

# Evaluierung und Optimierung eines neuartigen Bioreaktorsystems mit Ultraschallzerstäubung

Von

der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

**genehmigte Dissertation**

von

Dipl.-Chem. Janis Dreimann

geboren am 01. Dezember 1981 in  
Hannover

2014

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 22.04.2014

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich sehr für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Weiterhin möchte ich mich für das große Vertrauen bedanken, das er mir stets entgegengebracht hat. Für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann.

Herrn Dr. Frank Stahl danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für sein Interesse an meinen Arbeiten und die sinnvollen Anstöße zu ihrer Verbesserung durch die genaue und kritische Korrektur.

Dem gesamten AK Scheper möchte ich für das herzliche Arbeitsklima, die netten Freizeitaktivitäten und die ständige Hilfsbereitschaft danken. Besonderen Dank möchte ich meinen Bürokollegen für die tolle Atmosphäre und den vielen Spaß aussprechen. Ich freue mich über die zahlreichen Freundschaften, die entstanden sind und über den Unialltag hinausgingen. Besonders genannt seien hier Alexander Babitzky, Bernd Tscheschke und Ismet Bice, ihr habt meine Zeit am Institut wirklich geprägt und verschönert. Bernd, dir möchte ich zudem für die großartige Unterstützung besonders während der letzten Laborarbeiten danken. Der „Reaktor des Grauens“ hat uns nicht untergekrigt.

Thorsten Stempel und Friedbert Gellermann aus der Feinmechanikwerkstatt danke ich für die schnelle und unkomplizierte Anfertigung der Reaktorsysteme und die Hilfestellung und guten Ideen bei der Lösung kleiner und großer Probleme. Danke für die ständige Motivation und die interessanten Gespräche auch abseits der Arbeit.

Vielen Dank auch an die Elektronikwerkstatt unter der Leitung von Thorleif Hentrop für die Unterstützung bei einigen Experimenten und die kleine Einführung in die Elektrotechnik.

Ein großes Dankeschön geht ebenfalls an Martina Weiss, die mir bei vielen Problemen mit Apparaturen und CorelDraw mit Rat und Tat zur Seite stand.

Nicht genug Danken kann ich meinen Großeltern, meinen Eltern, meinen Geschwistern und dem Rest meiner Familie. Ohne eure ständige Unterstützung, Motivation, Liebe und den festen Glauben an mich, wären mein Studium und das Anfertigen dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Ein riesiges und herzliches Dankeschön geht an Estabraq. Deine Liebe und Unterstützung haben mich zur Fertigstellung dieser Arbeit getragen. Auch wenn es eine sehr stressige Zeit war, hast du mich stets motiviert und meine Gefühlsschwankungen tapfer ertragen. Vielen Dank dafür!



# Kurzzusammenfassung

## Evaluierung und Optimierung eines neuartigen Bioreaktorsystems mit Ultraschallzerstäubung

In der Regenerativen Medizin werden zum Erhalt gewebespezifischer Kulturbedingungen entsprechende Bioreaktorsysteme benötigt, um funktionale Gewebestücke zu züchten. Kultivierungen an der Luft-Nährmedium-Phasengrenze sind erfolgreiche Ansätze, um funktionales Gewebe über längere Zeiträume zu kultivieren. Jedoch ergeben sich bei solchen Systemen zum einen Scherstress-Probleme und zum anderen Limitierungen hinsichtlich Form und Größe des Gewebes. Bei dem Nebelkammerreaktor handelt es sich um 3D-Zellkultursystem, bei dem mittels Ultraschallzerstäubung des Nährmediums ein Aerosol produziert wird, welches die Zell- bzw. Gewebekonstrukte kontinuierlich mit einem Aerosol (Nebel) aus Nährmedium umhüllt und entsprechend mit Nährstoffen versorgt. Diese Technik unterscheidet sich somit prinzipiell von herkömmlichen Bioreaktorsystemen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das neuartige Nebelkammerreaktorsystem reaktionstechnisch charakterisiert. Hierzu wurden alle wichtigen Parameter (Verteilung der Nebelphase, Temperatur- und Konzentrationsverteilung, Sauerstoffeintrags in die Flüssigphase, Stabilität des pH-Werts und die Mischzeiten) bestimmt. Als Ergebnis der Charakterisierung zeigte sich als besondere Stärke des Nebelkammerreaktors der hohe Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase bei reiner Oberflächenbegasung. Als Unterschied zu anderen Bioreaktorsystemen und entscheidender Einflussfaktor erwies sich die Aerosolbildung. So konnte beispielsweise eine 24-fache Steigerung des Sauerstoffeintrags in die flüssige Phase bei aktiviertem gegenüber deaktiviertem Ultraschallzerstäuber erzielt werden. Dieses konnte experimentell und rechnerisch mit der deutlichen Vergrößerung der Phasengrenzfläche durch das Bilden der Aerosoltröpfchen begründet werden. Zur Beurteilung der biologischen Funktionalität wurde zudem der Einfluss des Ultraschalleintrags auf die Stabilität von Nährmediumkomponenten (Kohlenhydrate, Salze, Proteine, Aminosäuren und Antibiotika) ermittelt und die Langzeitstabilität von Nährmedien überprüft. Eine erfolgreiche Kultivierung des immobilisierten Mikroorganismus *Aspergillus niger* belegte die grundsätzliche Funktionalität des Systems. Durch eine ausführliche Charakterisierung unterschiedlicher Ultraschallzerstäuber konnten die für den Einsatz im Nebelkammerreaktor geeigneten Eigenschaften ermittelt werden. Die gewonnenen Ergebnisse dienen als Grundlage für den Bau eines optimierten Nebelkammerreaktors.

**Schlagwörter:** Bioreaktor, Ultraschallzerstäubung, Aerosol

## **Abstract**

### **Evaluation and optimization of a novel bioreactor system with ultrasonic atomization**

In the field of regenerative medicine, tissue-specific culture conditions appropriate bioreactor systems are needed to grow functional tissue. Cultivations at the air-liquid interphase are successful approaches to cultivate functional tissue over long periods. However in such systems shear stress problems as well as limitations regarding the shape and size of the tissue are occurring. The mist chamber reactor is a three-dimensional cell culture system in which the cells or tissue-constructs are continuously surrounded with an aerosol (mist) and are supplied with nutrients. The Aerosol is produced by ultrasonic atomization of the culture medium. This technique is fundamentally different from conventional bioreactor systems.

In this thesis, the novel mist chamber reactor system was technically characterized. All the key parameters (distribution of the mist phase, temperature, and oxygen transfer into the liquid phase, the stability of the pH and the mixing time) were determined. As a crucial result, the characterization proved the high oxygen transfer into the liquid phase at surface aeration to be a particular strength of the mist-chamber reactor. The contributing factor proved to be the formation of aerosol. A 24-fold increase of the oxygen transfer into the liquid phase can be achieved with activated compared to disabled ultrasonic atomizer. The reason is the significant increase of the interfacial area by forming aerosol droplets which could be experimentally and mathematically confirmed.

To evaluate the biological function, the influence of the ultrasonic energy on the stability of ingredients of culture media (carbohydrates, salts, proteins, amino acids and antibiotics) and the long-term stability of culture media were determined. A successful cultivation of the immobilized microorganism *Aspergillus niger* demonstrated the basic functionality of the system. Through a detailed characterization of different ultrasonic atomizers the suitable technical properties for the application in the mist chamber reactor could be identified. The results obtained had been the basis for the construction of an optimized mist chamber reactor.

**Keywords:** bioreactor, ultrasonic atomization, aerosol

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>3</b>
3.1	STANDARD BIOREAKTOREN .....	3
3.2	BIOREAKTOREN FÜR FUNKTIONALES GEWEBE.....	4
3.3	SCHALL .....	8
3.4	ULTRASCHALL.....	9
3.4.1	<i>Ultraschallerzeugung</i> .....	10
3.4.2	<i>Effekte von Ultraschall</i> .....	12
3.4.2.1	Kavitation.....	12
3.4.2.2	Acoustic streaming.....	15
3.4.3	<i>Ultraschall in der Biotechnologie</i> .....	16
3.5	ULTRASCHALLZERSTÄUBUNG .....	19
3.5.1	<i>Thermodynamische Grundlagen der Aerosolerzeugung</i> .....	20
3.5.2	<i>Mechanische Erzeugung eines Aerosols</i> .....	20
3.5.2.1	Düsenzerstäuber .....	21
3.5.2.2	Rotationzerstäuber.....	21
3.5.2.3	Mechanische Grundlagen der Ultraschallzerstäubung .....	22
3.5.2.4	Theoretische Grundlagen zur Tröpfchenerzeugung .....	25
3.5.2.5	Ultraschallzerstäubertypen .....	27
3.6	<i>MIST REACTORS FÜR DIE ZÜCHTUNG VON HAIRY ROOT-KULTUREN</i> .....	30
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>31</b>
4.1	KONZEPTVORSTELLUNG .....	31
4.2	NEBELKAMMERREAKTOREN .....	33
4.2.1	<i>Aufbau des NKR-Typ 0</i> .....	34
4.2.2	<i>Aufbau des NKR-Typ I</i> .....	36
4.3	VERWENDETE ULTRASCHALLZERSTÄUBER .....	38
4.4	AUFBAU EINER MESS- UND REGELEINHEIT.....	40
4.4.1	<i>Data Acquisition System</i> .....	41
4.4.2	<i>Adaptierter Streulichtsensor zur Bestimmung der Aerosoldichte</i> .....	42
4.4.3	<i>Sonden für den Einsatz faseroptischer Sensoren im Nebelkammerreaktor</i> .....	44
4.4.4	<i>Pulsgenerator</i> .....	45
4.5	CHARAKTERISIERUNG VON ULTRASCHALLZERSTÄUBERN.....	46
4.5.1	<i>Tröpfchengröße der Aerosole</i> .....	46
4.5.1.1	Bestimmung der Tröpfchengrößen mittels ISM .....	47
4.5.2	<i>Bestimmung physikalischer Größen</i> .....	51
4.5.2.1	Frequenz und Amplitude.....	53
4.5.2.2	Wirkleistung.....	55
4.5.2.3	Spezifischer Wirkungsgrad .....	56
4.5.3	<i>Zerstäubungsleistung und Aerosoldichte</i> .....	59
4.5.3.1	Zerstäubungsleistung und Aerosoldichte verschiedener Ultraschallzerstäuber .....	60
4.5.3.2	Einflüsse auf die Zerstäubungsleistung und die Aerosoldichte .....	63
4.5.4	<i>Untersuchungen zur Frequenzabhängigkeit der Stabilität von Penicillin G-Acylase</i> .....	67
4.5.5	<i>Fazit des Kapitels</i> .....	68
4.6	REAKTIONSTECHNISCHE CHARAKTERISIERUNG DES NKR-TYP I.....	73

4.6.1	Wärmeübertragung und Temperaturverteilung .....	73
4.6.2	Bestimmung des Sauerstoffeintrags anhand des volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten ( $k_L a$ -Wert) .....	82
4.6.3	Einfluss des Ultraschallzerstäubens und auf den pH-Wert des Nährmediums DMEM .....	94
4.6.4	Charakterisierung des Mischverhaltens .....	98
4.6.5	Fazit des Kapitels .....	101
4.7	EFFEKTE DES ULTRASCHALLGESTÜTZTEN ZERSTÄUBENS AUF NÄHRMEDIEN .....	103
4.7.1	Langzeitstabilitätstests von Nährmedien .....	104
4.7.1.1	Zerstäubung von Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) .....	104
4.7.1.2	LB-Medium .....	106
4.7.2	Einfluss des Ultraschalls auf Nährmediumkomponenten .....	108
4.7.2.1	Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf Glucose und Salze .....	108
4.7.2.2	Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf Proteine .....	109
4.7.2.3	Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf die Aminosäuren L-Glutamin und L-Phenylalanin .....	115
4.7.2.4	Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf Antibiotika .....	119
4.7.3	Aktive Verkeimung .....	128
4.7.4	Kultivierung von <i>Aspergillus niger</i> im Nebelkammerreaktor-Typ I .....	130
4.7.5	Fazit des Kapitels .....	134
4.8	WEITERENTWICKLUNG DES NEBELKAMMERREAKTOR-TYP I ZU EINEM OPTIMIERTEN NEBELKAMMERREAKTOR-TYP II .....	137
4.8.1	Aufbau .....	137
4.8.2	Reaktionstechnische Charakterisierung des NKR-Typ II .....	139
4.8.2.1	Wärmeübertragung und Temperaturverteilung .....	139
4.8.2.2	Bestimmung des Sauerstoffeintrags anhand des volumenbezogenen Stoffübergangs-koeffizienten ( $k_L a$ -Wert) .....	144
4.8.2.3	Eintrag von Kohlenstoffdioxid in die Reaktorkammer .....	145
4.8.2.4	Vergleichende Messungen der Aerosoldichte und „Kondensatbildungsrate“ .....	145
4.8.3	Fazit des Kapitels .....	147
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>148</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>151</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>162</b>
8.1	ERGÄNZENDE GRAPHEN .....	162
8.1.1	Tröpfchengrößenspektrum der Zerstäuber CH12V und CH24V .....	162
8.1.2	Tröpfchengrößenspektrum des Zerstäuber LHZ1 .....	163
8.1.3	Tröpfchengrößenspektrum des US-Zerstäubers AW-Typ II bei unterschiedlichen Regelungen 163	
8.1.4	Spannungsschwingungen weiterer US-Zerstäuber .....	164
8.1.5	Hüllkurven weiterer US-Zerstäuber .....	165
8.1.6	Ergebnisse der Aerosoldichtemessung der weiteren US-Zerstäuber .....	167
8.1.7	Ergebnisse der externen Testung von ultraschallzerstäubtem DMEM-Nährmedium mittels NiH-3T3-Zellen .....	168
8.1.8	Ergänzende Absorptionsspektren .....	169
8.1.9	Prozessüberwachung einer Kultivierung von in Na-Alginat immobilisiertem <i>Aspergillus niger</i> in einem Schüttelkolben .....	171
8.2	ERGÄNZENDE INFORMATIONEN ZUM EXPERIMENTELLEN TEIL .....	171
8.2.1	Sauerstoffübergang .....	171

8.2.2	<i>Funktionsweise faseroptischer Sensoren</i> .....	173
8.2.2.1	Faseroptischer Sauerstoffsensord .....	173
8.2.2.2	Faseroptischer pH-Sensord .....	173
8.3	METHODEN .....	174
8.3.1	<i>Testung der Volumenaktivität von Penicillin G-Acylase (NIPAB-Assay)</i> .....	174
8.3.2	<i>Sulfit Methode / Berechnung der Oxygen Transfer Rate</i> .....	175
8.3.3	<i>Bestimmung der Glucosekonzentration</i> .....	176
8.3.4	<i>Bradford-Assay</i> .....	176
8.3.5	<i>MTT-Assay</i> .....	176
8.3.6	<i>Absorptionsspektroskopie</i> .....	177
8.3.7	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i> .....	177
8.3.8	<i>SDS-PAGE</i> .....	177
8.3.9	<i>Hemmhof-Test</i> .....	178
8.3.10	<i>Zellzahlbestimmung</i> .....	178
8.3.11	<i>Kultivierung von E.coli K12</i> .....	178
8.3.12	<i>Immobilisierung und Kultivierung von A.niger</i> .....	178
8.3.13	<i>Ninhydrin-Assay</i> .....	179
8.4	MATERIALIEN.....	180
8.4.1	<i>Verwendete Chemikalien</i> .....	180
8.4.2	<i>Rezepte der verwendeten Kulturmedien</i> .....	181
8.4.2.1	DMEM .....	181
8.4.2.2	LB-Medium.....	181
8.4.2.3	FM-Medium .....	181
8.4.3	<i>Verwendete Puffer und Lösungen</i> .....	181
8.4.3.1	Glucose- und Laktatbestimmung.....	181
8.4.3.2	kLa-Wert-Messung .....	182
8.4.4	<i>Verwendete Materialien und Geräte</i> .....	182
8.5	LEBENS LAUF .....	184
8.6	PUBLIKATIONS LISTE .....	186

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Fließschema der Aufteilung des theoretischen Teils .....	3
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung von Spezialbioreaktoren für die Nachzucht von funktionalisiertem Knochengewebe: 1 Stresskammer; 2 Drehbettreaktor. ....	5
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung eines Spezialbioreaktors für die Nachzucht von funktionalisiertem Knorpelgewebe. ....	6
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung eines Perfusionsreaktors für die Nachzucht von funktionalisiertem Gewebe. ....	7
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung eines Spezialbioreaktors für die Nachzucht von funktionalisiertem arteriellem Gewebe.....	7
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Ausbreitung von Schall.....	8
Abbildung 3.7: Auftragung der Ausbreitung von Schallwellen gegen die Zeit .....	8
Abbildung 3.8: Perowskit-Einheitszelle von PZT .....	10
Abbildung 3.9: Piezokeramische Schwingungsgeber mit Elektroden .....	11
Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Aufteilung der Ultraschallzonen nach dem Abstrahlen von der Piezokeramik.....	11
Abbildung 3.11: Stadien einer asymmetrisch kollabierenden Kavitationsblase bis zur Ausbildung eines <i>Microjets</i> .....	13
Abbildung 3.12: Aufnahme der Verwirbelungen und Strömungen um eine stabile Kavitationsblase .....	14
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des „ <i>structured hot spot</i> “ Modells .....	14
Abbildung 3.14: Möglichkeiten der Interaktion von Ultraschall und einer Zelle .....	16
Abbildung 3.15: Schematische Einteilung der Effekte des Ultraschalls in Abhängigkeit von Ultraschallfrequenz und –intensität. ....	17
Abbildung 3.16: Schematische Darstellung von Bläschen in Knotenpunkten und Antiknotenpunkten einer stehenden Welle .....	18
Abbildung 3.17: Möglicher Aufbau eines Bioreaktorsystems mit Rückführung der ausgetragenen Zellen mittels ultraschallbasierten Zellfilter. ....	19
Abbildung 3.18: Schematische Darstellung eines Einstoffdüsenzerstäubers und eines Zweistoffdüsenzerstäubers .....	21
Abbildung 3.19: Schematische Darstellung eines Scheibenrotationszerstäubers.....	22
Abbildung 3.20: Vorgeschlagener Mechanismus der Bildung eines Aerosoltröpfchens durch eine ultraschallinduzierte, kollabierende Kavitationsblase.....	23
Abbildung 3.21: Vorgeschlagener Mechanismus der Bildung eines Aerosoltröpfchens aus Kapillarwellen .....	24
Abbildung 3.22: Mechanismus der Bildung von Aerosoltröpfchen aus Kapillarwellen mittels ultraschallinduzierten <i>acoustic streaming</i> .....	24
Abbildung 3.23: Schematische Darstellung eines <i>surface acoustic wave</i> (SAW)-Zerstäubers .....	27
Abbildung 3.24: Schematischer Aufbau eines angeregten Flüssigstrahlzerstäubers. ....	28
Abbildung 3.25: Aufbau und Funktionsweise eines submersen Ultraschallzerstäubers .....	28
Abbildung 3.26: Schematische Darstellung eines <i>Mesh</i> -Zerstäubers. ....	29

Abbildung 3.27: Schematische Darstellung eines <i>mist reactors</i> für die Züchtung von hairy root-Kulturen.....	30
Abbildung 4.1: Möglicher Aufbau eines Nebelkammerreaktors mit einer Zerstäubung vom Deckel (links) und vom Reaktorboden (rechts).....	31
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Aufgabenbereiche dieser Arbeit und des zeitlichen Ablaufs der Bearbeitung.....	32
Abbildung 4.3: <i>NKR-Typ 0</i> als Seitenansicht und als Draufsicht mit geöffnetem Deckel der Kultivierungskammer während des Betriebs.....	34
Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des <i>NKR-Typ 0</i> .....	35
Abbildung 4.5: <i>NKR-Typ I</i> als Seitenansicht mit deaktiviertem US-Zerstäuber und während des Betriebs mit 50%iger Aerosolfüllung.....	36
Abbildung 4.6: Schematische Darstellung eines senkrechten Querschnitts durch den <i>NKR-Typ I</i> ..	36
Abbildung 4.7: Aufnahme des Ultraschallrüssels und der Aerosolproduktion in dem <i>NKR-Typ I</i> bei steigender Ultraschallleistung.....	37
Abbildung 4.8: Verwendete US-Zerstäuber.....	38
Abbildung 4.9: Messaufbau für den <i>LHZ1-Zerstäuber</i> .....	40
Abbildung 4.10: Aufbau der Mess- und Regeleinheit.....	41
Abbildung 4.11: Schematische Darstellung des Verhaltens des Sensorsignals in Anhängigkeit von der Partikeldichte einer Suspension bei verschiedenen Messmethoden .....	43
Abbildung 4.12: Schematischer Aufbau und Funktionsweise des <i>CNY70-Reflexkopplers</i> . .....	44
Abbildung 4.13: Aufbau der speziell angefertigten Sonden für den Einsatz faseroptischer Sensoren im Nebelkammerreaktor .....	44
Abbildung 4.14: Universal-Impulsgenerator UPG 100 der Firma ELV .....	45
Abbildung 4.15: In-situ Mikroskop Typ III-XFT .....	47
Abbildung 4.16: Messaufbau für die Bestimmung der Tröpfchengröße mittels des ISM.....	48
Abbildung 4.17: Beispielhafte Gegenüberstellung der Tröpfchengrößen .....	49
Abbildung 4.18: Tröpfchengrößenspektrum der US-Zerstäuber.....	50
Abbildung 4.19: Schematische Darstellung der Reihenfolge und Abhängigkeiten der in diesem Kapitel bestimmten und berechneten physikalischen Größen .....	51
Abbildung 4.20: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Schwingung der Spannung, des Stroms und der Leistung. ....	52
Abbildung 4.21: Auftragung der Spannungsschwingungen der US-Zerstäuber .....	53
Abbildung 4.22: Darstellung der Hüllkurve der Spannungsschwingung gegen die Zeit .....	54
Abbildung 4.23: Messaufbau zur Bestimmung des Wärmeeintrags der US-Zerstäuber.....	56
Abbildung 4.24: Modifizierter Messaufbau aus Abbildung 4.23 zur Bestimmung des Fehlers .....	57
Abbildung 4.25: Auftragung des spezifischen Wirkungsgrads verschiedener US-Zerstäuber.....	58
Abbildung 4.26: Schematische Darstellung des Messaufbaus zur Bestimmung der produzierten Aerosolmenge und der Aerosoldichte der US-Zerstäuber.....	60
Abbildung 4.27: Messung der Aerosoldichte.....	61
Abbildung 4.28: Auftragung des Verhältnisses der gemessenen „Kondensatmenge“ und der Aerosoldichte .....	61
Abbildung 4.29: Schematischer Messaufbau zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Parameter auf die Zerstäubungsleistung.....	63

Abbildung 4.30: Einfluss verschiedener Parameter auf die Zerstäubungsleistung.....	65
Abbildung 4.31: Messaufbau für die Aufnahme von Temperaturprofilen..	75
Abbildung 4.32: Aufnahme der Temperaturprofile des <i>NKR-Typ I</i> .....	76
Abbildung 4.33: Aufnahme der Temperaturprofile des <i>NKR-Typ I</i> in Kombination mit dem US-Zerstäuber <i>AW-Typ I</i> .....	77
Abbildung 4.34: Messaufbau für die Bestimmung der Temperaturverteilung innerhalb der Reaktorkammer. ....	78
Abbildung 4.35: Darstellung der Temperaturverteilung innerhalb des <i>NKR-Typ I</i> .....	79
Abbildung 4.36: Schematische Darstellung des Ultraschallrüssels und der Aerosolproduktion bei den für die Bestimmung des $k_La$ -Werts bei unterschiedlichen Leistungen ....	84
Abbildung 4.37: Schematische Darstellung des Messaufbaus zur Bestimmung der Effizienz des Sauerstoffübergangs in die flüssige Phase.....	84
Abbildung 4.38: Auftragung der ermittelten $k_La$ -Werte.....	85
Abbildung 4.39: Schematischer Messaufbau zur Bestimmung der Effizienz des Sauerstoffeintrags in einer Schale aufgefangenem Aerosoltröpfchen .....	85
Abbildung 4.40: Auftragung der ermittelten $k_La$ -Werte bei unterschiedlichen Leistungen des Ultraschallzerstäubers. ....	86
Abbildung 4.41: Auftragung der ermittelten $k_La$ -Werte bei unterschiedlichen Leistungen des US-Zerstäubers im gepulsten und kontinuierlichen Betrieb .....	87
Abbildung 4.42: Schematischer Messaufbau zur Bestimmung des pH-Werts .....	95
Abbildung 4.43: Auftragung des gemessenen pH-Werts im Reservoir und Aerosol .....	95
Abbildung 4.44: Schematischer Messaufbau zur Messung der Transportfähigkeit des Aerosols....	99
Abbildung 4.45: Leitfähigkeiten des Kondensats an verschiedenen Messstellen .....	100
Abbildung 4.46: Schematischer Versuchsaufbau für die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente .....	104
Abbildung 4.47: Ergebnisse der externen Testung von ultraschallzerstäubtem DMEM-Nährmedium mittels SaOs-2-Zellen. ....	105
Abbildung 4.48: Auftragung der optischen Dichte von <i>E.coli K12</i> -Kulturen in LB-Medium. ....	106
Abbildung 4.49: Differenz-Absorptionsspektrum des LB-Mediums nach 24 h (A), 72 h (B), 96 h (C), 120 h (D), 144 h (E) und 160 h (F) Zerstäubungszeit .....	107
Abbildung 4.50: Auftragung der gemessenen Glucosekonzentration und der Leitfähigkeit und des pH-Werts der NPP-Lösung gegen die Zerstäubungszeit .....	109
Abbildung 4.51: Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren von BSA-Lösungen .....	110
Abbildung 4.52: Coomassiegefärbtes SDS-PAGE-Gele der Referenzproben und der Reaktorproben .....	112
Abbildung 4.53: Auftragung der relativen Enzymaktivität, bezogen auf die Volumenaktivität zu Beginn jedes Experiments, bei unterschiedlichen Leistungen (in W), gepulster Zerstäubung und bei unterschiedlichen Temperaturen US-Zerstäuberkühlung und einer Referenzlösung gegen die Zerstäubungszeit. ....	113
Abbildung 4.54: Absorptionsspektren von PGA-Lösungen (1 $\mu$ l/ml) in 50 mM KPP (pH 7,4) nach unterschiedlichen Zerstäubungszeiten.....	114
Abbildung 4.55: Auftragung der Konzentration von L-Glutamin in den Reaktor- (schwarze Linie) und Referenzproben (rote Linie) gegen die Zerstäubungszeit und	

	Auftragung der Konzentration von L-Phenylalanin in den Reaktor- und Referenzproben gegen die Zerstäubungszeit. ....	116
Abbildung 4.56:	Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben von L-Phenylalanin nach unterschiedlichen Zerstäubungszeiten.....	117
Abbildung 4.57:	Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten der in den zerstäubten L-Phenylalanin-Proben auftretenden Peaks .....	118
Abbildung 4.58:	Struktureller Aufbau der Moleküle L-Phenylalanin und L-Tyrosin .....	118
Abbildung 4.59:	Strukturformeln der getesteten Antibiotika .....	120
Abbildung 4.60:	Exemplarisches Foto einer Agarplatte mit einem <i>E.coli K 12</i> -Bakterienrasen und Hemmhöfen .....	121
Abbildung 4.61:	Auftragung des Durchmesserverhältnisses der Hemmhöfe von den Referenz- und Reaktorproben gegen die Zerstäubungszeit verschiedener Antibiotikalösungen .....	122
Abbildung 4.62:	Links: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 10 µg/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycin in 50 mM KPP Rechts: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Zerstäubungszeit der im 3D-Fluoreszenzspektrum auftretenden Peaks.....	123
Abbildung 4.63:	Links: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 50 µg/ml Ampicillin in 50 mM KPP Rechts: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Zerstäubungszeit der im 3D-Fluoreszenzspektrum auftretenden Peaks .....	125
Abbildung 4.64:	Aufbau der Diketopiperazin-Funktion eines Zersetzungsproduktes von Ampicillin .....	125
Abbildung 4.65:	Links: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 17,5 µg/ml Tetrazyklin in 50 mM Acetat-Puffer (pH 5) Rechts: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Zerstäubungszeit der im 3D-Fluoreszenzspektrum auftretenden Peaks.....	126
Abbildung 4.66:	Auftragung der relativen Zellzahl, bezogen auf die Zellzahl zu Beginn des Experiments, einer simulierten Kontamination des Nebelkammerreaktors mit <i>E.coli-K12</i> -Bakterien gegen die Zerstäubungszeit. ....	129
Abbildung 4.67:	Foto (links) und schematische Abbildung (rechts) des verwendeten Aufbaus zur Herstellung großer Mengen Alginatkugeln.....	131
Abbildung 4.68:	Schematische Abbildung des Aufbaus für die Kultivierung von in Na-Alginat immobilisiertem <i>A.niger</i> .....	132
Abbildung 4.69:	Prozessüberwachung der Testkultivierung im Nebelkammerreaktor von in Na-Alginat immobilisiertem <i>A.niger</i> in FM-Medium .....	133
Abbildung 4.70:	Mikroskopische Aufnahmen von in Na-Alginat immobilisiertem <i>A.niger</i> .....	133
Abbildung 4.71:	<i>NKR-Typ II</i> als Seitenansicht mit deaktiviertem US-Zerstäuber (links) und während des Betriebs mit 50%iger Aerosolfüllung (rechts).....	137
Abbildung 4.72:	Schematischer Aufbau des <i>NKR-Typ II</i> (unten) .....	138
Abbildung 4.73:	Messaufbau für die Aufnahme von Temperaturprofilen.. ..	140
Abbildung 4.75:	Darstellung der Temperaturverteilung innerhalb des <i>NKR-Typ II</i> .....	143
Abbildung 4.76:	Auftragung der „Kondensatbildungsrate“ und der relativen Aerosoldichten bei unterschiedlichen Leistungen des US-Zerstäubers .....	146

