + 0.06$; $R^2 = 0.9985$).

Time lapse microscopy

For time lapse microscopy, hAD-MSCs (transduced with a 2nd generation lentiviral vector system (pLVTHm, 11 kb), encoded for EGFP production) were seeded on respective material and cultured as described above for 72 h. Afterwards, time-lapse microscopy was performed in an incubator using Lumascope 600 (Etaluma Inc., Carlsbad, CA, USA) for 24 h. Attached videos show cell migration and proliferation at $1440\times$ speed.

Scanning electron microscopy (SEM)

Cell morphology and adherence to the respective material was evaluated with SEM. hAD-MSC were seeded on the constructs (9000 cells/cm²) and cultivated as described above in alpha-MEM for 96 h in order to reach partial confluence. For SEM preparation, the cells were fixed with 4% para formaldehyde (PFA) and 0.1% glutaraldehyde in PBS for 4 h. Subsequently, the cells were dried by several washing steps with ethanol solution: 1×10 min in 30% EtOH, 2×10 min in 30% EtOH, 2×5 min in 50% EtOH, 2×5 min in 70% EtOH, 2×5 min in 90% EtOH, 6×5 min in 100% EtOH. Finally, the objects were treated with hexamethyldisilazane (2×1 min).

For SEM images a Philips 505 microscope (Royal Philips AG, Eindhoven, Netherlands) was used.

Statistical analysis

All data are represented as mean \pm SD for measurements for each sample. Statistical significance was assessed with the ANOVA (One Way, Bonferroni) $p < 0.01$.

Results

The tested materials (see Table 1) were used to fabricate the model constructs via FDM 3D printing technology. Therefore, a three-step procedure was performed (Figure 1). First, the model constructs were drawn 3D using CAD once, followed by the conversion of the digital file (.stl) into a device specific and

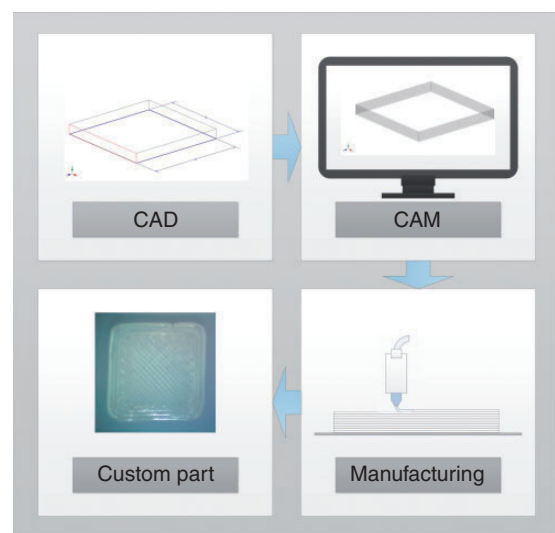


Figure 1. Additive manufacturing process of $10 \times 10 \times 1$ mm constructs: (1) construct design using computer aided design software (CAD), followed by (2) 3D print preparation by computer aided manufacturing (CAM) and (3) the final manufacturing with fused deposition modeling (FDM) 3D printing technique. Adapted from Raddatz et al.¹¹

3D-printable format (G-Code) and processed using computer aided manufacturing (CAM). Printing parameters (nozzle temperature and building plate temperature) were empirically optimized and are shown in Table 1.

In vitro biocompatibility

Processed materials (model constructs) were used for (1) extract preparation to evaluate possible toxic leachables and for (2) direct cell growth experiments with murine fibroblasts (L-929) and hAD-MSCs. The cells were seeded on the constructs in order to evaluate cell viability and proliferation on the 3D-printed materials.

***In vitro* toxicity of extracts.** In order to evaluate the risk of possible *in vivo* toxicity, the materials were tested *in vitro* on potential leachables and extractables, which could be rinsed out of the material during cultivation or after implantation and could have a negative impact on living cells. Extracts from all materials were prepared according to ISO 10993–12:2012. Cell viability was quantified with CellTiter-Blue® assay.

L-929 cells cultivated in extracts of all tested materials showed high cell viability (Figure 2(a)). The fluorescence signals of three samples (L210S, X206S, and LR706S) were above 100% compared to the control, indicating no toxic effect of the extracts on L-929 fibroblasts. Viability of cells treated with the material extract of C212 (PCL) was slightly decreased (86.72% ± 6.19) by about 13% in comparison to control. According to ISO 10993–5:2009 a reduction of cell viability of less than 30% is considered as non-toxic.³² Also results of primary cells cultured in extracts

(Figure 2(b)) show no *in vitro* toxicity. It clearly indicates no toxic impact of extracts of the 3D-printed materials on cell viability, since cell viability was above 90% in comparison to control.

Cell proliferation on printed constructs. Additionally to the *in vitro* extracts toxicity, cell viability of cells directly growing on the four tested materials was determined. Therefore, CTB® assays were conducted after 24 h and after 72 h of cell growth on the model constructs (Figure 3).

Control signals were obtained with cells cultivated on conventional plasma treated cell culture surface, which is optimized for cell growth and proliferation. Subsequently, they showed the highest cell viability signals at both time points. Even though fluorescence signals are lower for cells on 3D-printed materials, a good growth behavior of L-929 cells after the whole time period of 72 h was observed, indicating a good acceptance of the surface material (Figure 3(a)). The cell viability on all four tested materials increased over the cultivation time, indicating unaffected cell proliferation.

The highest proliferation rate among tested materials was obtained on lactic acid copolymer LR706S with a 4.78-fold increase in fluorescence signal (ratio 72 h/24 h). After the entire cultivation time of 72 h, poly-caprolactone C212 showed the highest signal. Considering all samples, results show a stable and comparable cell growth on all tested materials.

Cell proliferation of hAD-MSCs cultured on tested materials is shown in Figure 3(b), which shows the same tendency as L-929 cells. Here again, the highest proliferation rate was obtained with the cells growing on the cell culture treated surface. Nevertheless, cell

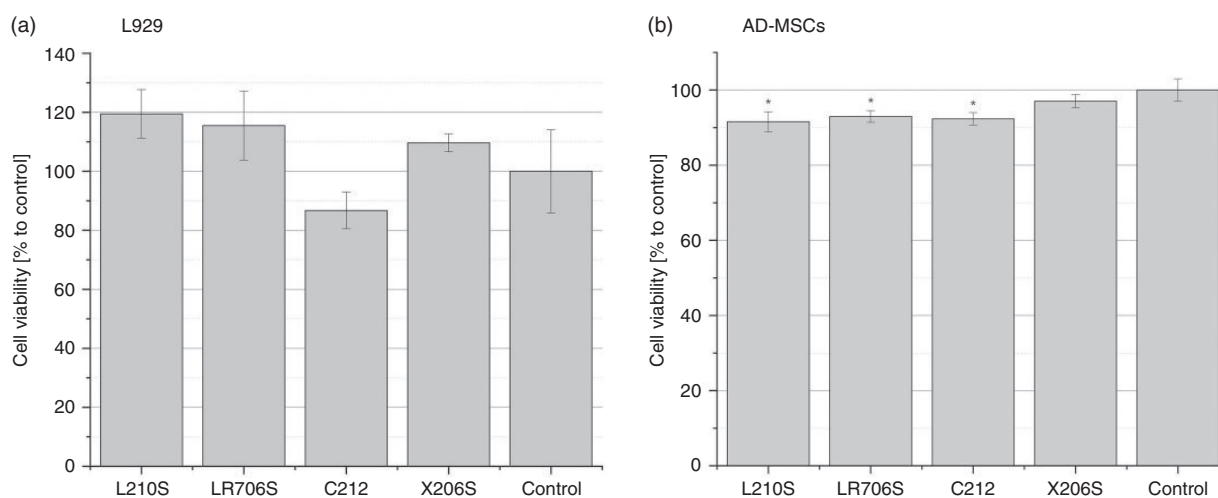


Figure 2. *In vitro* cytotoxicity of extracts prepared from four different 3D-printed materials and determined by the CTB® assay: (a) mouse fibroblast L-929 and (b) adipose-derived human mesenchymal stem cells hADMSCs. The metabolic activity of cells treated with cell culture media without contact to 3D-printed material is used as 100% fluorescence signal control. Data represent the mean ± SD, significant differences to control are indicated by * ($p < 0.01$).

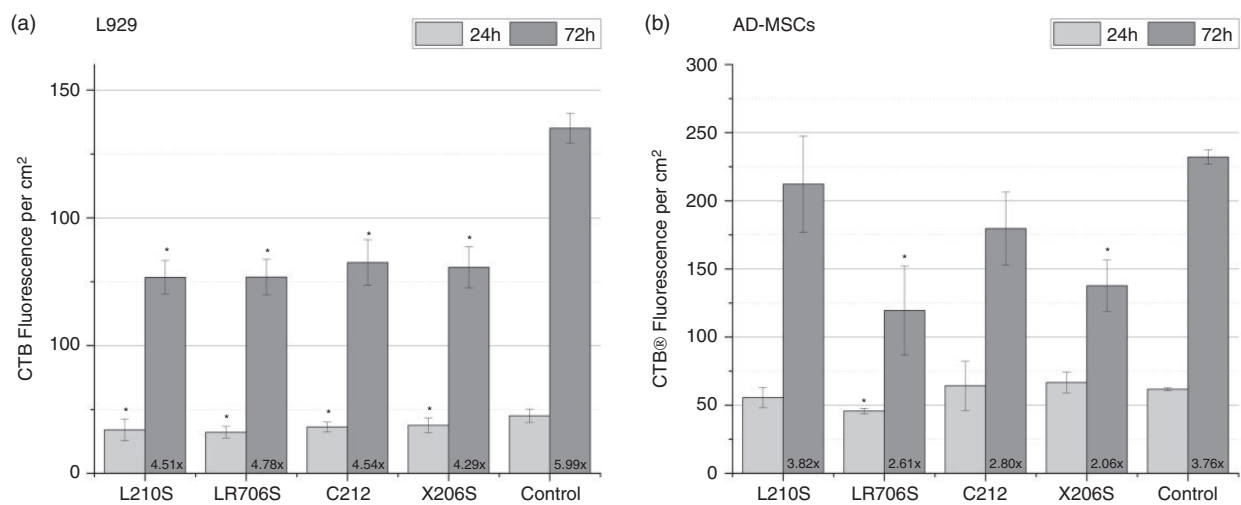


Figure 3. Cell viability of (a) L-929 fibroblasts and (b) hAD-MSCs after 24 h/72 h cultivation adhered to printed constructs determined by the CTB[®] assay including the ratio of both time points. The metabolic activity of cells cultured without 3D-printed material on conventional cell culture surface is used as fluorescence signal control. Data represent the mean \pm SD, significant differences to control are indicated by * ($p < 0.01$).

viability increased from 24 h and 72 h on all tested constructs and even reached proliferation rates comparable to the control: the PLA (L210S) sample not only showed highest cell viability throughout the materials, but also a 3.82-fold increase in cell viability (proliferation rate in control was 3.76).

Scanning electron microscopy (SEM). By means of SEM, cell adherence on the tested materials was evaluated to gather information about cell morphology, cell/material interactions, as well as material surface structure. Cells were seeded on respective printed constructs (9000 cells/cm^2), and cultivated for 96 h with following SEM preparation and imaging.

Figure 4 shows SEM images in two magnifications. In the $20\times$ magnified images, the material surface, printing quality, and layer structure can be better evaluated. Among all samples, the clearly visible layer structure (Figure 4(a1) to (d1)) shows adequate printing results: layers stick together forming a stringent surface. Printing-lanes were $200\text{--}250 \mu\text{m}$ in diameter, in parallel to each other and forming a 3D surface structure. Lanes show “hills” in their center, descending to the sides and finally touching neighboring lanes.

Layers beneath are in a 90° angle to top layer (not shown) to provide stable support for following layers. Construct shell is manufactured of three further lanes surrounding the core. This was necessary to ensure constructs shape.

LR706S (Figure 4(b1)) shows irregularities on the top layer, which could be caused by low nozzle temperature ($220\text{--}230^\circ\text{C}$) during the 3D printing process.

X206S SEM images show qualitatively the smoothest surface (Figure 4(d1)).

Taking all SEM images of Figure 4 into consideration, the material surface can be evaluated in detail: all printed materials showed a regular surface with AM typical artifacts as surface roughness and layer-built shape.

In regards to cell morphology, the higher magnified images demonstrate that the adherent cells reached partial confluence through all materials (except LR706S). Cell shape was comparable to the *in vitro*-typical hAD-MSCs appearance.³³ The stem cells were able to properly adhere to the surface and form an ECM in their surroundings. Furthermore, the cells showed migration between printing lanes (Figure 4 (a2) and (b2)) indicated by formation of bifurcations across a gap between lines.

Live cell imaging (time-lapse microscopy)

To obtain a better understanding of cell adherence, migration, movement and behavior on printed materials, live cell imaging studies were conducted. The representative single images of the time-lapse microscopy are presented in Figure 5. The time-lapse videos can be downloaded via QR-code.

The fluorescent cells (hAD-MSCs) show good adherence to all materials. Moreover, dividing cells can be seen on all printed constructs. Cell shape and migration pattern indicate, that the surface provides proper structure for the cell adhesion and migration. Interestingly, the cells are predominantly moving in printing direction over the constructs. This effect can be observed in all videos (except C212-recording, where

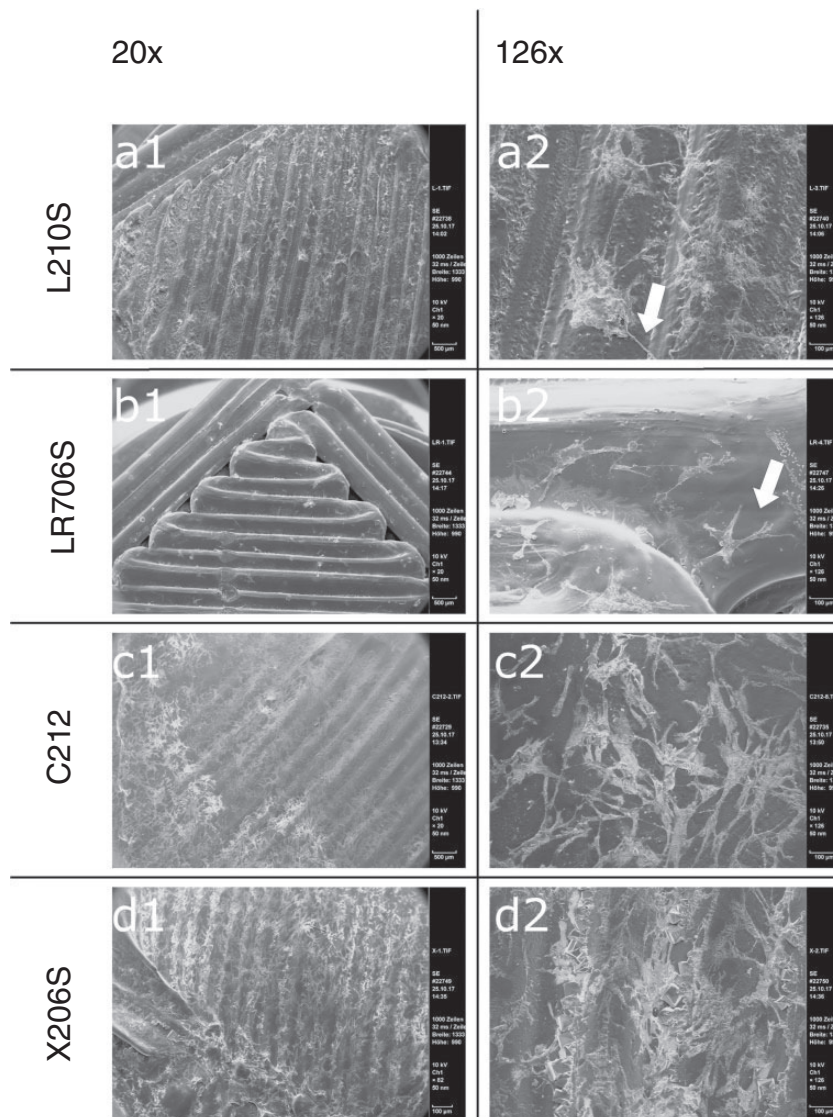


Figure 4. Scanning electron microscopy (SEM) images of 3D printed materials seeded with hAD-MSCs after 96 h cultivation. Arrows indicate bifurcations.

the movement seems to be more random). This may originate in the smooth surface of this material, comparing cell behavior in the video with Figure 4(c2). Also, cells prefer the middle of printing lanes and avoid the “valleys” between them.

In vitro degradation

All tested materials are esterified monomers, which have different chemical stability and physical properties, influencing their degradation and resorption time *in vivo*. In order to predict *in vitro* resorption, the rate of degradation was evaluated *in vitro* as described in section “Degradation studies”.

Poly(dioxanone) X206S showed strong degradation in comparison to other materials (Figure 6(a) and (b)).

Under static degradation conditions, the samples lost between 22% and 28% in weight compared to initial weight after the full incubation time of 12 weeks. All other materials degraded much slower, as PLA L210S reached 1.5% degradation, whereas LR706S and C212 showed higher stability in the used buffers.