Abbildung 8.1: Tröpfchengrößenspektrum der US-Zerstäuber <i>CHI2V</i> und <i>CH24 V</i> .....	162
Abbildung 8.2: Tröpfchengrößenspektrum des US-Zerstäubers <i>LHZI</i> .....	163
Abbildung 8.3: Tröpfchengrößenspektrum des US-Zerstäubers AW-Typ II bei unterschiedlichen Leistungen.....	163
Abbildung 8.4: Auftragung der Spannungsschwingungen des US-Zerstäubers <i>CH24V</i> .....	164
Abbildung 8.5: Auftragung der Spannungsschwingungen des US-Zerstäubers <i>CHI2V</i> .....	164
Abbildung 8.6: Darstellung der Hüllkurve des US-Zerstäubers <i>AW-Typ II</i> .....	165
Abbildung 8.7: Darstellung der Hüllkurve des US-Zerstäubers <i>TDK-NB80</i> . ....	165
Abbildung 8.8: Darstellung der Hüllkurve des US-Zerstäubers <i>CHI2V</i> .....	166
Abbildung 8.9: Darstellung der Hüllkurve der Spannungsschwingung gegen die Zeit des US-Zerstäubers <i>CH24V</i> . ....	166
Abbildung 8.10: Messung der Aerosoldichte des <i>AW-Typ II</i> .....	167
Abbildung 8.11: Messung der Aerosoldichte des <i>TDK-NB80</i> .....	167
Abbildung 8.12: Ergebnisse der externen Testung von ultraschallzerstäubtem DMEM-Nährmedium mittels NiH-3T3-Zellen.....	168
Abbildung 8.13: Absorptionsspektrum von L-Phenylalanin. Vermessen wurden die Proben nach unterschiedlichen Zerstäubungszeiten im Reaktor. ....	169
Abbildung 8.14: Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 10 µg/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycin in 50 mM KPP (pH 7,3).....	169
Abbildung 8.15: Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 50 µg/ml Ampicillin in 50 mM KPP (pH 7,3) .....	170
Abbildung 8.16: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Tetrazyklin-Lösung...	170
Abbildung 8.17: Prozessüberwachung der Testkultivierung in einem Schüttelkolben.....	171
Abbildung 8.18: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines faseroptischen Sauerstoffsensors .....	173
Abbildung 8.19: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines faseroptischen Sauerstoffsensors. ....	174
Abbildung 8.20: Reaktionsgleichung von NIPAB mit Penicillin G-Acylase .....	174
Abbildung 8.21: Reaktionsgleichung der Cobalt-katalysierten Oxidation von Sufit zu Sulfat .....	176

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Charakteristische Ultraschallgeschwindigkeiten in unterschiedlichen Medien .....	9
Tabelle 3.2: Gegenüberstellung einer Kultivierung in einem Perforationsreaktor mit und ohne Zellfilter.....	19
Tabelle 4.1: Experimentell bestimmte und berechnete mittlere Tröpfchengrößen verschiedener US-Zerstäuber .....	50
Tabelle 4.2: Aus experimentell bestimmten Daten berechnete Wirkleistungen verschiedener US-Zerstäuber .....	55
Tabelle 4.3: Zusammenstellung der experimentell bestimmten Größen verschiedener US-Zerstäuber .....	59
Tabelle 4.4: Daten verschiedener US-Zerstäuber bezüglich des Aerosols und der Zerstäubungsleistung.....	62
Tabelle 4.5: Zeiträume bis zum Erreichen einer 20 %igen Restaktivität einer mit verschiedenen US-Zerstäubern zerstäubten PGA-Lösung und der jeweiligen Arbeitsfrequenz.....	68
Tabelle 4.6: Zusammenfassung der relevanten Daten aller untersuchten US-Zerstäuber.....	72
Tabelle 4.7: Zusammenfassung der relevanten Parameter und Ergebnisse der Experimente TP1-TP5.....	78
Tabelle 4.8: Zusammenfassung der berechneten Werte bezüglich der Oberfläche, des Volumens und der Gesamtzahl der Aerosoltröpfchen. ....	88
Tabelle 4.9: Theoretische Diffusionszeiten nach Formel 36 für ausgewählte Distanzen .....	89
Tabelle 4.10: Auftragung des $k_{La}$ -Werts verschiedener Bioreaktoren in Abhängigkeit von Volumen und Begasungsart im Vergleich zu den ermittelten Werten des Nebelkammerreaktors .....	91
Tabelle 4.11: Theoretische maximale Zellzahlen und –dichten verschiedener adhärenter Säugerzelllinien im Nebelkammerreaktor.....	93
Tabelle 4.12: Zusammenfassung der Messdaten zur Entwicklung des pH-Werts während der Zerstäubung des Zellkulturmediums DMEM .....	96
Tabelle 4.13: Messergebnisse der Experimente zur Transportfähigkeit der Aerosoltröpfchen.....	99
Tabelle 4.14: Durchmesserhältnisse der Hemmhöfe der entnommenen Referenz- und Reaktorproben zu Beginn (S) und nach Beendigung der Experimente (E).....	122
Tabelle 4.15: Auflistung der Zeiträume bis zum kompletten Aktivitätsverlusts von PGA bei unterschiedlichen US-Zerstäubern bzw. verschiedenen Regelungen der Zerstäuber .....	136
Tabelle 4.16: Zusammenfassung der relevanten Parameter und Ergebnisse der Experimente zur Charakterisierung des Wärmeübergangs der Reaktoren .....	141
Tabelle 4.17: Vergleich der ermittelten $k_{La}$ -Werte im <i>NKR-Typ I</i> und <i>NKR-Typ II</i> bei unterschiedlichen Leistungen des <i>AW-Typ I</i> -Zerstäubers .....	144
Tabelle 4.18: Zusammenfassung der Messdaten zur Entwicklung des pH-Werts 7,2 während der Zerstäubung des Zellkulturmediums DMEM .....	145
Tabelle 8.1: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.....	180
Tabelle 8.2: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien .....	182

## Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
$\alpha$ -Apo-TC	$\alpha$ -Apo-Oxytetracyclin
APC	engl. Ampicillin penicilloic acid
APE	engl. Ampicillin peniellic acid
APENAM	engl. Ampicillin penamalic acid
APO	engl. Ampicillin penilloic acid
ATC	Anhydro-Tetracyclin
BMSC	Knochenmarksstammzellen
BNC	Bayonet Neill Concelman
BSA	Rinderalbumin
DKR	Dynamischer Kompressionsreaktor
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	engl. Deoxyribonucleic acid
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FCS	engl. Foetal calf serum
EATC	4-Epianhydrotetracyclin
Em	Emission
ETC	4-Epitetracyclin
Ex	Exzitation
ISM	<i>in-situ</i> -Mikroskopie
DH-ISM	Durchlicht-Hellfeld- <i>in-situ</i> -Mikroskop
„Kondensat“	siehe Definition in Kapitel 4.1
KPP	Kalium-Phosphatpuffer
LB	engl. Lysogeny Broth
LED	Licht-emittierende Diode
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NASA	engl. National Aeronautics and Space Administration
NIPAB	engl. 6-nitro-3-phenylacetamide benzoic acid
NKR	Nebelkammerreaktor
NPP	Natrium-Phosphatpuffer
OD	optische Dichte
OTR	Sauerstofftransportrate
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PGA	Penicillin-G-Acylase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PZT	Blei-Zirkonat-Titanat-Keramiken
RFI	relative Fluoreszenz intensität

RPM	engl. Revolutions per minute
SAW	engl. Surface acoustic wave
SDS	engl. Sodium dodecyl sulfate
TCI	Institut für Technische Chemie, Hannover
URT	Ultraschall-Resonator-Technologie
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
ZRM	Zentrum für Regenerative Medizin

# 1 Einleitung

In einem Bioreaktor werden kontrollierte Bedingungen für die Kultivierung von Zellen bereitgestellt. Der Erfolg einer Kultivierung ist dabei stark von dem Aufbau und der Betriebsweise des Bioreaktors abhängig.

In allen gängigen Zellkulturverfahren werden Zellen submers, d.h. vollständig vom Medium bedeckt, kultiviert. Hieraus resultieren insbesondere bei der Gewebezüchtung im Bereich der regenerativen Medizin (Tissue Engineering) viele Nachteile. Als besonders problematisch erweist sich die Realisierung einer scherstressarmen Versorgung von Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Zur Lösung dieser Problematik wurden diverse dynamische Reaktorsysteme entwickelt, bei denen jedoch die Zellen häufig durch starkes Rühren, platzende Gasbläschen oder Ein- und Austausch aus dem Medium abgetötet bzw. von dem Trägermaterial herunter gespült werden. Deshalb werden für Spezialanwendungen stetig neue Bioreaktorsysteme benötigt, die Limitierungen der Standardsysteme umgehen.

Eine erste Optimierung zu herkömmlichen Reaktoren stellen diesbezüglich Membran-Reaktoren dar, in denen die Zellen an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Gas kultiviert werden können. Ein Nachteil dieser Technik liegt jedoch in der Limitation des Systems bezüglich unterschiedlicher Gewebeformen und -flächen. Für die Kultivierung großflächiger dreidimensionaler Gewebe sind somit neue optimierte Reaktoren notwendig. In diesem Zusammenhang stellt der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Nebelkammerreaktor ein völlig neues Bioreaktor-Konzept dar. Bei diesem Nebelkammerreaktor wird im Gegensatz zu anderen Techniken den Zellen das Nährmedium als feiner Nebel / Aerosol zugeführt, welches durch einen Ultraschallzerstäuber erzeugt wird. Dieser besteht aus einer Piezokeramik, die mittels hochfrequenter Wechselspannung zum Schwingen gebracht wird. Aufgrund der in der Flüssigkeit entstehenden Druckwellen werden mikroskopisch kleine Aerosoltröpfchen aus der Flüssigkeit gelöst.

Das in dieser Arbeit verwendete Nebelkammerreaktormodell, welches in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Regenerative Medizin (ZRM) der Universität Tübingen entwickelt wurde, besteht aus einem Reaktorkessel, an dessen Boden ein Ultraschallzerstäuber angebracht ist. Die Besonderheit des Reaktors besteht darin, dass sich das mittels Ultraschall zerstäubte Nährmedium in Form von einigen Mikrometer großen Aerosoltröpfchen auf den im Reaktorinnenraum immobilisierten Zellen oder Mikroorganismen absetzt. So bildet sich ein dünner Nährmediumfilm auf den Zellen über den sie mit Nährstoffen und Sauerstoff nahezu scherstressfrei versorgt werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass für eine ausreichende und gleichmäßige Versorgung mit Nährstoffen, besonders bei großen dreidimensionalen Zellkonstrukten, weniger Nährmedium als in herkömmlichen Kultursystemen benötigt wird.

---

## 2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll ein völlig neuer Bioreaktor, welcher sich grundlegend von den bisher verwendeten Kultur- bzw. Bioreaktorverfahren unterscheidet, charakterisiert und auf seine Anwendbarkeit hin überprüft werden. Bei dem Nebelkammerreaktor handelt es sich um 3D-Zellkultursystem, bei dem mittels Ultraschallzerstäubung die Zell- bzw. Gewebekonstrukte kontinuierlich mit einem Aerosol (Nebel) aus Nährmedium umhüllt und entsprechend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Diese Technik unterscheidet sich prinzipiell von denjenigen Zellkultursystemen, bei denen die Zellen submers, d.h. im Zellkulturmedium kultiviert werden.

Der Hauptfokus liegt bei der Untersuchung der Einflüsse des Ultraschallzerstäubens auf den Sauerstoffeintrag, den Wärmeübergang, die Temperaturverteilung und das Mischverhalten. Basierend auf den Ergebnissen soll die Stabilität von Nährmedien sowie einzelner Bestandteile im Reaktor überprüft und mit Hilfe einer Testkultivierung eines Mikroorganismus bestätigt werden. Als weiterer Teilaspekt dieser Arbeit sollen unterschiedliche Ultraschallzerstäubermodelle anhand ihrer elektrischen Kenndaten (wie z.B. Tröpfchengröße, Wirkleistung, Wärmeproduktion) verglichen und ihre Eignung für den Einsatz im Nebelkammerreaktor evaluiert werden.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse sollen Optimierungen des Reaktors geplant und umgesetzt werden mit dem Ziel, die technische Funktionalität und die biologischen Bedingungen für die Kultivierung von Mikroorganismen und Zellen zu verbessern.

## 3 Theoretischer Teil

Der theoretische Teil dieser Arbeit gliedert sich in zwei Themenbereiche. Im ersten Themenbereich werden kurz Standard-Bioreaktoren vorgestellt. Der Hauptfokus wird hier auf die in der Zellkultur verwendeten Bioreaktoren, die in der Nachzucht von funktionalisiertem Gewebe eine Bedeutung haben, gelegt.

Der zweite Themenbereich befasst sich mit dem Phänomen des Schalls. Es wird besonders auf die Anwendungen und Effekte des Ultraschalls sowie die für den Nebelkammerreaktor unterschiedlichen verwendeten Typen von Ultraschallzerstäubern, deren Besonderheiten und die physikalischen Effekte, die zu der Zerstäubung von Flüssigkeiten führen, eingegangen.

Beide für die Zusammensetzung des Nebelkammerreaktors notwendigen Bereiche sind in Abbildung 3.1 zusammengefasst.

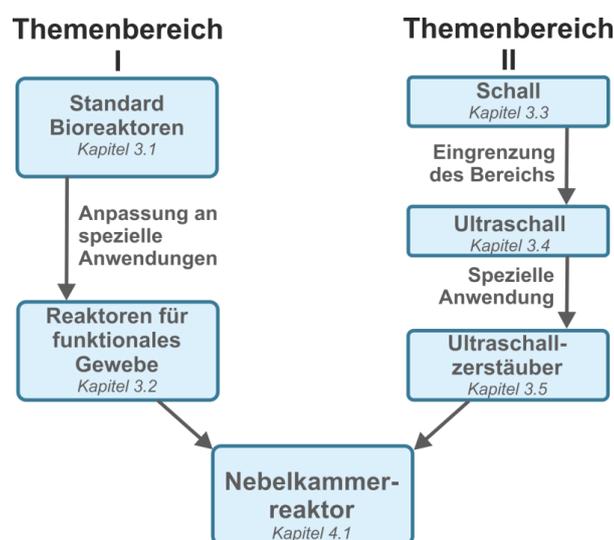


Abbildung 3.1: Fließschema der für den Nebelkammerreaktor notwendigen Bereichen, nach denen der theoretische Teil dieser Arbeit gegliedert ist.

### 3.1 Standard Bioreaktoren

Bioreaktoren sind Anlagen, welche als Hauptaufgabe die Bereitstellung einer passenden Umgebung für ein Wachstum von Zellen oder Mikroorganismen haben. Die Art und Konfiguration des Bioreaktorsystems hat einen deutlichen Einfluss auf die gewünschten Kultivierungsergebnisse. Diese können von mittleren zu hohen Zelldichten, Biomassen oder Produktkonzentrationen reichen [1].

Grundsätzlich kann zwischen einfach aufgebauten statischen Bioreaktoren (z.B. T-Flaschen, Schüttelkolben sowie Spinner- und Rollerflaschen) und eigenständigen Bioreaktorsystemen, die meist für Kultivierungen in großem Maßstab verwendet werden,

unterschieden werden. Statische Bioreaktoren benötigen externes Equipment wie z.B. Schüttler und Inkubatoren, um eine angemessene physikalische und chemische Umgebung für die Zellen bereitzustellen. Eigenständige Bioreaktorsysteme bestehen neben dem Reaktorkessel (z.B. Rührkesselreaktoren) zumeist aus einer Mess- und Regeleinheit, einem Heiz- und Kühlsystem, einem Begasungs- und Probenahmesystem und einer Rührereinheit. Sie sind somit nicht auf externes Equipment angewiesen [2]. In diesen Systemen können hohe Zelldichten und Produkttiter erreicht werden. Insbesondere bei der Gewebezüchtung im Bereich der regenerativen Medizin (*Tissue Engineering*) resultieren durch Rühren oder Schütteln viele Nachteile. Als besonders problematisch erweist sich die Realisierung einer scherstressarmen Versorgung von Zellen oder Geweben mit Sauerstoff und Nährstoffen. Deshalb wurden für diese Spezialanwendungen stetig neue Bioreaktorsysteme benötigt, die Limitierungen der Standardsysteme umgehen. Einige dieser Systeme werden im folgenden Kapitel näher vorgestellt.

## 3.2 Bioreaktoren für funktionales Gewebe

Die *in vitro*-Kultivierung von allogenen und autologen Zellen für patientenspezifische Therapien bildet ein relativ junges Betätigungsfeld. Das Ziel der Bemühungen ist die Produktion von Zellen in großem Maßstab für Zell- oder Gentherapien, die Generierung von funktionalem 3D-Gewebe oder -Konstrukten und die Entwicklung von Organmodulen (Bioartifizielle Organe) [3]. Das Hauptziel bei der Züchtung von 3D-Gewebe ist eine hohe Zell- und Gewebedichte mit gleichzeitiger gewebespezifischer Differenzierung und der Aufrechterhaltung der Funktionalität von *in vitro* generiertem Gewebe. Zum Erreichen einer optimalen Züchtung sind drei Schritte notwendig: 1. Zellproliferation, 2. Zelladhäsion auf einem Trägermaterial (Scaffold) und 3. die Zelldifferenzierung (Gewebebildung). Diese können in verschiedenen oder einem Bioreaktor durchgeführt werden. Aufgrund abweichender Anforderungen unterscheiden sich Reaktoren für die 3D-Gewebezucht von herkömmlichen Reaktoren zur Biomasseerzeugung oder zur Produktion von therapeutischen Wirkstoffen und anderen Proteinen. Dies liegt daran, dass die Bereitstellung einer biochemischen und biomechanischen *in vivo*-ähnlicher Umgebung besondere bauliche Maßnahmen erfordert und eine der Hauptaufgaben und -unterschiede ist, um eine ausreichende Zellproliferation und Gewebebildung zu erreichen. Die Funktionalität des Gewebes muss über Wochen oder sogar Monate erhalten bleiben, da eine Langzeitstabilität und -sterilität garantiert sein muss. Die Zellproliferation wird typischerweise in statischen Zellkulturreaktoren (z.B. Petrischalen, Wellplatten, T-Flaschen, gaspermeablen Beuteln) [4-6] durchgeführt. Höhere Zellzahlen konnten in mechanisch betriebenen Roller- und Spinnerflaschen mit auf Microcarriern immobilisierten Zellen erzielt werden. Die Bildung von 3D-Gewebe wird in Rollerflaschen, Spinnerflaschen und Perfusionsreaktoren durch den Einsatz von speziellen Scaffolds, welche die Grundlage für die Bildung von 3D-Gewebe liefern, gefördert [7, 8].

Komplexere Bioreaktoren liefern bessere Ergebnisse, indem sie eine kontrollierte Umgebung (bezüglich Temperatur, Feuchtigkeit, pH) bereitstellen, um eine spezifische Gewebestruktur zu erhalten. Aus diesem Grund wurden Membranreaktoren, Festbett- und Wirbelschichtreaktoren mit immobilisierten Zellen auf Trägern oder Scaffolds auf ihr Potential für die 3D-Gewebekultur von Hepatozyten, Hautzellen und Kardiovaskularzellen untersucht [9-15]. Als vielversprechende Alternative für einige Gewebeformen wurden Spezialbioreaktoren vorgeschlagen, die *in vivo* Bedingungen simulieren. Diese Reaktoren üben mechanische Belastungen (konstant, zyklisch oder dynamisch) auf das Gewebe aus [16-19]. In ursprünglich von der NASA entwickelten *Rotating vessel*-Reaktoren mit geringem Scherstress, hohem Massetransfer und einer simulierten Mikrogravitation wurde eine Vielzahl von Geweben (z.B. Knochen, Knorpel, Herz- und Lebergewebe) [20-25] erfolgreich gezüchtet. In den letzten Jahren wurden immer mehr gewebespezifische Spezialbioreaktoren entwickelt. Zusätzlich zu der Erhöhung der Gewebequalität sollten Strategien entwickelt werden, um die Differenzierung von Stammzellen in die gewünschte Zellart zu forcieren.

Neben der Verbesserung von Kultivierungsergebnissen in Spinnerflaschen, Perfusionsreaktoren und *Rotating Vessel Reaktoren* konnte gezeigt werden, dass durch die Imitation des *in vivo* Stresses (Zug-, Druck-, oder Pumpbewegungen) die Zellproliferation und -differenzierung gesteigert werden kann. Hierzu sind teilweise deutliche Abweichungen bezüglich des Aufbaus der Reaktorsysteme von den Standardsystemen notwendig. So müssen z.B. mechanische Bewegungen bzw. Kräfte (Stress) während der Kultivierung auf die Zellen übertragen werden oder das Wachstum an Phasengrenzflächen, z.B. flüssig/gasförmig ermöglicht werden. Im Folgenden werden einige dieser Spezialreaktoren vorgestellt, in deren Reihe sich auch das in dieser Arbeit verwendete Nebelkammerreaktorsystem einordnen lässt.

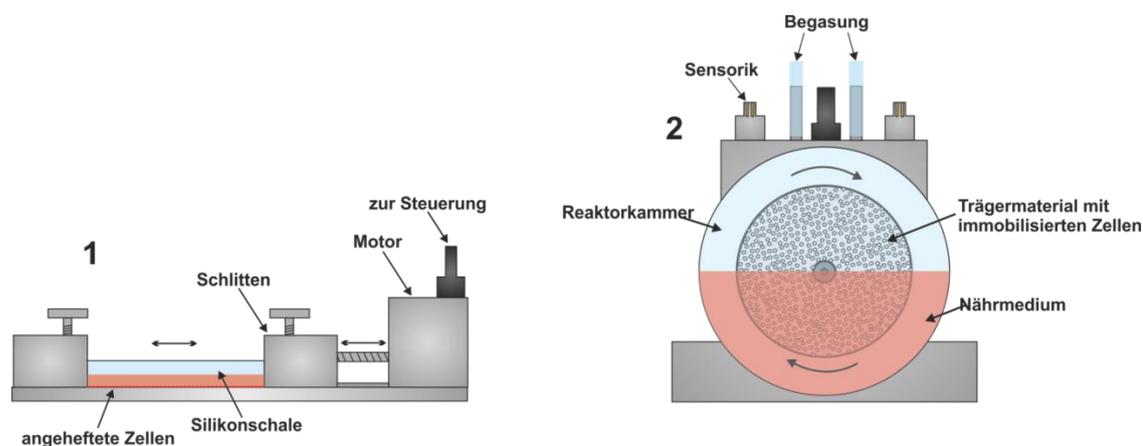


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung von Spezialbioreaktoren für die Nachzucht von funktionalisiertem Knochengewebe: 1 Stresskammer; 2 Drehbettreaktor. Adaptiert von [26].

Für die Differenzierung von Knochenmarksstammzellen (BMSC) in Knochenzellen werden u.a. *Streck-/Stresskammern* (Abbildung 3.2, 1) verwendet. In verschiedenen Studien zeigte sich, dass der menschliche Knochen im Körper durch Zieh-, Stoß- oder Verformungsbewegungen wächst und an Stabilität gewinnt [27-29]. Die Kammern bestehen aus Silikon und sind flexibel und verformbar. Die Zellen heften an dem Boden der Kammer an. Die Enden der Kammer sind in Backen eingespannt und der Abstand zueinander kann über einen Motor verändert werden. Dadurch können die angehefteten Zellen gezogen bzw. gestaucht werden. Die Ergebnisse zeigen eine höhere Zellproliferation, -differenzierung und Mineralisierung [26]. Für 3D-Kultivierungen kann ein *Rotating Bed Reactor* (Abbildung 3.2, 2) verwendet werden, in dem die Zellen auf Scheiben eines porösen Trägermaterials angesiedelt und durch Drehbewegungen in der mit Nährmedium halbgefüllten Reaktorkammer kontinuierlich in das Medium ein- und wieder ausgetaucht werden. Der entstehende Scherstress durch die Bewegung und den Wechsel zwischen Flüssig- und Gasphase führte zu einer verbesserten Zelldifferenzierung im Vergleich zu anderen Reaktorsystemen [30].

Für die künstliche Nachzucht von Knorpelgewebe wurde neben den oben genannten Standardreaktoren ein *Dynamischer Kompressionsreaktor (DKR)* (Abbildung 3.3) entwickelt [31]. Dieser soll die physikalischen Belastungen in der natürlichen Umgebung imitieren. Das Knorpelgewebe wird auf speziellen Scaffolds herangezogen und in die bereitgestellten Behälter des DKR überführt. Mit einem beweglichen Stempel kann das Gewebe komprimiert werden. Die Stärke (0,1 – 24 MPa), die Frequenz (0,0001 – 3 MHz) und das Zeitintervall der Kompression werden meist über einen Computer gesteuert [32].

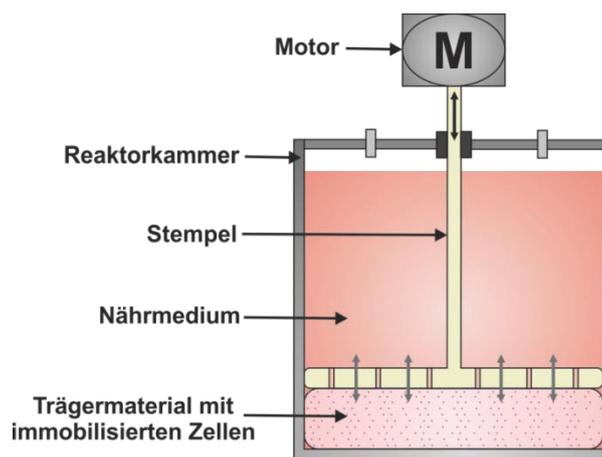


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung eines Spezialbioreaktors für die Nachzucht von funktionalisiertem Knorpelgewebe. Adaptiert von [31].

Für die Besiedlung und Kultivierung auf 3D-Scaffolds liefern Perfusionsreaktoren (Abbildung 3.4) ebenfalls gute Ergebnisse, während die meisten Standardsysteme Limitierungen bei der Gas- und Nährstoffversorgung bei 3D-Scaffolds aufweisen. Um

dieses zu vermeiden, wird bei Perfusionsreaktoren der Scaffold mit Nährmedium kontrolliert durchströmt, wodurch verbrauchtes Nährmedium und Metabolite aus dem Inneren des Scaffolds effektiv entfernt und durch frische Nährstoffe ersetzt werden. Die Effektivität dieser Methode ist stark abhängig von der Porengröße des Scaffolds und der Zelldichte. Der durch die Strömung entstehende Scherstress kann sich positiv auf die Differenzierung von Stammzellen auswirken und wird u.a. über die Strömungsgeschwindigkeit, die Dichte und Viskosität der Flüssigkeit definiert [32-35].

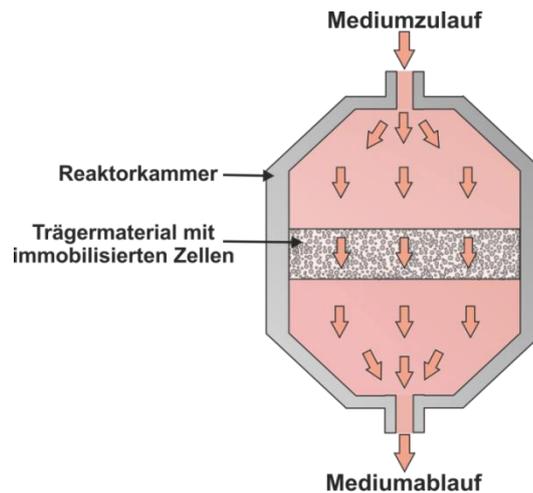


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung eines Perfusionsreaktors für die Nachzucht von funktionalisiertem Gewebe. Adaptiert von [31].

Die Zucht und Konditionierung von arteriellem (vaskulärem) Gewebe erfolgt zumeist in einem Zweikammerreaktorsystem (Abbildung 3.5). In eine zylindrische Reaktorkammer wird ein flexibler Scaffold in Form einer menschlichen Arterie gespannt. Das arterielle Gewebe auf dem Scaffold besteht hauptsächlich aus Endothel- und weichen Muskelzellen. Durch den Scaffold wird pulsartig Nährmedium gepumpt, um die natürliche Belastung im menschlichen Körper zu simulieren. Das Wachstum und die Konditionierung der Endothelzellen wird durch den durchflussbedingten Scherstress gefördert, das der Muskelzellen durch pulsartiges Dehnen und Zusammenziehen des Gewebes [36-38].

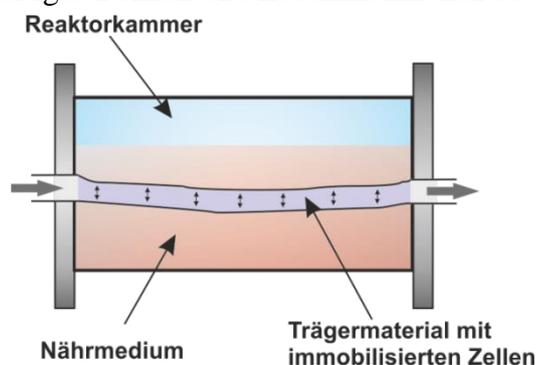


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung eines Spezialbioreaktors für die Nachzucht von funktionalisiertem arteriellem Gewebe. Adaptiert von [39]

### 3.3 Schall

Schall ist eine als Welle fortschreitende mechanische Deformation eines Mediums, bei dessen Weiterleitung die Molekülabstände sich vergrößern und verkleinern. Es entstehen Bereiche mit Überdruck (Druckspannung) (Abbildung 3.6, 1) und Unterdruck (Zugspannung) (Abbildung 3.6, 2).

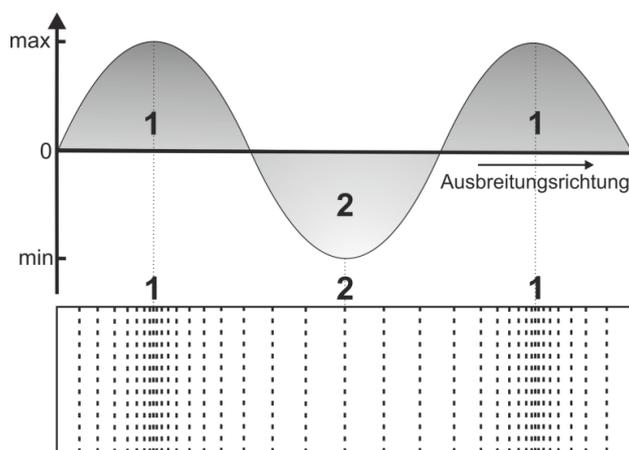


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Ausbreitung von Schall als Welle (oben) mit Druckmaxima (1) und Druckminimum (2) und als mechanische Deformation (unten) mit Variation der Molekülabstände. Adaptiert von [40].

In Gasen und Flüssigkeiten ist Schall immer eine Longitudinalwelle. In Feststoffen treten zusätzlich Transversalwellen auf, wodurch eine vertikale Molekülbewegung neben der Bewegung durch die Longitudinalwelle induziert wird. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit einer Schallwelle ist an die stofflichen Eigenschaften des Mediums gekoppelt. So führt z.B. eine größere Dichte zu höheren Geschwindigkeiten und gleichzeitig zu einer geringeren Dämpfung der Schwingung, wodurch der Schall eine deutlich größere Strecke in Feststoffen als in Gasen zurücklegen kann.

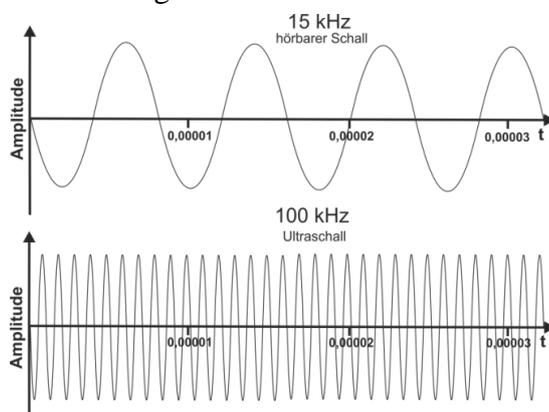


Abbildung 3.7: Auftragung der Ausbreitung von Schallwellen gegen die Zeit mit einer Frequenz von 15 kHz im hörbaren Bereich und einer Frequenz von 100 kHz im Ultraschallbereich. (Adaptiert von [41])

Die am häufigsten verwendeten Schallgrößen sind die Frequenz  $f$ , die Wellenlänge  $\lambda$  und die Schallgeschwindigkeit  $c$ . Die Frequenz wird in Hertz [ $\text{Hz} = 1/\text{s}$ ] angegeben und ist definiert als die Anzahl von Schwingperioden pro Sekunde (Abbildung 3.7). Wie weit sich der Schall räumlich ausbreiten kann, ist umgekehrt proportional zur Frequenz und variiert in z.B. Luft von einigen Metern im Kilohertzbereich bis zu einigen Millimetern im Gigahertzbereich (charakteristische Werte für die Ultraschallgeschwindigkeit in unterschiedlichen Medien sind in Tabelle 3.1 aufgelistet) [41, 42]. Die Wellenlänge beschreibt dabei den örtlichen Verlauf der Amplitude und die Schallgeschwindigkeit die spezifische Ausbreitungsgeschwindigkeit des Schalls in einem Medium. Sie ist nach Formel 1 mit der Frequenz  $f$  über die Wellenlänge  $\lambda$  verbunden:

$$c = \lambda \cdot f \quad (1)$$

Tabelle 3.1: Charakteristische Ultraschallgeschwindigkeiten in unterschiedlichen Medien, nach [43]

Medium	Schallgeschwindigkeit [m/s]
Vakuum	0
Luft	343
Flüssigkeiten (allg.)	800 - 2.000
Wasser	1484
Feststoffe	5.000 – 10.000

Die Schallfrequenz werden in verschiedene Bereiche eingeteilt. Der hörbare Schall liegt in einem Bereich von ca. 20 Hz bis 20 kHz. Geringere Frequenzen werden als Infraschall bezeichnet, Frequenzen von 20 kHz bis ca. 1,6 GHz als Ultraschall. Beide Frequenzbereiche sind für den Menschen nicht hörbar. Aus der Größe der Amplitude der Schwingung lassen sich die Energie des Schalls und der Schalldruck (wird in Pascal oder Dezibel angegeben) bestimmen. Je höher die Amplitude der Schallwellen im hörbaren Bereich ist, desto höher sind die Energie und der Schalldruck, was zur Folge hat, dass das Geräusch für den Menschen lauter wahrnehmbar ist.

### 3.4 Ultraschall

Wie in dem vorherigen Kapitel beschrieben, wird der Frequenzbereich von ca. 20 kHz bis 1,6 GHz als Ultraschall bezeichnet. Dieser lässt sich grob in zwei Unterbereiche einteilen: den „*high power / low frequency ultrasound*“ mit einem Frequenzbereich von ca. 20 bis 200 kHz und den „*low power / high frequency ultrasound*“ von 2 MHz bis 1,6 GHz. Die Einteilung ist möglich, da Ultraschall abhängig von der Frequenz sehr unterschiedliche Eigenschaften, Effekte und Anwendungsmöglichkeiten bietet. Die Bereiche sind nicht

scharf abgegrenzt. Zwischen ihnen liegt eine Übergangszone, die Charakteristika beider Bereiche aufweist [40, 44].

### 3.4.1 Ultraschallerzeugung

Die Erzeugung von Ultraschall erfolgt zumeist über einen piezokeramischen Schwingungswandler, der an eine hochfrequente Wechselspannung angeschlossen ist. Dieser ist für die Umwandlung von elektrischer Spannungsschwingung in mechanische Schwingung zur Erzeugung von (Ultra-)Schallwellen zuständig. Ermöglicht wird dieses durch den Piezoeffekt, der bei piezoelektrischen Keramiken auftritt, welche zur Gruppe der ferroelektrischen Materialien zählen. Ferroelektrika sind Kristalle, die ohne ein angelegtes elektrisches Feld polar sind. Charakteristisch ist die thermodynamisch stabile Umkehrbarkeit ihrer Polarisationsachse unter Einwirkung eines elektrischen Feldes, beschrieben durch den Verlauf einer Hystereseschleife. Die heute gebräuchlichen Piezokeramiken werden vorzugsweise aus Blei-, Zirkon- und Titanoxiden als Hauptbestandteile zum  $\text{PbTiO}_3$  -  $\text{PbZrO}_3$  -Typ und auch  $\text{BaTiO}_3$  synthetisiert (Abbildung 3.8). Spezielle Dotierungen dieser Blei-Zirkonat-Titanat-Keramiken (PZT) mit z. B. Ni-, Bi-, Sb-, Nb- Ionen usw., ermöglichen das gezielte Einstellen der geforderten piezoelektrischen und dielektrischen Parameter [45].

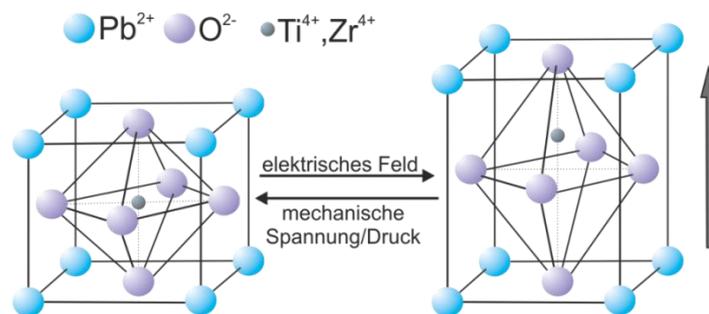


Abbildung 3.8: Perowskit-Einheitszelle von PZT. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes oder durch mechanischen Druck verändern sich die Molekülabstände, wodurch eine Spannung bzw. eine Verformung der Keramik induziert wird. Abbildung adaptiert von [45]

Es gibt zwei mögliche Arten, den piezoelektrischen Effekt auszunutzen:

1. Der direkte Piezoeffekt beschreibt den Aufbau einer elektrischen Spannung durch Krafteinwirkung auf eine Piezokeramik. Durch den Druck verschieben sich die positiven und negativen Gitterbausteine, wodurch Dipolmomente entstehen, die zu der Bildung eines elektrischen Feldes und somit zu einer elektrischen Spannung führen.
2. Der inverse Piezoeffekt beschreibt eine geometrische Deformation, die durch das Anlegen einer Spannung an einen piezoelektrischen Körper auftritt. Die erzielte Bewegung ist abhängig von der Polarität der angelegten Spannung und der Richtung des Vektors der

Polarisation. Durch Anlegen einer Wechselfspannung kann eine zyklische Änderung der Geometrie bezüglich der Dicke und des Durchmessers der Keramik erzielt werden. Wird die Keramik geklemmt, entsteht eine mechanische Spannung bzw. Kraft, welche zur Nutzung von z.B. Piezomotoren genutzt werden kann.

Piezoelektrische Schwingungswandler gibt es in verschiedensten geometrischen Formen. In vielen Anwendungen, wie auch Ultraschallzerstäubern, kommen runde Keramikscheiben zum Einsatz, die auf einer Seite mit Elektroden versehen sind. In Abbildung 3.9 (rechts) sind die möglichen Schwingbewegungen einer Keramikscheibe abgebildet [46].

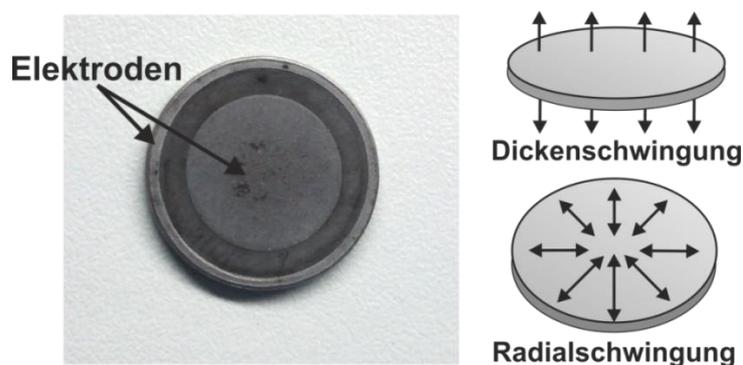


Abbildung 3.9: Links: Piezokeramische Schwingungsgeber mit Elektroden. Rechts: Mögliche Deformationsschwingungen nach Anlegen einer Wechselfspannung. Abbildung adaptiert von [46]

Die Frequenz der Schwingung wird durch die Frequenz der Wechselfspannung vorgegeben und wird am effektivsten am Resonanzpunkt des Schwingungswandlers in Schall umgewandelt. Der erzeugte Ultraschall wird bevorzugt auf direkt mit der Keramik in Kontakt stehendes flüssiges oder festes Medium übertragen, da der Schall an der Grenzfläche zwischen Gasen und Flüssigkeiten bzw. Feststoffen stark reflektiert wird und so hohe Verluste auftreten [45, 46].

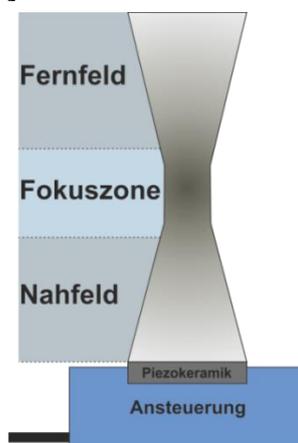


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Aufteilung der Ultraschallzonen nach dem Abstrahlen von der Piezokeramik [47]

Die vom Schallgeber ausgehenden Schallwellen durchlaufen, je nach Abstand von der Keramik, drei Zonen (Abbildung 3.10), die sich über verschiedene Eigenschaften definieren lassen. Direkt nach dem Schallgeber beginnt das Nahfeld, auch Fresnel-Zone genannt. Die axiale Ausdehnung ist abhängig vom Medium, der Frequenz und dem effektiven Durchmesser des Schallgebers (kann stark von dem geometrischen abweichen). Näherungsweise ist die Ausdehnung beschrieben durch

$$N = a^2/\lambda \quad (2)$$

mit  $a$  als effektiver Radius des Schallgebers und  $\lambda$  als Schallwellenlänge. Aus der Formel ist ersichtlich, dass die Ausdehnung des Nahfeldes  $N$  mit größerem Durchmesser des Schallgebers und kleinerer Frequenz steigt. Im Nahfeld treten teilweise starke Interferenzphänomene auf, die zu einer inhomogenen Verteilung der Schallintensität führen und dessen Intensitätsspitzen zu einem bis zu viermal höheren Wert als den gewünschten führen können. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es für die meisten Anwendungen notwendig, die genaue Ausdehnung des Nahfelds zu kennen um z.B. destruktive Effekte durch zu hohe Intensitäten, Unschärfe bei bildgebenden Verfahren und Messfehler bei Sensoren, in diesem Bereich zu vermeiden.

Der Durchmesser des Nahfeldes nimmt mit steigender Entfernung zum Schallgeber bis zu einem bestimmten Punkt ab. Der Bereich mit dem geringsten Durchmesser des Schallfeldes wird als Fokuszone bezeichnet. Hier treten keine Interferenzen auf und die Schallintensität ist am höchsten und gleichmäßig verteilt. Aufgrund dieser Bedingungen können die Eigenschaften des Ultraschalls in der Fokuszone am Effektivsten genutzt werden. Nahezu alle technischen Anwendungen von Ultraschall nutzen daher diese Zone als Arbeitsbereich.

Im Anschluss an die Fokuszone folgt das Fernfeld, auch Fraunhofer-Zone genannt, in der das Feld wieder zu divergieren beginnt und sich kugelförmig ausdehnt. Es treten keine Interferenzphänomene auf, die Dämpfung nimmt stark zu und die Schalldruckamplitude und damit die bei technischen Anwendungen verwendeten Eigenschaften nehmen umgekehrt proportional zu der Entfernung vom Schallgeber ab, wodurch dieser Bereich für Ultraschallanwendungen nur bedingt nutzbar ist. [47, 48]

## 3.4.2 Effekte von Ultraschall

### 3.4.2.1 Kavitation

Wie bereits in Kapitel 3.3 beschrieben, breitet sich Ultraschall durch Kompression und Dehnung der Molekülabstände in Flüssigkeiten aus, wobei lokale Druckmaxima und –minima entstehen. Besonders bei hochenergetischem Ultraschall können bei den Druckminima die Molekülabstände über die Mindestabstände für stabile Fluide

anwachsen, sodass Hohlräume in der Flüssigkeit entstehen, die sich mit in der Flüssigkeit gelöstem Gas füllen. Die so entstandenen Kavitationsblasen haben frequenz- und mediumabhängig unterschiedliche Durchmesser im Nanometerbereich bei hohen Frequenzen und sogar bis zu einigen hundert Mikrometer bei niederfrequentem Ultraschall. Der um eine Kavitationsblase zu bilden minimal benötigte Schalldruck  $P_B$  ist abhängig von dem Dampfdruck des Fluides  $P_F$ , dem Systemdruck  $P_0$ , der Oberflächenspannung  $\gamma$  und dem Anfangsradius der Blasen  $R_0$ . Nach Formel 3 besteht folgender Zusammenhang:

$$P_B = P_0 - P_F \frac{4}{3} \gamma \sqrt{\frac{2\sigma}{3(P_0 + 2\frac{\gamma}{R_0} - P_F R_0^3)}} \quad (3)$$

Mit den heutigen Ultraschallgebern wird nur bis zu einer Frequenz von ca. 1 MHz Schalldruck erzeugt, der eine deutliche Kavitation hervorrufen kann [41, 49-53].

Die Effekte und Einflüsse von Kavitationsblasen werden in physikalisch und chemisch unterschieden. Bei Frequenzen von ca. 20-100 kHz überwiegen die physikalischen Effekte, da durch den Kollaps der Mikrobläschen lokal sehr hohe Drücke von bis zu 70-100 MPa und hierdurch Druckwellen induziert werden können. Das asymmetrische Implodieren der Bläschen kann bereits ausreichend Energie freisetzen, um Polymerketten und Zellwände zu brechen. An Oberflächen ist dieser Einfluss durch asymmetrisches Kollabieren der Blase besonders stark. Bei der sogenannten transienten Kavitation (Abbildung 3.11) implodieren die Bläschen so, dass ein zur Grenzfläche gerichteter „Microjet“ (strahlförmige Kraftentladung) entsteht, wodurch z.B. Schmutzpartikel von der Oberfläche abgesprengt werden können. Dieser Effekt wird beispielsweise in Ultraschallreinigungsbädern zur Reinigung von Oberflächen genutzt.

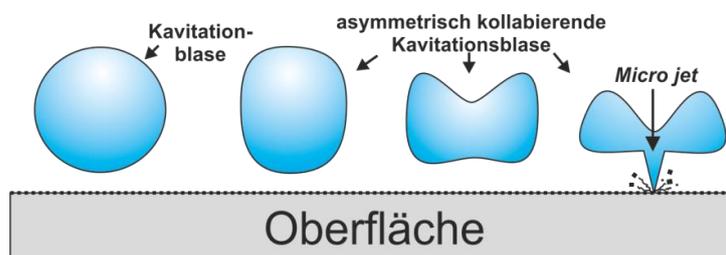


Abbildung 3.11: Stadien einer asymmetrisch kollabierenden Kavitationsblase bis zur Ausbildung eines *Microjets* an einer Oberfläche (von rechts nach links). Abbildung adaptiert von [41]

Bei stabiler Kavitation bleiben die Bläschen über mehrere Druckänderungszyklen bestehen und variieren lediglich ihren Durchmesser. Dieser Effekt induziert Mikroströmungen um die Blase herum (Abbildung 3.12). Diese bewirken einen erhöhten Massentransfer und setzen Zellen, Enzyme und Mikrokristalle einem Scherstress aus. Aufgrund des erhöhten

Massetransfers findet die stabile Kavitation Anwendung in biotechnologischen Prozessen [49, 51, 54, 55].

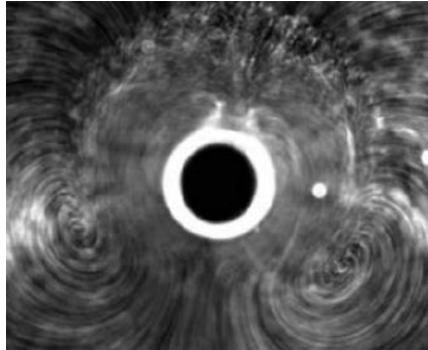


Abbildung 3.12: Aufnahme der Verwirbelungen und Strömungen um eine stabile Kavitationsblase. Abbildung adaptiert von [41]

In dem Frequenzbereich von 200-500 MHz überwiegen dagegen die chemischen Effekte der Kavitation. Der genaue Zusammenhang bzw. der genaue Ablauf chemischer Reaktionen in Zusammenhang mit Kavitationsblasen ist noch nicht abschließend geklärt. Am weitesten verbreitet ist die „hot spot“ Theorie, bei der davon ausgegangen wird, dass beim Kollabieren einer Kavitationsblase kurzzeitig Drücke von bis zu 1000 atm und Temperaturen von bis zu 5000 K auftreten. Hierdurch werden Hydroxyl ( $\text{OH}\cdot$ )- und Peroxylradikale ( $\text{OH}_2\cdot$ ) gebildet, die als Kettenreaktionsstarter für die so genannten sonochemischen Reaktionen verantwortlich sind. Beim „structured hot spot“ Modell (Abbildung 3.13) werden drei Reaktionszonen definiert. Der heiße gasförmige Kern (Kavitationsblasenkern); ein Phasengrenzbereich mit einem radialen Gradienten von Temperatur und Konzentration (Gas-Flüssigkeit Grenzfläche) und das flüssige Medium mit Umgebungstemperatur (Stammlösung) [41, 49, 56-61].

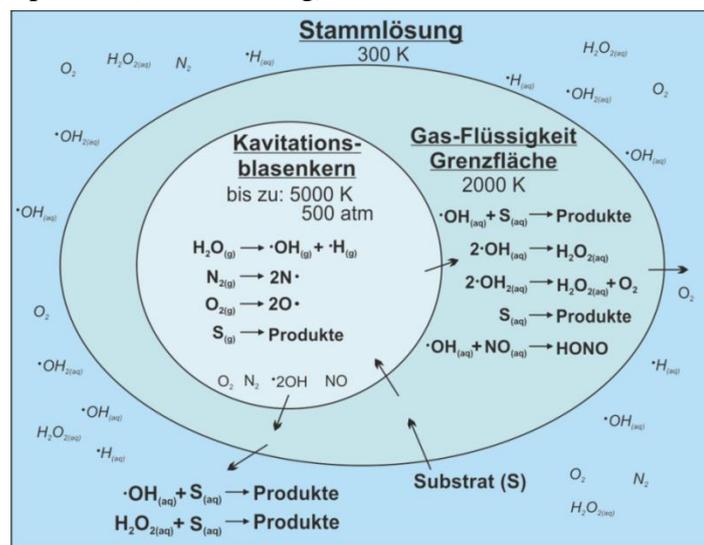


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der drei Reaktionszonen der „structured hot spot“ Modell mit vorherrschenden Temperaturen, Drücken und möglichen Reaktionen. Adaptiert von [62]

Reaktionen von freien Radikalen können in allen drei Reaktionszonen stattfinden. Im Zentrum der Blase liegen Wasser ( $H_2O$ ) und die darin gelösten Gase gasförmig vor. Unter den extremen Reaktionsbedingungen werden Bindungen gebrochen, das gasförmige  $H_2O$  und die weiteren Gase können dissoziieren und es entstehen freie Radikale oder angeregte Zustände. Bei dem Lösungsmittel oder einem Substrat (S) werden homolytisch Bindungen gespalten, woraus reaktive Intermediate entstehen. Die Radikale reagieren entweder untereinander zu neuen Molekülen oder diffundieren in die Lösung, um dort als Oxidantien zu reagieren. Die zweite Reaktionszone ist die Grenzfläche zwischen Gasphase und der Flüssigkeit. Es werden in diesem Bereich Temperaturen von ca. 2000 K angenommen. Verbrennungsreaktionen sowie Reaktionen mit freien Radikalen, wie z.B.  $OH \cdot$  aus der Zersetzung von  $H_2O$  können hier stattfinden. Diese Reaktionen sind vergleichbar mit denen der Pyrolyse, bei der Verbindungen bei hohen Temperaturen von 500-900°C ohne Sauerstoffeinfluss gespalten werden. Es wurde gezeigt, dass die meisten Abbaureaktionen an der oben genannten Grenzfläche zwischen Gasphase und Flüssigkeit stattfinden. Für diese Reaktionszone wird eine Ausdehnung von ca. 200 nm von der Blasenoberfläche und eine Lebensdauer von  $< 2 \mu s$  angegeben. In der umgebenden Lösung finden keine primären sonochemischen Reaktionen statt, jedoch können Folgereaktionen mit generierten Intermediaten oder vereinzelt Radikalen, die in die Lösung diffundiert sind, stattfinden und dabei neue Produkte bilden [62-66]. Ausgenutzt wird dieser Effekt z.B. zum Abbau von Schmutzstoffen in Abwässern, aber auch von Sprengstoffen und Pestiziden. Auch Farbstoffe, wie z.B. die Azo-Farbstoffe Remazol Black und Naphthol Black Blue [67, 68], werden bei einer Frequenz von 640 kHz entfärbt und abgebaut. In biotechnologischen Prozessen ist transiente Kavitation zumeist nicht erwünscht, da Zellen zerstört und Enzyme deaktiviert werden können [69].

#### 3.4.2.2 Acoustic streaming

Im Frequenzbereich von über 1 MHz tritt wie oben beschrieben nahezu keine Kavitation auf. Durch die hohen Frequenzen dominieren in diesem Bereich ultraschallinduzierte Strömungserscheinungen, auch acoustic streaming genannt. Die durch den Schall ausgelösten Druckunterschiede innerhalb des Mediums zusammen mit der Viskosität des Mediums führen zu einem viskosen Fluss. Die Höhe der Druckunterschiede ist direkt proportional zu dem Energieeintrag in das System. Der Effekt des acoustic streaming steigt bei gleicher US-Intensität bei höheren Frequenzen. Bei Frequenzen von 1,5 MHz bis 2,6 MHz wird dieser Effekt bei submersen Ultraschallzerstäubern zur Ausbildung des Ultraschallrüssels (Flüssigkeitstrahls aus der Oberfläche) oder bei höheren Frequenzen zur direkten Zerstäubung, siehe SAW-Zerstäuber [70], ausgenutzt. Ultraschallzerstäuber und der Mechanismus der Tröpfchenbildung werden in Kapitel 3.5.2 gesondert behandelt, daher wird an dieser Stelle noch nicht weiter darauf eingegangen [41, 59, 61].

### 3.4.3 Ultraschall in der Biotechnologie

In der Biotechnologie werden in der Literatur diverse Anwendungen für Ultraschall beschrieben. Aufgrund der Vielfalt werden im Folgenden die für diese Arbeit interessantesten Anwendungen an ausgewählten Beispielen vorgestellt.

Die oben genannten physikalischen und chemischen Einflüsse des Ultraschalls können diverse Auswirkungen auf lebende Zellen haben. Die Angriffsmöglichkeiten des Ultraschalls sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Die (lokale) Erwärmung des Mediums durch den ultraschallinduzierten Energieeintrag kann durch Pyrolyse zu Zellschädigungen oder zur Zellyse führen (Abbildung 3.14, 1). Dieser Einfluss auf die Zellwand wird allerdings zumeist von dem Effekt der Zerstörung der Zellwand durch Kavitation überlagert, die ebenfalls innerhalb der Zelle auftreten kann. Platzen der Kavitationsbläschen und die damit zusammenhängenden Scherkräfte können die Ultrastruktur der Zelle (Abbildung 3.14, 2) verändern und die Enzymaktivität in den Mitochondrien (Abbildung 3.14, 3) herabsetzen. Es können ebenfalls die Strukturen von Proteinen angegriffen werden, welches zur Denaturierung oder sogar Zersetzung der Proteine führt. Die durch Kavitation gebildeten freien Radikale können im Zellkern die DNA angreifen und schädigen (Abbildung 3.14, 4), indem die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren angegriffen werden und schließlich der Doppelstrang gebrochen wird. Die zurückbleibenden Fragmente sind besonders anfällig für Angriffe weiterer Radikale. In der restlichen Zelle kann Kavitation zur Freisetzung von Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ), salpetriger Säure ( $\text{HNO}_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) führen (Abbildung 3.14, 6), wodurch die Stabilität der Zelle verringert und das Wachstum gehemmt werden können. Ultraschalleinwirkung kann bei extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) (Abbildung 3.14, 5) Veränderungen oder Bindungsbrüche hervorrufen.

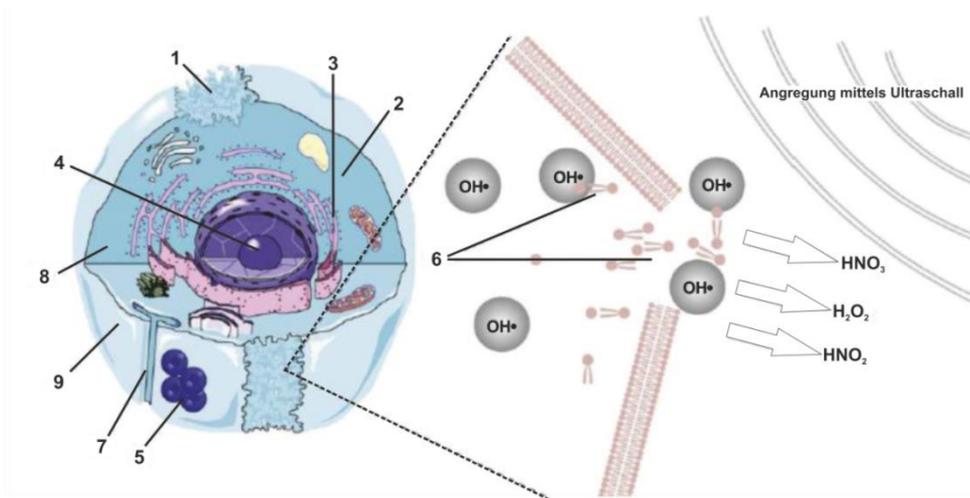


Abbildung 3.14: Möglichkeiten der Interaktion von Ultraschall und einer Zelle. Nach [71].

Abgesehen von den Effekten durch Kavitation und Temperaturmaxima kann auch das bereits beschriebene *acoustic streaming* (Abbildung 3.14, 7) die Zelle beeinflussen. So kann je nach Stärke z.B. die Permeabilität der Zellmembran erhöht werden oder durch zu starke Strömungen mechanische Schädigungen (Abbildung 3.14, 8) auftreten. Möglich sind auch Ladungsänderungen an der Membranoberfläche (Abbildung 3.14, 9), welches einen Einfluss auf den Metabolismus der Zelle hat [71].

Das Auftreten und die Stärke der genannten Effekte sind abhängig von der Frequenz und der Ultraschallintensität. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt.

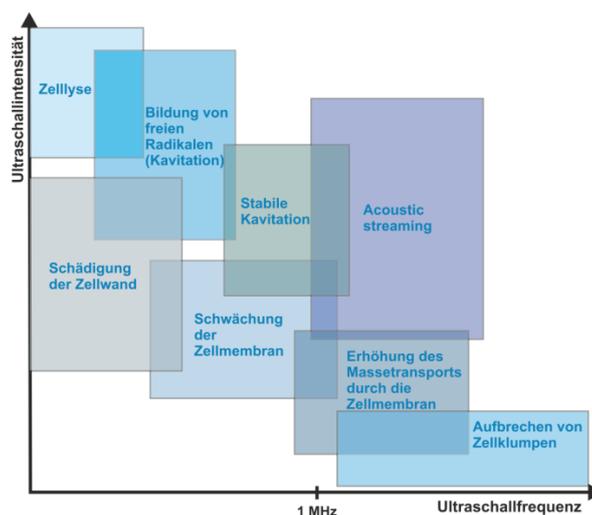


Abbildung 3.15: Schematische Einteilung nach dem stärksten Auftreten der Effekte des Ultraschalls in Abhängigkeit von Ultraschallfrequenz und -intensität. Adaptiert von [58].

Die physikalischen und chemischen Effekte werden für verschiedene Anwendungen genutzt. In Ultraschallbädern werden diese Effekte z.B. zur Reinigung von Oberflächen, wobei der Effekt des *micro jettings* (Abbildung 3.11) ausgenutzt wird, und zum Entgasen von Flüssigkeiten (Ölen, Lacken, Reaktionslösungen, Lebensmitteln) verwendet. Dem Entgasen liegt das Bilden von Kavitationsblasen zugrunde. In das Innere der Blasen diffundieren über die Phasengrenzfläche die in der Flüssigkeit gelösten Gase. Es können stabile Kavitationsblasen entstehen, welche zur Flüssigkeitsoberfläche steigen und das ursprünglich gelöste Gas an die Umgebungsluft abgeben. Ultraschallbäder arbeiten üblicherweise mit relativ geringen Frequenzen und hohen Energien um die Effekte der Kavitation möglichst gut ausnutzen zu können.

Neben Ultraschallbädern werden Ultraschallsonden verwendet, die mit deutlichen höheren Ultraschallintensitäten und -drücken als Ultraschallbäder arbeiten und zumeist für die Zellyse eingesetzt werden. Die unterschiedlichen Ultraschallintensitäten können bei gleicher Anwendung zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen, Ultraschallbäder können z.B. zur Extraktion von z.B. Proteinen aus Feststoffen verwendet werden. Die hohe

Intensität der Ultraschallsonden kann bei gleicher Anwendung bereits nach kurzer Zeit zu einer signifikanten Schädigung der Substanzen führen [49, 72].

Ein weiteres Einsatzgebiet von Ultraschall in der Biotechnologie sind akustische Zellfilter. Diese werden eingesetzt, um z.B. in Perfusionsbioreaktoren (siehe Kapitel 3.2) suspendierte Zellen aus dem Mediumstrom abzuschneiden und somit die Zellzahl und die Produktivität zu erhöhen. Bereits 1873 wurde von Kundt und Lehmann entdeckt, dass sich in den Knotenpunkten von stehenden Wellen Teilchen oder Bläschen sammeln. Eine stehende Welle kann sich durch Reflektion des Schalls an einer glatten Oberfläche und passendem Verhältnis zwischen Frequenz und Abstand zwischen Sender und Reflektor ausbilden [55, 73].