Figure 6(c) shows the degradation results of tested materials in KBM under dynamic conditions. Constructs were kept at a constant buffer flow rate of 0.25 ml/min in a custom incubation chamber at 37°C (Figure 6(d)). Buffer flow and composition were chosen to mimic fluid flow at the implant-tissue interfaces of the bone interstitial fluid flow and increase predictability of *in vitro* results with *in vivo* conditions.^{34,35} According to Figure 6(c), dynamic conditions increase degradation rate of X206S. The poly(dioxanone)

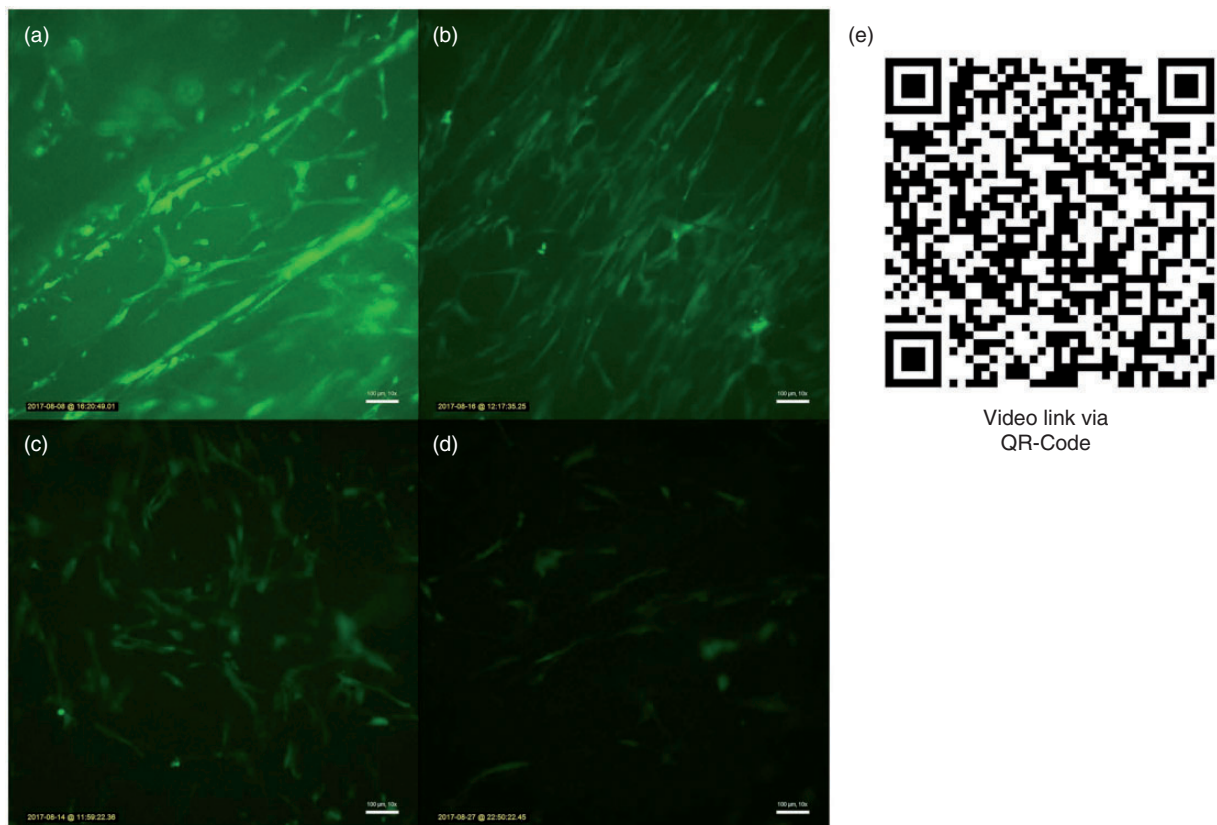


Figure 5. (a) L210S, (b) LR706S, (c) C212, (d) X206S: single images of time-lapse microscopy, (e) QR-code linking to time lapse videos of hAD-MSCs migrating on Resomers[®]. Videos show cell migration over a cultivation time of 24 h in high speed (1440× speed).

degrades about 28% to initial mass, which is a 5% increase compared to static degradation in the same buffer/media. The three remaining materials showed higher stability in dynamic degradation and lost less than 0.5% of the initial mass.

Osteogenic differentiation of hAD-MSCs on 3D-printed constructs

The effect of all materials on differentiation behavior of hAD-MSCs should be evaluated. For differentiation studies, the model constructs were seeded with hAD-MSCs and cultivated for 21 days in osteogenic differentiation media. After cultivation, the cell viability was evaluated by the CTB[®] assay and the degree of differentiation was quantified with Alizarin red staining and extraction.

The overview image of the 3D-printed constructs with cells after cultivation in proliferation and differentiation media followed by Alizarin red staining can be seen in Figure 7. During osteogenic differentiation hAD-MSCs accumulated calcium in the ECM. The red color results from Alizarin/Ca-chelate complexes and is an indicator for the degree of differentiation.

hAD-MSCs cultivated for 21 days in proliferation medium and remained undifferentiated, which is indicated by negative Alizarin red staining. Staining also indicates that differentiated cells seem to strongly adhere to the material surface when compared to undifferentiated control cells. The latter ones showed a detaching of the cells after grown into full confluence.

Alizarin red extraction. In order to quantify the osteogenic differentiation on the printed constructs, Alizarin red was extracted and its concentration was measured photometrically (Figure 8). Moreover, cell viability after 21 days of cultivation on the printed constructs was evaluated. High cell viability was measured after 21 days of cultivation (Figure 8(a)), with the lowest CTB[®] fluorescence signal being produced from the LR706S sample. Despite high cell viability, no Alizarin red was detected in the proliferation controls. This indicates that no spontaneous differentiation took place on the printed constructs. The degree of osteogenic differentiation with external stimulus differs between materials with the highest value on C212 and the lowest on LR706S (Figure 8(b)).

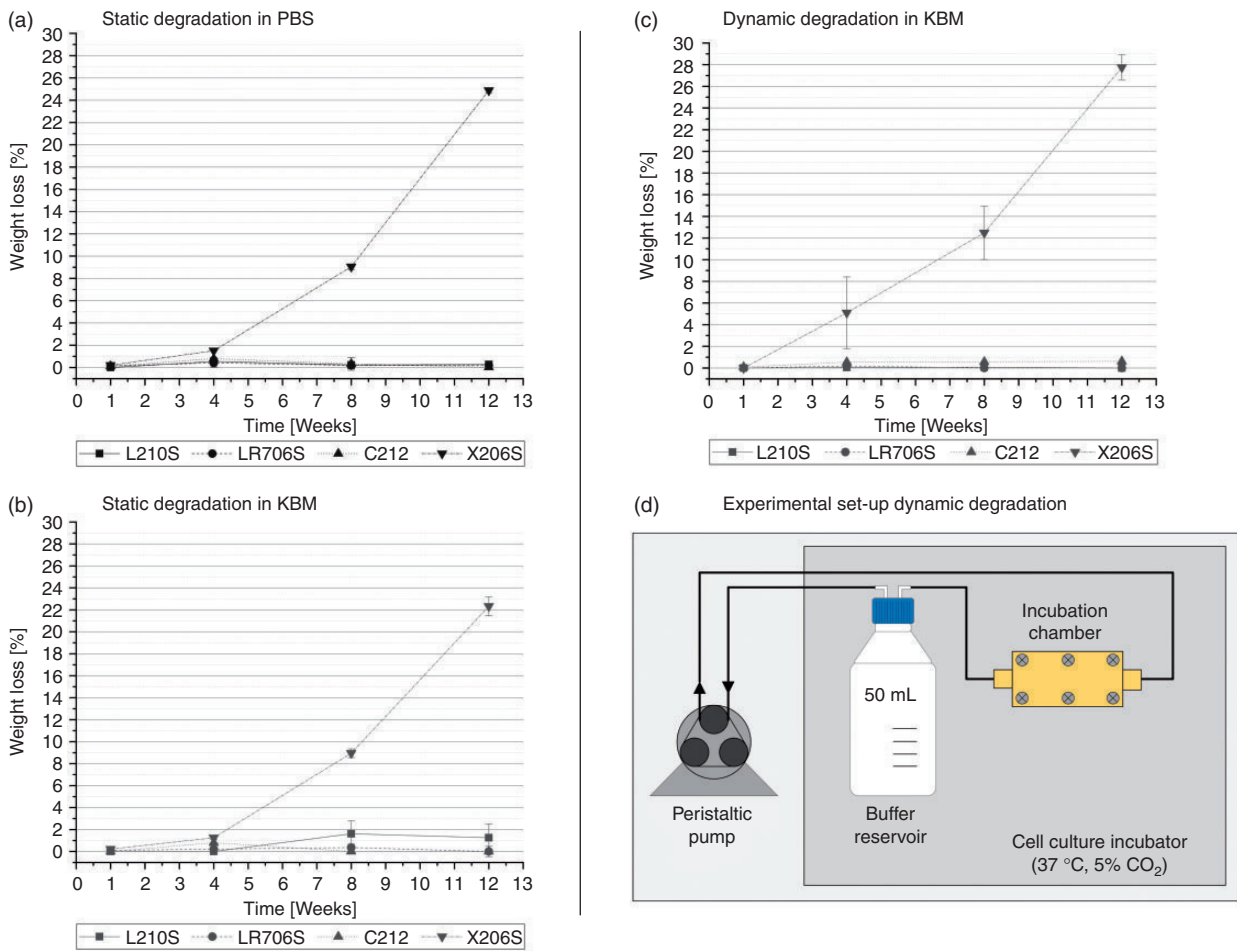


Figure 6. Degradation behavior of printed materials: (a) static degradation in PBS (one construct per 3 ml buffer), (b) static degradation in KBM (one construct per 3 ml buffer), (c) dynamic degradation study in KBM with constant buffer flow rate of 0.25 ml/min, (d) experimental set-up for dynamic degradation. Data points are means + SD, n = 3.

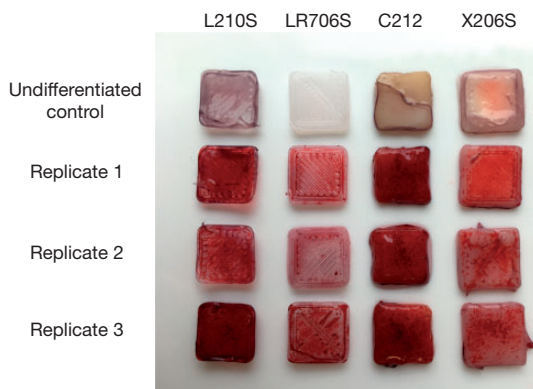


Figure 7. Analysis of the osteogenic differentiation on the 3D-printed constructs with Alizarin red staining: Red colour indicates calcium accumulation in the ECM. Replicates 1–3 represent differentiated hAD-MSCs cultivated on printed material samples. Undifferentiated control samples were cultivated in proliferation medium and are negative for the staining.

Discussion/conclusion and final remarks

Utilization of resorbable materials for 3D printing of implants allows rapid production of highly personalized and sustainable medical products. This approach could solve several existing challenges including creation of highly precise and specific geometrical forms without additional mold production, flexibility in the single piece manufacturing and necessity of implant replacement or removal after healing. In this study four 3D-printed materials (see Table 1) were evaluated regarding their applicability as primary commodity for additive manufactured implants.

To properly manufacture constructs with 3D printing technology, the filament needs to be heated in order to reach the melting point/glass temperature and then extruded by the printing nozzle. Such material manipulations can cause the production of undesirable toxic

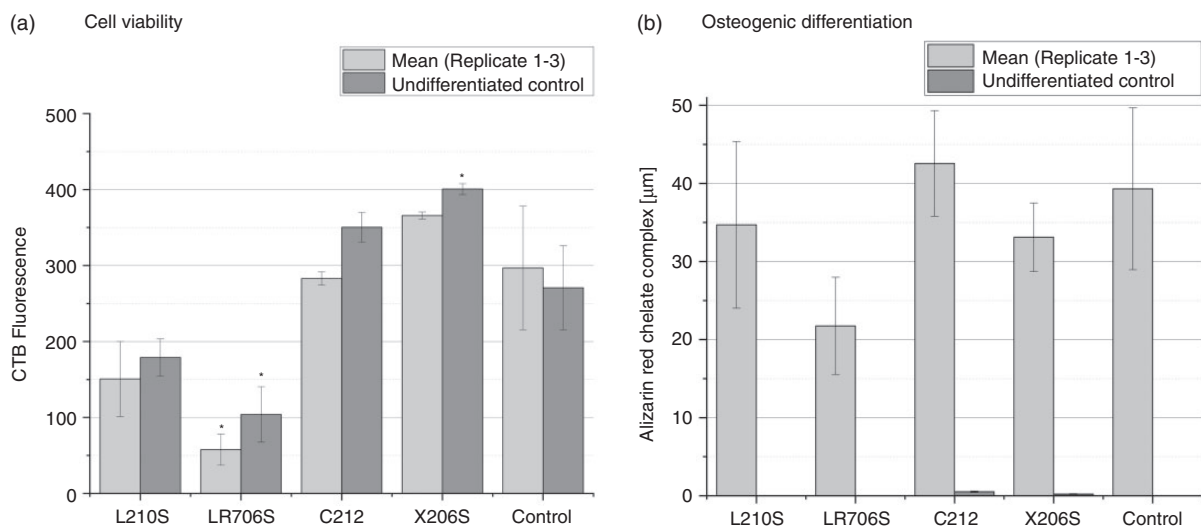


Figure 8. Cell viability (a) and quantification of hAD-MSCs osteogenic differentiation (b) (Alizarin red concentration) on the printed Evonik Resomers[®]. Bars represent the mean of three independent replicates of extracted Alizarin red concentrations of differentiated cells on respective materials as well as a negative control. Very right bars of (a) and (b) are differentiation controls with cells cultivated on conventional cell culture surface. Data represent the mean \pm SD, significant differences to control are indicated by * ($p < 0.01$).

compounds, which can influence the implant functionality *in vivo*. We did show that extracts prepared from the printed materials have no significant negative influence on cell viability on L-929 fibroblasts and hAD-MSCs *in vitro*.

Also cell viability and proliferation directly on the printed model constructs were determined. Support of the cell adhesion and growth on the material is important for the application, since poor adhesion leads to insufficient implant incorporation with risk of inflammation and infection. Cells proliferated well and showed proper cell viability over 72 h of cultivation on all tested materials. The reason of the higher proliferation rates of the control surface could be the plasma treatment of polystyrene surfaces of the control plates in order to enhance protein adsorption and cell adhesion with improved *in vitro* cell growth.^{36,37} Despite the slower growth rate, CTB[®] fluorescence signals of cells adhered to the materials increased over 72 h of cultivation showing acceptable cell proliferation on all tested materials. The lowest proliferation rate and differentiation degree was obtained with LR706S-3D-printed constructs. This material must be closer studied in order to understand the reason for slower cell growth, which could be due to a higher hydrophobicity or weaker cell adhesion on the printed LR706S. Moreover, possibility of non-thermal plasma treatment of printed constructs in order to increase hydrophilicity must be examined. Indeed, Yang et al. could demonstrate that plasma treatment of poly(D,L-lactide) leads to higher fibroblasts adhesion.³⁸ Moreover, modification of plasma treated surface with collagen further improved cell attachment. Another research group

modified the surface of PLA with plasma treatment, which enhanced human fibroblasts adhesion.³⁹

SEM analysis together with time-lapse microscopy also revealed good hAD-MSCs spreading and migration on all printed materials with the lowest cell adhesion and distribution on LR706S. Taken together, cells migrated and proliferated well on all tested printed materials. Cell division could also be observed on-line on all printed materials (Figures 4 and 5). Preferred observed cell movement (except for C212) was along the printing direction, which can be seen in time-lapse videos. One explanation of this behavior could be the microstructures generated during FDM printing as for PCL printing temperature is in between the glass transition temperature and the melting point. The heated printing material is released of the extruder nozzle and applied on previous layer. During this process, the material is pushed in printing direction, generating small grooves along the filament axis. In contrast to these materials, C212 did not show such a phenomenon due to higher smoothness as a result different viscous behavior during the printing process.

For application in bone regeneration field (such as implant or tissue engineered constructs), 3D-printed resorbable materials should not affect (but rather support) osteogenic cell differentiation. In order to predict this influence we examined osteogenic differentiation of hAD-MSCs. All materials did not trigger spontaneous differentiation without additional stimulation. No negative effect after stimulation of osteogenic differentiation could be observed (Figure 8). Predictable degradation behavior is another key issue of the non-permanent implant design.

Depending on the application, type of bone defect or desired bone fixation manner/properties, various degradation rates are desired for different implants. For example, in the case of bone healing, the process of degradation and replacement should be adjusted to the patient's tissue recovery speed. Normal bone fracture of the healthy patient lasts, depending on the bone type and defect size, in the range of 30–150 days.⁴⁰ In this time, osteocytes proliferate and mineralize to populate the cavity at the injury site and connect broken bone parts while the non-permanent implant slowly starts degrading.

To predict the *in vivo* degradation, *in vitro* degradation studies under static and dynamic conditions were performed. Tested materials were carbon-based esters that degrade under acid and leach conditions. Their estimated full degradation timeframe varies between the materials making them suitable for different applications.⁴¹

In order to evaluate degradation *in vitro*, three independent studies were performed. Degradation in PBS was used as a gold standard often recommended for the evaluation of degradation (e.g. ISO 13781:2017). Other degradation studies were performed using a medium designed to mimic salt concentration of blood plasma.³¹ Furthermore, degradation was evaluated under dynamic conditions. Fluid dynamics play an important role in bone biology and implant incorporation: fluid flow is one type of mechanical loading in the bone and interstitial fluid flow provides a specific mechanical environment that is important for the physiological activities of interstitial cells.^{35,42,43} Moreover, interstitial fluid flow at the bone-implant interface has been proposed to play an important role in peri-implant healing. Mathematical models suggest the fluid flow at the implant-bone interface to be 2–4 mm/s.^{42,44} Therefore, it is essential to predict the degradation behavior and rate under dynamic conditions. Degradation behavior of the materials across the three experimental set-ups was quite similar. L210S, LR706S, and C212 degraded very slowly, at about 1.5%, whereas X206S lost about 22% under static and 28% under dynamic conditions of its initial weight after 12 weeks of incubation under static conditions. Degradation of 3D-printed X206S was even more pronounced under dynamic conditions (up to 28%). Highly degradable materials like X206S could be utilized as matrix material for fast regenerating wounds, where a fast vanishing implant is desired. It should be also kept in mind that construct design (e.g. surface/volume ratio) as well as its size have a great influence on degradation behavior. Moreover, if the resorbable materials will be used as scaffolds for tissue engineered constructs, which have to be cultivated *in vitro* in dynamic conditions before

implantation—it is important to know if the constructs lose mass and shape during this cultivation.