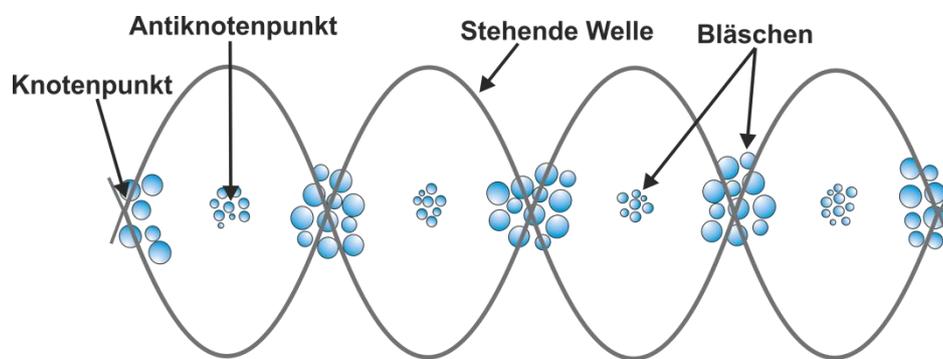


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung von Ansammlungen von Bläschen in den Knotenpunkten und Antiknotenpunkten einer stehenden Welle. Adaptiert von [41].

In Abbildung 3.16 ist schematisch eine Ansammlung von Bläschen in den Knotenpunkten und Antiknotenpunkten dargestellt, die Größenverteilung ist dabei abhängig von den Resonanzeffekten der Bläschen. Der Zellfilter in Bioreaktoren beruht auf dem Effekt, dass sich auch Zellen in einem Knotenpunkt sammeln können. In Perfusionsreaktoren sind Zellen auf porösen Trägermaterialien immobilisiert (Kapitel 3.2), die von einem Nährmedium durchströmt werden. Hierbei können sich intakte lebende Zellen von dem Trägermaterial lösen und mit dem Erntestrom entsorgt werden. Um dieses zu verhindern, kann ein Zellfilter in den Erntestrom geschaltet werden, da lebende und tote Zellen bzw. Zellfragmente unterschiedliche Schallwiderstände besitzen. Durch gezielte Beschallung mit Ultraschall können nur lebende Zellen zurückgehalten werden, durch die Bildung von schweren Zellaggregaten sinken diese zurück auf das Trägermaterial und können wieder festhaften. Es resultiert eine deutliche Erhöhung der Zellzahl und der Produktbildungsrate. Abbildung 3.17 zeigt schematisch den Aufbau eines Bioreaktorsystems für Suspensionszellen mit Zellfilter, wobei der schematische Aufbau für den Perfusionsbetrieb und für Suspensionszellen ähnlich ist.

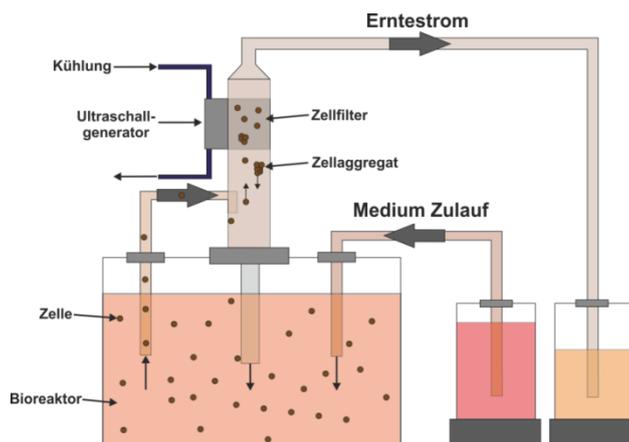


Abbildung 3.17: Möglicher Aufbau eines Bioreaktorsystems mit Rückführung der ausgetragenen Zellen mittels ultraschallbasierter Zelfilter. Adaptiert von [74].

In Tabelle 3.2 sind die Daten einer Kultivierung in einem Perfuptionsbioreaktor mit und ohne Zelfilter dargestellt. Es wird deutlich, dass durch die Zellrückführung die Werte für die tägliche Ernte deutlich verbessert werden konnten [41, 74-78].

Tabelle 3.2: Gegenüberstellung einer Kultivierung in einem Perfuptionsreaktor mit und ohne Zelfilter. Nach [74].

Parameter	ohne Zelfilter	mit Zelfilter
Fermentationsvolumen [l]	6	5.25
Max. Zellkonzentration [Zellen/ml]	$9 \cdot 10^5$	$9.6 \cdot 10^6$
Max. Konzentration lebender Zellen [Zellen/ml]	$6 \cdot 10^5$	$8.7 \cdot 10^6$
Max. täglicher Volumenstrom [l]	1.9	28.5
Max. tägliche Ernte [mg/l]	1.7	25.4

Stehende Wellen werden ebenfalls in der Ultraschall-Resonator-Technologie (URT) verwendet um in Lösungen die Proteinfaltung über die Ultraschallgeschwindigkeit zu beobachten. Anwendung sollen diese Systeme besonders bei der Aufreinigung (Downstreaming) von z.B. rekombinant hergestellten Proteinen finden. Durch die URT soll diese in Echtzeit exakte Faltung von Proteinen beobachtet werden können [79].

### 3.5 Ultraschallzerstäubung

In industriellen Prozessen gibt es heutzutage viele Gebiete und Anwendungen bei denen eine Flüssigkeit in sehr kleine Tropfen zerstäubt werden muss. Das hierbei entstehende Aerosol wird auch Spray oder Sprüh bezeichnet. Einige Anwendungsgebiete sind die

Lackiertechnik, Diesel- und Benzininjektoren, Tintenstrahldrucker, Pflanzenschutzmittel und Sprühdosen (Deodorant, Haarspray etc.).

### 3.5.1 Thermodynamische Grundlagen der Aerosolerzeugung

Zur Zerstäubung und Überführung eines flüssigen Mediums in ein Aerosol wird eine definierte Menge Energie benötigt, um intermolekulare Kräfte, wie van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken überwunden zu können. Durch die Tröpfchenbildung findet eine deutliche Vergrößerung der Oberfläche statt. Da eine Oberflächenvergrößerung thermodynamisch ungünstiger ist, muss thermodynamische Arbeit verrichtet werden. Diese kann als thermodynamischer Einfluss der Oberfläche  $A$  in der Fundamentalgleichung der Thermodynamik berücksichtigt werden. Für die Änderung der Freien Enthalpie  $G$  des Systems ergibt sich damit

$$dG = -SdT + VdP + \sum_i \mu_i dn_i \left. \frac{\delta G}{\delta A} \right|_{T,p,n} dA \quad (5)$$

mit  $S$  als Entropie,  $T$  als Temperatur, dem Gesamtvolumen  $V$  und  $\mu_i dn_i$  als Produkt des chemischen Potentials und Stoffmengenänderung der Komponente  $i$ . Der Differentialquotient  $|\delta G/\delta A|_{T,p,n}$  besitzt die Einheit  $J/m^2$  oder  $N/m$ . Er wird als spezifische freie Oberflächenenthalpie bezeichnet und entspricht der thermodynamischen Definition der Oberflächenspannung  $\gamma$ . Vereinfacht dargestellt ergibt sich Oberflächenarbeit  $\delta W$  aus der Vergrößerung der Oberfläche  $A$  und der Oberflächenspannung  $\gamma$  [80]:

$$\delta W = \gamma \cdot dA \quad (6)$$

Die notwendige Energie zur Produktion eines Aerosols kann über unterschiedliche Wege (Druck, Schall, Kinetik) bereitgestellt werden. Im Folgenden werden diese Möglichkeiten zur Produktion eines Aerosols und ihre technische Umsetzung beschrieben.

### 3.5.2 Mechanische Erzeugung eines Aerosols

Ein wichtiger Aspekt und Qualitätsmerkmal eines Zerstäubers ist die Erzeugung eines gleichmäßigen Sprays in Bezug auf das zerstäubte Volumen pro Zeit und Tröpfchengrößenspektrum. Es gibt verschiedene Arten von Zerstäubern, deren jeweiliges Funktionsprinzip hier kurz vorgestellt wird. In dem in dieser Arbeit verwendeten Nebelkammerreaktorsystem wurden ausschließlich Ultraschallzerstäuber verwendet. Diese werden gesondert in einem extra Kapitel 3.5.2.5 detailliert beschrieben. Die Gründe für die Wahl von Ultraschallzerstäubung zur Produktion eines Aerosols werden zu Beginn des nächsten Kapitels, nachdem die Eigenschaften und Vor- und Nachteile aller Zerstäubertypen in diesem Kapitel vorgestellt wurden, dargestellt.

### 3.5.2.1 Düsenzerstäuber

Düsenzerstäuber können in die Gruppe der Einstoffdüsen und der Zweistoffdüsen, auch pneumatische Zerstäuber genannt, unterteilt werden. Bei Einstoffdüsen (Abbildung 3.18 links) wird das zu zerstäubende Medium mit hohem Druck durch Öffnungen mit einem geringen Durchmesser gepresst. Durch eine turbulente Strömung beim Austreten und hohe Geschwindigkeiten der Flüssigkeit zerstäubt das Medium aufgrund der hohen kinetischen Energie (Turbulenzdüsen) direkt nach Austritt aus der Düse oder tritt zunächst in Lamellenform aus und zerreißt erst nach einigem Abstand in kleine Tröpfchen (lamellenbildene Düsen) [81].

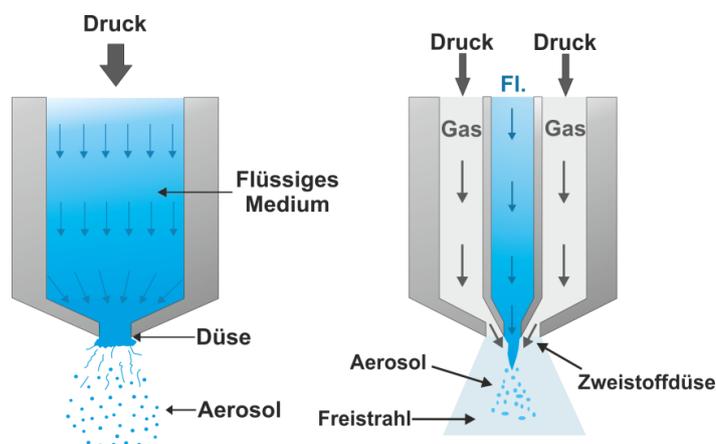


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung eines Einstoffdüsenzerstäubers (links) und eines Zweistoffdüsenzerstäubers (rechts). Adaptiert von [81]

Pneumatische (Zweistoffdüsen) Zerstäuber (Abbildung 3.18 rechts) beziehen die notwendige Energie zum Zerstäuben der Flüssigkeiten aus der Geschwindigkeit eines Zerstäubungsgases. Das zu zerstäubende Medium läuft mit geringer Geschwindigkeit durch einen Kanal zum Düsenausgang. Über einen zweiten Kanal wird ein Gas mit hoher Geschwindigkeit ebenfalls zum Düsenausgang geleitet. Beim Zusammentreffen von Gas und Flüssigkeit wird die Flüssigkeit durch das Gas beschleunigt und bei ausreichender kinetischer Energie des Gases zerstäubt.

### 3.5.2.2 Rotationzerstäuber

Bei Rotationszerstäubern wird das zu zerstäubende Medium meist zentral auf einen mit hoher Geschwindigkeit rotierenden Körper, z.B. Scheibe, gegeben. Durch die Zentrifugalwirkung wird das Medium annähernd radial zum Scheibenrand auf deren Oberfläche verteilt. Am Rand der Scheibe bildet das Medium Lamellen von denen Tröpfchen abgerissen werden (Abbildung 3.19). Über die Rotationsgeschwindigkeit lässt sich die Tröpfchengröße in einem gewissen Rahmen steuern [81].

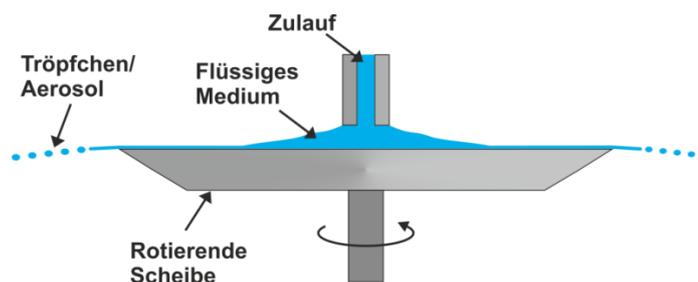


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung eines Scheibenrotationszerstäubers. Adaptiert von [81]

### 3.5.2.3 Mechanische Grundlagen der Ultraschallzerstäubung

Anders als Düsen- und Rotationszerstäuber, die mit kinetischer Energie arbeiten, verwenden Ultraschallzerstäuber zur Aerosolbildung akustische Wellen mittlerer bis hoher Frequenz als Energiequelle, um Oberflächenspannung und Kapillarkräfte zu überwinden.

Die Entwicklung von Ultraschallzerstäubern begann 1927 als das erste Mal von Wood und Lomis [82] über die Möglichkeit ein Aerosol aus kleinen Tröpfchen mittels Ultraschall zu erzeugen berichtet wurde. Die ersten Ultraschallzerstäuber wurden 1949 hauptsächlich als Raumbefeuchter hergestellt. Zu dieser Zeit wurden elektronische Oszillatoren als Quelle zur Anregung piezoelektronischer Energiewandler im Frequenzbereich von 10 kHz bis 1 MHz für die Allgemeinheit erhältlich [83]. Diese waren allerdings noch sehr groß und teuer, so dass sie bis in die 1980er Jahre keine große Beachtung fanden. Erst zu dieser Zeit wurde es durch technischen Fortschritt möglich kleinere und günstigere Geräte herzustellen, die ein breiteres Einsatzfeld ermöglichten.

Grundsätzlich wird bei Ultraschallzerstäubern eine hochfrequente Wechselspannung an einen piezokeramischen Energiewandler angelegt, welcher das elektrische Signal in eine mechanische Schwingung umwandelt und direkt in Kontakt mit dem zu zerstäubenden flüssigen Medium steht. Es entstehen lokale Druckunterschiede innerhalb der Flüssigkeit. Die Schallwellen breiten sich durch die gesamte Flüssigkeit aus, wodurch die Flüssigkeitsmoleküle zum Schwingen angeregt werden und lokale Temperatur- und Dichteunterschiede hervorgerufen werden. Die Flüssigkeit als Ganzes reagiert deutlich langsamer auf die Schwingungsanregung. Der Effekt des Schalls auf die Flüssigkeit wird durch die physikalischen Eigenschaften Viskosität, Oberflächenspannung und Dichte der Flüssigkeit bestimmt.

Der Mechanismus der Tröpfchenbildung ist noch nicht abschließend geklärt und wird in der Literatur viel diskutiert. Allgemein werden zwei mögliche Mechanismen vorgeschlagen, wie die Vibration der Schallwellen die nötige Energie liefern kann, um die Oberflächenspannung und die Kapillarkräfte zu überwinden und die freie Oberfläche so zu destabilisieren, dass sich kleine Tröpfchen aus der Oberfläche herauslösen können [82].

Ein von Söllner [84] vorgeschlagener Mechanismus ist die Destabilisierung der Flüssigkeitsoberfläche durch Kavitation (Kapitel 3.4.2.1). Durch Boguslavskii und Éknadosyants [85] wurde eine Theorie vorgeschlagen, bei der die Schockwellen der implodierenden Kavitationsbläschen Kapillarwellen mit einer Amplitude, die über dem kritischen Wert liegt, erzeugen und so eine Tröpfchenablösung ermöglichen [86, 87]. Abbildung 3.20 zeigt von, links nach rechts, die einzelnen Schritte des möglichen Mechanismus der Tröpfchenbildung durch Kavitation. Zunächst entsteht eine Kavitationsblase, die sich radial ausdehnt. Durch Implosion der Blase entsteht eine Flüssigkeitssäule aus der sich ein Tröpfchen abschnürt. Durch eine Vielzahl dieser Abläufe direkt unter der Oberfläche können quasi-stehende Kapillarwellen entstehen [88], aus denen sich nach Erreichen eines kritischen Schwellenwerts eine große Menge an Tröpfchen lösen kann und sich zu einem Aerosol formen.

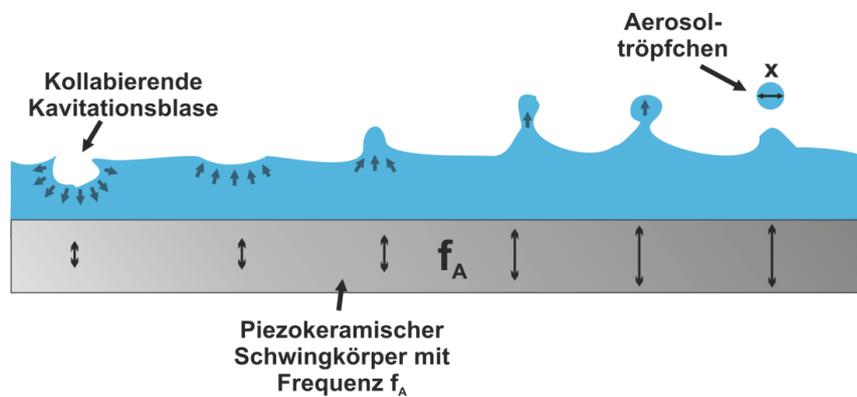


Abbildung 3.20: Vorgeschlagener Mechanismus (von links nach rechts) der Bildung eines Aerosoltröpfchens durch eine ultraschallinduzierte, kollabierende Kavitationsblase unter der Flüssigkeitsoberfläche [89]

Eine Aerosolbildung ist allerdings auch unter Bedingungen möglich, bei denen keine Kavitation auftreten kann. Dieses ist in entgasten Medien und bei geringer Energieeinwirkung der Fall. Als Erklärung wird davon ausgegangen, dass die Energie und die Amplitude der Kapillarwellen den kritischen Wert für eine Tröpfchenabschnürung erreichen (Abbildung 3.21) [90-92]. Einige Studien schlagen vor, dass diese Variante bei geringen Energien für die Tröpfchenbildung zuständig ist und bei höheren Energien die Kavitation dominiert [93]. Da beide Phänomene parallel auftreten, ist ein Zusammenspiel der Mechanismen wahrscheinlich, um die nötige Energie zur Störung der Oberfläche zu erzeugen und somit eine Tröpfchenbildung zu ermöglichen [94].

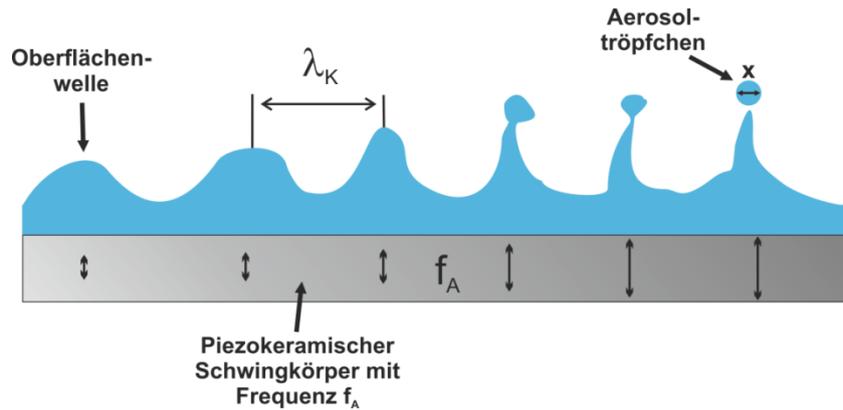


Abbildung 3.21: Vorgeschlagener Mechanismus (von links nach rechts) der Bildung eines Aerosoltröpfchens aus Kapillarwellen durch überschreiten der kritischen Amplitude in einer mittels Ultraschall zum Schwingen angeregten Flüssigkeit. Adaptiert von [81]

Ein weiterer Mechanismus zur Tröpfchenbildung beruht auf dem *acoustic streaming* (Kapitel 3.4.2.2). Während sich die Schallwelle durch die Flüssigkeit bewegt, werden durch Absorption der Schallenergie Flüssigkeitsmoleküle in Bewegung und Rotation versetzt. Der gesamte Flüssigkeitskörper beginnt in seiner eigenen Resonanzfrequenz zu vibrieren [70]. Dieses kann zur Destabilisation der Oberflächenstruktur führen, wodurch Kapillarwellen ausgebildet und Tröpfchen abgeschnürt werden (Abbildung 3.22). Auch hier ist nicht eindeutig geklärt, inwiefern Kavitation und andere Effekte die Tröpfchenbildung beeinflussen. Es ist daher gut möglich, dass beide Mechanismen gleichzeitig ablaufen, nur die Gewichtung sich bei unterschiedlichen Filmdicken der Flüssigkeit verschiebt [95].

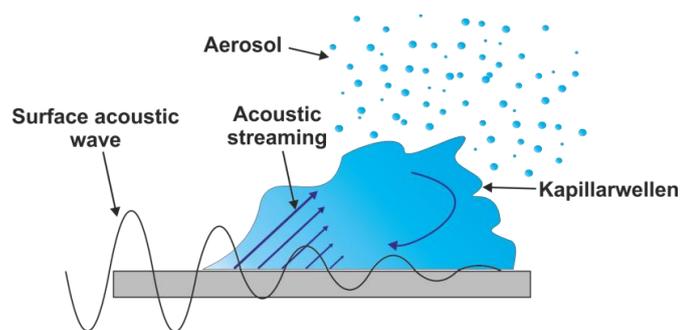


Abbildung 3.22: Mechanismus der Bildung von Aerosoltröpfchen aus Kapillarwellen mittels ultraschallinduzierten *acoustic streaming*. Adaptiert von [70, 96]

Bei jedem Ultraschallzerstäubertyp tritt kein definierter Tröpfchendurchmesser, sondern immer ein Tröpfchengrößenspektrum auf. Die wahrscheinlichste Erklärung liegt in der zeitlichen und örtlichen zufälligen Bildung von Kavitationsbläschen unter der Flüssigkeitsoberfläche. Durch diesen Effekt entstehen Kapillarwellen und Flüssigkeitssäulen unterschiedlicher Höhe, wodurch Tröpfchen mit unterschiedlichen Durchmessern entstehen [97].

### 3.5.2.4 Theoretische Grundlagen zur Tröpfchenerzeugung

Wie bereits weiter oben erwähnt, ist die Tröpfchengröße der Sprays ein wichtiger Parameter für viele Anwendungen. Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse an einer möglichst genauen rechnerischen Vorhersage des Durchmessers und der Größenverteilung. Wegen des nicht vollständig geklärten Mechanismus der Tröpfchenbildung erweist sich die Berechnung der Tröpfchengröße als kompliziert. Im Folgenden sind die am häufigsten verwendeten die Annahmen und Herleitungen zur Berechnung der theoretischen Tröpfchengröße aufgeführt.

Unabhängig vom Mechanismus zur Tröpfchenbildung muss eine gewisse kritische Amplitude der entstehenden Oberflächenwellen überschritten werden um ein Ablösen der Tröpfchen zu ermöglichen. Der Grenzwert setzt sich aus den stabilisierenden und den destabilisierenden Kräften zusammen. Dieses kann durch eine akustische oder kapillare Bindungsnummer beschrieben werden:

$$Bo_{a,c} \equiv \frac{\rho A^2 \omega^2 L}{\gamma} \quad (7)$$

mit  $\rho$  als Dichte der Flüssigkeit,  $A$  und  $\omega$  als Amplitude bzw. Frequenz der Vibration,  $L$  als Längenskalierung der Flüssigkeit und  $\gamma$  als Oberflächenspannung. Durch einführen der Viskosität  $\mu$  und einer linearen Stabilitätsanalyse eine kritische Amplitude  $a_c$  [94] definiert werden [91], bei der Oberflächendestabilisation einsetzt. Es folgt:

$$a_c = \frac{2\mu}{\rho} \left( \frac{\rho}{\pi\gamma\omega} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (8)$$

Ab dem drei- bis sechsfachen der kritischen Amplitude kann Zerstäubung auftreten. Die Tröpfchengröße wird durch die Amplitude der Schwingung nicht beeinflusst [70], allerdings die Geschwindigkeit der Tröpfchen sowie die Zerstäubungsrate [90]. Durch eine mathematische Untersuchung des Einflusses von Kapillarwellen auf die Stabilität von freien Oberflächen lässt sich ebenfalls eine Vorhersage über die „gefährlichste“ Wellenzahl  $k_{max}$  treffen, bei der die stärkste Destabilisierung auftritt. Der durchschnittliche Tröpfchendurchmesser korreliert mit  $k_{max} = 1/\lambda$  woraus sich

$$D_{32} \sim \frac{1}{k_{max}} \approx C\lambda \quad (9)$$

ergibt. Mit  $\lambda$  als Wellenlänge der Anregungsfrequenz und  $D_{32}$  als Sauterdurchmesser. Der empirische Koeffizient  $C$  wird häufig benutzt um die experimentellen Daten an die Vorhersage anzupassen. Die Limitierung der oben genannten mathematischen Lösung lässt

sich gut an den unterschiedlichen in der Literatur eingesetzten Werten für  $C$  (z.B.  $0,34$ ,  $1/\pi$ , und zwischen  $1$  und  $3,8$  [90, 92, 98]) abschätzen.

Die Wellenlänge  $\lambda$  lässt sich durch die bekannte Formel von Kelvin spezifizieren, welche durch eine lineare Stabilitätsanalyse für den Fall der Anregung von Oberflächenwellen durch vertikale Kräfte erhalten wurde:

$$\lambda \sim \left( \frac{2\pi\gamma}{\rho f_c^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (10)$$

In dieser Formel wird allerdings nicht die Frequenz berücksichtigt in der die Oberfläche der Flüssigkeit im Verhältnis zu der Anregungsfrequenz schwingt. Auch die Dicke des Flüssigkeitsfilms und die Amplitude der Anregungsschwingung finden keine Berücksichtigung. Wie Lang et al. [92] herausstellten, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Anregungsfrequenz  $f$  und der Frequenz der Kapillarwellen  $f_c$ . Da die Kapillarwellen subharmonisch zu der Anregungsfrequenz schwingen, ergibt sich  $f_c = f/2$  und somit aus Formel 10 der Ausdruck

$$\lambda \sim \left( \frac{8\pi\gamma}{\rho f^2} \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (11)$$

Diese Formel ist in der Literatur [90, 94, 98-100] weit verbreitet und ermöglicht eine ungefähre Vorhersage der Tröpfchengröße. Allerdings gibt es unterschiedliche Meinungen über das Einsetzen der subharmonischen Frequenz, da vor allem bei Frequenzen oberhalb von  $10$  kHz eine einfache Schwingung nach Faraday [101] vermutlich nicht mehr die Realität abbildet. Qi et al. (2008) [70] schlagen eine alternative Herleitung für  $f_c$  vor, da die Frequenz der Kapillarwellen nur abhängig von der Längengeometrie des Flüssigkeitskörpers  $L$ , der Viskosität  $\mu$  und der Oberflächenspannung  $\gamma$  ist:

$$f_c \sim \frac{\gamma}{\mu L} \quad (12)$$

Eingesetzt in Formel 11 lassen sich bei Frequenzen von  $1 - 10$  kHz gute Vorhersagen treffen. Bei höheren Frequenzen, wie sie z.B. bei *Surface Acoustic Wave*-Zerstäubern [98] (Kapitel 3.5.2.5) zu finden sind, wird vermutet, dass die Tröpfchengröße nicht mehr von der Anregungsfrequenz bestimmt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine genaue Vorhersage der Tröpfchengröße noch nicht möglich ist. Es besteht zum einen das Problem, dass der Mechanismus der Tröpfchenbildung noch nicht vollständig geklärt ist. Zum anderen werden bei der zurzeit verwendeten Formel einige Faktoren, wie Amplitude der Anregungswellen, Dicke des Flüssigkeitsfilms und komplexe Zusammenhänge der Kapillarwellenbildung

und -ausbreitung bei hohen Frequenzen im Megahertzbereich nicht berücksichtigt. Trotzdem lässt sich mit Formel 13 in Kombination mit dem Korrekturfaktor  $C$

$$D = C \left( \frac{8\pi\gamma}{\rho f^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (13)$$

eine ungefähre Vorhersage der mittleren Tröpfchengröße  $D$  treffen.

### 3.5.2.5 Ultraschallzerstäubertypen

Ultraschallzerstäuber (US-Zerstäuber) können aufgrund ihrer Funktionsweise in vier Kategorien unterteilt werden: *Surface acoustic wave* (SAW)-Zerstäuber, „angeregte Flüssigkeitsstrahl“-Zerstäuber, submerse Zerstäuber (Kavitationszerstäuber) und *Mesh*-Zerstäuber. Der Aufbau und die Funktion aller US-Zerstäuber werden im Folgenden kurz vorgestellt. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der entstehenden Tröpfchengrößen und den möglichen Effekten auf Moleküle und somit auf den für diese Arbeit wichtigen Parameter zur Beurteilung der Einsetzbarkeit als Zerstäubungseinheit in dem Nebelkammerreaktor.

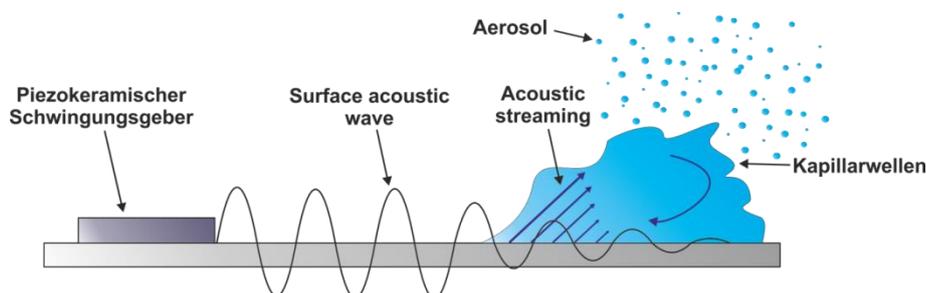


Abbildung 3.23: Schematische Darstellung eines *surface acoustic wave* (SAW)-Zerstäubers [70, 96]

SAW-Zerstäuber sind aus einer einkristallinen Platte aus  $\text{LiNbO}_3$  und einem oder mehreren Ultraschallgebern aufgebaut (Abbildung 3.23). Die durch den Schallgeber induzierten akustischen Oberflächenwellen mit Amplituden im Nanometerbereich breiten sich über die gesamte Oberfläche des Kristalls aus, bis sie auf Flüssigkeit treffen. Hier gehen sie in die Flüssigkeit über und erzeugen Kapillarwellen, woraus eine Tröpfchenbildung resultiert. Diese Geräte zeichnen sich durch hohe Frequenzen (häufig 10 MHz) [102, 103] geringe Tröpfchengrößen (1-5  $\mu\text{m}$ ), einen niedrigen Energieverbrauch von ca. 1 W und eine relativ geringe Zerstäubungsleistung aus. Der geringe Energieeinsatz und die hohen Frequenzen bieten zudem den Vorteil, dass keine Kavitation auftritt und somit keine oder nur eine sehr geringe Denaturierung von Proteinen oder andern Biomolekülen zu erwarten ist, welches ein wichtiger Faktor für das Zerstäuben von flüssigen Medien mit Biomolekülen (z.B. Nährmedien für Mikroorganismen) ist [104].

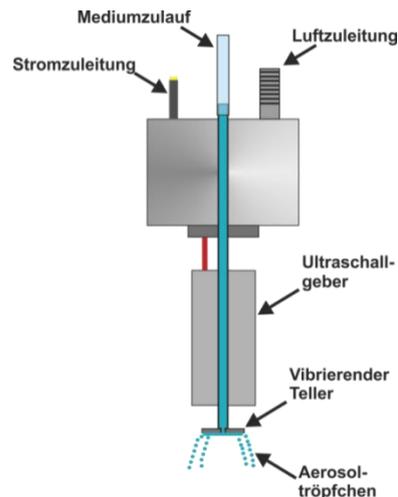


Abbildung 3.24: Schematischer Aufbau eines angeregten Flüssigstrahlzerstäubers. Adaptiert von [81]

Bei „angeregten Flüssigkeitsstrahl-Zerstäubern“ (Abbildung 3.24) wird eine Flüssigkeit mit einer bestimmten Geschwindigkeit in eine Kammer mit einer Öffnung gepumpt. An Ende dieser Kammer befindet sich direkt vor der Öffnung eine Art Teller, der durch einen Ultraschallgeber zum Schwingen gebracht wird. Tropft die Flüssigkeit auf den Teller, wird das flüssige Medium durch die Vibration zerstäubt und tritt als Aerosol aus der Kammer aus. Durch Anlegen von Druckluft kann eine bessere Verteilung des Aerosols erzielt werden. Diese Art von Zerstäubern wird hauptsächlich im Bereich von 45 – 500 kHz betrieben und zeichnet sich durch relativ große Tröpfchendurchmesser von ca. 15 – 35  $\mu\text{m}$  aus. Große Tröpfchen eignen sich zur sanften und gleichmäßigen Berieselung von Oberflächen. Wird ein langlebiges Aerosol benötigt sind deutlich kleinere Tröpfchengrößen notwendig [81].

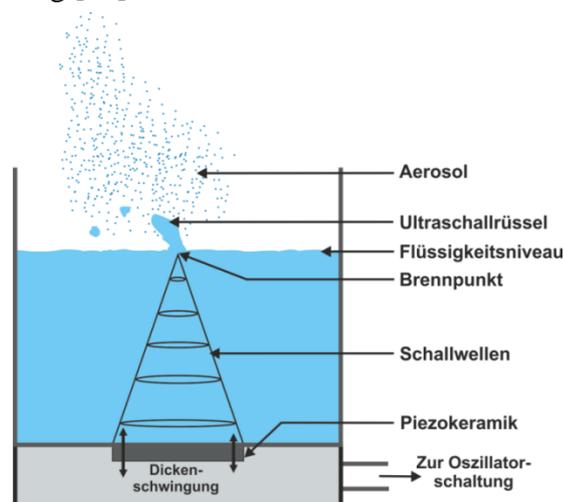


Abbildung 3.25: Aufbau und Funktionsweise eines submersen Ultraschallzerstäubers [105]

Bei submersen Ultraschallzerstäubern (Kavitationszerstäubern) (Abbildung 3.25) wird eine piezokeramische Schwingungsscheibe wasserdicht in ein Gehäuse verbaut, sodass nur die Oberfläche der Keramik mit der Flüssigkeit in Berührung kommen kann. Diese Zerstäuber arbeiten mit Frequenzen von 1,5 bis 3 MHz [106]. Die erzeugten Schallwellen wandern durch die Flüssigkeit und verdichten sich bei einem, für jede Piezokeramik charakteristischen, Fokuspunkt so stark, dass sie sich aufrichten und einen so genannten Ultraschallrüssel bilden. Aus diesem werden dann Tröpfchen im Größenbereich von 1 – 5  $\mu\text{m}$  abgelöst. Problematisch erweisen sich hier die hohen Energien, die in das Medium eingebracht werden müssen und zu Erwärmungen führen können. Die hohe Energie und der verwendete Frequenzbereich begünstigen zudem Kavitation. Als Folge besteht bei dem Einsatz submerser Zerstäuber das Risiko von Reaktionen mit in der zerstäubten Flüssigkeit gelösten Molekülen [107].

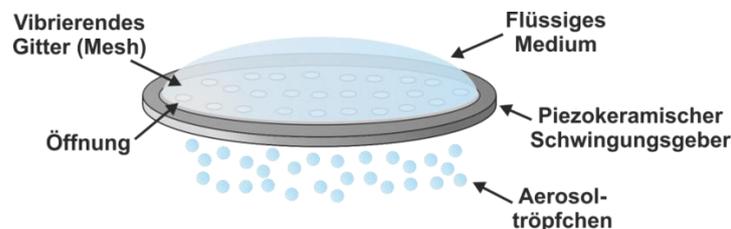


Abbildung 3.26: Schematische Darstellung der Membran mit Löchern im Mikrometerbereich und dem piezokeramischen Schwingungsgeber eines *Mesh*-Zerstäubers [108].

Die neuartigen *Mesh*-Zerstäuber (Abbildung 3.26) [108-110] nutzen dieselbe Technik wie die submersen Zerstäuber. Allerdings wird hier ausschließlich ein äußerer Ring aus einer Piezokeramik verwendet. Dazwischen wird eine dünne Metallmembran gespannt, in die mittels Lasertechnik Löcher mit Durchmessern im Mikrometerbereich geschossen werden. Durch Vibration der Keramik werden Tröpfchen durch die Membran gepresst und somit ein Aerosol produziert. Die Tröpfchengröße ist dabei abhängig von dem Durchmesser der Löcher in der Membran. Diese Art von Zerstäubern benötigt deutlich weniger Energie, da nur die Membran in Schwingung versetzt werden muss und es wird ein sehr konstanter und gleichmäßiger Tröpfchendurchmesser beschrieben [109]. Allerdings ist diese Technologie anfällig für Verunreinigungen, Verstopfung der Löcher und Kontaminationen bei unzureichender Reinigung und/oder dauerhafter Benutzung. Zusätzlich ist die Zerstäubungsleistung in den kommerziell erhältlichen Geräten relativ gering. Da die zu zerstäubende Flüssigkeit nicht oder nur minimal mit Ultraschall in Berührung kommt, keine Kavitation und geringer Scherstress auftreten, ist diese Methode sehr schonend zu Molekülen in dem zerstäubten Medium [111].

### 3.6 *Mist reactors* für die Züchtung von *hairy root*-Kulturen

Die Infektion von Pflanzenwurzeln mit dem *Agrobacterium rhizogenes* oder die Biotransformation von Pflanzenzellen, kann zur Herstellung von *hairy root*-Kulturen genutzt werden. Hierbei handelt es sich um abnormal schnell und dicht wachsende Pflanzenwurzeln, die ohne die Mutterpflanze gezüchtet werden können [112]. Besonderes Interesse besteht in der Zucht dieser Kulturen, da sie Sekundärmetabolite produzieren können, die in der Mutterpflanze nicht vorkommen bzw. diese in deutlich höheren Konzentrationen vorkommen [113, 114]. Die Zucht dieser Kulturen wirft bisher mehrere Probleme auf. Eine entscheidende Limitierung tritt häufig bei Gasversorgung mit  $O_2$  und  $C_2H_4$  bzw. dem Abtransport von  $CO_2$  auf. Eine Lösung des Problems sollen eine besondere Form von Gasphasenreaktoren, *Mist reactors*, bieten, bei denen die *hairy root*-Kulturen in einem Aerosol aus einer Nährlösung kultiviert werden. Die Nährlösung wird zentral oder dezentral zerstäubt und den Kulturen zugeführt. Die Zerstäubung wird hierbei durch die in Kapitel 3.5.2 aufgeführten Methoden realisiert werden, wobei die Ultraschallzerstäubung einen vielversprechenden Ansatz bietet und erste Erfolge erzielt werden konnten [115].

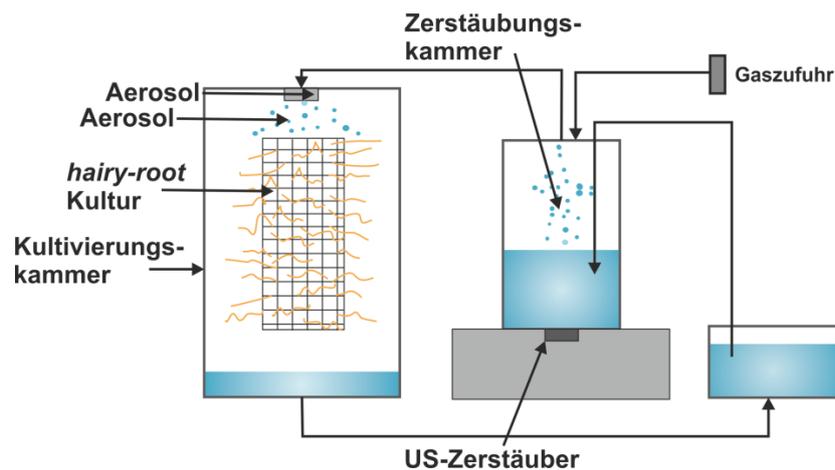


Abbildung 3.27: Schematische Darstellung eines *mist reactors* für die Züchtung von *hairy root*-Kulturen

## 4 Experimenteller Teil

### 4.1 Konzeptvorstellung

Das in dieser Arbeit verwendete neuartige Nebelkammerreaktorsystem besteht vereinfacht dargestellt aus einer Reaktorkammer, in der sich das Aerosol ausbreiten kann und Proben platziert werden können, und einem daran gekoppelten Ultraschallzerstäuber (Abbildung 4.1). Aufgrund der unterschiedlichen Funktionsweisen (Kapitel 3.5.2.5) der Ultraschallzerstäuber (US-Zerstäuber) besteht, je nach gewählten Modell, die Notwendigkeit der Anbringung im Reaktordeckel (Zerstäubung von oben) oder im Reaktorboden (Zerstäubung von unten).

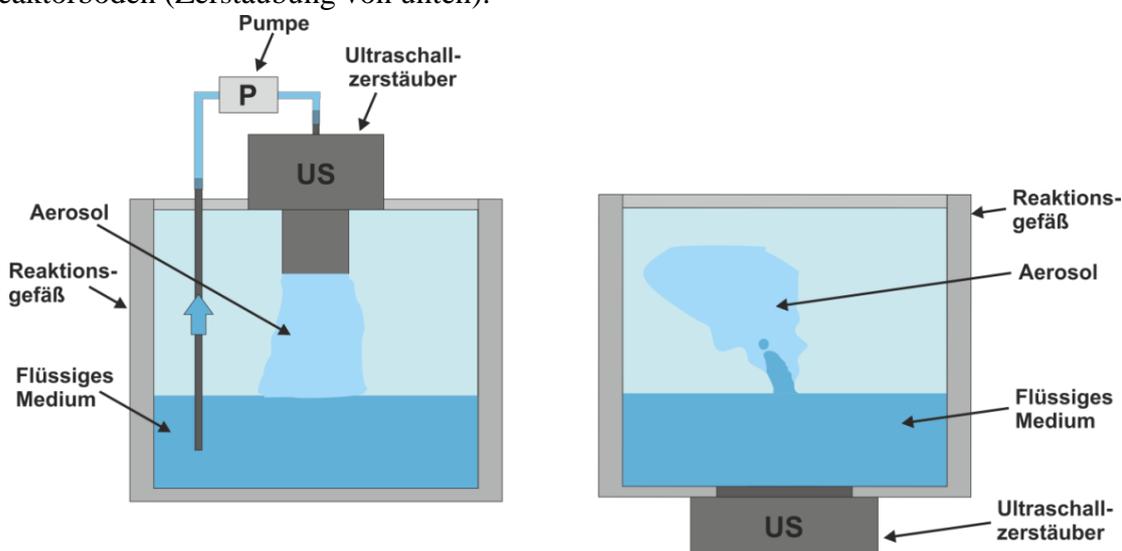


Abbildung 4.1: Möglicher Aufbau eines Nebelkammerreaktors mit einer Zerstäubung vom Deckel (links) und vom Reaktorboden (rechts)

In dem Nebelkammerreaktor-System unterscheidet sich das Prinzip der Aerosolerzeugung bei dem grundlegend von der thermischen Erzeugung von Aerosolen und bietet für die Anwendung deutliche Vorteile. Thermische Bildung von Aerosolen (Nebel) beruht auf der Bildung von Tröpfchen durch verdampfendes Wasser und anschließende Kondensation aus übersättigter kühlerer Luft. Es gehen lediglich einzelne Wassermoleküle in die Gasphase über, wodurch kein Transport von anderen Molekülen in/mit dem Aerosol möglich ist und diese in der Stammlösung zurück bleiben. Zudem muss die Lösung meist stark erhitzt werden. Bei der Ultraschallzerstäubung werden die Aerosoltröpfchen mechanisch aus der Stammlösung gelöst. Die Tröpfchen sollten theoretisch die gleiche Konzentration an gelösten Stoffen enthalten, wie die Stammlösung. Das Prinzip der Ultraschallzerstäubung bietet gegenüber den anderen Methoden zur Zerstäubung von Flüssigkeiten (Kapitel 3.5.2.1, 3.5.2.2) den Vorteil, dass mit geringem technischem Aufwand (bei der Verwendung von Submers-Zerstäubern ohne Pumpen etc.) gearbeitet werden kann. Zudem haben die Tröpfchen eine relativ geringe kinetische Energie und es werden die kleinsten

Tröpfchengrößen der vorgestellten Methoden erzielt. Diese Eigenschaften sind die Grundlage für die weiter oben aufgeführten Vorteile des Nebelkammerreaktor-Systems.

Die praktischen Arbeiten lassen sich in vier Bereiche einteilen (Abbildung 4.2). Ein Teilbereich (Bereich I.1) beschäftigt sich mit dem Aufbau und der reaktionstechnischen Charakterisierung des im Rahmen dieser Arbeit als Testreaktor verwendeten Nebelkammerreaktor-Typ I (*NKR-Typ I*). Dieser dient als Grundlage für den Bau des optimierten Systems *NKR-Typ II*, welcher in einem zweiten Teilbereich (Bereich I.2) beschrieben und getestet wird.

Neben dem Aufbau und des Designs der Reaktorkammer, spielen die Funktionsweise und die technischen Eigenschaften der US-Zerstäuber eine wichtige Rolle. Die Untersuchung der elektrischen Größen der US-Zerstäuber und die Analyse der produzierten Aerosole bilden Bereich II. Wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, kann Ultraschall Einfluss auf diverse Moleküle, insbesondere auf Proteine, haben bzw. chemische Reaktionen hervorrufen. Bereich III der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich daher mit der Stabilität von Nährmedien für tierische Zellen und Mikroorganismen und den Einfluss des Ultraschalls auf deren Bestandteile. Zusätzlich wurde eine Testkultivierung mit einem Mikroorganismus (*A.niger*) durchgeführt, um die generelle Funktion und Einsetzbarkeit des Nebelkammerreaktors zu evaluieren. Neben dem passenden Aufbau der Reaktorkammer und der Wahl des geeigneten US-Zerstäubers beschäftigt sich Bereich IV mit dem Aufbau und der Zusammenstellung einer Mess- und Regeleinheit, deren Sensoren im Aerosol sowie im flüssigem Medium verlässliche Werte liefern und alle Prozessgrößen zentral zusammenführt.

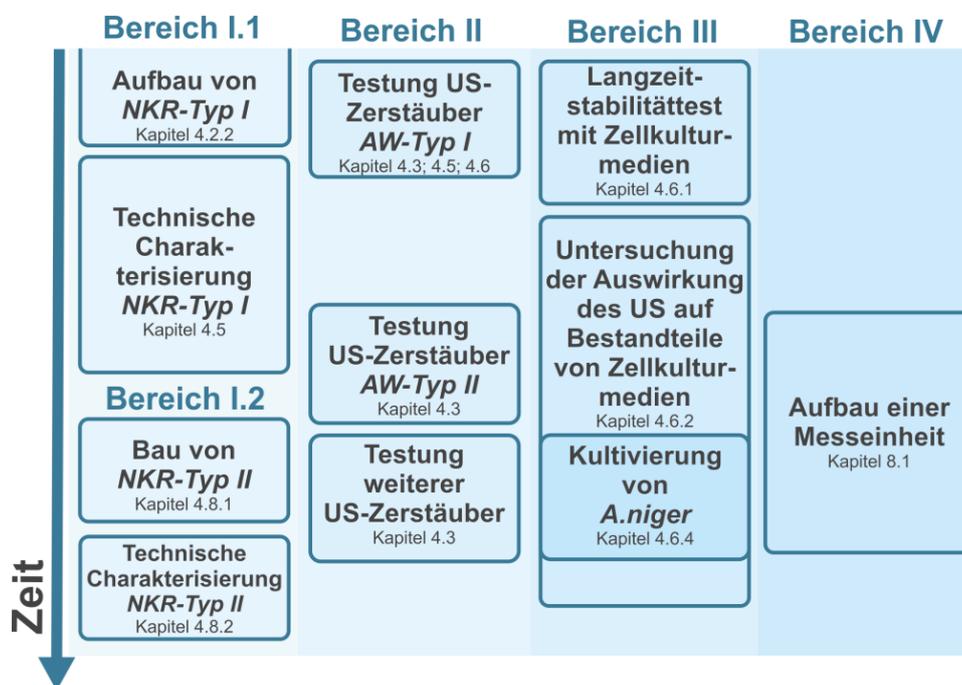


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Aufgabenbereiche dieser Arbeit und des zeitlichen Ablaufs der Bearbeitung

Abbildung 4.2 zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf der Arbeiten in den verschiedenen Bereichen. Zu Beginn der praktischen Arbeiten standen ausschließlich der *NKR-Typ I* und der US-Zerstäuber *AW-Typ I* zur Verfügung. Weitere US-Zerstäuber wurden nach eingehender Untersuchung des *AW-Typ I* und des *NKR-Typ I* getestet. In Verlauf dieser Arbeit werden zur besseren Übersichtlichkeit trotzdem die Ergebnisse aller getesteten US-Zerstäuber in einem Kapitel zusammengefasst. Die Experimente in den Bereichen I.1 und Bereich III wurden größtenteils mit dem *NKR-Typ I* und dem *AW-Typ I* durchgeführt. Daher wird die Kombination aus Reaktormodell und US-Zerstäubereinheit zu Beginn des jeweiligen Kapitels angegeben. Bei den einzelnen Experimenten werden nur Abweichungen von der vorher angegebenen Kombination explizit aufgeführt. Um das Messkonzept, dem diese Arbeit zugrunde liegt verständlich abzubilden, werden zunächst der Aufbau und die Funktionsweise der Nebelkammerreaktor vorgestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff Kondensat für die Flüssigkeit verwendet, die sich durch das Absetzen der Aerosoltröpfchen auf Oberflächen bildet. Da dieses nicht der physikalischen Definition von Kondensation entspricht, wird das Wort im Folgenden in Anführungszeichen gesetzt.

## 4.2 Nebelkammerreaktoren

Wie bereits (Kapitel 4.1) beschrieben, ist das Nebelkammerreaktor-System ein neuartiges Bioreaktor-System bestehend aus einer Kombination eines klassischen (Kessel-)Bioreaktor und einem Ultraschallzerstäuber (US-Zerstäuber). Um ein einfaches Design zu ermöglichen, wurden zur Konstruktion der ersten Nebelkammerreaktor-Prototypen submerse US-Zerstäuber (Kapitel 3.5.2.5) verwendet. Sie können relativ unkompliziert an dem Reaktorboden befestigt werden und benötigen, im Gegensatz zu US-Zerstäufern (Kapitel 3.5.2.5), die vom Deckel betrieben werden müssen, kein zusätzliches Equipment (wie z.B. Pumpen). Dieses vermindert den technischen Aufwand und verringert das Kontaminationsrisiko. Als einzige Grundvoraussetzung von Seiten des US-Zerstäubers ist eine Flüssigkeitssäule (Höhe vom Modell abhängig) über der Piezokeramik.

Der Reaktor sollte eine relativ große Kammer aufweisen, in der sich das Aerosol ausbreiten kann und eine Vorrichtung zur Platzierung von (Zell-)Proben enthalten. Durch ein Mediumreservoir im Reaktorboden kann die benötigte Flüssigkeitssäule über dem US-Zerstäuber bereitgestellt werden. In den folgenden Kapiteln wird der Aufbau von Nebelkammerreaktor-Prototypen und des zu Beginn der praktischen Arbeiten verwendeten Modells vorgestellt.

### 4.2.1 Aufbau des *NKR-Typ 0*



Abbildung 4.3: Seitenansicht (links) und Draufsicht mit geöffnetem Deckel der Kultivierungskammer des *NKR-Typ 0* während des Betriebs (rechts)

Der *NKR-Typ 0* (Abbildung 4.3 + Abbildung 4.4) wurde in der Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie (TCI) der Universität Hannover in enger Zusammenarbeit mit dem Zentrum für regenerative Medizin der Universität Tübingen (ZRM) gefertigt. Der Reaktor besteht komplett aus Edelstahl. Anhand erster Tests mit einfachen Prototypen konnte gezeigt werden, dass sich aus dem Ultraschallrüssel (Kapitel 3.5.2.5) Aerosoltröpfchen mit einem Durchmesser von ca. 1-10  $\mu\text{m}$  lösen und weitere große Tropfen mit Durchmessern im Millimeterbereich herausgeschleudert werden (siehe auch Abbildung 4.4). Da diese Tröpfchen fragile Zellkonstrukte schädigen bzw. Zellen von Trägermaterialien abwaschen können, wurde für den *NKR-Typ 0* ein Zweikammersystem entwickelt. In der kleineren Zerstäubungskammer mit einem Volumen von 0,57 l wird das flüssige Medium mittels Ultraschall zerstäubt. An dem Boden der Zerstäubungskammer befindet sich eine Öffnung, an die ein Flansch mit einem Hohlraum geschraubt und an dessen Boden der Ultraschallzerstäuber befestigt wird. Der Hohlraum (im Folgenden Kühlkammer genannt) des Flansches ist mit Zu- und Abläufen versehen, worüber Kühlflüssigkeit gepumpt werden kann, welche die entstehende Wärme des Zerstäubers ableitet. Da Ultraschallzerstäuber nicht autoklavierbar sind, wurde zwischen dem Flansch und dem Reaktorboden eine Folie aus Edelstahl gespannt, die ein Autoklavieren ohne montierte US-Zerstäuber ermöglicht. Die Kühlkammer muss bei Betrieb stets mit Flüssigkeit gefüllt sein, da der Schall nur durch flüssiges oder festes Medium ausreichend transportiert wird. Zusätzlich garantiert der Flansch den nötigen Abstand von fünf Zentimetern zwischen der Piezokeramik und der Flüssigkeitsoberfläche. Dieser ist notwendig, damit der Brennpunkt des US-Zerstäubers in der Nähe der Flüssigkeitsoberfläche liegt und eine hohe Ausbeute an Aerosol erreicht werden kann.

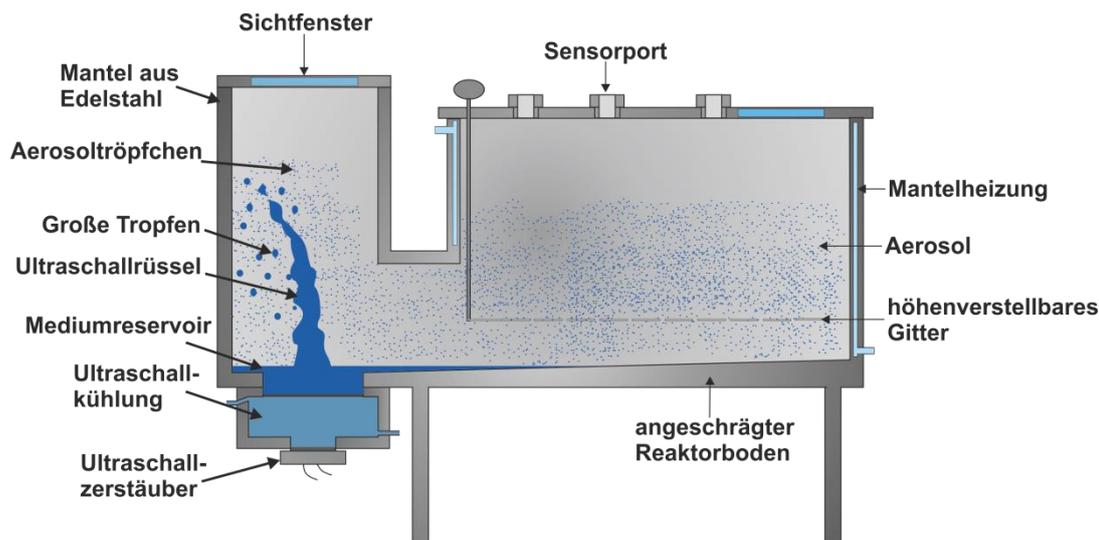


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung eines senkrechten Querschnitts durch den NKR-Typ 0

Über ein Verbindungsstück mit einem Fenster von 7 x 9,5 cm können die Aerosoltröpfchen in die größere Kultivierungskammer (Volumen = 4,7 l) strömen, so werden die störenden großen Tropfen in der Zerstäubungskammer zurückgehalten. In den Boden der Kultivierungskammer wurde eine leichte Schräge in Richtung der Zerstäubungskammer eingebaut, wodurch das kondensierte Medium zurück in das Mediumreservoir fließen kann. Aufbauten und Proben können auf einem höhenverstellbaren Gitter in der Kultivierungskammer platziert werden. In dem Deckel sind diverse Ports für Sonden, Sensoren etc. enthalten. In den Deckeln beider Kammern ist ein Sichtfenster eingearbeitet, welches die visuelle Kontrolle der Aerosolproduktion bzw. der Proben ermöglichen soll. Die Außenwand der Kultivierungskammer besteht aus einem Doppelmantel. Der Raum zwischen den beiden Wänden kann über Anschlüsse mit Flüssigkeit gefüllt und somit zur Temperaturregulierung der Kammer verwendet werden.

In Vorarbeiten [116] wurde das System getestet, wobei festgestellt wurde, dass durch das Zweikammersystem verhindert werden konnte, dass große Tropfen in die Kultivierungskammer gelangen. Für die Produktion einer ausreichenden Menge Aerosol wurde allerdings viel Ultraschallenergie benötigt, da ein hoher Anteil sich bei der Ausbreitung in die Kultivierungskammer absetzt. Als problematisch dabei erwies sich die Vermutung, dass hochenergetischer Ultraschall Moleküle in Zellkulturmedien schädigt.

Eine visuelle Kontrolle der Bedingungen im Reaktor stellte sich trotz Sichtfenstern als nahezu unmöglich heraus, da fehlendes Licht zusammen mit dem dichten Aerosol die visuelle Kontrolle von Proben unmöglich machte. Als weiterer Nachteil erwiesen sich die Größe und das hohe Gewicht des Reaktors.

Anhand der Vorarbeiten konnte die Funktion des Nebelkammerreaktor-konzepts belegt werden, da aus einem flüssigen Medium ein Aerosol gebildet wurde, welches die Flüssigkeit zu anderen Stellen im Reaktor transportiert. Ebenfalls wurde erfolgreich eine erste Testkultivierung mit Kresse durchgeführt.

### 4.2.2 Aufbau des *NKR-Typ I*



Abbildung 4.5: *NKR-Typ I* als Seitenansicht mit deaktiviertem US-Zerstäuber (links) und während des Betriebs mit 50%iger Aerosolfüllung (rechts)

Aufgrund der oben genannten Problematik des Edelstahl-Zweikammersystems (*NKR-Typ 0*) wurde ein komplett überarbeiteter *NKR-Typ I* (Abbildung 4.5) in Zusammenarbeit des ZRM und des TCI entwickelt und in der Feinmechanikwerkstatt des TCI gefertigt. Der Deckel und der Reaktorboden bestehen aus Edelstahl, der Mantel aus Glas. In Abbildung 4.6 ist der schematische Aufbau dargestellt.

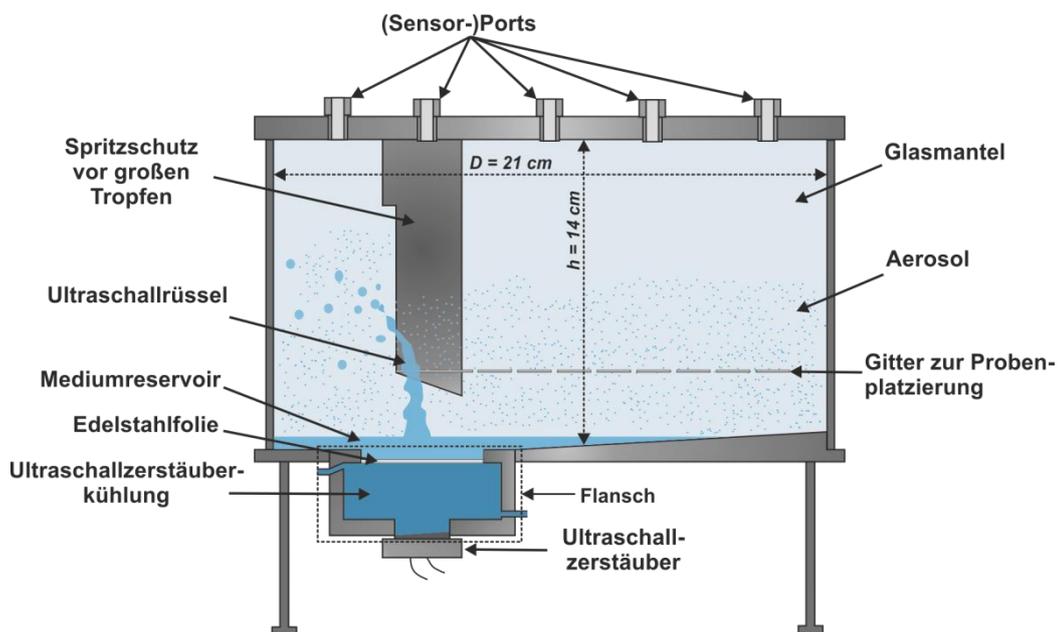


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung eines senkrechten Querschnitts durch den *NKR-Typ I*

Um die benötigte Ultraschalleistung und den Energieeintrag zur ausreichenden Füllung des Reaktors mit Aerosol zu vermindern, wurde das Konzept auf ein komplett rundes Einkammersystem umgestellt und das Gesamtvolumen von 5,27 l auf 4,88 l verringert. Durch die kompaktere Bauweise entfällt z.B. der problematische Transport des Aerosols durch das Brückenstück. Das bewährte Konzept des Flansches als Kühlraum und Abstandshalter wurde von dem *NKR-Typ 0* weitestgehend übernommen. Als Spritzschutz

vor großen Tropfen wurde am Deckel des Reaktors ein Metallrohr mit einem Durchmesser von fünf Zentimetern über dem Zerstäuber angeschweißt, welches ca. vier Zentimeter über der Flüssigkeitsoberfläche endet. Durch den Spritzschutz werden große Tropfen daran gehindert unkontrolliert in den Reaktorraum geschleudert zu werden. In die zur Reaktorwand gewandte Seite des Rohres wurde eine Öffnung eingearbeitet, da sich in einem komplett geschlossenen Rohr die Aerosoltröpfchen zu stark absetzen, was eine schlechte Aerosolausbeute zur Folge hat. Der Flansch mit dem Zerstäuber ist in der Nähe des Reaktorrandes platziert und der restliche Reaktorboden ist zum Zerstäuber hin angeschrägt, wodurch das kondensierte Medium in das Mediumreservoir zurück laufen kann und so der Einsatz von geringen Medienvolumina ermöglicht wird. Der Mantel des Reaktors besteht komplett aus Glas, damit die Gewichtsreduktion und die visuelle Kontrolle des Reaktorinnenraums möglich sind. Durch das Wegfallen der Mantelheizung muss der Reaktor zur Temperaturregulierung in einem Inkubator oder mit einer Heizmanschette betrieben werden. (Zell-)Proben, dreidimensionale Konstrukte und Scaffolds können auf einem höhenverstellbaren Lochgitter platziert werden, welches an dem Spritzschutz befestigt ist und über eine Stange von außerhalb des Reaktors in der Höhe verstellt werden kann. In dem Reaktordeckel befinden sich mehrere Ports und Anschlüsse für Sensoren und für die Begasung. Abbildung 4.7 zeigt in den Bildabschnitten A-D den Aufbau eines Aerosols aus DMEM-Nährmedium von geringer Ultraschalleistung A bis zu maximaler Leistung D in dem *NKR-Typ I* und dem *US-Zerstäuber AW-Typ I*. Zu erkennen ist die Ausbildung und die Zunahme des Ultraschallrüssels, sowie des Aerosols mit Steigerung der Leistung (A→D).