Conclusion

It can be stated that 3D printing could be an asset to implant development and production due to its flexibility for implant design (e.g. design freedom, faster design iterations). In particular for resorbable polymers 3D printing is in its infancy. For their implementation regulated starting materials are key to ensure biocompatibility and therefore proper device functionality and control. It was shown that tested resorbable materials can be 3D-printed, they support direct cell growth and the extracts of the printed constructs do not show any toxic effect *in vitro* and (in different rate) on their surface. Further studies, including *in vivo* animal models and mechanical tests, however, must be performed to closely evaluate printed materials. Taken together, our results show that resorbable materials L210S, LR706S, C212, and X206S are suitable for FDM 3D printing, safe application without *in vitro* cytotoxicity and can support *in vitro* osteogenic differentiation of MSCs. Thus, they can be used for implant manufacturing as well as scaffolds for bone tissue engineering.

Author contributions

LR, RG and AL designed the experiments. LR conducted the experimental work, drafted and revised the manuscript. MK conducted cytotoxicity and differentiation assays. JS performed REM. TW and SJ prepared raw material. RG, KA optimized printing parameters and manufactured model constructs and revised the manuscript. TB, SB, DG, MS, AK, TS and AL supervised the work and helped designing the experiments, revised the manuscript and provided helpful ideas for present work. KA, RG, SJ, AK, and TW are employed by the company Evonik Industries AG and had not influenced data collecting or their interpretation.

Acknowledgements

The authors acknowledge the corporation with Dr. Sarah Strauss, Hannover Medical School (Germany), who provided tissue material for hAD-MSCs. We thank PD Dr. Constanca Figueiredo, Hannover Medical School (Germany), for providing EPFG encoding lentiviral vector system for hAD-MSCs.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was also supported by the “Biofabrication

for NIFE” cluster funded by the State of Lower Saxony ministry of Science and Culture and the Volkswagen Stiftung.

ORCID iD

Lukas Raddatz  <http://orcid.org/0000-0002-4170-8318>

References

1. Becker MJ. Ancient “dental implants”: a recently proposed example from France evaluated with other spurious examples. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 19–29.
2. Burkarth A. Handprothese des Götz von Berlichingen. *Landesstelle.de* 2010; 1.
3. Barrows T. Degradable implant materials: a review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clin Mater* 1986; 1: 233–257.
4. FDA. implants and prosthetics. *FDA* 2015; 1.
5. Wintermantel E and Ha S-W. Medizintechnik life science engineering. In: *Medizintechnik life science engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, pp.269–290.
6. Ha S-W, Wintermantel E and Maier G. Polymere. In: *Medizintechnik life science engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, pp.211–268.
7. Ha S-W. Metalle. In: *Medizintechnik life science engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009, pp.183–209.
8. Pina S and Ferreira J. Bioresorbable plates and screws for clinical applications: a review. *J Healthc Eng* 2012; 3: 243–260.
9. Serra T, Mateos-Timoneda MA, Planell JA, et al. 3D printed PLA-based scaffolds: a versatile tool in regenerative medicine. *Organogenesis* 2013; 9: 239–244.
10. Ventola CL. Medical applications for 3D printing: current and projected uses. *P T* 2014; 39: 704–711.
11. Raddatz L, Austerjost J and Beutel S. 3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken. *Chemie unserer Zeit*. Epub ahead of print 6 September 2017. DOI: 10.1002/ciuz.201700802.
12. Raddatz L, Vries I, Austerjost J, et al. Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes. *Eng Life Sci* 2017; 17: 931–939.
13. Ude C, Hentrop T, Lindner P, et al. New perspectives in shake flask pH control using a 3D-printed control unit based on pH online measurement. *Sens Actuators B Chem* 2015; 221: 1035–1043.
14. Lücking TH, Sambale F, Schnaars B, et al. 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: in vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. *Eng Life Sci* 2015; 15: 57–64.
15. Funke M, Diederichs S, Kensy F, et al. The baffled microtiter plate: increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnol Bioeng* 2009; 103: 1118–1128.
16. Russon M-A. China: recycled concrete houses 3D-printed in 24 hours. *International Business Times*, 24 April 2014, www.ibtimes.co.uk/china-recycled-concrete-houses-3d-printed-24-hours-1445981 (24 April 2014, accessed 10 January 2017).
17. Kellner T. Jet engines with 3D-printed parts power next-gen airbus passenger jet, www.gereports.com/post/119370423770/jet-engines-with-3d-printed-parts-power-next-gen/ (2015, accessed 17 January 2018).
18. Hull CW. *EP0171069A2.pdf*EP0171069, USA, https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=EP&NR=0171069A2&KC=A2&FT=D&ND=3&date=19860212&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en_EP (1986, accessed 23 January 2018).
19. Mertz L. Dream it, design it, print it in 3-D: what can 3-D printing do for you?. *IEEE Pulse* 2013; 4: 15–21.
20. Gentsch R and Börner HG. Designing three-dimensional materials at the interface to biology. In: Börner HG, Lutz J-F (eds) *Bioactive surfaces – advances in polymer science*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010, pp.163–192.
21. An J, Teoh JEM, Suntornnond R, et al. Design and 3D printing of scaffolds and tissues. *Engineering* 2015; 1: 261–268.
22. Grund M. *Implementierung von schichtadditiven fertigungsverfahren*. Berlin, Heidelberg: Springer. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1007/978-3-662-44266-1.
23. Banks J. Adding value in additive manufacturing: researchers in the United Kingdom and Europe look to 3D printing for customization. *IEEE Pulse*. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1109/MPUL.2013.2279617 (accessed 23 November 2013)
24. Bartlett S. Printing organs on demand. *Lancet Respir Med*. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1016/S2213-2600(13)70239-X (accessed 04 November 2013)
25. Mertz L. New world of 3-D printing offers ‘completely new ways of thinking’: Q&A with author, engineer, and 3-D printing expert Hod Lipson. *IEEE Pulse*. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1109/MPUL.2013.2279615 (accessed 06 November 2013).
26. Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed Eng Online* 2013. DOI: 10.1186/1475-925X-12-62.
27. Jammalamadaka U and Tappa K. Recent advances in biomaterials for 3D printing and tissue engineering. *J Funct Biomater* 2018; 9: 22
28. La W-G, Jang J, Kim BS, et al. Systemically replicated organic and inorganic bony microenvironment for new bone formation generated by a 3D printing technology. *RSC Adv* 2016; 6: 11546–11553.
29. Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng* 9. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1186/s13036-015-0001-4 (accessed 01 February 2015).
30. Cui H, Zhu W, Nowicki M, et al. Hierarchical fabrication of engineered vascularized bone biphasic constructs via dual 3D bioprinting: integrating regional bioactive factors into architectural design. *Adv Healthc Mater* 2016; 5: 2174–2181.
31. Kirkland NT, Waterman J, Birbilis N, et al. Buffer-regulated biocorrosion of pure magnesium. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23: 283–291.

32. ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.5594/J09750 (accessed June 2009)
33. Eblenkamp M, Neuss-Stein S, Salber S, et al. Stammzellen. In: *Medizintechnik*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009, pp.443–471.
34. Bose S, Vahabzadeh S and Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater Today* 2013; 16: 496–504.
35. Agrawal CM, McKinney JS, Lanctot D, et al. Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21: 2443–2452.
36. Sarstedt und Co. Zell-und Gewebekultur, 2016, 1–21.
37. van Kooten TG, Spijker HT and Busscher HJ. Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2004; 25: 1735–1747.
38. Yang J, Bei J and Wang S. Enhanced cell affinity of poly (d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials* 2002; 23: 2607–2614.
39. Jacobs T, Declercq H, De Geyter N, et al. Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24: 469–478.
40. Busse JW, Bhandari M, Kulkarni AV, et al. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. *CMAJ* 2002; 166: 437–441.
41. Evonik Industries. Bioresorbable polymers for new directions in therapy development, <http://healthcare.evonik.com/product/health-care/en/products/biomaterials/RESOMER/> (2016, accessed 22 January 2018).
42. Hillsley MV and Frangos JA. Review: bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43: 573–581.
43. Fritton SP and Weinbaum S. Fluid and solute transport in bone: flow-induced mechanotransduction. *Annu Rev Fluid Mech* 2009; 41: 347–374.
44. Malfroy Camine V, Terrier A and Pioletti DP. Micromotion-induced peri-prosthetic fluid flow around a cementless femoral stem. *Comput Methods Biomech Biomed Eng* 2017; 20: 730–736.

4.3 Entwicklung und Etablierung einer neuartigen 3D-Bioprinting Strategie für Natriumalginat Hydrogele

Durch die (Weiter-) Entwicklung der additiven Fertigungstechnologien und der Errungenschaften im Bereich 3D-Zellkultur ist in den vergangenen Jahren ein neues Feld des *Tissue Engineerings* entstanden: 3D-Bioprinting. Dieses Zellkulturwerkzeug ist durch die Kombination beider Technologien in der Lage die Zellkultur zu revolutionieren, da es das individuelle Design und die Fertigung von strukturierten 3D-Zellclustern erlaubt.

Ein weites Feld des 3D-Bioprinting beschäftigt sich mit der Etablierung von Zellassays in 3D-Gewebeimitaten. Diese Multilayer-Zellstrukturen zeigen wesentlich realitätsnäheres Zellverhalten als konventionelle 2D-Zellkulturen. Die unzureichende Ausbildung der extrazellulären Matrix in 2D-Kulturen hat ausbleibende Zell/Zell-Kommunikation zur Folge und beeinflusst biochemische Prozesse stark.

Im 3D-Bioprinting werden Zellkulturen in einer gelartigen Matrix (*Bioink*, häufig aus Hydrogelen bestehend) suspendiert und mithilfe des 3D-Bioprinters analog zu anderen extrusionsbasierten schichtadditiven Verfahren über eine Düse geschichtet. Während oder nach der Materialdeposition muss das zunächst flüssige Hydrogel ausgehärtet werden. Der ablaufende Prozess hängt stark vom verwendeten Hydrogel und dem Bioprinting-Verfahren ab und wird photokatalytisch (z.B. Aktivierung eines Photoinitiators per UV-Licht), chemisch (z.B. Natriumalginat/ CaCl_2 -Reaktion) oder physikalisch (z.B. thermisch) induziert. Die Materialien müssen besondere Eigenschaften aufweisen, um als Bioink Verwendung zu finden: (1) adäquate Viskosität und scherverdünnendes Verhalten, (2) schnelle Gelation, (3) (Form-) Stabilität und (4) Biokompatibilität.

Natriumalginat-basierte Hydrogele erfüllen die aufgeführten Kriterien und werden in vielen Publikationen als Material (Bioink) oder Bestandteil des Bioinks verwendet. Insbesondere die hohe Biokompatibilität, gute 3D-Druck-Eigenschaften und geringe Materialkosten zeichnen diese Hydrogele aus. Der Gelationsprozess wird nach der Extrusion chemisch initiiert, indem direkt in eine Calciumchlorid-Lösung gedruckt wird. Durch negative Effekte des CaCl_2 ist diese Vorgehensweise jedoch nicht unkritisch: Hohe CaCl_2 -Konzentrationen wirken zelltoxisch und inhibieren die Sauerstoffdiffusion im Hydrogel. Darüber hinaus sind hohe Auflösungen mit dieser Methode schwierig umzusetzen, da, nach der Fertigung im Bioprinter, das Objekt in ein Kultivierungsgefäß überführt werden muss, wobei die gefertigte Struktur oft Schaden nimmt und die Zellviabilität reduziert wird.

In diesem Abschnitt wird eine neuartige Methode beschrieben, mit der Natriumalginat-Hydrogele über einen Nebel aus einer CaCl_2 -Lösung polymerisiert werden können. Mithilfe einer additiv

gefertigten (MJP-Verfahren) Vernebler-Einheit (LR06) kann eine zellverträglichere Polymerisation des Hydrogels erreicht und die Inkubationsdauer im CaCl_2 -Nebel verringert werden. Des Weiteren erlaubt es die Verwendung von niedriger konzentrierter CaCl_2 -Lösung in dem Nebel. Die Verneblung wird über einen piezoelektrisch betriebenen Ultraschallmechanismus erreicht.

Neben dem Design, der Prototypisierung und der Anwendung der Entwicklung zur Verneblung, werden die verwendeten Hydrogele rheometrisch charakterisiert und ein *proof-of-concept* der Methode erbracht. Es konnte festgestellt werden, dass durch den Verneblungsprozess der additiv gefertigte LR06 keinen Schaden nimmt und sich prinzipiell als Fertigungsgerät eignet. Schließlich wurde mit dem erfolgreichen 3D-Druck verschiedener Zelltypen (Stammzellen und Fibroblasten) die Anwendbarkeit der Entwicklung gezeigt.

Die gesamten Ergebnisse hierzu sind im Artikel „Development and application of an additively manufactured calcium chloride nebulizer for alginate bioprinting purpose“ (2018), erschienen im Journal of Functional Biomaterials, zu finden.

Article

Development and Application of an Additively Manufactured Calcium Chloride Nebulizer for Alginate 3D-Bioprinting Purposes

Lukas Raddatz ^{1,2} , Antonina Lavrentieva ¹, Iliyana Pepelanova ¹, Janina Bahnemann ¹ ,
Dominik Geier ², Thomas Becker ², Thomas Scheper ¹ and Sascha Beutel ^{1,*}

¹ Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany; raddatz@iftc.uni-hannover.de (L.R.); lavrentieva@iftc.uni-hannover.de (A.L.); pepelanova@iftc.uni-hannover.de (I.P.); jbahnemann@iftc.uni-hannover.de (J.B.); scheper@iftc.uni-hannover.de (T.S.)

² Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, Technische Universität München, Weihenstephaner Steig 20, 80354 Freising, Germany; dominik.geier@tum.de (D.G.); tb@tum.de (T.B.)

* Correspondence: beutel@iftc.uni-hannover.de; Tel.: +49-511-762-2868

Received: 24 August 2018; Accepted: 5 November 2018; Published: 9 November 2018



Abstract: Three-dimensional (3D)-bioprinting enables scientists to mimic in vivo micro-environments and to perform in vitro cell experiments under more physiological conditions than is possible with conventional two-dimensional (2D) cell culture. Cell-laden biomaterials (bioinks) are precisely processed to bioengineer tissue three-dimensionally. One primarily used matrix material is sodium alginate. This natural biopolymer provides both fine mechanical properties when gelled and high biocompatibility. Commonly, alginate is 3D bioprinted using extrusion based devices. The gelation reaction is hereby induced by a CaCl₂ solution in the building chamber after material extrusion. This established technique has two main disadvantages: (1) CaCl₂ can have toxic effects on the cell-laden hydrogels by oxygen diffusion limitation and (2) good printing resolution in the CaCl₂ solution is hard to achieve, since the solution needs to be removed afterwards and substituted by cell culture media. Here, we show an innovative approach of alginate bioprinting based on a CaCl₂ nebulizer. The device provides CaCl₂ mist to the building platform inducing the gelation. The necessary amount of CaCl₂ could be decreased as compared to previous gelation strategies and limitation of oxygen transfer during bioprinting can be reduced. The device was manufactured using the MJP-3D printing technique. Subsequently, its digital blueprint (CAD file) can be modified and additive manufactured easily and mounted in various extrusion bioprinters. With our approach, a concept for a more gentle 3D Bioprinting method could be shown. We demonstrated that the concept of an ultrasound-based nebulizer for CaCl₂ mist generation can be used for 3D bioprinting and that the mist-induced polymerization of alginate hydrogels of different concentrations is feasible. Furthermore, different cell-laden alginate concentrations could be used: Cell spheroids (mesenchymal stem cells) and single cells (mouse fibroblasts) were successfully 3D printed yielding viable cells and stable hydrogels after 24 h cultivation. We suggest our work to show a different and novel approach on alginate bioprinting, which could be useful in generating cell-laden hydrogel constructs for e.g., drug screening or (soft) tissue engineering applications.

Keywords: 3D printing; bioprinting; alginate; bioink; cell culture technology; rapid tooling; hydrogels; customizable labware

1. Introduction

One of the most important achievements of mankind is the invention of the printing by Johannes Gutenberg in 1450 AD. With this new method, the typesetting and printing of books was made easier, faster, and less expensive than ever before [1]. Book prices dropped and common people obtained access to literature, which is often referred to as the trigger for “democratization of knowledge” and paved the way for the Reformation and the European Enlightenment [2]. Today, about 570 years later, another disruptive technology revolutionizes our society: three-dimensional (3D) printing. Compared to conventional production strategies this technology enables the fabrication of complex structures in very short periods of time and at lower costs. Because of these advantages, it could, analogously to Gutenberg’s invention, initiate the “democratization of manufacturing”. Since its invention in the 1980s and after significant impact on the production industry, 3D printing currently finds application in biotechnological and chemical laboratories [3–7]. The current research generally confirms that it enables scientists to generate custom tissue constructs for cell screening. In the past years, the disadvantages of conventional two-dimensional (2D) cell culture for pharmaceutical research and industry have become more apparent, as accurate *in vitro* assays turn out to be of poor predictive value [8] caused by reduced cell-cell contacts in 2D cell cultivation. The extra cellular matrix (ECM) generation is limited significantly, resulting in completely different cell behavior compared to *in vivo* 3D tissues [9]. Bioprinting combines 3D printing technology with cell culture technology and it enables researchers to additively manufacture custom structures containing living cells and to imitate tissues [10]. The use of hydrogels as the biomaterials in 3D bioprinting has been described intensively and the most frequently used methods involve: laser-induced forward transfer (LIFT), inkjet printing (IP), and extrusion or dispensing based (EB) [11–13]. Despite its comparable low resolution of about 200–500 μm in the *x/y* plane, EB’s fabrication speed is significantly higher compared to other methods and is often described as the most promising among bioprinting techniques [11,14,15]. One main aspect of 3D bioprinting and bioink compositions are the physical properties of the tissue that shall be imitated—the spectrum reaches from hard cartilage and bone tissue [16] to super soft tissue. The latter was realized using cryogenic 3D printing methods and poly(vinyl) based bioinks. With this technique, constructs can be manufactured, which are of comparable softness as brain and lung tissue [17]. Besides hydrogels as bioinks, silicone compositions are frequently used, as well. Due to their biocompatibility, oxygen permeability, and porous structure, they are suitable for several applications in 3D bioprinting. However, despite its use for the mimicry of mechanical structures, its applicability is limited and e.g., not suitable for drug release or direct cell to cell studies [18]. Recent innovations led to the fabrication of a heart valve using an alginate based bioink [19], but it is still far away from generating transplantable tissues. On the other hand, functional human tissue for drug testing [20], collagen-derived natural leather, and food [21] are already purchasable—to list a few examples. The most frequently used bioprinting materials are hydrogels, which are water retaining insoluble polymers consisting of e.g., proteins and carbohydrates. The highly biocompatible substances, allow cell remodeling, attachment, and spreading. Ideally, the gel undergoes a quick and controlled sol-gel transition, through a change in temperature or pH. Some hydrogels, however, have to be modified chemically to allow fast curing during or after 3D bioprinting. A high variety of materials are used for 3D bioprinting, among which gelatin methacrylate, collagen/gelatin, fibrinogen, agarose, methacrylated hyaluronic acid, and alginate play an important role. Also, compositions are used in order to improve cell-hydrogel interactions or printability [22]. Sodium alginate (Na/Alg) based bioinks have already been extensively studied and numerous publications demonstrate their high potential and wide range of applicability. Na/Alg is a salt derived from the alginic acid and forms a water insoluble hydrogel by the addition of divalent ions, such as Ca^{2+} . It is biodegradable, non-toxic, non-immunogenic, and composed of linear polysaccharides (guluronic and mannuronic acids) [23]. This biopolymer gets utilized both as stand-alone material and as an additive for bioink compositions.