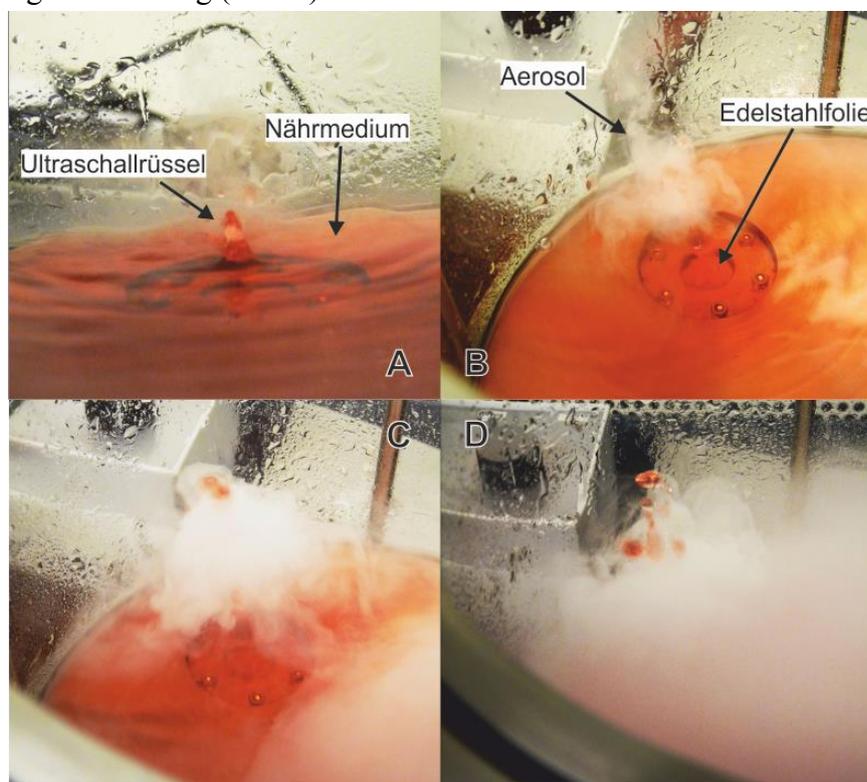


Abbildung 4.7: Aufnahme des Ultraschallrüssels und der Aerosolproduktion in dem *NKR-Typ I* bei steigender Ultraschalleistungen (A = 36 W, B = 40 W, C = 45 W und D = 48 W) des *AW-Typ I*-Zerstäubers

### 4.3 Verwendete Ultraschallzerstäuber

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben lässt sich eine erste grobe Einteilung bei Ultraschallzerstäubern über die Form des Einbaus (Zerstäubung von oben bzw. unten) durchführen. Einige Modelle entlassen das Aerosol nach unten, andere Modelle werden in oder unter der zu zerstäubenden Flüssigkeit platziert. Für den Fall des in dieser Arbeit eingehend getesteten *NKR-Typ I* bestand bei der Konstruktion die Möglichkeit US-Zerstäuber zu verwenden, die im Reaktordeckel angebracht werden müssen (*Mesh-* und „Angeregte Flüssigkeitsstrahl“-Zerstäuber) oder am Reaktorboden (submerse Zerstäuber). Submerse Zerstäuber bieten den Vorteil der einfacheren Handhabung, da allen Modellen, die im Reaktordeckel angebracht werden, das zu zerstäubende Medium mittels einer Pumpe zugeführt werden muss. Es resultiert ein größerer technischer Aufwand und eine höhere Fehler- und Kontaminationsanfälligkeit. Submers-Zerstäuber können mit Medium überschlachtet werden, so dass keine Rückführung des Mediums notwendig ist. Aus diesem Grund wurde in den *NKR-Typ I* der Submers-Zerstäuber *AW-Typ I* (Abbildung 4.8, 3) verbaut. In den praktischen Arbeiten zur Testung unterschiedlicher US-Zerstäuber wurde primär mit unterschiedlichen Modellen von Submers-Zerstäubern gearbeitet. Vergleichend wurde zusätzlich ein Modell eines „angeregten Flüssigkeitsstrahl-Zerstäubers“ getestet.

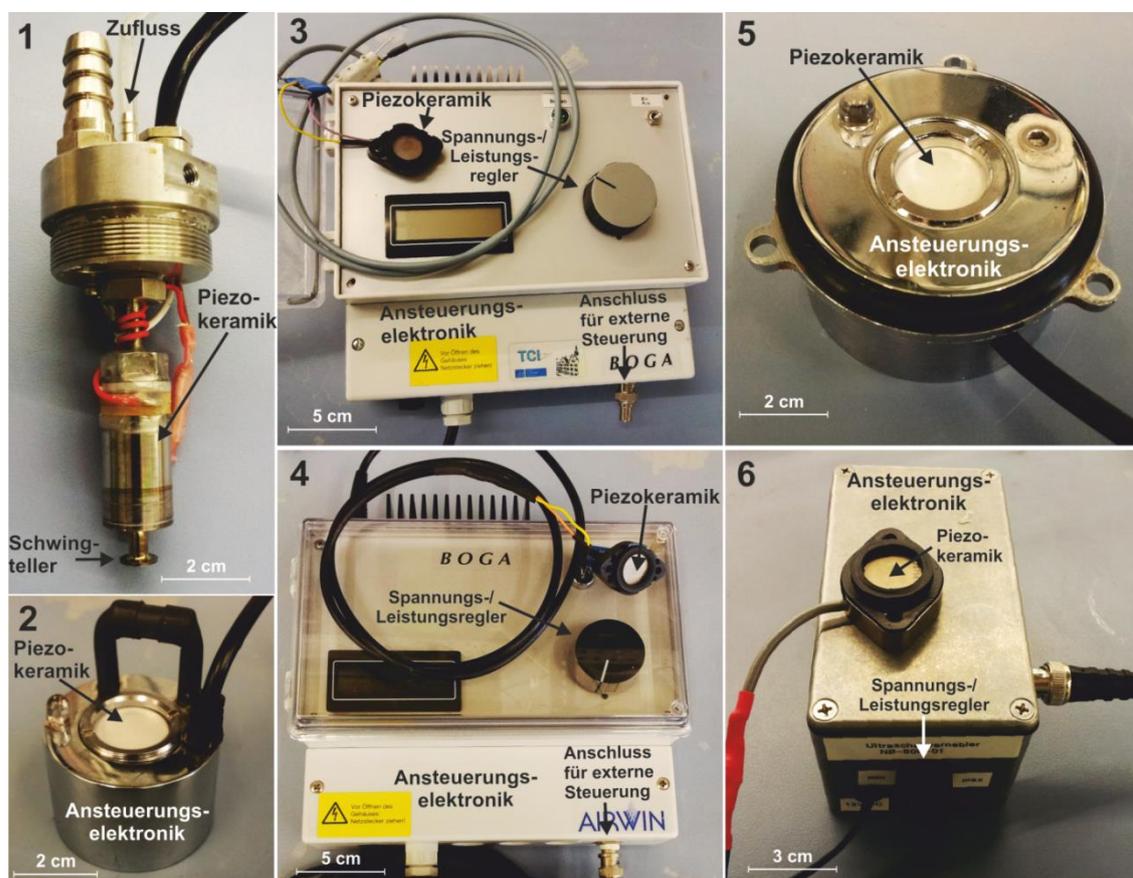


Abbildung 4.8: Verwendete US-Zerstäuber: 1 LHZ1-Zerstäuber, 2 CH24V, 3 AW-Typ I, 4 AW-Typ II, 5 CH12V, 6 TDK-NB80

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit getesteten US-Zerstäuber bezüglich ihres Aufbaus vorgestellt. Anschließend werden die Experimente und die daraus ermittelten Daten zur Charakterisierung der US-Zerstäuber (Kapitel 4.3) beschrieben. Die technische Anforderungen an die US-Zerstäuber für den Nebelkammerreaktor war es, ein möglichst stabiles Aerosol mit einer geringen Sedimentationsrate zu erzeugen und keine/wenige ultraschallinduzierte chemische Reaktionen hervorzurufen. Da der Nebelkammerreaktor ein völlig neues Einsatzfeld für US-Zerstäuber darstellt, ist es notwendig die Kenndaten zu bestimmen und in ein Verhältnis zu setzen, um die optimale Konfiguration für die Anforderungen des Nebelkammerreaktors zu erhalten.

Im Rahmen der praktischen Arbeiten wurden sechs verschiedene US-Zerstäuber getestet. Hierzu zählen zwei Modelle der Firma *BOGA Gerätetechnik GmbH*, die im Folgenden als *AW-Typ I* (Abbildung 4.8, 3) und *AW-Typ II* (Abbildung 4.8, 4) bezeichnet werden. Beide Modelle sind individuelle Anfertigungen bezüglich der elektronischen Ansteuerung des piezokeramischen Schallwandlers. Sie arbeiten mit derselben Piezokeramik, allerdings sind für die Erzeugung des Ultraschalls unterschiedliche Platinen verbaut. Die Ansteuerung und die Schwingeinheit sind räumlich getrennt. Die Steuerung bietet die Möglichkeit des Anschlusses einer externen Steuerung (z.B. Pulsgebers) und die freie Regelung der Ansteuerungsspannung (*AW-Typ I* = 0 - 70 V; *AW-Typ II* = 0 - 58 V). Der Wert für die Ansteuerungsspannung ist proportional mit der Leistung des jeweiligen US-Zerstäubers. Eine Kooperation mit der Herstellerfirma bietet die Möglichkeit ggf. Anpassungen an der Ansteuerungselektronik durchzuführen.

Des Weiteren wurde ein kommerziell erhältliches Modell mit höherer Frequenz, der *TDK-NB80* (Abbildung 4.8, 6), getestet. Auch bei diesem Modell ist die Ansteuerungselektronik von dem Schallwandler räumlich getrennt. Sie bietet zudem die Möglichkeit des Anschlusses eines Potentiometers zur Variation der Spannung/Leistung und einer externen Regelung zur Aktivierung und Deaktivierung des Ultraschalls. Zum Schutz der Platine wurde für den *TDK-NB80* ein Gehäuse angefertigt, in das ein Potentiometer mit Drehregler eingearbeitet wurde.

Als Vergleichsmodelle wurden zwei Standard-Submers-Zerstäuber verwendet, die Einsatz in verschiedenen kommerziell erhältlichen Artikel finden. Laut Herstellerangaben arbeiten sie mit unterschiedlichen Frequenzen. Bei diesen Modellen ist der piezokeramische Schallwandler fest mit der Ansteuerungselektronik verbaut und bietet somit keine Möglichkeit zur direkten oder externen Regelung. Die Modelle werden im Weiteren als *CH12V* (Abbildung 4.8, 5) und *CH24V* (Abbildung 4.8, 2) bezeichnet.

Als Vergleichsmodell zu den Submers-Zerstäubern wurde ein angeregter Flüssigkeitsstrahl-Zerstäuber der Firma *Lechler*, im Folgenden *LHZ1* genannt, verwendet. Wie in Kapitel 3.5.2.5 beschrieben Arbeiten diese Zerstäuber von dem Deckel eines Gefäßes. Als Testgefäß wurden an dem Anatomischen Institut Tübingen modifizierte Schott-Flaschen angefertigt (Abbildung 4.9) und für die Testung bereitgestellt.



Abbildung 4.9: Messaufbau für den *LHZI-Zerstäuber*, bestehend aus einer 500ml-Schottflasche mit angepasster Halterung im Deckel

#### 4.4 Aufbau einer Mess- und Regeleinheit

In diesem Kapitel wird der Aufbau einer Mess- und Regeleinheit für den Nebelkammerreaktor beschrieben werden. In Vorversuchen wurden faseroptische Sauerstoff- und pH-Sensoren mit elektrochemischen Sensoren auf ihre Einsetzbarkeit im Nebelkammerreaktor evaluiert. Herkömmliche Sensoren für Bioreaktoren sind auf den Betrieb in flüssigen Medien ausgelegt. Bei dem Nebelkammerreaktor stellt sich die Herausforderung, dass das Aerosol eine Mischung aus Flüssig- und Gasphase darstellt und somit besondere Anforderungen an Sensoren stellt. Als besser geeignet haben sich faseroptische Sensoren erwiesen, da sie in flüssiger Phase sowie im Aerosol verlässliche Daten lieferten und durch ihre kompakte Bauweise den Vorteil einer großen Flexibilität besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die faseroptischen Sensorsysteme *Oxy-4-mini* (Kapitel 8.2.2.1) und *pH-1-mini* (Kapitel 8.2.2.2) der Firma PreSens GmbH (Regensburg) verwendet. Als weitere Größen mussten die Temperatur und die Aerosoldichte im Nebelkammerreaktor aufgezeichnet werden können. Ziel der Arbeiten war es die Daten der Sensoren in einer zentralen datenverarbeitenden Einheit zusammenzuführen, auszuwerten und für eventuelle Regulierungen bereitzustellen. Zu Beginn der experimentellen Arbeiten dieser Arbeit stand für die Pulsung der Zerstäubung ein externer Pulsgeber (Kapitel 4.4.4) bereit. Die Aufgabe der Pulsung sollte im Laufe der experimentellen Arbeiten von der zentralen Mess- und Regeleinheit übernommen werden können. Im Folgenden werden der in dieser Arbeit verwendete Datenlogger, der Sensor zur Messung der Aerosoldichte und die speziell angefertigten Sonden zum Einsatz der faseroptischen Sensoren im Nebelkammerreaktor näher vorgestellt.

### 4.4.1 Data Acquisition System

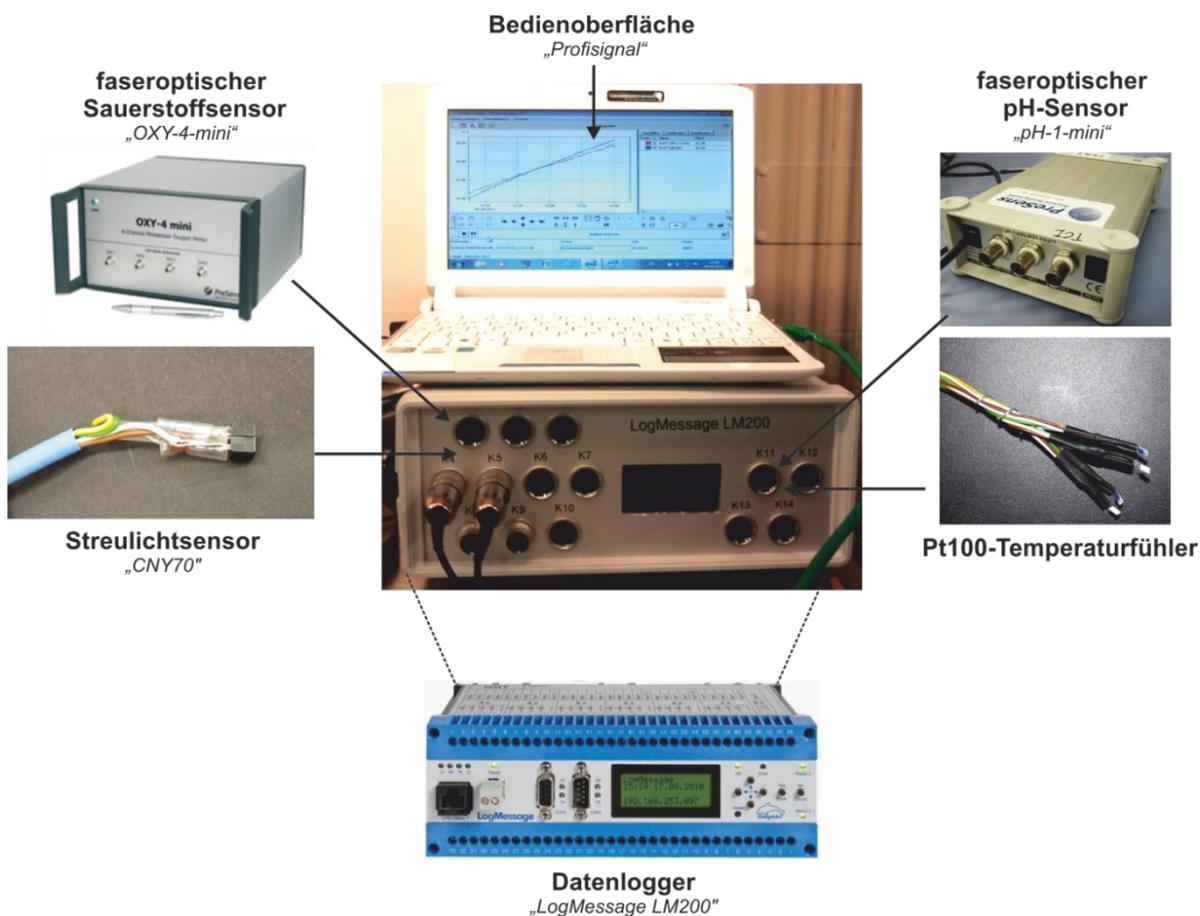


Abbildung 4.10: Aufbau der Mess- und Regeleinheit. Als zentraler Datenlogger diente die *LogMessage LM200* der Firma Delphin. Durch diverse analoge und digitale Eingänge konnten z.B. die faseroptischen Sensoren zur Sauerstoff- und pH-Wert-Messung, der Aerosoldichtesensor und verschiedene Pt100-Temperaturfühler mit dem Datenlogger verbunden, die Daten ausgelesen und mit der Software *Profisignal* grafisch dargestellt, ausgewertet und exportiert werden. Die analogen und digitalen Ausgänge des Datenloggers bieten zudem die Möglichkeit der Steuerung externer Geräte

Für die Datenerfassung, -überwachung und -regelung wurde das Data Acquisition System (DAQ) *LogMessage LM200* der Firma *Delphin* verwendet (Abbildung 4.10). Das System arbeitet durch einen internen Datenspeicher autark und ist modular aus einer Recheneinheit, einem analogen ADT Modul mit 10 Eingängen und 1 Ausgang und einem digitalen DIOT Modul mit 12 Eingängen und 16 Ausgängen aufgebaut. Als weitere Anschlussmöglichkeiten sind zwei serielle Schnittstellen vorhanden. Die *LogMessage* bietet somit Anschlussmöglichkeiten für die unten vorgestellten Sensorsysteme. Es können alle wichtigen Prozessparameter erfasst, ausgewertet und ggf. reguliert werden. Das Auslesen und Programmieren der *LogMessage* erfolgt dezentral über Ethernet. Als Bedienoberfläche dient die mitgelieferte Software *„Profisignal“*, die es ebenfalls erlaubt die Messdaten zu exportieren. Die interne Recheneinheit ermöglicht neben der Erfassung der Daten die Umrechnung der Messsignale in die gewünschten physikalischen Größen durch bereits vorhandene oder vom Nutzer hinterlegte Formeln. Zudem können

Bedingungen für z.B. das Ein- und Ausschalten bestimmter Kanäle und/oder Geräte definiert werden. So könnte z.B. die Pulsung des Ultraschallzerstäubers in Abhängigkeit von der Nebeldichte gesteuert und der in dieser Arbeit verwendete Pulsgenerator ersetzt werden. Dieses konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit noch nicht verlässlich realisiert werden, weshalb zur Pulsenergieerzeugung ausschließlich der weiter unten beschriebene Universal-Impulsgenerator *UPG 100* der Firma ELV verwendet wurde.

Zum Schutz der Elektronik wurde in der Werkstatt des TCI ein Gehäuse nach der internationalen Schutzart IP 67 gefertigt. Es besitzt ein Sichtfenster zum Ablesen des Displays und DIN genormte Rundstecker-Anschlüsse, welche je nach Bedarf mit den digitalen und analogen Anschlüssen der *LogMessage* verbunden werden können.

#### 4.4.2 Adaptierter Streulichtsensor zur Bestimmung der Aerosoldichte

Die Bestimmung der Aerosoldichte, die eine Aussage über die Aerosolmenge ermöglichen soll, ist theoretisch über zwei optische Methoden möglich. Zum einen kann eine Art Lichtschranke verwendet werden, bei der auf einer Seite des Reaktors eine Lichtquelle, z.B. ein Laser, installiert wird und auf der gegenüberliegenden Seite ein Photo-Detektor (Transmissionslichtmessung). Dabei waren zwei Anordnungen denkbar: 1. Ein starker Laser wird in Reaktorbodennähe platziert und die Abnahme der Lichtintensität durch Streuung an den Tröpfchen detektiert. Die Abnahme der Intensität würde auf eine höhere Anzahl Tröpfchen schließen lassen und umgekehrt. 2. Ein schwächerer Laser wird in dem Abstand zum Reaktorboden angebracht werden unter die die Obergrenze des Aerosols nicht sinken soll. Ist genügend Aerosol zwischen Lichtquelle und Photodetektor vorhanden, kann das Licht durch die Streuung an den Tröpfchen nicht zu dem Detektor gelangen. Sinkt das Aerosol unter diese Grenze könnte das Licht zu dem Detektor durchdringen und ein Signal an ein Gerät zur Datenerfassung, z.B. den *LogMessage* Datenlogger, liefern. Im Falle des *LogMessage* Datenloggers könnte, durch eine entsprechende Programmierung, als Folge der Ultraschallzerstäuber eingeschaltet werden. Dieses würde eine Optimierung und eine automatisierte Steuerung der Zerstäubung ermöglichen.

Die zweite Methode ist die Nutzung des Streulichts zur Bestimmung der Nebeldichte. Hierzu werden ein Licht-Emitter und ein Photo-Detektor benötigt. Das Prinzip beruht auf der Detektion des durch Streuung an den Tröpfchen zurückgeworfenen Lichts in einem Photo-Detektor, welcher das einfallende Licht in Strom umwandelt. Je mehr Aerosol im Messbereich vorhanden ist, desto stärker wird das Licht gestreut, wodurch eine größere Menge auf den Detektor trifft. Emitter und Detektor können je nach Methode im Gegensatz zu der Lichtschranken-Methode eine sehr geringe räumliche Trennung aufweisen und können in einem Bauteil verbaut sein. Vorversuche haben ergeben, dass die Streuung aufgrund der hohen Anzahl von Tröpfchen für handelsübliche kompakte Laser zu stark ist und das Licht nicht durch das Aerosol hindurchdringt. Daher sollte für die

Experimente dieser Arbeit ein Streulicht-Sensor verwendet werden. Als weiterer Vorteil gegenüber der Durchlicht-Methode ist die geringere Anzahl von Bauteilen und Fehlerquellen zu betrachten. Für die einfachere Auswertung der Messsignale ist von Vorteil, wenn das Sensorsignal gegenüber der Partikeldichte, hier Aerosoltröpfchen, ein lineares Verhalten aufweist. Nach Abbildung 4.11 ist dieses bei der 180°-Streulichtmessung über den größten Bereich der Fall. Im Gegensatz hierzu ist bei der Transmissionslichtmessung, wie weiter oben beschrieben, der Bereich mit linearem Verhalten deutlich geringer.

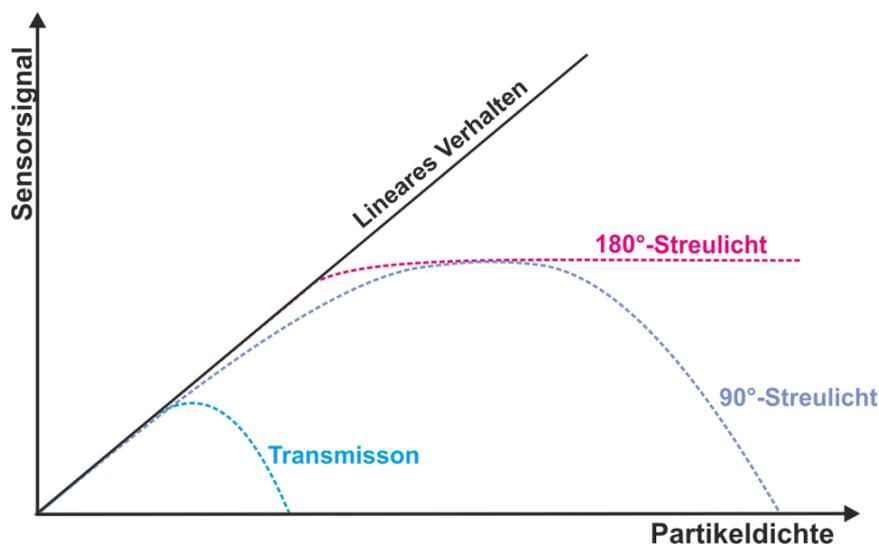


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung des Verhaltens des Sensorsignals in Abhängigkeit von der Partikeldichte einer Suspension bei verschiedenen Messmethoden

Daher wurde für die experimentellen Arbeiten der CNY70 Reflektionslicht-Sensor der Firma Vishay als *Aerosoldichtesensor* verwendet. Der Sensor besteht aus einem Emitter (Wellenlänge = 950 nm) und einem Phototransistor als Detektor (Abbildung 4.12). Die Arbeitsentfernung wird mit 0 bis 5 mm angegeben und die Streulichtdetektion erfolgt in einem Winkel von nahezu 180°. Die Signalausgabe erfolgt in Ampere, welches durch das Vorschalten definierter Widerstände in eine Spannung umgewandelt und somit von der *LogMessage* erfasst werden konnte. Durch ein integriertes Tageslicht-Blockier-System werden Störungen durch Umgebungslicht vermindert.

Um ein stabiles Signal zu erhalten ist es notwendig den Sensor fest auf dem Glasmantel des Reaktors zu fixieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Halterung konstruiert, bei der der Sensor in einer Aluminiumschiene fixiert wird, welche mit Hilfe von zwei Saugnäpfen an jeder beliebigen Stelle des Reaktormantels für einige Stunden befestigt werden kann. Für längerfristige Messungen ist die Befestigungsmethode bedingt geeignet und bietet Verbesserungspotential.

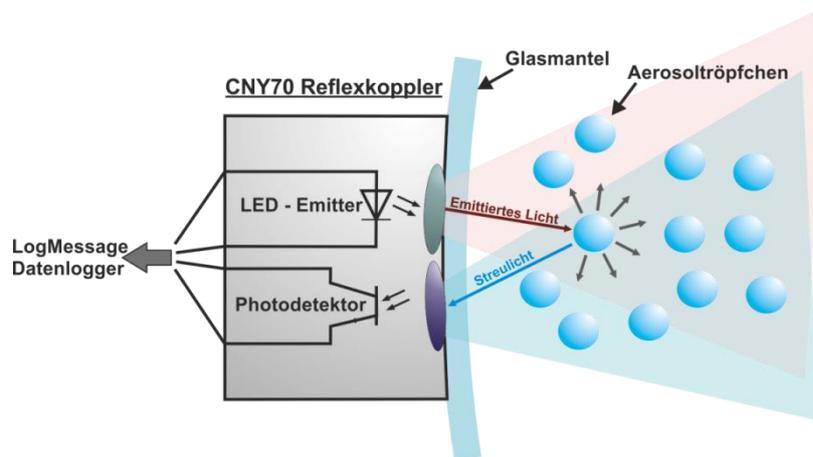


Abbildung 4.12: Schematischer Aufbau und Funktionsweise des *CNY70*-Reflexkopplers. Über einen LED-Emitter wird Licht im IR-Bereich durch den Glasmantel in den Reaktor gesendet. Trifft dieses auf Aerosoltröpfchen, wird es dort gestreut und fällt bei passendem Winkel zurück auf den Photodetektor. Hier wird das Licht abhängig von der Intensität in Strom umgewandelt, der über den Datenlogger aufgezeichnet werden konnte.

#### 4.4.3 Sonden für den Einsatz faseroptischer Sensoren im Nebelkammerreaktor

Der Vorteil faseroptischer Sensoren liegt in der geringen Größe des eigentlichen Sensors (Abbildung 4.13). Diese so genannten Sensorspots können auf einer Seite von durchsichtigen Materialien befestigt werden und von der anderen Seite mittels eines Lichtleiters ausgelesen werden. Für den Einsatz im Nebelkammerreaktor ist diese flexible Einsetzbarkeit von Vorteil, da je nach Einsatzgebiet an verschiedenen Stellen des Reaktors gemessen werden muss.

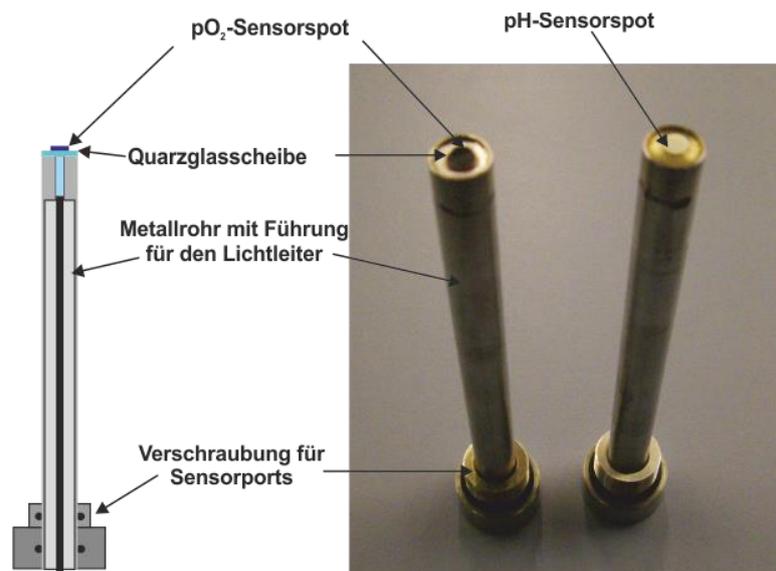


Abbildung 4.13: Aufbau der speziell angefertigten Sonden für den Einsatz faseroptischer Sensoren im Nebelkammerreaktor

Für den Einsatz in dieser Arbeit wurden spezielle Sonden angefertigt. Sie bestehen aus einem Rohr aus Edelstahl, das an einem Ende eine große Bohrung ( $D = 1 \text{ cm}$ ) und an anderen eine schmale Öffnung mit dem genauen Durchmesser der Lichtleiterkabel ( $D \approx 2 \text{ mm}$ ) aufweist. Das Ende mit der schmalen Öffnung besitzt eine ca. 1 mm tiefe Aussparung in die eine Quarzglasscheibe eingeklebt wurde, auf die die Sensorpatches geklebt werden konnten. Durch die schmale Öffnung konnten die Lichtleiter direkt vor der Scheibe fixiert werden und so die Sensorpatches auslesen. Die Sonden konnten in jeden Port des Reaktordeckels geschraubt werden und waren durch integrierte O-Ringe in der Höhe verstellbar.