Several groups are using cell-laden alginate hydrogels containing primary hepatocytes, HUVECs, or human chondrocytes in order to manufacture respective tissue at some point [24–28].

Furthermore, microphysiological systems and vascular graft structures were successfully bioprinted and described [25,29]. Sodium alginate is polymerized by ionic crosslinks with CaCl_2 . Normally, in order to convert the liquid alginate to a gel, the cell-laden bioink is printed directly into a CaCl_2 solution. Often, this extensive and complex-to-handle procedure leads to inadequate results. The post-processing, including construct transfer to a cultivation vessel, can lead to its destruction and can influence the cell viability. Moreover, oxygen transfer to the cells in the biomaterial is inhibited when 3D bioprinted directly into a CaCl_2 solution. Other researchers are facing this issue by using alginate containing composites aiming to improve construct quality and hydrogel properties. "CELLINK" is a commercially available bioink that combines nanocellulose and alginate. This hydrogel has fast crosslinking features, making it relevant for soft tissue applications producing more stable objects [10,23]. In other approaches using gelatin [30] or chitosan as accessory agent successfully improved bioprinting results [30,31]. However, the mentioned studies use alginate composite bioink. Another advance was made establishing a different curing method. The freeform reversible embedding of suspended hydrogels (FRESH) termed method utilizes a secondary hydrogel (for example gelatin) functioning as a temporary support [32]. The support matrix contains CaCl_2 inducing the gelation immediately. It could be shown that soft hydrogel scaffolds can be manufactured using FRESH [32], although major disadvantages include the low product resolution, and again, its destruction during post processing and gelatin wash off.

We have developed a novel crosslinking approach using a custom 3D printed CaCl_2 nebulizer. This method allows for a decrease of CaCl_2 concentration to avoid possible toxic effects on the cells and to improve construct grip to the culture plate surface. Current protocols use either a higher CaCl_2 concentration, a significant longer incubation time of the constructs in the curing solution, or combinations of different polymers [19,27,33]. In this study, the nebulization chamber LR06 was designed using CAD software and was printed with a multi jet printer (MJP). The LR06 provides high mist density without affecting the bioprinting process utilizing a piezo element. By applying alternating voltage to the element, the crystal starts to oscillate. This movement is transferred to the above-placed CaCl_2 solution inducing compression waves in the liquid. At the surface of the solution, the high kinetic energy of the waves leads to the nebulization of the liquid, yielding a mist. Two theories are discussed to explain the process: (1) The capillary waves theory postulates that the nebulization takes place at the crests of instable waves at the liquid surface. According to (2), the cavitation bubble theory, a different effect is responsible for the nebulization: Caused by pressure differences between the compression waves, small gas bubbles deploy and implode, generating the mist [34–38]. The exact nebulization mechanism is yet not understood entirely [35]. Different concentrations of alginate were characterized in terms of viscosity and stiffness after polymerization. We successfully 3D bioprinted adipose-derived mesenchymal stem cells and murine fibroblasts (NIH-3T3-GFP) suspended in different alginate concentrations. The cells remained viable and the hydrogels stable during cultivation time. We successfully combined the nebulizer with the Allevi (Allevi Inc., Philadelphia, PA, USA) bioprinter Biobot 1. By reason of its customizable building plate-mount, the LR06 can easily be adjusted to other bioprinter models. The therefore needed CAD .stl blueprints are provided and are ready to download as supplementary material (Files S1 and S2).

2. Results

2.1. Design, Manufacturing and Functioning of the CaCl_2 Nebulizer

The presented 3D bioprinting system is a novel development and uses nebulized CaCl_2 in order to induce Na/Alg polymerization reaction. The main parts of the system (lid and mist chamber with petri dish mount, displayed in grey, Figure 1) were designed using CAD software and additively manufactured with a MJP 3D printer. Using this method, high definition products can be manufactured in short periods of time and of high quality material. The printing material (epoxy resin) is further discussed in Section 2.1.1. The device was designed for the Allevi 1 bioprinter, but it can be modified in

CAD and adapted for other extrusion-based bioprinters. The second part of this device is the nebulizer, mounted to the nebulizer adapter (Figure 1). For the mist generation, it uses a piezo element (piezo crystal). For the whole experimental set-up and workflow, Figure 1C provides the hyperlink to a demonstration video or see supplementary material (Video S1).

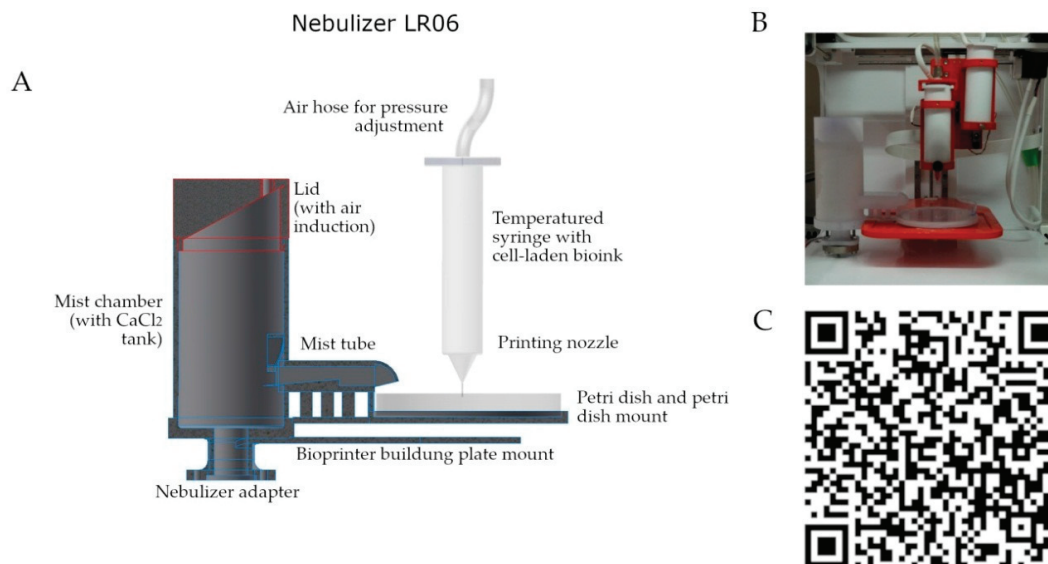


Figure 1. Additive manufactured CaCl₂ Nebulizer LR06. (A) Schematic representation of the LR06 and extruder nozzle; (B) Photograph of the LR06 mounted to a bioprinter; (C) A demonstration video of the LR06 can be found in the supplementary section of the journal and linked as a QR-Code.

2.1.1. Toxicity Evaluation of the Printing Material and Nebulization Effect

The here demonstrated 3D printed nebulizer is made from a resin polymer [39] and it has to fulfill important characteristics, like chemical stability. The printing technique was already evaluated in previous studies, as were the fabricated materials for potential leaching of the cured resin when in contact with biological compounds. It could be shown that the use of this material has no negative influence on the cell viability of animal cell lines (L-929 and NIH-3T3) and cell growth of microbial cells (*E. coli*) [4]. During the ultrasound-driven nebulization process, the liquid is exposed to a high amount of kinetic energy. Material debris could reach the 3D printing platform carried by the mist. In order to evaluate the potential toxic effects on the cell culture, a cytotoxicity assay was performed. Therefore, conventional cell culture media (alpha-MEM) was nebulized both in the LR06 and a second (non-3D-printed) vessel of high performance polyoxymethylene (POM) plastic. The nebulization took place with complete reflux to the tank. This media was further used for a cultivation (mesenchymal stem cells) and a cell viability assay (CellTiterBlue[®]). With this set-up, the cell viability of the cells cultivated in (1) the native media (control), (2) the nebulized media (without risk of debris contamination), and (3) the nebulized media in the LR06 can be evaluated. The results of the cell viability assay are shown in Figure 2. The cell viability of both samples is distinctively above 90% to control, indicating no negative effect on the cells (referring to ISO-10993-5:2009) [40]. The slight decrease of 1% (POM) and 6.9% (LR06) in cell viability as compared to the control notable in Figure 2 could not be statistically validated.

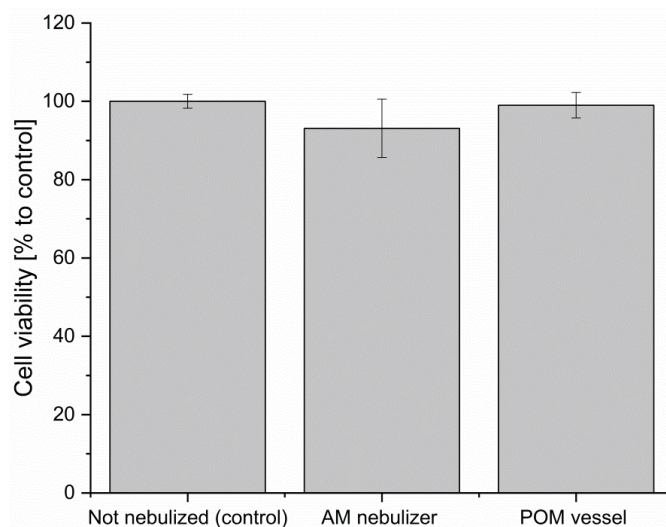


Figure 2. Evaluation of additive manufactured (AM) material used for the manufacture of the LR06. Cell viability of hAD-MSCs in cell culture media that was previously nebulized using: the LR06 (middle column), a vessel made of inert material (POM) (right column). As the control untreated media was used (left column). Cell viability is high (above 90%) in both experimental set-ups indicating, that no negative effect was generated during the nebulization process. Data points are means and SD for $n = 3$. Statistical analysis of the data found no significant difference of shown means (ANOVA One Way, $p = 0.24$).

2.2. Hydrogel Characterization

In order to be suitable as biomaterials for 3D bioprinting, hydrogels must have certain properties, as described above. The viscosity of alginate solutions (Na/Alg) and the storage modulus of crosslinked alginate (Ca/Alg) were determined for various relevant concentrations.

2.2.1. Viscosity

Viscosity of five Na/Alg concentrations (0.5%, 1%, 2%, 3%, and 4% (w/v)) was determined with the help of rheometry. Figure 3 demonstrates the viscosity behavior over a temporal increase of the shear rate. Results show that an increase in alginate concentration leads to a higher material viscosity, going along with the current literature. The lowest concentrations of 0.5–1% (w/v) alginate show the lowest viscosity of 13.5 mPa s (at 100 1/s) and 23.1 mPa s (at 100 1/s). The solution with 2% (w/v) shows a nine-fold higher viscosity of 218.6 mPa s (at 100 1/s) and a further concentration increase results in even higher viscosities: 3% (w/v): 1007.7 mPa s (at 100 1/s) and 4% (w/v): 2156.6 mPa s (w/v).

Furthermore, the solutions with 2–4% alginate show a reduction of viscosity at increasing shear rate. This material behavior is typical for some polymers and it is called the shear-thinning effect [41]. Especially for extrusion 3D printing applications, a shear-thinning behavior of the bioink is desired. It leads to a better fluid flow when the material undergoes a certain force, as it is predominant in the extrusion nozzle during 3D bioprinting. Because of the pressure-induced shear stress, the viscosity decreases, which results in easier hydrogel deposition. Once the stress is removed, the viscosity increases again, leading to improved shape stability. In this case, a shear-thinning effect can be observed at alginate concentrations of 2% and higher.

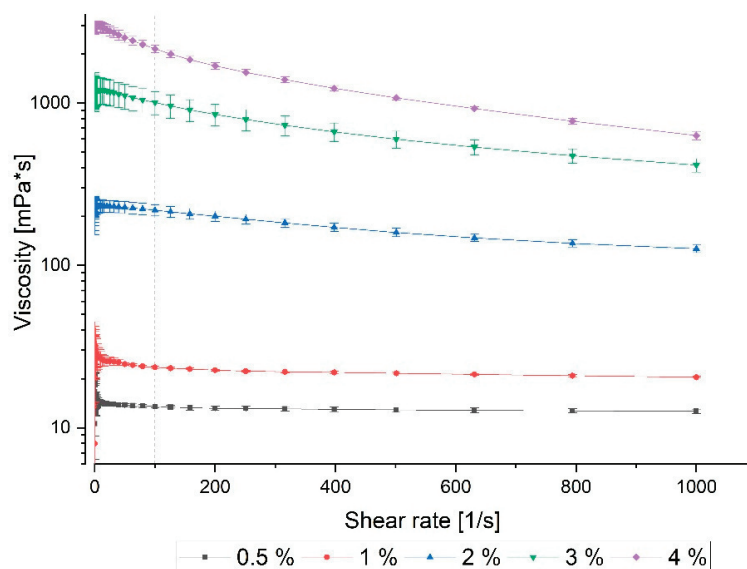


Figure 3. Rheological determination of the viscosity of different sodium alginate concentrations (% (w/v)). Data was obtained by rotational viscometry at 37 °C and logarithmic increase of the shear rate. 2–4% samples show a shear-thinning behavior making them suitable for 3D bioprinting. Data points are means and SD for $n = 3$.

2.2.2. Storage Modulus

The storage modulus (G') was determined together with G'' in oscillation rheology. The G' was always higher than the G'' , indicating the all tested constructs behaved like solids. Furthermore, G' stayed at the same level throughout the measurement, indicating that polymerization was complete [41].

Figure 4 shows the storage moduli of different alginate concentrations. As expected and according to the literature, the storage moduli increase with increasing concentration. Whereas, the storage modulus of the lowest alginate concentration (0.5%) is about 834 ± 143 kPa, the highest alginate concentration of 4% = 23.767 ± 5.614 kPa. The other three samples G' values in between this range and vary from 5.738 ± 2.729 to 9.144 ± 3.078 kPa.

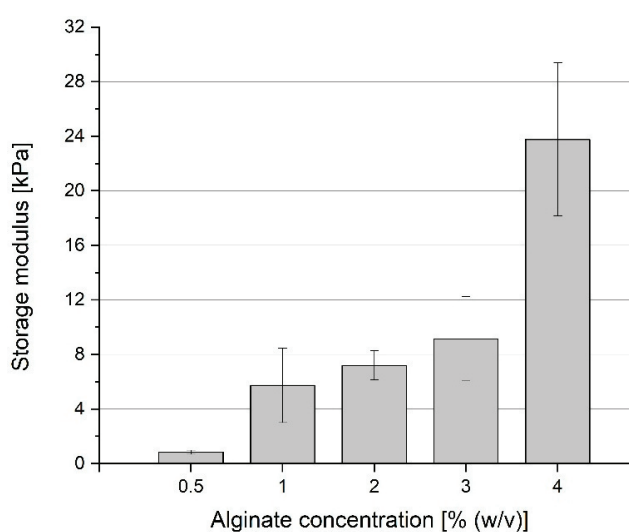


Figure 4. Effect of Cross-linking at five different alginate concentrations on the Storage modulus (G'). G' was determined using model constructs (2 cm diameter, 1 mm height) by performing a time sweep in an oscillation experiment. Data points are means and SD for $n = 3$.

2.3. Bioprinting

Before actual bioprinting with stem cells (hAD-MSCs) and murine fibroblasts (NIH-3T3-GFP) was conducted, the bioprinting parameters of used hydrogels were determined (Table 1).

2.3.1. Bioprinting Parameters and Shape Evaluation

Table 1 shows the used bioprinting parameters for all experiments. The alginate hydrogels with the lowest concentrations (0.5% and 1% (*w/v*)) did not show shear-thinning properties in rheological experiments. These findings go together with poor resolution and shape fidelity in the printing results in this set-up. These concentrations were not used for further bioprinting with cells (Table 1).

In Figures 5 and 6 printing results with different alginate concentrations containing cells are shown. The printing line diameter averages at 500 μm . The adherence on the surface was strong enough to let the constructs stick to the petri dish surface during cultivation. The constructs' theoretical side length (please see supplementary material, Figure S1) was supposed to be 9 mm with the inner lines being 5 mm long. Actual results show 11 mm sides and a 6.5 mm inner line length. Bioprinting of non-linear geometries can be critical and it is often avoided. Figure 6 (bottom right) also shows that narrow curves were manufactured without loss in shape quality or material diffluence.

Table 1. Bioprinting parameters for different Na/Alg hydrogel concentrations.

Na/Alg [%, (<i>w/v</i>)]	Printing Temperature	Printing Platform Temperature	Air Pressure for Extrusion		CaCl ₂ [c]
			[PSI]	[mPa]	
0.5	37 °C	RT (up to 40 °C possible)	N/A	N/A	500 mM
1			<1.5	<10.3	
2			1.8–2.4	12.4–16.5	
3			2.1–2.8	14.5–19.3	
4			9.9–13.1	68.2–90.3	

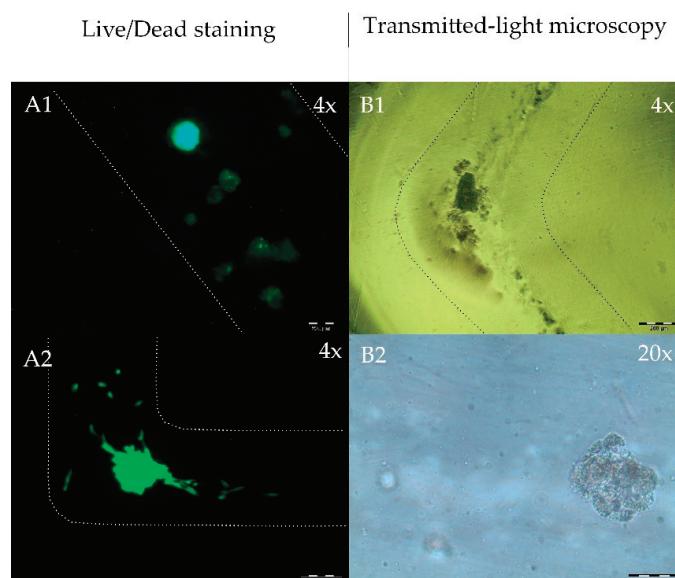


Figure 5. Microscopic images of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSC) spheroids in Ca/Alg hydrogel. Images were taken right after three-dimensional (3D)-bioprint using the LR06. All images show different sections. The borders of the lanes were marked for better visibility. (A) Live/dead (Calcein AM/Propidium Red) images in 4 \times magnification (scale bar = 200 μm). In subfigures (A1) and (A2) the majority of the cells show green fluorescence and is viable. (B) Transmitted-light microscopy showing one corner of the 3D printed construct indicating the precision of the method ((B1), 4 \times) and a zoom on one spheroid ((B2), 20 \times , scale bar = 50 μm). Spheroid diameter is 50–200 μm .

2.3.2. HAD-MSB Bioprinting

Bioprinting with stem cells obtained the best results using 3% Ca/Alg concentration—shown in Figure 5. Average printing line diameter is 400 μm . A critical area in terms of product quality are corners in the printed object. Figure 5 (top right, bottom left) shows that this area could be manufactured without diffuence of the bioink. The images were taken after 24 h cultivation time and show both cell types after live/dead staining. The majority of the cells are still viable and survived both the bioprinting process intself and CaCl_2 mist-induced bioink polymerization. The majority the of cells in the live/dead image show green fluorescence and are viable.

2.3.3. NIH-3T3 3D Bioprinting

In addition to the printed stem cells that are presented above, murine fibroblasts were 3D bioprinted while using the LR06. The used cell line was transduced with a green fluorescence protein. This allows for observing the cells under fluorescent light and track cell viability via GFP protein biosynthesis. The printing results for three different Ca/Alg concentrations are presented in Figure 6. The fibroblasts' green appearance is originated in GFP expression in the hydrogel in all 3D bioprinted alginate concentrations, indicating viable cells.

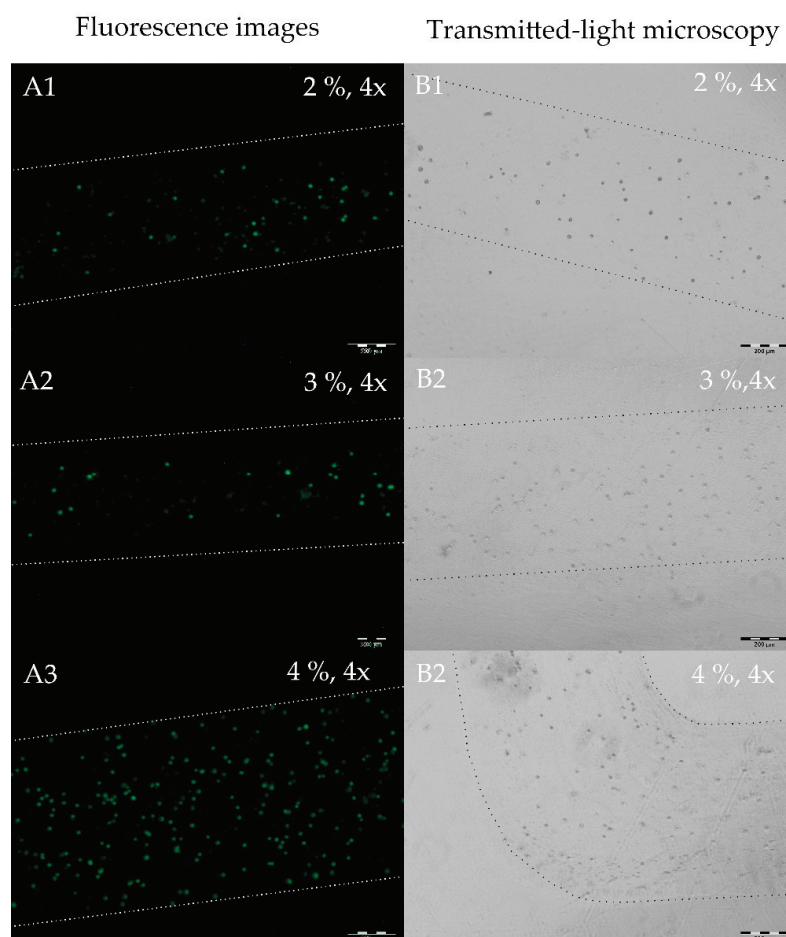


Figure 6. Microscopic images of NIH-3T3-GFP fibroblasts of different alginate-concentrations (2%, 3% and 4% (*v/w*)) in 4 \times magnification (scale bar = 200 μm). The images were taken after 3D-bioprint using the LR06 and 24 h cultivation. All images show different sections. The borders of the lanes were marked for better visibility. (A) Fluorescence microscopy images. (A1–A3) show green fibroblasts due to GFP expression. (B) Transmitted-light microscopy images. (B1–B3) show the transmitted-light microscopy images. (B3) shows a 90° angle of the 3D-bioprinted structure.

3. Discussion and Conclusions

Recent research demonstrates the importance of Na/Alg 3D bioprinting and its many applications [19,23–29]. The here introduced 3D printed nebulizer (LR06) is an innovative approach of Na/Alg 3D bioprinting and it is realized by combining two additive manufacturing methods: (1) The presented nebulizer LR06 was 3D printed using MJP technology and designed for (2) extrusion based 3D bioprinting applications. We demonstrated that this set-up is suitable for manufacturing alginate constructs. This allows the assumption that its application in regulated fields with high standards, such as the biotechnological sector and tissue engineering, is possible. No negative effects on investigated cell lines that came in contact with the generated mist could be measured. The used cells showed no reduction in cell viability compared to the control. In actual application of the LR06, however, no media but CaCl_2 gets nebulized and is washed off immediately after crosslinking, minimizing the risk of toxic effects.

Besides the development of LR06, the characterization of suitable alginate concentration for bioprinting was carried out. Viscosity and storage modulus (G' , describing the behavior of a visco-elastic body under oscillatory shear stress) of Na/Alg, and Ca/Alg in concentrations of 0.5–4% (w/v) were determined. Corresponding to existing literature, we showed that concentrations of 2% and higher have shear-thinning material properties, a relevant characteristic of a biomaterial for extrusion bioprinting [42]: The pneumatically applied pressure on the bioink improves its fluid flow behavior and it enhances the construct to hold its shape after extrusion process and before completion of the polymerization. Storage modulus (G') of the alginate was determined for the same alginate concentrations and an increase with higher Ca/Alg concentration could be evaluated. This leads to two conclusions: (1) Lower concentrated Ca/Alg results in less stable hydrogels using the LR06 and (2) with each concentration another potential application comes along, some tissues (e.g., vascular tissues) demand stiffer environments than others (e.g., muscle cells). We obtained the best printing results using 3% and 4% Na/Alg. These concentrations are commonly used and described in the literature [11,23,25,43–46]. Other groups use composites in order to yield stable products [10,23] or complex protocols (e.g., cryogenic 3D printing [17] or FRESH [32]). With our approach, we were able to produce stable Na/Alg structures presenting a feasible method. In addition to that, we could use medium to low concentrated CaCl_2 solution, as compared to other studies [19,27,33].

The objective of this work was to demonstrate the application of this innovative printing set-up to the materials of different viscosities. In further studies, direct comparison of the printed structures of the same architecture and volume but different viscosities must be performed. Furthermore, bioprinting with two different cell types (hAD-MSCs spheroids and NIH-3T3-GFP) could be accomplished using the LR06. Cells stayed viable for the cultivation period of at least 24 h and the printed constructs neither lost their shape nor dissolved in the media. This proof of principle shows that the LR06 works. In order to characterize the device and the 3D bioprinted products thoroughly, further studies need to be performed. The direct comparison of the printed structures of the same architecture and volume but different viscosities, the shape fidelity (mechanical characterization) over time, as well as the warping and adhesion behavior, need to be evaluated. In addition to that, more sophisticated alginate based hydrogel compositions could be tested with the LR06. For example, the use of cell culture medium instead of deionized water for Na/Alg preparation, which could enhance cell growth and viability [25].

Altogether, the LR06 has proven to be a functional device for sodium alginate bioprinting and it could be used by other researchers working with alginate-based bioinks. In addition, CaCl_2 mist is suitable to induce polymerization without a negative impact on the cell containing bioink.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture

Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) were isolated from the adipose tissues of patients after abdominoplastic surgery. Informed consent was obtained from all

donors and the process was approved by the ethics committee of Hannover Medical School. hAD-MSCs were maintained in alpha-MEM (ThermoFisher Corporation, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% human serum (HS) (CC Pro GmbH, Oberdorla, Germany) and 0.5% Gentamycin (Biochrom GmbH, Berlin, Germany). All the cells were incubated at 37 ± 1 °C in a humidified atmosphere of $5\% \pm 1\%$ (*v/v*) CO₂ in air. The cell number in the trypsinized cell suspension was determined using a haemocytometer.

NIH-3T3 mouse fibroblast cells transduced with a GFP were kindly provided by Prof. Andrea Hoffmann (Hannover Medical School). NIH-3T3 were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (D7777 Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 100 µg/mL antibiotics (penicillin-streptomycin) in a humidified environment at 37 °C and 5% CO₂. Only cells of up to ten passages were used in all experiments.

hAD-MSCs Spheroids

hAD-MSC-spheroids were created using CELLSTAR[®] Cell-Repellent Surface cultivation flasks (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland). Cell suspension, eight million cells in 10 mL alpha-MEM (ThermoFisher Corporation, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% human serum (HS) (CC Pro GmbH, Oberdorla, Germany) and 0.5% Gentamycin (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) was placed into T75 flask for 24 h and the resulting spheroids were centrifuged at 300 g and resuspended in alginates.

4.2. Cell Staining (Live/Dead Assay)

For live/dead staining, bioprinted constructs were incubated for 15 min at 37 °C in cell culture medium containing 15 µL Calcein-AM (SigmaAldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) and 3 µL propidium iodide (SigmaAldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) per 1.482 mL alpha-MEM medium. Microscopic images were taken with fluorescence microscope Olympus IX 50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) with the camera (Olympus SC30, IX-TVAD, Tokyo, Japan) and CellSens Software (CellSens Standard 1.7.1, Olympus).

4.3. Cell Toxicity Evaluation of Nebulized Media and CellTiterBlue[®] Assay

Cell toxicity experiment evaluation is based on the ISO 10993-12:2012 (Biological evaluation of medical devices—Part 12: Sample preparation and reference materials) protocol. Here, a reduction of cell viability after treatment with extraction media of >20% indicates a toxic effect on the cells. The operation procedure for the ISO protocol-derived assay is as follows: 20 µL media were nebulized in the respective vessel for 1 min and was used for the cultivation of AD-MSCs (100 µL and 8000 cells per well) in 96 well plates for 24 h at 37 ± 1 °C in a humidified atmosphere of $5\% \pm 1\%$ (*v/v*) CO₂ in air. After medium replacement with CTB[®] solution cell culture medium (without nebulization) was incubated for 72 under the same conditions served as control.

CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay (Promega Corporation, Fitchberg, WI, USA) was conducted according to manufacturer instructions: Briefly, working solution of CellTiter-Blue[®]-reagent in DMEM/alpha-MEM without antibiotics and serum was prepared: 10% CellTiter-Blue[®]-reagent in DMEM or alpha-MEM. 100 µL of CTB[®]-working solution was added into each well. Additionally, two wells without cells were filled with CellTiter-Blue[®] working solution for the blank measurement. Plates were incubated at 37 ± 1 °C in a humidified atmosphere of $5\% \pm 1\%$ (*v/v*) CO₂ in air for 105 min. Fluorescence was measured with a microplate fluorometer (Ex579 nm/Em584 nm) (Fluoroskan Ascent, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA).

4.4. CAD Modeling and 3D Printing Techniques

4.4.1. Nebulizer

The nebulizer used in this study is a custom design. It is assembled of two parts: (1) 3D printed bioprinter-mount with mist chamber and (2) the nebulizer. The latter is a waterproof ultrasonic mist generator (Sens humidity 12 V nebulizer mod, NB80E-01-H, TDK Corporation, Tokyo, Japan). The settings of the piezo element were set once and used for all presented results: 12 V operating voltage, 40 mm CaCl₂ solution level, 1600 Hz. Please see Figure 1 for further details.

For design, all 3D printed parts were constructed with computer-aided-design (CAD) software Autodesk Inventor Professional 2015 (Autodesk Inc., San Rafael, CA, USA). The nebulizer is designed to be mounted in an Allevi Biobot 1 bioprinter. As rapid prototyping for preliminary experiments (fitting to Biobot 1 bioprinter, CaCl₂ mist tests), the fused deposition modeling (FDM) 3D printing technique was used. Therefore, the nebulizer was manufactured with a Makerbot Z18 (Stratasys, Eden Prairie, MN, USA), as printing material poly lactic acid (PLA) was deployed (printing time 14 h at 0.2 mm layer height). The final product, which was used for bioprinting experiments, was 3D printed using a high definition multi jet 3D printer (MJP) ProJet 2500 (3D Systems, Rock Hill, SC, USA) and sliced with 3D Sprint software (3D Systems; Rock Hill, SC, USA). Printing material was VisiJet M2-RCL [4] (printing time 21 h at 30 μm layer height). The used 3D printing material was tested both on its chemical stability and biocompatibility in previous studies and published by Raddatz et al. in 2017 [4].

4.4.2. Bioink Preparation

As bioink 0.5%, 1%, 2%, 3% and 4% (*w/v*) sodium alginate solution (0.5; 1; 2, 3, and 4 g CaCl₂ in 100 mL deionized water) was used and heat steam sterilised before further application. After cultivation as described above, the cells (hAD-MSCs, NIH-3T3-GFP) were centrifuged (5 min, 300× *g*) and resuspended in the respective hydrogel concentration (5×10^6 cells/mL). Before centrifugation, NIH-3T3-GFP were detached from the cell culture surface using 4 mL Trypsin solution. Finally, the bioink was transferred to 10 mL syringes and instantly mounted in the bioprinter and used for bioprinting.

4.4.3. 3D Bioprinting

3D bioprinted constructs were designed using CAD software mentioned in Section 4.4 and sliced with Repetier Host. For 3D bioprinting, the robotic dispensing bioprinter Biobot 1 (Allevi Inc., Philadelphia, PA, USA) was used.

Bioprinting took place in petri dishes (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich). Therefore, the nebulizer was mounted on the bioprinter's building platform, as seen in Figure 1B. In order to improve surface hydrophilicity and gain better printing results, the surface was roughened using abrasive paper (3M Lapping Film Bogen x261, 3 μm grain size, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Germany). Different printing nozzles were tested and 0.256 mm diameter nozzles (Nordson Corporation, Westlake, OH, USA) turned out to yield the best results (not shown). Gelation was induced by nebulized 500 mM CaCl₂. Further printing parameters are listed in Table 1.

Before bioprinting all devices and material were sterilized. The bioprinter, petri dishes, and the 3D printed nebulizer were sterilized prior to the experiment (rinsed with 70% (*v/v*) isopropanol and 30 min under UV radiation). CaCl₂ solution was sterilized using sterile filtration. Assembly of the nebulizer and actual bioprinting were conducted in sterile environments in a laminar flow cabinet.

Bioprinting work flow: After assembly of the nebulizer and its mounting in the bioprinter, the syringe is filled with hydrogel (containing the hAD-MSC spheroids and NIH-3T3-GFP, respectively). After the 3D print has ended, the construct is exposed to the CaCl₂ mist for 30 s. Afterwards, the petri dish with the bioprinted construct is washed with PBS twice and 250 μL cell culture media (alpha-MEM) and then incubated at 37 ± 1 °C in a humidified atmosphere of $5\% \pm 1\%$ (*v/v*) CO₂ in air.

4.5. Rheology

Alginate solutions for rheology experiments were prepared as described in Section 4.4.2. Measurements were performed with a MCR302 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria) rheometer equipped with plate-plate geometry and a temperature-controlled peltier element. Each concentration was measured in three replicates.

4.5.1. Viscosity

Viscosity measurements were performed with rotational viscometry with a measuring plate of 40 mm diameter and a gap size of 1 mm. The sample (1.4 mL) was pipetted onto the measuring plate and was allowed to equilibrate for 2 min at 37 °C. Measurements were performed at 37 °C with a logarithmic increase of the shear rate [1/s] at 41 time points 0–1000 1/s.

4.5.2. Storage Modulus

The storage modulus was determined for model constructs of Ca/Alg discs that were fabricated in the dimensions matching the plate geometry of the rheological instrument. For this purpose, Na/Alg solution of appropriate concentration was poured in silicone casting molds (2 cm diameter, 1 mm height). The constructs could not be crosslinked by the nebulizer as the height of 1 mm provided too high of a diffusion barrier and the solution remained liquid. Therefore, direct addition of CaCl₂ solution had to be performed.

Storage modulus measurements were performed with a time sweep in an oscillation experiment with constant 0.3% (amplitude γ) and a frequency of 1 Hz in the linear viscoelastic range of the alginate hydrogel. Measurements were performed at 37 °C with a measuring plate of 20 mm, a gap size of 1 mm, and a constant load of 1 N. Values shown are averages of six individual measurements.

4.6. Chemicals

Used bulk chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Corp. (Taufkirchen, Germany). Deionized water was prepared with Arium[®] (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany). Sodium alginate (A2033, 100 kDa, M/G ratio: 1.56) was purchased at Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

4.7. Statistical Analysis

For the statistical analysis, ANOVA (One Way, Bonferroni) was used. The confidence interval is 99%. As operating software Origin 2018 Version 95G (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) was used. All data represented as mean \pm SD for measurements for each sample.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-4983/9/4/63/s1>, File S1: LR06-Chamber, File S2: LR06-Lid, Video S1: Demonstration-Video, Figure S1: Object-processing.