#### 4.4.4 Pulsgenerator

Für eine gepulste Zerstäubung zu ermöglichen bieten die Steuerungen der US-Zerstäuber *AW-Typ I* und *AW-Typ II* einen analogen Eingang (BNC), worüber ein externes Ein- und Ausschalten des US-Zerstäubers möglich ist. Zur Steuerung der Pulsung wurde der Universal-Impulsgenerator *UPG 100* der Firma *ELV* verwendet. Dieser erzeugt genau definierbare Taktimpulse mit einstellbaren Puls- und Pausenzeiten. Über einen Ausgang mit einstellbarem Spannungspegel wird der Pulsgeber mit der Steuerung verbunden und durch Anlegen einer 5 V - Spannung geregelt. Die Pulsausgabe kann über eine definierte Zahl von Pulsen oder einen kontinuierlichen Betrieb erfolgen.



Abbildung 4.14: Universal-Impulsgenerator UPG 100 der Firma ELV

## 4.5 Charakterisierung von Ultraschallzerstäubern

Der Einsatz eines Nebelkammerreaktors für die Kultivierung von Säugerzellen und Mikroorganismen ist komplett neu und stellt besondere Anforderungen an die Eigenschaften der eingesetzten US-Zerstäuber. Während in der Pflanzenzucht (*hairy root*-Kulturen) einfache Nährmedien eingesetzt werden und die Kulturen relativ unempfindlich auf mögliche Konzentrationsänderungen reagieren (Kapitel 3.6), können bei tierischen Zellen und Mikroorganismen bereits geringe Änderungen der Nährstoffzusammensetzungen zu Wachstumshemmungen oder Absterben führen. Da es sich um eine neuartige Form der Anwendung von US-Zerstäubern handelt, ist es notwendig ein grundlegendes Verständnis für die Zusammenhänge zwischen den physikalischen Eigenschaften, wie z.B. Frequenz, Leistung und Tröpfchengröße, eines US-Zerstäubers und den resultierenden Einflüssen auf Nährmedien zu erlangen. Hierzu ist eine Charakterisierung der US-Zerstäuber notwendig, die praktischen Arbeiten hierzu werden in den folgenden Kapiteln für verschiedene US-Zerstäuber beschrieben und dienen als Grundlage für ein tieferes Verständnis und eine Optimierung des Nebelkammerreaktor-Systems.

Zur Realisierung dieser Anforderung wurden die technischen Daten, Schwingfrequenz der Piezokeramik, Spannungs- und Stromschwingung, Wirkleistung, Wirkungsgrad, Zerstäubungsleistung und Tröpfchengröße anhand verschiedener Experimente für die oben vorgestellten US-Zerstäuber (Kapitel 4.3) ermittelt. Im Verlauf der praktischen Arbeiten zeigte sich, dass diese Parameter große Auswirkungen auf den Einfluss des Ultraschalls auf Bestandteile von Nährmedien (Kapitel 4.6), aber z.B. auch auf den Sauerstoffeintrag (Kapitel 4.5.2) haben. Ein genaues Verständnis der technischen und elektrischen Eigenschaften und der Unterschiede zwischen den US-Zerstäubern zu erhalten war essentiell, um Ansatzpunkte für Optimierungen des Nebelkammerreaktors zu erhalten.

### 4.5.1 Tröpfchengröße der Aerosole

Ein Qualitätsmerkmal von Ultraschallzerstäubern ist eine geringe Varianz der Tröpfchengröße, da sie u.a. ein Indiz für eine ausgewogene Anregung der Piezokeramik ist. Weiterhin ist es für viele Anwendungen (z.B. eine gleichmäßige Beschichtung von Oberflächen, Dosierung von Medikamenten) von Bedeutung, eine möglichst konstante Tröpfchengröße und geringe Abweichungen des mittleren Durchmessers zu erhalten [81]. Bei der Beurteilung der Tröpfchengrößen sind der mittlere Tröpfchendurchmesser und die Tröpfchengrößenverteilung entscheidende Faktoren. Für die spezielle Anwendung im Nebelkammerreaktor sollte ein möglichst langlebiges Aerosol mit einer geringen Sedimentationsrate der Tröpfchen erzeugt werden, welches auch z.B. bei kurzzeitigem Abschalten des Zerstäubers lange bestehen bleibt und somit in dem Reaktor platzierte Zellproben oder Mikroorganismen kontinuierlich mit Nährmedium versorgt. Grundsätzlich

gilt die Regel, dass je kleiner die Tröpfchen sind, desto länger können sie der Gravitation entgegenwirken und in einem Schwebestand verweilen. Ab einem Durchmesser von  $<0,5 \mu\text{m}$  sind die Tröpfchen kaum noch abhängig von der Gravitation und die Sedimentationsrate geht gegen Null. Kleine Tröpfchen bieten zusätzlich den Vorteil, dass sie gegenüber größeren Tröpfchen eine geringere Geschwindigkeit aufweisen [90]. Wenn z.B. ein mit Zellen besiedeltes Trägermaterial in dem Aerosol platziert wird, soll vermieden werden, dass die Zellen durch große und/oder Tröpfchen mit hoher kinetischer Energie von dem Trägermaterial abgewaschen oder beschädigt werden.

#### 4.5.1.1 Bestimmung der Tröpfchengrößen mittels ISM

Der Mechanismus der Tröpfchenbildung ist noch nicht komplett entschlüsselt (Kapitel 3.5.2.4), daher ist es bisher nicht gelungen eine Formel zur exakten Vorhersage der Tröpfchengröße aufzustellen. Wie in Kapitel 3.5.2.4 beschrieben, wird in der Literatur häufig Formel 13 angewendet um eine ungefähre Vorhersage über den mittleren Tröpfchendurchmesser zu treffen. Bei der Zerstäubung von Flüssigkeiten mittels Ultraschall entstehen immer Tröpfchen unterschiedlicher Größen. Über die Verteilung der Tröpfchengrößen können anhand Formel 13 keine Auskünfte erhalten werden:

$$D = C \left( \frac{8\pi\gamma}{\rho f^2} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (13)$$

Als empirischer Korrekturfaktor  $C$  wurde in dieser Arbeit zur Berechnung der theoretischen Werte der regelmäßig in der Literatur verwendete Wert 0,34 verwendet.

Da die mittlere Tröpfchengröße, aber auch die Verteilung der Tröpfchengrößen ein wichtiger Faktor für eine Beurteilung der US-Zerstäuber sind, wurden diese experimentell mit einem am Institut für Technische Chemie entwickelten *in-situ*-Mikroskops (ISM) Typ III-XTF (Abbildung 4.15) bestimmt.

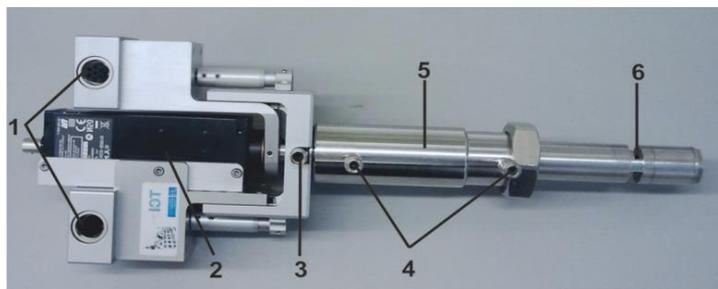


Abbildung 4.15: In-situ Mikroskop Typ III-XTF, 1) Anschlüsse für Controller, 2) CCD-Kamera, 3) LED Stromversorgung, 4) Anschlüsse für Heißdampf, 5) Mikroskopbody, 6) Durchfluss-Messzone

Hierbei handelt es sich um ein modular aufgebautes Durchlicht-Hellfeld-*in-situ*-Mikroskop (DH-ISM), mit dem Aufnahmen von z.B. in Flüssigkeiten suspendierten Partikeln (oder Zellen) gemacht werden können, während sie durch die Messzone strömen. Abhängig von der Partikelgröße können Objektive mit unterschiedlichen Vergrößerungen eingesetzt

werden. Im Strahlengang ist eine CCD-Kamera platziert, auf welche das reelle Zwischenbild projiziert wird. Am unteren Ende des Mikroskops befindet sich die Durchfluss-Messzone, welche durch zwei Saphirglasscheiben begrenzt wird.

Das ISM ist mit einer EDV Einheit verbunden und kann über die Software „Insitu Control“ gesteuert und Bilder aufgenommen werden. Eine genauere Beschreibung aller Funktionen des ISM und der Software wird durch Lindner (2006) [117] und Bluma (2009) [118] geliefert.

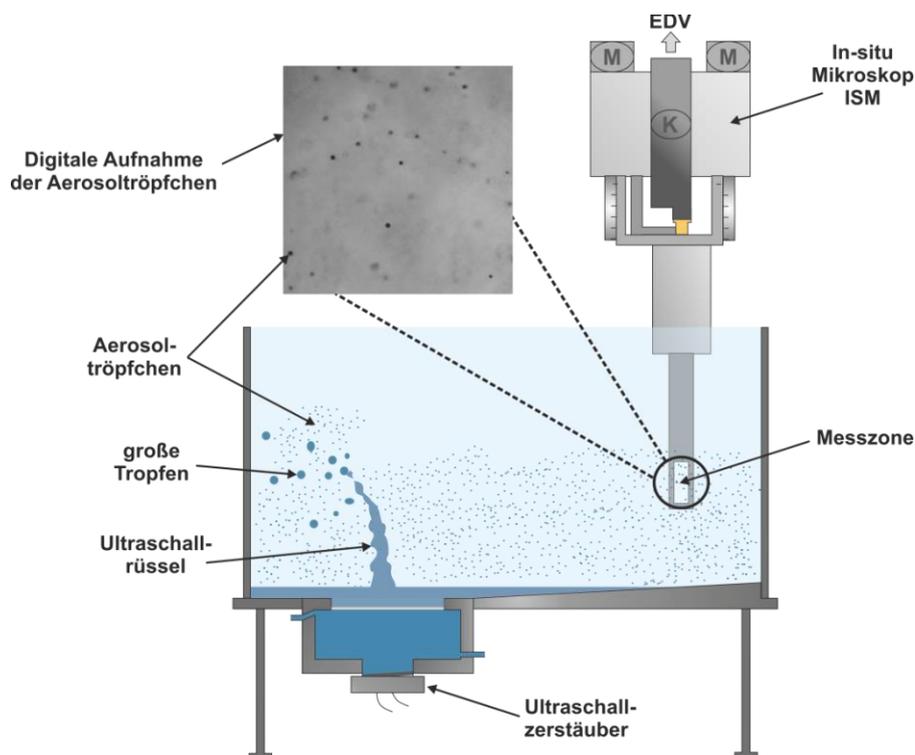


Abbildung 4.16: Messaufbau für die Bestimmung der Tröpfchengröße mittels ISM

Zur Bestimmung der Tröpfchengröße der US-Zerstäuber *AW-Typ I*, *AW-Typ II*, *TDK NB80*, *CH12V*, *CH24V* und *LHZ1-Zerstäuber* wurde das In-situ-Mikroskop Typ III XTF mit einer Sony XCD SX910 Kamera verwendet. Um auswertbare Bilder zu erhalten ist für den Größenbereich der Tröpfchen (1 - 50  $\mu\text{m}$ ) ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung notwendig. Der zu testende US-Zerstäuber wurde jeweils an dem *NKR-Typ I* (Kapitel 4.2.2) befestigt und dieser mit 150 ml deionisiertem Wasser befüllt. Das ISM wurde so positioniert, dass die Messzone komplett in das entstehende Aerosol eintaucht und sie somit möglichst viele Tröpfchen passieren. Es wurde zudem darauf geachtet, dass keine großen Tropfen  $>100 \mu\text{m}$  in die Messzone gelangen, da diese in späteren Kultivierungen durch den Spritzschutz aufgehalten würden und somit kein repräsentatives Tröpfchenspektrum abgebildet würde (Abbildung 4.16). Die Bilder wurden mit Hilfe der Software „Insitu Control“ aufgenommen und abgespeichert. Zur Auswertung wurden die aufgenommenen Tröpfchen mit Hilfe der Software „ImageJ“ über die Anzahl an Bildpixeln ausgemessen. Die Kantenlänge eines Bildpixels beträgt bei einer 10-fachen Vergrößerung

bei der verwendeten Kamera  $0,37 \mu\text{m}$  [118]. Es wurde für jeden US-Zerstäuber eine repräsentative Menge von mindestens 150 Tröpfchen ausgezählt. Aus den erhaltenen Daten wurde der mittlere Tröpfchendurchmesser berechnet und eine histologische Tröpfchengrößenverteilung erstellt.

Als ergänzende Experimente wurden bei dem US-Zerstäuber *AW-Typ I* stellvertretend für alle submersen Zerstäuber zwei weitere Messungen durchgeführt. Zum einen wurde der Abstand der Messzone des ISM zum Reaktorboden verringert und zum anderen bei verminderter Leistung des US-Zerstäubers gemessen und so die möglichen Unterschiede der Tröpfchengrößen bestimmt.

Wie Abbildung 4.17 zeigt, sind alle detektierten Tröpfchen rund und können als Kugel betrachtet werden. Aufgrund des geringen Durchmessers ist der Einfluss der Gravitation sehr gering, sodass keine Verzerrung der Tröpfchen auftritt und sich die thermodynamisch bevorzugte Kugelform ausbildet.

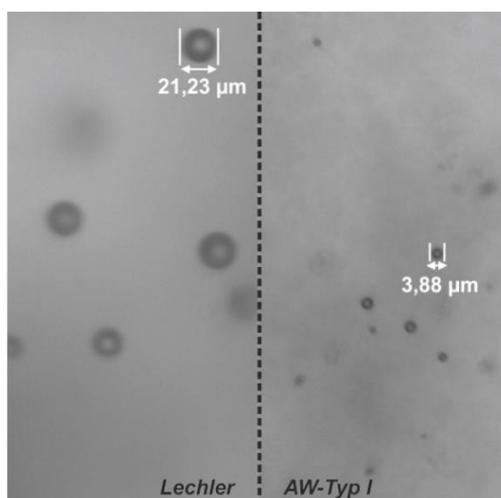


Abbildung 4.17: Beispielhafte Gegenüberstellung der mittels ISM aufgenommenen Tröpfchen der US-Zerstäuber *LHZ1* (links) und *AW-Typ I* (rechts)

Die empirisch erhaltenen mittleren Tröpfchendurchmesser, sowie die durch Formel 13 berechneten theoretischen Werte, sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Aus Formel 13 geht hervor, dass mit steigender Arbeitsfrequenz des Zerstäubers der Tröpfchendurchmesser sinkt. Dies zeigt sich eindeutig beim Vergleich der Frequenzen ( $f$ ) und mittleren Tröpfchengrößen ( $D$ ) der Zerstäuber:

*LHZ1-Zerstäuber* ( $f = 100 \text{ kHz}$  /  $D = 19,25 \mu\text{m}$ ) (Abbildung 4.17 links),  
*AW-Typ II* ( $f = 1,694 \text{ MHz}$  /  $D = 4,73 \mu\text{m}$ ) (Abbildung 4.17 rechts) und  
*TDK-NB80* ( $f = 2,475 \text{ MHz}$  /  $D = 3,2 \mu\text{m}$ ).

Tabelle 4.1: Experimentell bestimmte und berechnete mittlere Tröpfchengrößen verschiedener US-Zerstäuber

mittlere Tröpfchengröße	<i>AW-Typ I</i>	<i>AW-Typ II</i>	<i>TDK-NB80</i>	<i>CH12V</i>	<i>CH24V</i>	<i>LHZ1</i>
gemessen	3,73 $\mu\text{m}$	4,73 $\mu\text{m}$	3,2 $\mu\text{m}$	3,57 $\mu\text{m}$	5,01 $\mu\text{m}$	20,92 $\mu\text{m}$
berechnet	2,92 $\mu\text{m}$	2,92 $\mu\text{m}$	2,27 $\mu\text{m}$	2,28 $\mu\text{m}$	2,85 $\mu\text{m}$	19,25 $\mu\text{m}$

Auffällig ist der Unterschied zwischen den US-Zerstäubern *AW-Typ I* und *AW-Typ II*. Obwohl beide Zerstäuber bei quasi der gleichen Frequenz 1,690 MHz bzw. 1,695 MHz arbeiten, unterscheiden sich die mittleren Tröpfchendurchmesser deutlich mit 3,73  $\mu\text{m}$  bzw. 4,73  $\mu\text{m}$ . Zur Erklärung muss das Tröpfchengrößenspektrum beider US-Zerstäuber betrachtet werden (Abbildung 4.18). Es wird deutlich, dass der *AW-Typ I* eine deutlich geringere Varianz der Tröpfchengrößen als der *AW-Typ II* aufweist. Circa 50% der Tröpfchen besitzen einen Durchmesser von 3 – 4,5  $\mu\text{m}$  und die maximale Größe liegt bei 6,49  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz hierzu ist bei dem Modell *AW-Typ II* zwar ein Maximum zwischen 3 – 3,49  $\mu\text{m}$  zu erkennen, allerdings erstreckt sich das Spektrum bis zu einem Durchmesser von 11,99  $\mu\text{m}$ . Da der *TDK-NB80* mit einer höheren Frequenz arbeitet ist das Tröpfchenspektrum zu kleineren Durchmessern verschoben, wobei über 70 % der Tröpfchen einen Durchmesser zwischen 2  $\mu\text{m}$  und 4  $\mu\text{m}$  aufweisen.

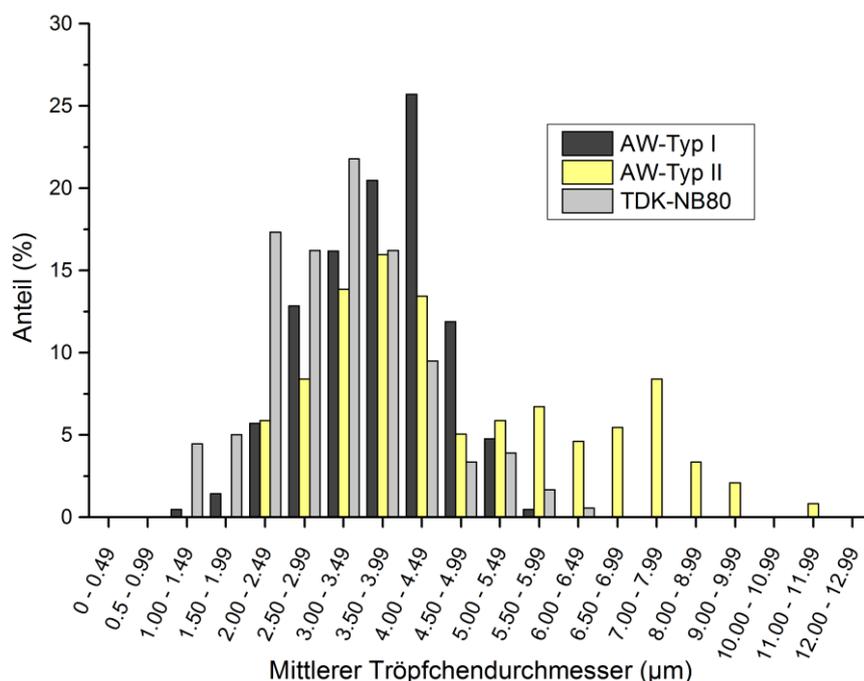


Abbildung 4.18: Tröpfchengrößenspektrum der US-Zerstäuber *AW-Typ I*, *AW-Typ II* und *TDK-NB80*. Aufgetragen ist der mittlere Tröpfchendurchmesser (in definierten Bereichen zusammengefasst) gegen den Gesamtanteil in % aller Tröpfchen des jeweiligen US-Zerstäubers (Die Tröpfchengrößenspektren der weiteren US-Zerstäuber finden sich in den Kapiteln 8.1.1 +8.1.2)

Nach Formel 13 ist der Tröpfchendurchmesser nicht abhängig von der Amplitude der Anregungsschwingung und somit von der eingestellten Leistung des US-Zerstäubers. Dieses konnte ebenfalls experimentell bestätigt werden, da keine signifikanten Unterschiede der Tröpfchendurchmesser bei voller und 70 %iger Leistung lagen (siehe Grafik in Kapitel 8.1.3).

Aufgrund der höheren Sedimentationsgeschwindigkeit von großen Tröpfchen konnte erwartet werden, dass im senkrechten Querschnitt durch das Aerosol die Tröpfchen Richtung Reaktorboden im Durchschnitt größer werden. Diese Erwartung wurde durch Messungen bei unterschiedlichen Abständen des ISM zum Reaktorboden bestätigt. So wurden in Reaktorbodennähe deutlich mehr Tröpfchen mit einem großen Durchmesser detektiert.

#### 4.5.2 Bestimmung physikalischer Größen

Die Bestimmung der elektrischen Größen, die von der Ansteuerungselektronik an die Piezokeramik geliefert werden, sollte Aufschlüsse über die komplexe Beziehung zwischen der Ultraschallfrequenz, der Ultraschallintensität, der Zerstäubungsleistung und der Auswirkung dieser Faktoren auf Biomoleküle in Nährmedien liefern. Abbildung 4.19 zeigt schematisch den Zusammenhang der physikalischen Größen und die Abfolge der hierzu durchgeführten Experimente.

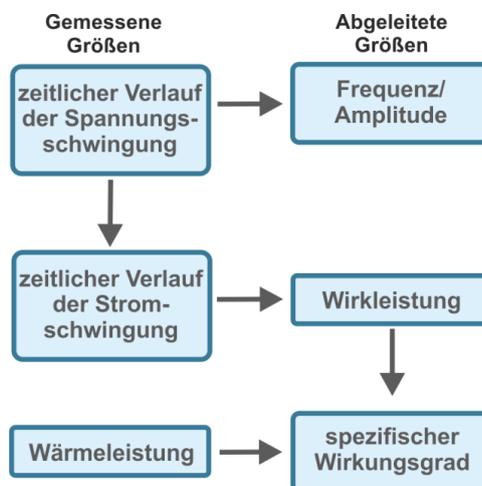


Abbildung 4.19: Schematische Darstellung der Reihenfolge und Abhängigkeiten der in diesem Kapitel bestimmten und berechneten physikalischen Größen der US-Zerstäuber

Durch Aufzeichnen der Spannungsschwingung gegen die Zeit lassen sich direkt Frequenz und Amplitude des Ultraschalls bestimmen. Zusätzlich ist die Kenntnis der Wirkleistung und hiermit verbunden die des Wirkungsgrads eine weitere wichtige Voraussetzung zur Evaluierung eines Ultraschallzerstäubers. Die Wirkleistung der Piezokeramiken kann durch hinzuziehen des experimentell ermittelten zeitlichen Spannungsverlaufs berechnet werden. Wirkleistung ist die Leistung, die von dem Verbraucher (hier der Piezokeramik) tatsächlich umgesetzt wird. Sie ist die Summe aus der Scheinleistung (Abbildung 4.20

grün) und der Blindleistung. Die Scheinleistung  $S$  ist das Produkt aus den Effektivwerten von Strom  $I$  (blau) und Spannung  $U$  (rot) und stellt die gesamte Leistung, die einem Verbraucher zugeführt wird  $S = U \cdot I$  (Abbildung 4.20) Summe der Beträge der mit + und – gekennzeichneten Bereiche), dar. Dabei wird nicht berücksichtigt, dass häufig Leistung zurück zum Erzeuger (Netzteil) fließt und somit keine Arbeit leistet. Die Höhe dieser Leistung ist abhängig von dem Geräte- und Schaltungsaufbau und wird als Blindleistung  $Q$  (mit – gekennzeichnete Bereiche) bezeichnet. Durch abziehen des Betrags der Blindleistung von dem Betrag der Scheinleistung, wird der Wert der Wirkleistung  $W = |S| - |Q|$  erhalten (mit + gekennzeichnete Bereiche) [119].

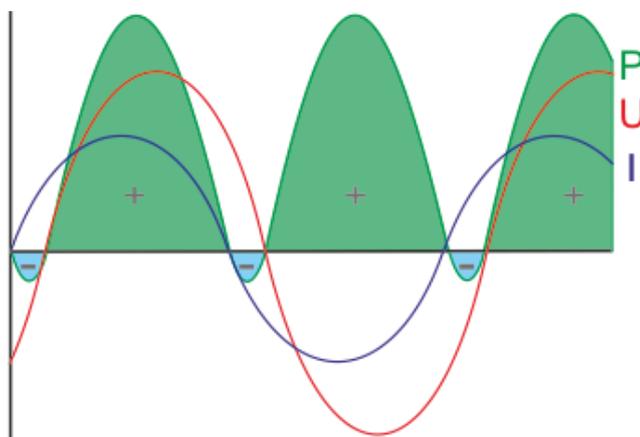


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Schwingung der Spannung  $U$  (rot), des Stroms  $I$  (blau) und der Leistung  $P$  (grün). Die mit einem + markierten grünen Bereiche stellen dabei die Wirkleistung  $WK$ , die mit einem – markierten blauen Bereiche die Blindleistung  $Q$  dar [119].

Zur Vervollständigung der gewonnenen Daten, wurde in einem dritten Teil der Versuchsreihe der Anteil in das Medium eingebrachter thermischer Energie bestimmt. Für die US-Zerstäuber *AW-Typ I* und *AW-Typ II* sowie den *TDK-NB80* konnten zusätzlich die Wärmeleistung und der Wirkungsgrad bestimmt werden, da die Ansteuerungselektronik zugänglich war und von dem Schwingungswandler getrennt vorlag. Für die anderen US-Zerstäuber war dieses aufgrund der verkapselten Verbauung von der Piezokeramik und der Ansteuerungselektronik (Abb. 8 1, 2, 5) nicht möglich.

Grundsätzlich kann durch die Aufnahme des Wärmeanstiegs mit der Zeit der Wirkungsgrad  $\eta$  der Zerstäuber berechnet werden. Eine Bestimmung des reinen Wirkungsgrades der Keramiken ist nur mit großem Aufwand durchführbar, da eine Unterscheidung der thermischen Energie, die durch Verluste an der Keramik und der die durch ultraschallinduzierte Molekülbewegungen in der Flüssigkeit erzeugt wird, schwer möglich ist. Für den Kontext dieser Arbeit war lediglich die Bestimmung des gesamten Temperatureintrags von Interesse, daher wurde der spezifische Wirkungsgrad  $\eta^*$  eingeführt, der das Verhältnis zwischen der Wirkleistung und der Wärmeleistung angibt.

#### 4.5.2.1 Frequenz und Amplitude

Im ersten Teil der Experimentreihe wurden über ein Oszilloskop die Schwingungen der Spannung und des Stroms aufgezeichnet. Die Messköpfe wurden an den Zuleitungen der Elektroden befestigt, sodass der jeweilige US-Zerstäuber uneingeschränkt arbeiten konnte. Dabei konnte die Spannung direkt und der Strom über einen 100 mΩ Widerstand gemessen werden. Die US-Zerstäuber wurden bei maximaler Leistung betrieben und die Schwingung beider Größen gegen die Zeit aufgenommen.

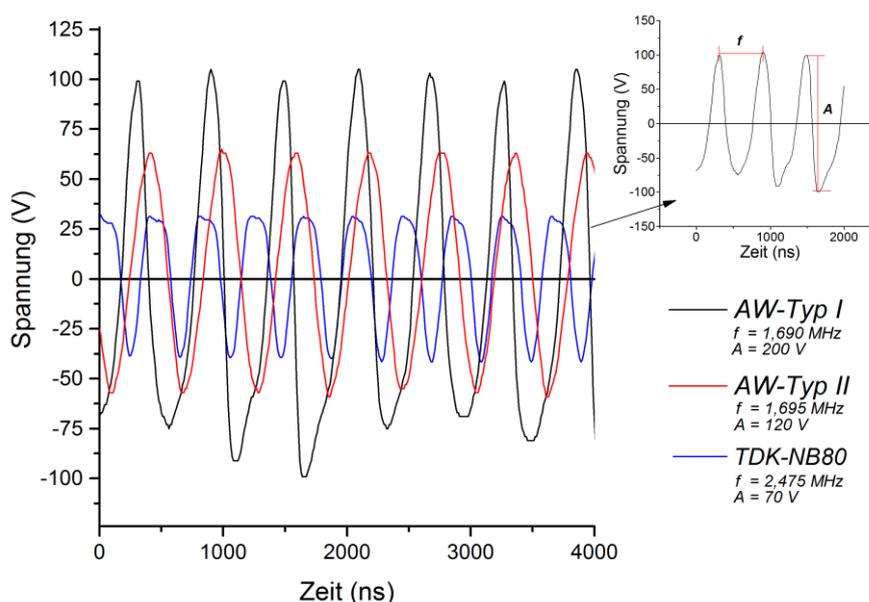


Abbildung 4.21: Auftragung der Spannungsschwingungen der US-Zerstäuber *AW-Typ I* (schwarz), *AW-Typ II* (rot) und *TDK-NB80* (blau) gegen die Zeit. Das eingesetzte Diagramm zeigt einen Ausschnitt der Schwingung des *AW-Typ I* und die Möglichkeiten zur Bestimmung der Größen Frequenz  $f$  und Amplitude  $A$  der Schwingung

In Abbildung 4.21 sind wegen der besseren Übersichtlichkeit lediglich die Spannungsverläufe der US-Zerstäuber *AW-Typ I*, *AW-Typ II* und *TDK-NB80* gegen die Zeit aufgetragen (Weitere Kurven in Kapitel 8.1.4). Diese Art der Auftragung ermöglicht zum einen das Ablesen der (unterschiedlichen) Frequenz (Schwingungen pro Sekunde) (Abbildung 4.21,  $f$ ) der US-Zerstäuber, sowie die Bestimmung der Amplitude der Spannungsschwingung (Peak-to-Peak) (Abbildung 4.21,  $A$ ).