Author Contributions: Conceptualization, L.R. and A.L.; Formal analysis, L.R.; Funding acquisition, J.B., D.G., T.B., T.S. and S.B.; Investigation, L.R., A.L. and I.P.; Methodology, L.R.; Project administration, T.B., T.S. and S.B.; Software, L.R.; Supervision, D.G., T.B., T.S. and S.B.; Visualization, L.R.; Writing—original draft, L.R.; Writing—review & editing, L.R., A.L. and T.S.

Funding: The publication of this article was funded by the Open Access fund of Leibniz Universität Hannover.

Acknowledgments: The authors acknowledge Ethan Overfelt for proofreading the manuscript and all associates for helpful discussions and technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lehmann-Haupt, H.E. Johannes Gutenberg. German Printer. Britannica.com. Available online: <https://www.britannica.com/biography/Johannes-Gutenberg> (accessed on 3 May 2018).
2. Johnston, G. *Preaching to a Postmodern World: A Guide to Reaching Twenty-First Century Listeners*; Baker Books: Ada, MI, USA, 2001; ISBN 0801063671.

3. Raddatz, L.; Austerjost, J.; Beutel, S. 3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken. *Chem. Unserer Zeit* **2017**. [[CrossRef](#)]
4. Raddatz, L.; Vries, I.; Austerjost, J.; Lavrentieva, A.; Geier, D.; Becker, T.; Beutel, S.; Scheper, T. Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes. *Eng. Life Sci.* **2017**, *17*, 931–939. [[CrossRef](#)]
5. Lücking, T.H.; Sambale, F.; Beutel, S.; Scheper, T. 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: A proof of principle. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 51–56. [[CrossRef](#)]
6. Lücking, T.H.; Sambale, F.; Schnaars, B.; Bulnes-Abundis, D.; Beutel, S.; Scheper, T. 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 57–64. [[CrossRef](#)]
7. Ude, C.; Hentrop, T.; Lindner, P.; Lücking, T.H.; Scheper, T.; Beutel, S. New perspectives in shake flask pH control using a 3D-printed control unit based on pH online measurement. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *221*, 1035–1043. [[CrossRef](#)]
8. Maltman, D.J.; Przyborski, S.A. Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 1072–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Holmes, A.M.; Charlton, A.; Derby, B.; Ewart, L.; Scott, A.; Shu, W. Rising to the challenge: Applying biofabrication approaches for better drug and chemical product development. *Biofabrication* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hölzl, K.; Lin, S.; Tytgat, L.; Van Vlierberghe, S.; Gu, L.; Ovsianikov, A. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* **2016**, *8*, 032002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Malda, J.; Visser, J.; Melchels, F.P.; Jüngst, T.; Hennink, W.E.; Dhert, W.J.A.; Groll, J.; Huttmacher, D.W. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5011–5028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Koch, L.; Gruene, M.; Unger, C.; Chichkov, B. Laser Assisted Cell Printing. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2013**, *14*, 91–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gungor-Ozkerim, P.S.; Inci, I.; Zhang, Y.S.; Khademhosseini, A.; Dokmeci, M.R. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater. Sci.* **2018**, *6*, 915–946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Derby, B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science* **2012**, *338*, 921–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ferris, C.J.; Gilmore, K.G.; Wallace, G.G.; in het Panhuis, M. Biofabrication: An overview of the approaches used for printing of living cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 4243–4258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. De Mori, A.; Peña Fernández, M.; Blunn, G.; Tozzi, G.; Roldo, M.; De Mori, A.; Peña Fernández, M.; Blunn, G.; Tozzi, G.; Roldo, M. 3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *Polymers* **2018**, *10*, 285. [[CrossRef](#)]
17. Tan, Z.; Parisi, C.; Di Silvio, L.; Dini, D.; Forte, A.E. Cryogenic 3D Printing of Super Soft Hydrogels. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mohanty, S.; Alm, M.; Hemmingsen, M.; Dolatshahi-Pirouz, A.; Trifol, J.; Thomsen, P.; Dufva, M.; Wolff, A.; Emnéus, J. 3D Printed Silicone-Hydrogel Scaffold with Enhanced Physicochemical Properties. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 1321–1329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Duan, B.; Hockaday, L.A.; Kang, K.H.; Butcher, J.T. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, *101A*, 1255–1264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Shepherd, B.R.; Presnell, S.C.; Evinger, A.J. Engineered Three-Dimensional Connective Tissue Constructs and Methods of Making the Same. WO2013192290A1, 27 December 2013.
21. Lipton, J.I.; Cutler, M.; Nigl, F.; Cohen, D.; Lipson, H. Additive manufacturing for the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *43*, 114–123. [[CrossRef](#)]
22. Jammalamadaka, U.; Tappa, K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *J. Funct. Biomater.* **2018**, *9*, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Axpe, E.; Oyen, M.L. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kim, Y.; Kang, K.; Jeong, J.; Paik, S.S.; Kim, J.S.; Park, S.A.; Kim, W.D.; Park, J.; Choi, D. Three-dimensional (3D) printing of mouse primary hepatocytes to generate 3D hepatic structure. *Ann. Surg. Treat. Res.* **2017**, *92*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Jia, J.; Richards, D.J.; Pollard, S.; Tan, Y.; Rodriguez, J.; Visconti, R.P.; Trusk, T.C.; Yost, M.J.; Yao, H.; Markwald, R.R.; Mei, Y. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 4323–4331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Wu, D.Y.; Meure, S.; Solomon, D. Self-healing polymeric materials: A review of recent developments. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 479–522. [[CrossRef](#)]
27. Nguyen, D.; Hägg, D.A.; Forsman, A.; Ekholm, J.; Nimkingratana, P.; Brantsing, C.; Kalogeropoulos, T.; Zaunz, S.; Concaro, S.; Brittberg, M.; Lindahl, A.; Gatenholm, P.; Enejder, A.; Simonsson, S. Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jia, W.; Gungor-Ozkerim, P.S.; Zhang, Y.S.; Yue, K.; Zhu, K.; Liu, W.; Pi, Q.; Byambaa, B.; Dokmeci, M.R.; Shin, S.R.; et al. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials* **2016**, *106*, 58–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Williams, S.K.; Touroo, J.S.; Church, K.H.; Hoying, J.B. Encapsulation of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells in Alginate Hydrogel Spheroids Using a Direct-Write Three-Dimensional Printing System. *Biores. Open Access* **2013**, *2*, 448–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kyle, S.; Jessop, Z.M.; Al-Sabah, A.; Whitaker, I.S. ‘Printability’ of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1700264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Li, Z.; Ramay, H.R.; Hauch, K.D.; Xiao, D.; Zhang, M. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3919–3928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hinton, T.J.; Jallerat, Q.; Palchesko, R.N.; Park, J.H.; Grodzicki, M.S.; Shue, H.J.; Ramadan, M.H.; Hudson, A.R.; Feinberg, A.W. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci. Adv.* **2015**, *1*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. George, A.; Hu, B.; Xue, Z.; Du, Z.; Nageswar, Y.V.D.; Murthy, S.N.; Madhav, B.; Shankar, J.; Lin, T.-H.; Huang, W.-H.; et al. Biomineralization and Biomimetic Synthesis of Biomineral and Nanomaterials. In *Advances in Biomimetics*; InTech: Rijeka, Croatia, 2011; ISBN 978-953-307-191-6.
34. Dreimann, J. *Evaluierung und Optimierung Eines Neuartigen Bioreaktorsystems—Technische Informationsbibliothek (TIB)*; Leibniz Universität Hannover: Hannover, Germany, 2014.
35. Tscheschke, B. *Nebelkammerreaktoren zur Kultivierung Biotechnologisch Relevanter—Technische Informationsbibliothek (TIB)*; Leibniz Universität Hannover: Hannover, Germany, 2015.
36. Barreras, F.; Amaveda, H.; Lozano, A. Transient high-frequency ultrasonic water atomization. *Exp. Fluids* **2002**, *33*, 405–413. [[CrossRef](#)]
37. Avvaru, B.; Patil, M.N.; Gogate, P.R.; Pandit, A.B. Ultrasonic atomization: Effect of liquid phase properties. *Ultrasonics* **2006**, *44*, 146–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Wozniak, G. *Zerstäubungstechnik*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2003; ISBN 978-3-642-62509-1.
39. *Safety Data Sheet According to VisiJet[®] M2-RCL 1*; 3D Systems, Inc.: Rock Hill, SC, USA, 2015.
40. *Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity*; ISO 10993-5:2009; ISO: Geneva, Switzerland, 2009.
41. Mezger, T.G. *Angewandte Rheologie—Mit Joe Flow auf der Rheologie-Straße*; Anton Paar GmbH: Graz, Austria, 2014; ISBN 978-3-200-03652-9.
42. Wilson, S.A.; Cross, L.M.; Peak, C.W.; Gaharwar, A.K. Shear-Thinning and Thermo-Reversible Nanoengineered Inks for 3D Bioprinting. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 43449–43458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Tabriz, A.G.; Hermida, M.A.; Leslie, N.R.; Shu, W. Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *Biofabrication* **2015**, *9*, 45012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Song, S.-J.; Choi, J.; Park, Y.-D.; Hong, S.; Lee, J.J.; Ahn, C.B.; Choi, H.; Sun, K. Sodium Alginate Hydrogel-Based Bioprinting Using a Novel Multinozzle Bioprinting System. *Artif. Organs* **2011**, *35*, 1132–1136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. He, Y.; Yang, F.; Zhao, H.; Gao, Q.; Xia, B.; Fu, J. Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhao, Y.; Li, Y.; Mao, S.; Sun, W.; Yao, R. The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication* **2015**, *7*, 045002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



5 Zusammenfassung und Ausblick

Additive Fertigung wird als disruptive Technologie bezeichnet, als Verfahren, das die „Demokratisierung der Produktion“ bedeuten könnte und gilt allgemein als wichtiger Bestandteil der vierten Industriellen Revolution (Industrie 4.0). Die wirtschaftliche Bedeutung wird nach aktuellen Prognosen weiterhin stark wachsen und additive Herstellungsverfahren werden in Zukunft einen relevanten Teil in der produzierenden Industrie ausmachen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von drei unabhängigen Studien gezeigt werden, welches Potential der Technologie innewohnt und welchen Einfluss sie auf die entsprechenden Branchen haben kann.

Es konnte mit dem individualisierbaren Kolbendeckel ein funktionales Bauteil designt, gefertigt und erfolgreich in einem *Fed-Batch*-Prozess etabliert werden. Dabei wurde herausgearbeitet, dass mithilfe der additiven Fertigung hochspezifische Produkte erzeugt werden können, die die Vorteile des 3D-Drucks in sich vereinen: Geringe Stückzahlen können zeitnah realisiert und in hoher Qualität bei vergleichsweise geringen Kosten produziert werden. Durch die *in-house* Produktion können Änderungen rasch umgesetzt werden und die Produktoptimierungszyklen wesentlich rascher ablaufen. Die Notwendigkeit von teuren und aufwendigen Formen (z.B. für Spritzgussmaschinen) entfallen. Darüber hinaus wurde mit einem SDS-PAGE-Gelkamm ein standardisiertes Laborutensil additiv gefertigt. An diesem Beispiel wird verdeutlicht, wie weit die Technologie fortgeschritten ist und die Möglichkeit zur eigenen Fertigung von Einwegware bietet. Die Lieferkosten und –zeiten reduzieren sich auf die Rohmaterialien für den 3D-Druck.

Die vorgestellten Entwicklungen sind richtungsweisend und müssen weiter optimiert werden. Die Übertragung der Erkenntnisse auf andere Anwendungen (zum Beispiel kontinuierliche Schüttelflaschen-Kultivierungen mit dem additiv gefertigten Kolbendeckel oder die pH-Regulierung von Prozessen) können das Anwendungsspektrum der Entwicklung erweitern. Denkbar sind auch andere additiv gefertigte Utensilien im Laboralltag: Die Technologie und verfügbare Materialien erlauben es, komplette Kultivierungsgefäße (6-, 12-, 24-, 48-, 96 Wellplates, Schüttelkolben) additiv zu fertigen. Vielversprechende 3D-Druckverfahren erlauben die Fertigung aus verschiedenen Materialien, die es ermöglichen optische Fenster in ein Bauteil zu integrieren. Dennoch stellen die aktuell verfügbaren Materialien einen „Flaschenhals“ in der Realisierung weiterer Entwicklungen dar. Die Halbwertszeit spritzgegossener Kunststoffbauteile übersteigt jene von additiv gefertigten Bauteilen, da durch die Schichtstruktur eine Bruchgefahr besteht. Vielversprechende Verfahren wie die *Continuous Liquid Interface Production* (CLIP), die das Objekt kontinuierlich erzeugen, sind bereits im Handel. Dadurch weist das Objekt eine geringere Schichtstruktur auf und „Sollbruchstellen“ werden reduziert. Unabhängig von der AM-Strategie sind mittelfristig Datenbanken denkbar, welche die entsprechenden Dateien zum 3D-Druck

bereitstellen und die Fertigung vor Ort erlauben. Damit ist die Vision der Produktion exakt auf die Ansprüche der eigenen Forschungsarbeiten zugeschnittener Produkte in greifbarer Nähe.

Im Bereich der Implantatentwicklung und –fertigung wurden Studien zur Charakterisierung additiv gefertigter Strukturen aus resorbierbaren Polymeren durchgeführt. In diesem Kapitel lag der Blickpunkt auf der Wechselwirkung verschiedener Zelllinien (Stammzellen und Fibroblasten) mit dem 3D-Druck-Material. Für die Wundheilung an der Schnittstelle von Implantat und Gewebe ist dies von entscheidender Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass die vier untersuchten Materialien als Rohstoff für additiv gefertigte Implantate infrage kommen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine gute Zelladhärenz auf den Oberflächen bei gleichzeitig guter Proliferation und Zellviabilität besteht. Aufbauend auf diesen Vorexperimenten wurde die osteogene Differenzierung von Stammzellen erfolgreich induziert. Es wurde auch das Abbauverhalten der Materialien unter verschiedenen Bedingungen getestet. Dies ist entscheidend, da je nach Anwendungsbereich andere Abbauraten *in-vivo* erwünscht sind.

Aufgrund dieser vielversprechenden Erkenntnisse sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die vorhandenen Ergebnisse zu stützen. Die mechanische Stabilität (zum Beispiel die Zugfestigkeit) sollte charakterisiert werden, da sichergestellt sein muss, dass die Funktion des Implantats bis zur Wundheilung gegeben ist. Hierbei müssen auch Tierversuche durchgeführt werden, um die Materialien unter *in-vivo* Bedingungen genau bewerten zu können.

Im finalen Kapitel der Arbeit wurde ein neuartiges 3D-Bioprinting Verfahren entwickelt, bei dem mithilfe eines Nebels einer Calciumchlorid-Lösung die Polymerisation des Hydrogels (Natriumalginate) erreicht wird. Dadurch wird die Handhabung der gefertigten Strukturen erleichtert und die Expositionsdauer und Konzentration des (cyto-toxischen) Calciumchlorids reduziert. Grundlage der Methode bildet ein additiv gefertigtes Bauteil („LR06“), welches piezoelektrisch den CaCl_2 Nebel erzeugt.

Im Rahmen der Studie wurde der LR06 entwickelt, charakterisiert und erfolgreich eingesetzt. Dabei wurde gezeigt, dass keine Toxizität vom vernebelten CaCl_2 ausgeht und eine Polymerisation des Bioinks auf diesem Wege möglich ist. Spheroidhaltige Hydrogele (hAd-MSC-Spheroide) und Fibroblasten (NIH-3T3) wurden als Modellorganismen verwendet.

Aufbauend auf diesem Konzept sollte der LR06 weiterentwickelt und auf weitere Anwendungen getestet werden. Da zumeist tierische Zellen Bestandteil der Hydrogele sind, ist die Implementierung eines Heizelements zur Temperierung auf 37-40 °C geplant, damit die Zellviabilität aufgrund zu niedriger Temperaturen im Bauraum nicht leidet.

Für die biotechnologische und chemische Forschung sowie Industrie ergeben sich auf Grundlage der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse große Chancen neue Anwendungen zu erschließen und entsprechende Produkte zu entwickeln. Im Vordergrund muss hierbei der Kunde beziehungsweise Wissenschaftler stehen für den individuelle und schnell verfügbare Produkte wünschenswert und mithilfe der additiven Fertigung in vielen Bereichen nun leichter realisierbar sind.

6 Literatur

1. 3D Systems, I. Safety Data Sheet according to VisiJet ® M2-RCL 1. *Regul. JIS Z* 2015.
2. Agrawal, C. M.; McKinney, J. S.; Lancot, D.; Athanasiou, K. A. Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2443–2452, doi:10.1016/S0142-9612(00)00112-5.
3. ASTM ASTM F2792-12a - Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies. *Rapid Manuf. Assoc.* **2013**, 10–12, doi:10.1520/F2792-12A.2.
4. Avvaru, B.; Patil, M. N.; Gogate, P. R.; Pandit, A. B. Ultrasonic atomization: Effect of liquid phase properties. *Ultrasonics* **2006**, *44*, 146–158, doi:10.1016/j.ultras.2005.09.003.
5. Axpe, E.; Oyen, M. L. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17121976.
6. Bähr, C.; Leuchtle, B.; Lehmann, C.; Becker, J.; Jeude, M.; Peinemann, F.; Arbter, R.; Büchs, J. Dialysis shake flask for effective screening in fed-batch mode. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *69*, 182–195, doi:10.1016/j.bej.2012.08.012.
7. Banks, J. Adding value in additive manufacturing: Researchers in the United Kingdom and Europe look to 3D printing for customization. *IEEE Pulse* **2013**, *4*, 22–26, doi:10.1109/MPUL.2013.2279617.
8. Barreras, F.; Amaveda, H.; Lozano, A. Transient high-frequency ultrasonic water atomization. *Exp. Fluids* **2002**, *33*, 405–413, doi:10.1007/s00348-002-0456-1.
9. Barrows, T. Degradable implant materials: A review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clin. Mater.* 1986, *1*, 233–257.
10. Bartlett, S. Printing organs on demand. *lancet. Respir. Med.* **2013**, doi:10.1016/S2213-2600(13)70239-X.
11. Becker, M. J. Ancient “Dental Implants”: A Recently Proposed Example from France Evaluated with Other Spurious Examples. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **1999**, *14*, 19–29.
12. Berman, B. 3-D printing: The new industrial revolution. *Bus. Horiz.* **2012**, *55*, 155–162, doi:10.1016/j.bushor.2011.11.003.
13. Bose, S.; Vahabzadeh, S.; Bandyopadhyay, A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater. Today* 2013, *16*, 496–504.
14. Brennan, M.; Bokhari, F.; Eddington, D. Open Design 3D-Printable Adjustable Micropipette that meets ISO Standard for Accuracy. *bioRxiv* **2017**.
15. Büchs, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem. Eng. J.* **2001**, *7*, 91–98, doi:10.1016/S1369-703X(00)00106-6.
16. Burkarth, A. Handprothese des Götze von Berlichingen Available online: <http://www.landesstelle.de/handprothese-des-goetz-von-berlichingen/> (accessed on Jan 18, 2018).
17. Busse, J. W.; Bhandari, M.; Kulkarni Abhaya V.; Tunks, E. The effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on time to fracture healing: a meta-analysis. *CMAJ* **2002**, *166*, 437–41.
18. Chia, H. N.; Wu, B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J. Biol. Eng.* **2015**, *9*, doi:10.1186/s13036-015-0001-4.

19. Clement, H.; Zopf, C.; Brandner, M.; Tesch, N. P.; Vallant, R.; Puchwein, P. Performance test of different 3.5 mm drill bits and consequences for orthopaedic surgery. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **2015**, *135*, 1675–1682, doi:10.1007/s00402-015-2338-z.
20. Cui, H.; Zhu, W.; Nowicki, M.; Zhou, X.; Khademhosseini, A.; Zhang, L. G. Hierarchical Fabrication of Engineered Vascularized Bone Biphasic Constructs via Dual 3D Bioprinting: Integrating Regional Bioactive Factors into Architectural Design. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 2174–2181, doi:10.1002/adhm.201600505.
21. De Mori, A.; Peña Fernández, M.; Blunn, G.; Tozzi, G.; Roldo, M.; De Mori, A.; Peña Fernández, M.; Blunn, G.; Tozzi, G.; Roldo, M. 3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*, 285, doi:10.3390/polym10030285.
22. de Vries, I.; Busse, C.; Kopatz, J.; Neumann, H.; Beutel, S.; Scheper, T. Polysialic acid production using *Escherichia coli* K1 in a disposable bag reactor. *Eng. Life Sci.* **2017**, 1–9, doi:10.1002/elsc.201600220.
23. Deckard, C. Apparatus for producing parts by selective sintering 1997.
24. Derby, B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science (80-.)*. 2012, *338*, 921–926.
25. DeSimone, J. *What if 3D printing was 100x faster?*; TED.com, 2015;
26. Dreimann, J. Evaluierung und Optimierung eines neuartigen Bioreaktorsystems - Technische Informationsbibliothek (TIB), Leibniz Universität Hannover , 2014.
27. Duan, B.; Hockaday, L. A.; Kang, K. H.; Butcher, J. T. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, *101A*, 1255–1264, doi:10.1002/jbm.a.34420.
28. Eblenkamp, M.; Neuss-Stein, S.; Salber, S.; Jacobs, V. R.; Wintermantel, E. Stammzellen. In *Medizintechnik*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; pp. 443–471.
29. Elspass, W. J.; Kleefoot, M.; Relations, P. ZHAW-Masterstudenten entwickeln neuartigen 3D-Drucker Dank.
30. Evonik Industries Bioresorbable polymers for new directions in therapy development. Available online: <http://healthcare.evonik.com/product/healthcare/en/products/biomaterials/RESOMER/> (accessed on Jan 22, 2018).
31. FDA Implants and Prosthetics Available online: <https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/ImplantsandProsthetics/default.htm> (accessed on Feb 5, 2018).
32. Ferris, C. J.; Gilmore, K. G.; Wallace, G. G.; In Het Panhuis, M. Biofabrication: An overview of the approaches used for printing of living cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, *97*, 4243–4258.
33. Fey, M. *Waffen aus dem 3D-Drucker: Additives Fertigen als sicherheitspolitisches Risiko?*; Leibniz-Institut Hessische Stiftung Friedens- und Konfliktforschung (HSFK): Frankfurt am Main, 2016; ISBN 9783946459071.
34. Formlabs Inc., Boston, MA, U. High Temp Photopolymer Resin for Form 1+ and Form 2 FLHTAM01 MATERIAL PROPERTIES 2016, 1–3.
35. Fritton, S. P.; Weinbaum, S. Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **2009**, *41*, 347–374, doi:10.1146/annurev.fluid.010908.165136.

36. Funke, M.; Diederichs, S.; Kensity, F.; Müller, C.; Büchs, J. The baffled microtiter plate: Increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 1118–1128, doi:10.1002/bit.22341.
37. Gentsch, R.; Börner, H. G. Designing three-dimensional materials at the interface to biology. In *Bioactive Surfaces - Advances in Polymer Science*; Börner, H. G., Lutz, J.-F., Eds.; Springer, Berlin, Heidelberg, 2010; Vol. 240, pp. 163–192 ISBN 9783642201547.
38. George, A.; Hu, B.; Xue, Z.; Du, Z.; Nageswar, Y. V. D.; Murthy, S. N.; Madhav, B.; Shankar, J.; Lin, T.-H.; Huang, W.-H.; Jun, I.-K.; Jiang, P.; Jin, R.-H.; Yuan, J.-J.; Masselter, T.; Speck, T. *Advances in Biomimetics Edited Biomineralization and Biomimetic Synthesis of Biomineral and Nanomaterials*; 2011; ISBN 978-953-307-191-6.
39. Gross, B. C.; Erkal, J. L.; Lockwood, S. Y.; Chen, C.; Spence, D. M.; Gates, R. Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3240–3253, doi:10.1021/ac403397r.
40. Grund, M. *Implementierung von schichtadditiven Fertigungsverfahren*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015; Vol. 4; ISBN 978-3-662-44265-4.
41. Guan, J.; Fujimoto, K. L.; Sacks, M. S.; Wagner, W. R. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3961–3971, doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.018.
42. Ha, S.-W. Metalle. In *Medizintechnik Life Science Engineering*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp. 183–209 ISBN 978-3-540-74924-0.
43. Ha, S.-W.; Wintermantel, E.; Maier, G. Polymere. In *Medizintechnik Life Science Engineering*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg; pp. 211–268.
44. Hillsley, M. V.; Frangos, J. A. Review: Bone tissue engineering: The role of interstitial fluid flow. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 573–581, doi:10.1002/bit.260430706.
45. Hinton, T. J.; Jallerat, Q.; Palchesko, R. N.; Park, J. H.; Grodzicki, M. S.; Shue, H. J.; Ramadan, M. H.; Hudson, A. R.; Feinberg, A. W. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, doi:10.1126/sciadv.1500758.
46. Holmes, A. M.; Charlton, A.; Derby, B.; Ewart, L.; Scott, A.; Shu, W. Rising to the challenge: Applying biofabrication approaches for better drug and chemical product development. *Biofabrication* **2017**, *9*.
47. Hölzl, K.; Lin, S.; Tytgat, L.; Van Vlierberghe, S.; Gu, L.; Ovsianikov, A. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* **2016**, *8*, 032002, doi:10.1088/1758-5090/8/3/032002.
48. Hull, C. W. EP0171069A2.pdf 1986.
49. Jacobs, T.; Declercq, H.; De Geyter, N.; Cornelissen, R.; Dubruel, P.; Leys, C.; Beaurain, A.; Payen, E.; Morent, R. Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 469–478, doi:10.1007/s10856-012-4807-z.
50. Jammalamadaka, U.; Id, K. T. Functional Biomaterials Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering., doi:10.3390/jfb9010022.
51. Jammalamadaka, U.; Tappa, K. Recent Advances in Biomaterials for 3D Printing and Tissue Engineering. *J. Funct. Biomater.* **2018**, *9*, 22, doi:10.3390/jfb9010022.

52. Jeude, M.; Dittrich, B.; Niederschulte, H.; Anderlei, T.; Knocke, C.; Klee, D.; Büchs, J. Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 433–445, doi:10.1002/bit.21012.
53. Jia, J.; Richards, D. J.; Pollard, S.; Tan, Y.; Rodriguez, J.; Visconti, R. P.; Trusk, T. C.; Yost, M. J.; Yao, H.; Markwald, R. R.; Mei, Y. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 4323–4331, doi:10.1016/j.actbio.2014.06.034.
54. Jia, W.; Gungor-Ozkerim, P. S.; Zhang, Y. S.; Yue, K.; Zhu, K.; Liu, W.; Pi, Q.; Byambaa, B.; Dokmeci, M. R.; Shin, S. R.; Khademhosseini, A. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials* **2016**, *106*, 58–68, doi:10.1016/j.biomaterials.2016.07.038.
55. Johnston, G. *Preaching to a Postmodern World: A guide to reaching twenty-first century listeners*; 2001; ISBN 0801063671.
56. Jones, R.; Haufe, P.; Sells, E.; Iravani, P.; Olliver, V.; Palmer, C.; Bowyer, A. RepRap – the replicating rapid prototyper. *Robotica* **2011**, *29*, 177–191, doi:10.1017/S026357471000069X.
57. Kane, R. S.; Takayama, S.; Ostuni, E.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2363–2376.
58. Kellner, T. *Jet Engines With 3D-Printed Parts Power Next-Gen Airbus Passenger Jet*; 2015;
59. Kim, Y.; Kang, K.; Jeong, J.; Paik, S. S.; Kim, J. S.; Park, S. A.; Kim, W. D.; Park, J.; Choi, D. Three-dimensional (3D) printing of mouse primary hepatocytes to generate 3D hepatic structure. *Ann. Surg. Treat. Res.* **2017**, *92*, 67, doi:10.4174/ast.2017.92.2.67.
60. Kirkland, N. T.; Waterman, J.; Birbilis, N.; Dias, G.; Woodfield, T. B. F.; Hartshorn, R. M.; Staiger, M. P. Buffer-regulated biocorrosion of pure magnesium. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, *23*, 283–291, doi:10.1007/s10856-011-4517-y.
61. Koch, L.; Gruene, M.; Unger, C.; Chichkov, B. Laser Assisted Cell Printing. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2013**, *14*, 91–97, doi:10.2174/138920113804805368.
62. König, W.; Klocke, F. *Fertigungsverfahren 3 Abtragen und Generieren*; 3rd ed.; Springer Berlin Heidelberg: Heidelberg, 1997; ISBN 9783662072066.
63. Kyle, S.; Jessop, Z. M.; Al-Sabah, A.; Whitaker, I. S. ‘Printability’ of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art.’ *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1700264, doi:10.1002/adhm.201700264.
64. La, W.-G.; Jang, J.; Kim, B. S.; Lee, M. S.; Cho, D.-W.; Yang, H. S. Systemically replicated organic and inorganic bony microenvironment for new bone formation generated by a 3D printing technology. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 11546–11553, doi:10.1039/C5RA20218C.
65. Lehmann-Haupt, H. E. Johannes Gutenberg | German printer | Britannica.com Available online: <https://www.britannica.com/biography/Johannes-Gutenberg> (accessed on May 3, 2018).
66. Leyden, R. N.; Thayer, J. S.; Bedal, B. J. L.; Almquist, T. A.; Hull, C. W.; Earl, J. M.; Kerekes, T. A.; Smalley, D. R.; Merot, C. M.; Fedchenko, R. P.; Lockard, M. S.; Pang, T. H.; That, T. Modelling by selective deposition of material to form three-dimensional objects 1996, 1–177.
67. Li, Z.; Ramay, H. R.; Hauch, K. D.; Xiao, D.; Zhang, M. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3919–3928, doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2004.09.062.

68. Lipton, J. I.; Cutler, M.; Nigl, F.; Cohen, D.; Lipson, H. Additive manufacturing for the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *43*, 114–123, doi:10.1016/j.tifs.2015.02.004.
69. Lücking, T. H.; Sambale, F.; Beutel, S.; Scheper, T. 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: A proof of principle. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 51–56, doi:10.1002/elsc.201400093.
70. Lücking, T. H.; Sambale, F.; Schnaars, B.; Bulnes-Abundis, D.; Beutel, S.; Scheper, T. 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. *Eng. Life Sci.* **2015**, *15*, 57–64, doi:10.1002/elsc.201400094.
71. Malda, J.; Visser, J.; Melchels, F. P.; Jüngst, T.; Hennink, W. E.; Dhert, W. J. A.; Groll, J.; Huttmacher, D. W. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5011–28, doi:10.1002/adma.201302042.
72. Malfroy Camine, V.; Terrier, A.; Pioletti, D. P. Micromotion-induced peri-prosthetic fluid flow around a cementless femoral stem. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **2017**, *20*, 730–736, doi:10.1080/10255842.2017.1296954.
73. Maltman, D. J.; Przyborski, S. A. Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 1072–5, doi:10.1042/BST0381072.
74. Manyika, J.; Chui, M.; Bughin, J.; Dobbs, R.; Bisson, P.; Marrs Disruptive technologies: Advances that will transform life, business, and the global economy. *McKinsey Glob. Insights* **2013**, 163.
75. Mertz, L. New world of 3-D printing offers “completely new ways of thinking”: Q&A with author, engineer, and 3-D printing expert Hod Lipson. *IEEE Pulse* 2013.
76. Mertz, L. Dream it, design it, print it in 3-D: What can 3-D printing do for you? *IEEE Pulse* **2013**, *4*, 15–21, doi:10.1109/MPUL.2013.2279616.
77. Mezger, T. G. *Angewandte Rheologie - Mit Joe Flow auf der Rheologie-Straße*; 2014; ISBN 978-3-200-03652-9.
78. Mironov, V.; Boland, T.; Trusk, T.; Forgacs, G.; Markwald, R. R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 157–161, doi:10.1016/S0167-7799(03)00033-7.
79. Mohanty, S.; Alm, M.; Hemmingsen, M.; Dolatshahi-Pirouz, A.; Trifol, J.; Thomsen, P.; Dufva, M.; Wolff, A.; Emnéus, J. 3D Printed Silicone-Hydrogel Scaffold with Enhanced Physicochemical Properties. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 1321–1329, doi:10.1021/acs.biomac.5b01722.
80. Morris, M.; Ciardullo, C.; Lents, K.; Yashar, M.; Montes, J.; Rudakevych, O.; Sono, M.; Sono, Y. Martian Ice Habitats: Approaches to Additive Manufacturing with H₂O Beyond Mars Ice House., doi:10.2514/6.2016-5528.
81. Müller, F. G.; Bressner, M.; Görzig, D.; Röber, T. Industrie 4.0: Entwicklungsfelder für den Mittelstand - Aktuelle Hemmnisse und konkrete Bedarfe 2016, 76.
82. Nguyen, D.; Hägg, D. A.; Forsman, A.; Ekholm, J.; Nimkingratana, P.; Brantsing, C.; Kalogeropoulos, T.; Zaunz, S.; Concaro, S.; Brittberg, M.; Lindahl, A.; Gatenholm, P.; Enejder, A.; Simonsson, S. Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink., doi:10.1038/s41598-017-00690-y.
83. NSF International *Food Equipment Materials (ANSI/NSF 51-1997)*; Ann Arbor, MI, USA, 1997;

84. Panula-Perälä, J.; Šiurkus, J.; Vasala, A.; Wilmanowski, R.; Casteleijn, M. G.; Neubauer, P. Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7*, 31, doi:10.1186/1475-2859-7-31.
85. Pina, S.; Ferreira, J. Bioresorbable Plates and Screws for Clinical Applications: A Review. *J. Healthc. Eng.* **2012**, *3*, 243–260, doi:10.1260/2040-2295.3.2.243.
86. Ponsford, M. (CNN); Glass, N. (CNN) The night I invented 3D printing 2014.
87. Raddatz, L.; Austerjost, J.; Beutel, S. 3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken. *Chemie unserer Zeit* **2017**, doi:10.1002/ciuz.201700802.
88. Raddatz, L.; Vries, I.; Austerjost, J.; Lavrentieva, A.; Geier, D.; Becker, T.; Beutel, S.; Scheper, T. Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes. *Eng. Life Sci.* **2017**, *17*, 931–939, doi:10.1002/elsc.201700055.
89. Rode, B.; Endres, C.; Ran, C.; Stahl, F.; Beutel, S.; Kasper, C.; Galuska, S.; Geyer, R.; Mühlenhoff, M.; Gerardy-Schahn, R.; Scheper, T. Large-scale production and homogenous purification of long chain polysialic acids from *E. coli* K1. *J. Biotechnol.* **2008**, *135*, 202–209, doi:10.1016/j.jbiotec.2008.03.012.
90. Russon, M.-A. China: Recycled Concrete Houses 3D-Printed in 24 Hours. *Int. Bus. Times* 2014.
91. Sarstedt und Co Zell-und Gewebekultur 2016, 1–21.
92. Scheidle, M.; Dittrich, B.; Klinger, J.; Ikeda, H.; Klee, D.; Büchs, J. Controlling pH in shake flasks using polymer-based controlled-release discs with pre-determined release kinetics. *BMC Biotechnol.* **2011**, *11*, 25, doi:10.1186/1472-6750-11-25.
93. Scheidle, M.; Jeude, M.; Dittrich, B.; Denter, S.; Kensy, F.; Suckow, M.; Klee, D.; Büchs, J. High-throughput screening of *Hansenula polymorpha* clones in the batch compared with the controlled-release fed-batch mode on a small scale. *FEMS Yeast Res.* **2010**, *10*, 83–92, doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00586.x.
94. Schubert, C.; van Langeveld, M. C.; Donoso, L. A. Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *Br. J. Ophthalmol.* **2014**, *98*, 159–161, doi:10.1136/bjophthalmol-2013-304446.
95. Serra, T.; Mateos-Timoneda, M. A.; Planell, J. A.; Navarro, M. 3D printed PLA-based scaffolds: A versatile tool in regenerative medicine. *Organogenesis* 2013, *9*, 239–244.
96. Shepherd, B. R.; Presnell, S. C.; Evinger, A. J. Engineered three-dimensional connective tissue constructs and methods of making the same 2013, WO 2013/192290 A1.
97. Simon, S. (NPR) After Losing Half A Beak, Grecia The Toucan Becomes A Symbol Against Abuse 2016.
98. Smalley, D. R.; Vorgitch, T. J.; Manners, C. R.; Hull, C. W.; VanDorin, S. L. Simultaneous multiple layer curing in stereolithography. *United States Pat. Trademark Off.* 1997.
99. Tan, Z.; Parisi, C.; Silvio, L. Di; Dini, D.; Forte, A. E. Cryogenic 3D Printing of Super Soft Hydrogels., doi:10.1038/s41598-017-16668-9.
100. Tscheschke, B. Nebelkammerreaktoren zur Kultivierung biotechnologisch relevanter - Technische Informationsbibliothek (TIB), Leibniz Universität Hannover , 2015.
101. Tumbleston, J. R.; Shirvanyants, D.; Ermoshkin, N.; Januszewicz, R.; Johnson, A. R.; Kelly, D.; Chen, K.; Pinschmidt, R.; Rolland, J. P.; Ermoshkin, A.; Samulski, E. T.;

- DeSimone, J. M. Continuous liquid interface production of 3D objects. *Science (80-.)*. **2015**, 347, 1349–1352, doi:10.1126/science.aaa2397.
102. Ude, C.; Hentrop, T.; Lindner, P.; Lücking, T. H.; Scheper, T.; Beutel, S. New perspectives in shake flask pH control using a 3D-printed control unit based on pH online measurement. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, 221, 1035–1043, doi:10.1016/j.snb.2015.07.017.
 103. van Kooten, T. G.; Spijker, H. T.; Busscher, H. J. Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* **2004**, 25, 1735–47.
 104. Ventola, C. L. Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *P T* **2014**, 39, 704–711, doi:10.1016/j.infsof.2008.09.005.
 105. Voxeljet AG VOXELJET BAUT ASTON MARTIN MODELLE FÜR SKYFALL 2012.
 106. Waldbaur, A.; Rapp, H.; Länge, K.; Rapp, B. E. Let there be chip - towards rapid prototyping of microfluidic devices: One-step manufacturing processes. *Anal. Methods* **2011**, 3, 2681–2716, doi:10.1039/c1ay05253e.
 107. Weuster-Botz, D.; Altenbach-Rehm, J.; Arnold, M. Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. In *Biochemical Engineering Journal*; 2001; Vol. 7, pp. 163–170.
 108. Williams, S. K.; Touroo, J. S.; Church, K. H.; Hoying, J. B. Encapsulation of Adipose Stromal Vascular Fraction Cells in Alginate Hydrogel Spheroids Using a Direct-Write Three-Dimensional Printing System. *Biores. Open Access* **2013**, 2, 448–454, doi:10.1089/biores.2013.0046.
 109. Wilson, S. A.; Cross, L. M.; Peak, C. W.; Gaharwar, A. K. Shear-Thinning and Thermo-Reversible Nanoengineered Inks for 3D Bioprinting., doi:10.1021/acsami.7b13602.
 110. Windhagen, H.; Radtke, K.; Weizbauer, A.; Diekmann, J.; Noll, Y.; Kreimeyer, U.; Schavan, R.; Stukenborg-Colsman, C.; Waizy, H. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: Short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed. Eng. Online* **2013**, 12, doi:10.1186/1475-925X-12-62.
 111. Wintermantel, E.; Ha, S.-W. Medizintechnik Life Science Engineering. In *Medizintechnik Life Science Engineering*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp. 269–290 ISBN 978-3-540-74925-7.
 112. Wozniak, G. *Zerstäubungstechnik*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2003; ISBN 978-3-642-62509-1.
 113. Yamané, T, Shimizu, S. Fed-batch Techniques in Microbial Processes. *Adv. Biochem. Eng.* **1984**, 30, 147–194, doi:10.1007/BFb0006382.
 114. Yang, J.; Bei, J.; Wang, S. Enhanced cell affinity of poly (d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials* **2002**, 23, 2607–2614, doi:10.1016/S0142-9612(01)00400-8.
 115. Yang, X.; Lu, Z.; Wu, H.; Li, W.; Zheng, L.; Zhao, J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, 83, 195–201, doi:10.1016/j.msec.2017.09.002.
 116. Zhao, Y.; Li, Y.; Mao, S.; Sun, W.; Yao, R. The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. *Biofabrication* **2015**, 7, 045002, doi:10.1088/1758-5090/7/4/045002.
 117. DIN EN ISO 10993-12:2012-10 2012.

7 Anhang

7.1 Genehmigungen zur Nutzung der Publikationen

12.7.2018

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 12, 2018

This Agreement between Mr. Lukas Raddatz ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4386390209126
License date	Jul 12, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Chemie in unserer Zeit
Licensed Content Title	3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken
Licensed Content Author	Lukas Raddatz, Jonas Austerjost, Sascha Beutel
Licensed Content Date	Sep 6, 2017
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Additive Fertigung in der Biotechnologie (Arbeitstitel)
Expected completion date	Jan 2019
Expected size (number of pages)	160
Requestor Location	Mr. Lukas Raddatz Borstelmannstraße 13 30539 Hannover Hannover, Niedersachsen 30539 Germany Attn: Mr. Lukas Raddatz
Publisher Tax ID	EU826007151
Customer VAT ID	DE0
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 12, 2018

This Agreement between Mr. Lukas Raddatz ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4386390882221
License date	Jul 12, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	ENGINEERING IN LIFE SCIENCES (ELECTRONIC)
Licensed Content Title	Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes
Licensed Content Author	Lukas Raddatz, Ingo Vries, Jonas Austerjost, et al
Licensed Content Date	Aug 4, 2017
Licensed Content Volume	17
Licensed Content Issue	8
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	2
Languages	English, German
Title of your thesis / dissertation	Additive Fertigung in der Biotechnologie (Arbeitstitel)
Expected completion date	Jan 2019
Expected size (number of pages)	160
Requestor Location	Mr. Lukas Raddatz Borstelmannstraße 13 30539 Hannover Hannover, Niedersachsen 30539 Germany Attn: Mr. Lukas Raddatz
Publisher Tax ID	EU826007151
Customer VAT ID	DE0
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright



RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Comparison of different three dimensional-printed resorbable materials: In vitro biocompatibility, In vitro degradation rate, and cell differentiation support

Author: Lukas Raddatz, Marline Kirsch, Dominik Geier, et al

Publication: Journal of Biomaterials Applications

Publisher: SAGE Publications

Date: 07/13/2018

Copyright © 2018, © SAGE Publications

LOGIN

If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a RightsLink user or want to learn more?

If you are a SAGE journal author requesting permission to reuse material from your journal article, please note you may be able to reuse your content without requiring permission from SAGE. Please review SAGE's author re-use and archiving policies at <https://us.sagepub.com/en-us/nam/journal-author-archiving-policies-and-re-use> for more information.

If your request does not fall within SAGE's reuse guidelines, please proceed with submitting your request by selecting one of the other reuse categories that describes your use. Please note, a fee may be charged for reuse of content requiring permission. Please contact permissions@sagepub.co.uk if you have questions.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2018 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#). Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer@copyright.com

Der zu Kapitel 4.3 zugehörige Artikel wurde in einem Open Access Verlag veröffentlicht und bedarf keiner weiteren Berechtigung zur Veröffentlichung.

7.2 Kooperationen und betreute Abschlussarbeiten

Im Rahmen der Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, sowie am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie der Technischen Universität München wurden Kooperationen geführt und aufgebaut sowie Abschlussarbeiten begleitet, welche im Folgenden zusammengefasst werden.

7.2.1 Kooperationen und weitere Forschungsarbeiten

- Polymertestung und Charakterisierung (Dr. Rafael Gentsch, Fa. Evonik)

Die Publikation in Kapitel 4.3 ging aus der Zusammenarbeit mit der Firma Evonik (Essen, Deutschland) hervor.

- Konzept Modularer Kolbendeckel als *Feeding*-System (Prof. Dr. Neubauer, TU Berlin)

Für die Arbeitsgruppe von Prof. Neubauer wurde eine Variante des in Kapitel 4.2 präsentierten Kolbendeckels entwickelt.

- Entwicklung eines Algorithmus zur Mischzeitbestimmung (Dr. Daniel Marquard, Institut für Technische Chemie, LU Hannover)

Für die Entwicklung eines Algorithmus zur Bestimmung der Mischzeit in Kultivierungsgefäßen wurden verschiedene Geometrien im 6-Wellplate-Maßstab entwickelt. Ziel war es, die Mischzeit gegenüber klassischer Geometrien zu reduzieren und einen besseren Sauerstoffeintrag in das Medium zu erreichen.

- „smartLAB“

Im Rahmen der smartLAB-Initiative wurde an der Realisierung des Messeprojekts „smartLAB – Lab 4.0“ auf der Labvolution 2015 und 2017 mitgearbeitet.

- „Praktikum der Zukunft“

Zur Weiterentwicklung des Curriculums wurde im vom Fond der Chemischen Industrie geförderten Projekt ein studentischer Laborversuch entwickelt. Ziel ist es, die Studierenden im Rahmen eines Mischzeitexperimentes an innovative Technologien wie 3D-Druck und Augmented Reality heranzuführen.

7.2.2 Begleitete Abschlussarbeiten

- Jana Schlaugat, *„Entwicklung und Charakterisierung eines neuen Rührers für Bioprozesse mittels des Additive Manufacturing“*, Masterarbeit, 2015
- Carola Schmitz, *„Hydrogele als BioInks für 3D-Bioprinting: Eigenschaften und Anwendung“*, Masterarbeit, 2017

7.3 Publikationsliste

Im Folgenden sind die Publikationen (Forschungsartikel; Posterbeiträge, Vorträge) gelistet, die im Zeitraum des Promotionsvorhabens entstanden sind. Detaillierte Informationen zu den vier Publikationen dieser kumulativen Dissertation sind in Tabelle 1 (Seite 86) zu finden.

Wissenschaftliche Artikel:

Raddatz, L. (70%), de Vries, I., Austerjost, J., Lavrentieva, A., Geier, D., Becker, T., Beutel, S. and Scheper, T. (2017), Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes. *Eng. Life Sci.*, 17: 931–939. doi:10.1002/elsc.201700055

Raddatz, L. (70%), Austerjost, J. and Beutel, S. (2017), 3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken. *Chem. Unserer Zeit*. doi:10.1002/ciuz.201700802

Raddatz, L. (75%), Kirsch, M., Geier, D., Schaeske, J., Acreman, K., Gentsch, R., Jones, S., Karau, A., Washington T., Stiesch, M., Becker, T., Beutel, S., Scheper, T. and Lavrentieva, A. (2018), Comparison of different 3D-printed resorbable materials: *in vitro* biocompatibility, *in vitro* degradation rate and cell differentiation support. *Journal of Biomaterial Applications*, doi: 10.1177/0885328218787219

Raddatz, L. (85%), Lavrentieva, A., Pepelanova, I., Bahnemann, J., Geier, D., Becker, T., Scheper, T. and Beutel, S. (2018). Development and application of an additively manufactured CaCl₂ vaporizer for alginate bioprinting purposes. *Journal of Functional Biomaterials*, doi: 10.3390/jfb9040063.

Austerjost, J., Marquard, D., **Raddatz, L.**, Geier, D., Becker, T., Scheper, T., Lindner, P. and Beutel, S. (2017), A smart device application for the automated determination of *E. coli* colonies on agar plates. *Eng. Life Sci.*, 17: 959–966. doi:10.1002/elsc.201700056

Korzhikov-Vlakh, V., Averianov, I., Shved, J., Polyakov, D., Sinitsyna, E., Lavrentieva, A., **Raddatz, L.**, Scheper, T., Tennikova, T. (2018) Hydrophilic polyvinylsaccharide spacer for biofunctionalization of polyester-based supermacroporous matrices and nanoparticles *Bioconjugate Chemistry*. *Polymers*, doi: 10.3390/polym10121299

Prante, M., Ude, C., Meyer, M., **Raddatz, L.**, Krings, U., John, G. T., Belkin, S., Scheper, T. (2018) A bioluminescence biosensor for 2,4-Dinitrotoluene. *Sensors*, doi: 10.3390/s18124247

Poster und Konferenzbeiträge:

Raddatz, L., Austerjost, J., Lücking, T., Busse, C., Kirsch, M., Lavrentieva, A., Beutel, S., Scheper, T. (2016), Additive Fertigung in der Biotechnologie, Chemie Ingenieur Technik, ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2016, DOI: 10.1002/cite.201650279

Raddatz, L., Schmitz, C., Gellermann, P., Lavrentieva, A., Pepelanova, I., Becker, T., Beutel, S., Scheper, T. (2017) Hydrogels as Bioinks for 3D bioprinting: Properties and Application, 2nd International Conference on 3D Printing in medicine. (Ausgezeichnet mit dem "Best Poster Award")

Raddatz, L., Schmitz, C., Gellermann, P., Kirsch, M., Geier, D., Beutel S., Becker, T., Scheper, T., Pepelanova, I., Lavrentieva, A. (2018) Characterization of GelMa and alginate hydrogels for bioprinting: printability, polymerization and biocompatibility. DECHEMA 3D Cell Culture 2018.

Raddatz, L., Austerjost, J., Kardass, M., Geier, D., Becker, T., Beutel, S., Scheper, T. (2018), Smart mobile Devices as Guidance Tool for higher Education Chemical Engineering Experiments, Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Orlando, Florida (USA)

Austerjost, J., **Raddatz, L.**, Geier, D., Becker, T., Beutel, S., Scheper, T. (2018) Smartglasses as a Digital Support for Brewing Analysis Processes, Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Orlando, Florida (USA)

Austerjost, J., **Raddatz, L.**, Lindner P., Endres, C., Scheper, T., Beutel, S. (2016) Smartglasses for a Digitally Supported Laboratory Workflow, Chemie Ingenieur Technik, ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2016, DOI: 10.1002/cite.201650276

Dillschneider, P., Satalov, A., Burmeister, L., Besecke, K., Schaefer, P., Koroleva, A., **Raddatz, L.**, Pflaum, M., Schmeckebier, S., Gellermann, E., Steindorff, M., Winkel, A., Stiesch, M. (2017) Testing Biomolecules, Scaffolds and Drug Delivery Systems for Dental Tissue Engineering. Biofabrication Symposium

Vorträge:

Raddatz, L., Lavrentieva, A., Pepelanova, I., T., Beutel, S. and Scheper, T. (2016) Additive Manufacturing meets Hydrogels. Connaught Summer Institute in 3D-Bioprinting, University of Toronto (Toronto, Kanada)

Raddatz, L., Austerjost J., Geier, D., Becker, T., Beutel, S., Scheper, T. (2018) Additive Manufacturing in Biotech und Pharma. Formlabs Roadshow 2018, (Hannover, Deutschland)

Gentsch, R., **Raddatz, L.**, Acreman, K., Nikoukar, M., Jones S, Windhab, N., Kessler C., Lavrentieva, A., Beutel, S., Scheper, T. (2017) Defined biomaterials and ingredients in regenerative medicine - Evidence paradigm. European Society for Biomaterials Translational Research Symposium (Athen, Griechenland)

Tabelle 1: Verantwortungsbereiche der Autoren der vier Publikationen dieser kumulativen Dissertation.

Verantwortungsbereiche an der Publikation											
Autoren	Konzept	Experimentelles Arbeiten	Methodik	Media (Abbildungen, Tabellen, Videos)	Verfassen des Manuskripts	Korrekturen der Revisionen und Edition	Projekt-administration	Finanzierung			
Raddatz, Lukas	abcd	bcd	abcd	abcd	abcd	abcd					
Acreman, Kevin		c									
Austerjost, Jonas		b		ab	a	b					
Bahnemann, Janina								d			
Becker, Thomas								bcd			
Beutel, Sascha							ad	abcd			
de Vries, Ingo	b	b				b					
Geier, Dominik							b	bd			
Gentsch, Rafael	c		c				c				
Jones, Scott		c									
Karau, Andreas							c	c			
Kirsch, Marline		c									
Lavrentieva, Antonina	c	bcd	c			c	c				
Pepelanova, Iliyana		d									
Schaeske, Jörn		c									
Scheper, Thomas							bcd	bcd			
Stiesch, Maike								c			
Washington, Tommy		c									
a	<i>3D-Druck: Chancen, Möglichkeiten, Risiken (ChiuZ, 2017)</i>			c	<i>Comparison of different three dimensional-printed resorbable materials: In vitro biocompatibility, In vitro degradation rate, and cell differentiation support (JBA, 2018)</i>						
b	<i>Additive manufactured customizable labware for biotechnological purposes (ELS, 2017)</i>			d	<i>Development and application of an additively manufactured calcium chloride nebulizer for alginate bioprinting purposes (JFB, 2018)</i>						

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Lukas Raddatz
Geboren am 27.07.1987
Geburtsort Hannover
Nationalität Deutsch

Beruf

2015-2018 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** am Institut für Technische Chemie (Leibniz Universität Hannover) und Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie (Technische Universität München)

2007-2009 **Zivildienst** als Rettungshelfer (Johanniter-Unfall-Hilfe Hannover OV Wasserturm) und Mitarbeit im qualifizierten **Krankentransport** (Klinikum Region Hannover)

Studium

2015-2018 **Promotion** im Fach Chemie an der Leibniz Universität Hannover

2012-2014 **Masterstudium** „Life Science“ an der Leibniz Universität Hannover und der Northeastern University Boston (MA, USA), Abschlussnote: Mit Auszeichnung

2009-2012 **Bachelorstudium** „Life Science“ an der Leibniz Universität Hannover, Abschlussnote: Mit Auszeichnung

Schulische Bildung

2000-2007 Wilhelm-Raabe-Schule (Gymnasium) mit Abschluss **Abitur**

1994-2000 **Grundschule** Wasserkampstraße und **Orientierungsstufe** Anderten

Mitgliedschaften

Seit 2015 DECHEMA e.V.
Seit 2007 World Wide Fund for Nature (WWF)