Neben den Eigenschaften (Dicke, Durchmesser, Material) des piezokeramischen Schwingungswandlers (Piezokeramik), wird die Schwingfrequenz der Keramiken primär durch die Spannungsschwingung vorgegeben. Alle getesteten Zerstäuber, mit Ausnahme des *CH12V*, weisen eine nahezu sinusförmige Schwingung auf. Bei dem *CH12V* treten zusätzlich kleinere periodische Unterschwingungen auf (Anhang). Aus den gemessenen Verläufen der Spannung und des Stroms mit der Zeit ließen sich zwei wichtige Größen (Frequenz, Leistung) der Ultraschallzerstäuber bestimmen bzw. berechnen. Die

Schwingfrequenz der Piezokeramik hat direkte Auswirkung auf die Tröpfchengröße (Kapitel 4.4.1), ist aber auch ein Parameter, der die Art und Stärke des Einflusses (Kapitel 4.6.2) des Ultraschalls auf Moleküle bestimmt.

Die Frequenz wird zumeist in Hertz [Hz] angegeben und liefert Auskunft darüber, wie viele Schwingungsperioden pro Sekunde [1/s] auftreten. Bei Betrachten der Abbildung 4.21 fällt auf, dass der *TDK NB80* (blau) eine deutlich höhere Frequenz (2,475 MHz) als der *AW-Typ I* (1,690 MHz) und *AW-Typ II* (1,694 MHz) besitzt. Interessant ist, dass das Modell *AW-Typ II* eine geringfügig höhere Frequenz aufweist, als das Modell *AW-Typ I*. Dieses ist insofern bemerkenswert, als dass in beiden Modellen die gleiche Piezokeramik verbaut ist und davon ausgegangen werden muss, dass sie in beiden Modellen mit exakt derselben Frequenz angesteuert wird. Wird eine Piezokeramik nicht bei ihrer Resonanzfrequenz angesteuert, kann es zu einer ungleichmäßigen Schwingung der Piezokeramik kommen und somit zu einer Beeinflussung der Eigenschaften des produzierten Aerosols. Auffällig sind zudem die deutlich unterschiedlichen Amplituden der Schwingungen (Peak-to-Peak). Sie stiegen von dem *TDK NB80* (ca. 80 V) über den *AW-Typ II* (ca. 130 V) bis zum *AW-Typ I* (ca. 240V) an.

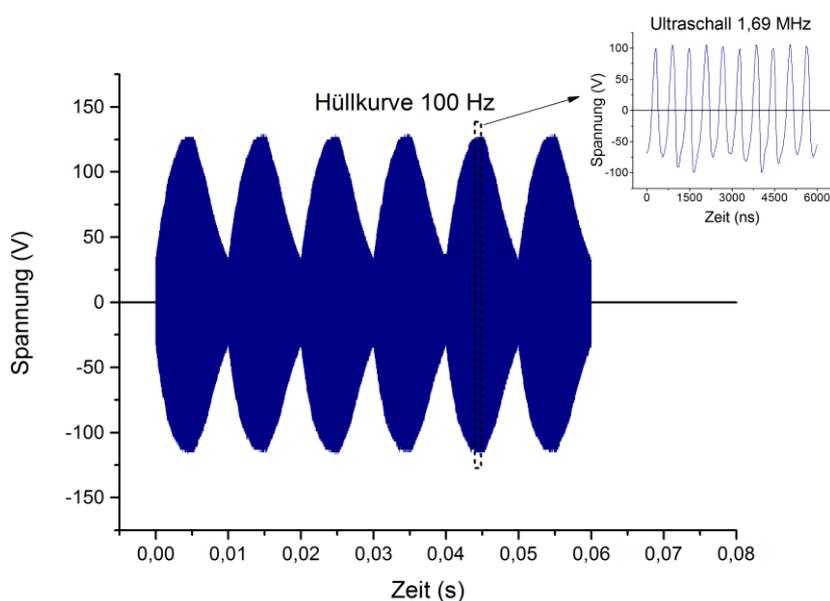


Abbildung 4.22: Darstellung der Hüllkurve der Spannungsschwingung gegen die Zeit des US-Zerstäubers *AW-Typ I*. Das eingesetzte Diagramm zeigt die in die Hüllkurve eingebettete Schwingung im Ultraschallbereich

Die Amplitude der Schwingung im Megahertz-Bereich schwingt wiederum in einer sogenannten Hüllkurve (Abbildung 4.22), deren Frequenz abhängig von dem Aufbau des Schwingkreises ist. Die Hüllkurven der Zerstäuber *AW-Typ I* und *AW-Typ II* weisen eine Frequenz von ca. 100 Hz auf, die des *TDK-NB80* ca. 17 kHz. Die in Abbildung 4.21 dargestellten Kurven wurden bei einem Maximum der Hüllkurve aufgenommen. Anhand der Hüllkurven kann ebenfalls abgelesen werden, dass die Amplituden während eines

Schwingzyklus um den Faktor 4 bis 10 schwanken. Ob die Form der Hüllkurven einen Einfluss auf die Zerstäubungsleistung oder andere Faktoren haben, ist in der Literatur nicht beschrieben und auch die Hersteller von Piezokeramiken konnten hierzu keine Angabe machen. Vielmehr treten die Hüllkurven als Nebeneffekt des Schwingkreises auf und werden wahrscheinlich nicht gezielt produziert. Somit ist die Beurteilung des Einflusses der Hüllkurven schwierig und im Rahmen dieser Arbeit nicht leistbar. Bei den durchgeführten Experimenten und deren Beurteilung wird deshalb lediglich auf die Schwingungen im Ultraschallbereich eingegangen.

#### 4.5.2.2 Wirkleistung

Für die Bestimmung der Wirkleistung wurden zunächst die zu der Piezokeramik fließenden Ströme und Spannungen gemessen. Es wurde darauf geachtet einen möglichst großen und repräsentativen Bereich zu erfassen, da durch die Hüllkurve deutliche Schwankungen des Stroms und der Spannung auftraten. Zusätzlich musste sichergestellt werden, dass das Oszilloskop in dem gewünschten Bereich eine ausreichende Auflösung bietet, um Verfälschungen zu vermeiden. Bei den erhaltenen Datensätzen wurden Strom und Spannung für jeden Messpunkt multipliziert und eine numerische Integration durchgeführt. Die somit erhaltene Wirkleistung ist ein Mittelwert über die Zeit. Es muss jedoch beachtet werden, dass es bedingt durch die Hüllkurve auch hier zu großen Schwankungen der Leistung über die Zeit kommt. Die so erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Aus experimentell bestimmten Daten berechnete Wirkleistungen verschiedener US-Zerstäuber

US-Zerstäuber	<i>AW-Typ I</i>	<i>AW-Typ II</i>	<i>TDK NB80</i>
Wirkleistung [W]	47,63	23,66	19,72

Wie aus Tabelle 4.2 hervorgeht lagen die Wirkleistungen der Zerstäuber *AW-Typ II* (23,66 Watt) und *TDK NB80* (19,72 Watt) relativ dicht zusammen. Auffällig ist die große Abweichung des Zerstäubers *AW-Typ I* (47,63 Watt). Das Ergebnis passt zu den vorherigen, die zeigten, dass bei dem Modell *AW-Typ I* deutlich höhere Amplituden bei der Schwingung der Spannung auftraten. Die Leistungsaufnahme des *AW-Typ I* war somit mehr als doppelt so hoch wie die des *AW-Typ II* und des *TDK-NB80*. Diese Werte alleine sind noch nicht aussagekräftig, da nicht bekannt ist wie viel dieser Leistung in mechanische Energie (Schwingung) und wie viel in thermische Energie (Wärme) umgewandelt werden. Hierzu war die Bestimmung des spezifischen Wirkungsgrades notwendig.

### 4.5.2.3 Spezifischer Wirkungsgrad

Zur Bestimmung des spezifischen Wirkungsgrades  $\eta^*$  wurde als Messgefäß ein Rohr aus einem gering wärmeleitenden Kunststoff angefertigt ( $H \times D = 10 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ ). An einem Ende wurde der US-Zerstäuber befestigt, das andere Ende wurde mit einem Gummipfropfen verschlossen. Dieser enthielt eine Bohrung, durch die ein Temperatursensor geführt werden konnte (Abbildung 4.23).

Das Volumen des Messgefäßes wurde so gewählt, dass die Keramik, genau wie im Reaktor, von einer fünf Zentimeter hohen Flüssigkeitssäule überschichtet werden kann. Zudem wurden von der Flüssigkeitsoberfläche weitere 5 cm Abstand zum Verschluss eingeplant, um ein Zerstäuben mit Aerosolbildung zu ermöglichen und somit die Zerstäubungsbedingungen im Reaktor möglichst gut nachzustellen.

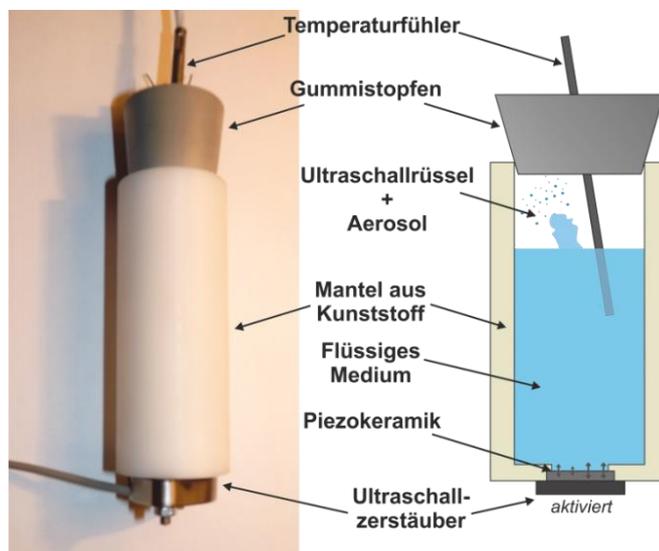


Abbildung 4.23: Messaufbau zur Bestimmung des Wärmeeintrags verschiedener US-Zerstäuber in ein flüssiges Medium

Das Messgefäß wurde mit 34 ml deionisierten Wasser befüllt und der Zerstäuber gestartet. Das Gefäß wurde leicht geschüttelt und der Temperaturanstieg mittels eines Pt100-Temperaturfühlers über einen Zeitraum von 3 min aufgezeichnet. Mit dem bekannten Temperaturanstieg pro Zeit ( $K/s$ ), dem Gewicht des Wassers bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $g$ ) und der spezifischen Wärmekapazität von Wasser  $C = 4,1826 \text{ Ws/Kg}$  (bei  $25^\circ\text{C}$  [120]) konnte die Wärmeleistung ( $W$ ) errechnet werden. Das Verhältnis aus Wärmeleistung und Wirkleistung ergibt den spezifischen Wirkungsgrad  $\eta^*$ , der die Anteile der zugeführten Leistung in Schwingungs- und Wärmeenergie angibt.

Um aussagekräftige Werte zu erhalten war es notwendig den Wärmeverlust des gewählten Messaufbaus zu bestimmen und diesen mit den Messwerten für die US-Zerstäuber zu verrechnen. Der Wärmeverlust des Messaufbaus wurde ermittelt, indem ein dünner Kupferdraht zu einer Spule gewickelt wurde (Abbildung 4.24). Da der innere Widerstand

des Drahtes bekannt ist, kann über die Spannung eine definierte Heizleistung eingestellt werden und über das Verhältnis von theoretischem Wert und Ist-Wert der Verlust durch den Messaufbau berechnet werden. Die Länge und Dicke des Drahtes wurde so gewählt, dass die Wärmeleistung im Bereich der Zerstäuber (ca. 5 W) liegt.

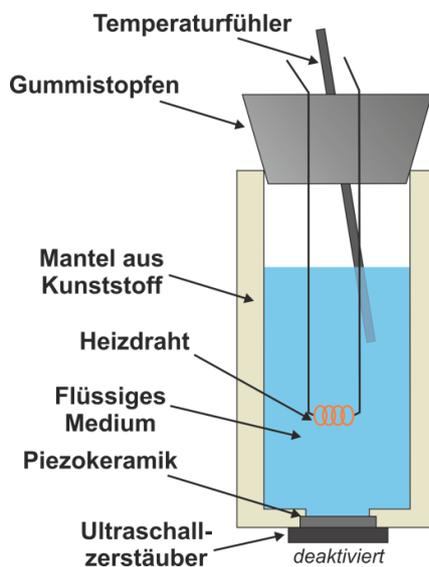


Abbildung 4.24: Modifizierter Messaufbau aus Abbildung 4.23 zur Bestimmung des Fehlers des Messaufbaus

Zur Bestimmung des Verlustes durch den Messaufbau wurde der Temperaturanstieg über die Zeit aufgenommen. Über die Wärmekapazität des Wassers wurde für die angelegte Leistung (4,97 W) der theoretische (verlustfreie) Temperaturanstieg berechnet, mit dem experimentell bestimmten in Verhältnis gesetzt und somit der Fehler der Apparatur bestimmt. Dieser lag bei 2,28 % und wurde zu den Ergebnissen für die Zerstäuber hinzugerechnet. Es wurde im Weiteren angenommen, dass der Fehler über die kurzen Messzeiträume und relativ geringen Temperaturanstiege konstant war.

Mittels der oben beschriebenen Methode wurde für die Zerstäuber *AW-Typ I*, *AW-Typ II* und *TDK-NB80* die Wärmeleistung bestimmt und anhand Formel 14 der spezifische Wirkungsgrad berechnet:

$$\eta^* = \frac{(\text{Wirkleistung} - \text{Wärmeleistung})}{\text{Wirkleistung}}. \quad (14)$$

Abbildung 4.25 zeigt die ermittelten spezifischen Wirkungsgrade der US-Zerstäuber. Während die Werte für die Zerstäuber *TDK-NB80* (0,78) und *AW-Typ I* (0,80) nahezu identisch waren, ergab sich für den Zerstäuber *AW-Typ II* ein deutlich geringerer Wert von 0,47. Folglich wurde bei dem Zerstäuber *AW-Typ II* eine erheblich größere Menge der zugeführten Leistung in Wärme umgewandelt. Dieses ließ auf eine unausgewogene bzw. ineffektivere Ansteuerung der Piezokeramik schließen. Durch Einführen des spezifischen

Wirkungsgrades wurden neben den Verlusten an der Piezokeramik ebenfalls die ultraschallinduzierten Molekülbewegungen innerhalb der Flüssigkeit berücksichtigt. Wie hoch die einzelnen Anteile im Einzelnen sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt, da zur Evaluierung der US-Zerstäuber in Bezug auf die Stabilität der Bestandteile von Nährmedien primär der Gesamtwert der eingebrachten Wärme in die zerstäubten Flüssigkeiten von Bedeutung ist.

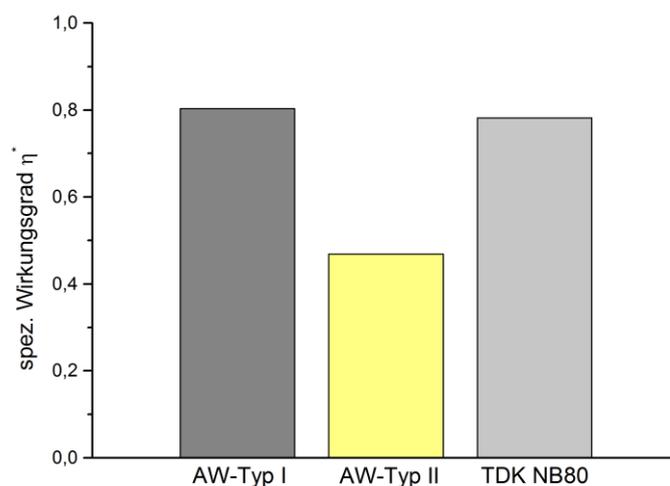


Abbildung 4.25: Auftragung des spezifischen Wirkungsgrads verschiedener US-Zerstäuber

### Fazit:

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente dienten zur Bestimmung der physikalischen Größen Arbeitsfrequenz und Amplitude der Spannungsschwingung, der Wirkleistung und des spezifischen Wirkungsgrads. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Mit einem Oszilloskop wurde die Spannungsschwingung verschiedener US-Zerstäuber aufgezeichnet sowie die Frequenz und die Amplitude der Schwingung berechnet. Es zeigte sich, dass die US-Zerstäuber anhand der Arbeitsfrequenz in zwei Gruppen eingeteilt werden konnten. Die US-Zerstäuber *AW-Typ I*, *AW-Typ II* und *CH24V* arbeiten mit einer Frequenz von ca. 1,7 MHz und der *TDK-NB80* und *CH12V* bei ca. 2,45 MHz. Die maximalen Amplituden der US-Zerstäuber mit den hohen Frequenzen (50 V bzw. 70 V) liegen deutlich unter denen der US-Zerstäuber mit geringeren Frequenzen (100 V - 200 V). Aufgrund der nicht zugänglichen Steuerungselektronik (Kapitel 4.3) war die Bestimmung weiterer Größen nur für die US-Zerstäuber *AW-Typ I*, *AW-Typ II* und *TDK-NB80* möglich. Aus der Strom- und der Spannungsschwingung mit der Zeit konnten die Wirkleistungen der US-Zerstäuber berechnet werden. Hierbei war besonders auffällig, dass der *AW-Typ I* einen ca. doppelt so hohen Wert (47,63 W) aufwies, als der *AW-Typ II* (23,66 W) und der *TDK-NB80* (19,72 W). Als wichtige Eigenschaft eines US-Zerstäubers in

Nebelkammerreaktor wurde der Wärmeeintrag der US-Zerstäuber bei maximaler Leistung untersucht, in ein Verhältnis mit der Wirkleistung gesetzt und hieraus der spezifische Wirkungsgrad errechnet. Dieser gibt das Verhältnis zwischen Schallleistung und induzierter Wärme an und sollte für die Anwendung in einem Nebelkammerreaktor möglichst hohe Werte aufweisen. Während der *AW-Typ I* und der *TDK-NB80* ca. 80 % der Wirkleistung in Schallenergie umwandeln, liegt dieser Wert bei dem *AW-Typ II* lediglich unter 50 %. Zur Vermeidung einer Schädigung von temperatursensitiven Bestandteilen von Nährmedien, sollte möglichst wenig thermische Energie in das Medium eingetragen werden. In Tabelle 4.3 sind die ermittelten Kenndaten der getesteten US-Zerstäuber zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Zusammenstellung der experimentell bestimmten Größen verschiedener US-Zerstäuber. Hierbei ist auffällig, dass die Zerstäuber mit geringerer Frequenz kleinere Amplituden der Spannungsschwingung besitzen. Als nachteilig erweist sich der geringe spezifische Wirkungsgrad des *AW-Typ II*, woraus resultiert, dass mehr Leistung in Form von Wärmeenergie in das zu zerstäubende Medium eingebracht wird.

	<i>AW-Typ I</i>	<i>AW-Typ II</i>	<i>TDK-NB80</i>	<i>CH12V</i>	<i>CH24V</i>
<b>Frequenz experimentell</b>	1,690 MHz	1,694 MHz	2,475 MHz	2,451 MHz	1,752 MHz
<b>maximale Amplitude</b>	200 V	120 V	70 V	50 V	100 V
<b>Wirkleistung</b>	47,63 Watt	23,66 Watt	19,72 Watt	-	-
<b>Spez. Wirkungsgrad</b>	0,803	0,469	0,782	-	-

### 4.5.3 Zerstäubungsleistung und Aerosoldichte

Es war notwendig die Zerstäubungsleistung ( $\text{ml}_{\text{Aerosol}}/\text{h}$ ) der US-Zerstäuber zu kennen und diese relativ zu den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Daten (Frequenz, Wirkleistung) zu betrachten, um die Zerstäuber bezüglich ihrer technischen Daten in ein Verhältnis setzen und beurteilen zu können. So hätte beim Vergleich der Zerstäuber z.B. ein doppelt so hoher Wärmeeintrag bei gleichzeitiger dreifach höherer Zerstäubungsleistung relativiert werden können. Zur Zerstäubungsleistung gab es zwar für einige US-Zerstäuber Herstellerangaben, diese waren jedoch mit großen Varianzen angegeben. Zudem konnte der Reaktoraufbau bzw. die Art der Anbringung des US-Zerstäubers an dem Reaktor einen deutlichen Einfluss auf die Zerstäubungsleistung haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zerstäubungsleistung indirekt über die „Kondensatmenge“ (Teil 1) bestimmt. Zusätzlich sollte mithilfe des *Aerosoldichtesensors* (Kapitel 8.1.2) der Zusammenhang zwischen der Aerosoldichte und Zerstäubungsleistung hergestellt werden (Teil 2).

#### 4.5.3.1 Zerstäubungsleistung und Aerosoldichte verschiedener Ultraschallzerstäuber

Zur Vergleichbarkeit der Zerstäuber untereinander, wurde ein Versuchsaufbau gewählt der es ermöglichte relative Werte zu erhalten. In dem *NKR-Typ I* wurde eine Schale aus Edelstahl ( $D = 6 \text{ cm}$ ), in einem Abstand von  $2,5 \text{ cm}$  zum Reaktorboden, auf einer Halterung platziert. In den Reaktor wurden  $150 \text{ ml}$  deionisiertes Wasser gefüllt und jeder US-Zerstäuber bei voller Leistung für eine Stunde betrieben. (Abbildung 4.26).

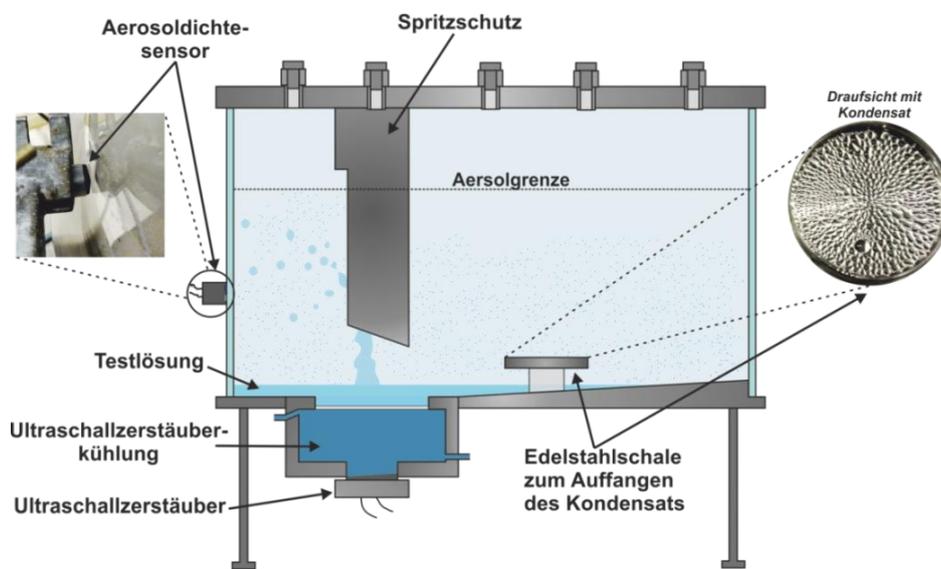


Abbildung 4.26: Schematische Darstellung des Messaufbaus zur Bestimmung der produzierten Aerosolmenge und Aerosoldichten der getesteten US-Zerstäuber.

Da die Zerstäubungsleistung von der Temperatur des zu zerstäubenden Mediums abhängt (Kapitel 3.5.2.4), wurde für alle US-Zerstäuber die Kühlung auf  $22^\circ\text{C}$  geregelt und der Reaktor bei RT betrieben. Die Masse des aufgefangenen „Kondensats“, welches direkt proportional zu der erzeugten Menge Aerosol war, wurde durch wiegen der Schale vor und nach dem Zerstäuben ermittelt. Die Aerosoldichte wurde mittels des an den *LogMessage*-Datenlogger (Kapitel 8.1.1) angeschlossenen *Aerosoldichte-Sensor* (Kapitel 8.1.2) (Abbildung 4.26) bestimmt. Die Messung wurde mit dem Aktivieren des US-Zerstäubers gestartet. Als die Aerosoldichte einen stationären Zustand erreicht hatte, wurde der US-Zerstäuber deaktiviert und die Abnahme der Aerosoldichte bis zur vollständigen Sedimentation des Aerosols aufgenommen.

Die Kurve in Abbildung 4.27 zeigt den Messsignalverlauf (je höher die Spannung, desto dichter das Aerosol) des *Aerosoldichte-Sensors* vom Aktivieren des *AW-Typ I* bis zur Deaktivierung und der anschließenden Sedimentation der Aerosoltröpfchen. Es sind deutlich drei Phasen erkennbar: 1. Der Aerosolaufbau (Aufbauphase). 2. Die stationäre Phase, in der zwischen dem Absetzen bzw. dem Verschmelzen und der Bildung der Tröpfchen ein Gleichgewicht herrscht. 3. Der Sedimentationsphase der Aerosoltröpfchen

nach dem deaktivieren des US-Zerstäubers. Die Kurven der anderen Zerstäuber ähneln der in Abbildung 4.27 dargestellten und werden im Anhang gezeigt.

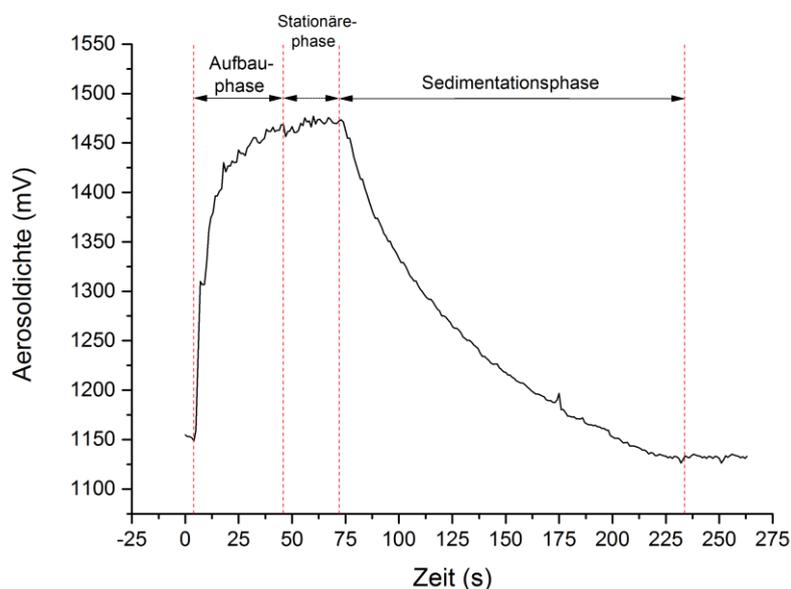


Abbildung 4.27: Messung der Aerosoldichte von Starten bis zum Ausschalten des US-Zerstäubers und der vollständigen Sedimentation des Aerosols des *AW-Typ I*. Aufgetragen ist das zur Aerosoldichte proportionale Messsignal gegen die Zeit.

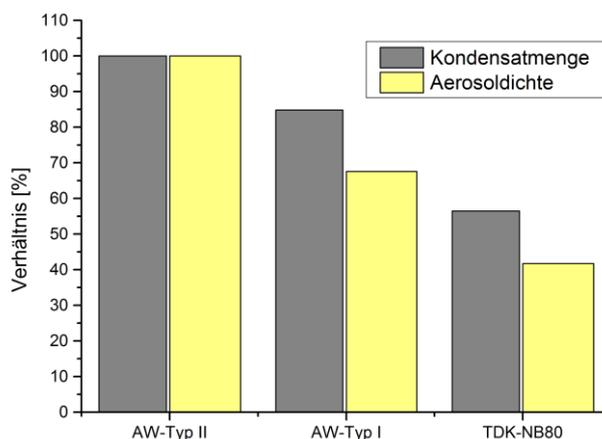


Abbildung 4.28: Auftragung des Verhältnisses der gemessenen „Kondensatmenge“ und der Aerosoldichte verschiedener US-Zerstäuber bezogen auf die Werte des US-Zerstäubers *AW-Typ II*

In Abbildung 4.28 sind die „Kondensatmengen“ und gemessenen Aerosoldichten der Zerstäuber *AW-Typ I*, *AW-Typ II* und *TDK-NB80* im prozentualen Verhältnis zum US-Zerstäuber mit den höchsten Werten aufgetragen. Die Aerosoldichte und die „Kondensatmenge“ und daraus abgeleitet die Zerstäubungsleistung sind bei dem *AW-Typ II* am höchsten. Im Verhältnis zum *AW-Typ II* liegen die Werte des *AW-Typ I* für die

„Kondensatmenge“ bei ca. 80 % und die der Aerosoldichte bei ca. 70 %. Der *TDK-NB80* weist mit ca. 60 % für das Kondensat und 40 % für die Nebeldichte die geringsten Werte auf.

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der Zeiträume vom Start der Zerstäubung bis zum Einstellen der stationären Phase des Aerosols und für die Sedimentation der Tröpfchen nach Abschalten des US-Zerstäubers aufgeführt (Graphen siehe Kapitel 8.1.6).

Tabelle 4.4: Daten verschiedener US-Zerstäuber bezüglich des Aerosols und der Zerstäubungsleistung

US-Zerstäuber	Messsignaldifferenz [ΔmV]	Verhältnismäßige Aerosoldichte [%]	Zunahme der Aerosoldichte [s]	Sedimentations- dauer [s]
<i>AW-Typ II</i>	546,58	100	47	151
<i>AW-Typ I</i>	369,24	67,55	43	160
<i>TDK-NB80</i>	228,1	41,73	51	197

Die unterschiedlichen Werte der US-Zerstäuber können mit der in Kapitel 4.4.1 ermittelten Tröpfchengrößenverteilung begründet werden. Die Nebelzunahme ist in erster Linie abhängig von der Zerstäubungsleistung, bei der die Zerstäuber *AW-Typ I* und *AW-Typ II* sehr ähnliche Werte aufweisen. Für den *AW-Typ II* müsste anhand der deutlich höheren Zerstäubungsleistung eine schnellere Einstellung des stationären Zustands erwartet werden. Dass dieser Fall nicht eintritt, hängt bei hinzuziehen des Tröpfchengrößenspektrum des *AW-Typ II* (Abbildung 4.18) von der vermehrten Produktion größerer Tröpfchen ab. Aufgrund der höheren Sedimentationsrate setzen sich die im Schnitt größeren Tröpfchen des *AW-Typ II* schneller ab. Beim *AW-Typ I* ist der Anteil kleiner Tröpfchen höher, wodurch sich als Folge die stationäre Phase des Aerosols schneller einstellt. Im Fall des *TDK-NB80* kann der noch kleinere mittlere Tröpfchendurchmesser die geringere Zerstäubungsleistung nicht ausgleichen, was zur Folge hat, dass hier der längste Zeitraum bis zum Aufbau der stationären Aerosoldichte benötigt wird. Bei der Betrachtung darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass der *TDK-NB80* nicht bei einem nicht optimalen Abstand zwischen US-Zerstäuber und Flüssigkeitsoberfläche betrieben wurde. Deutlicher wird der Einfluss der unterschiedlichen Tröpfchengrößen bei der Sedimentationsdauer des Aerosols. Durch die im Durchschnitt größeren Tröpfchen des *AW-Typ II* ist eine vollständige Sedimentation nach 151 Sekunden schneller erreicht, als bei den anderen US-Zerstäubern. Der *TDK-NB80* weist von den drei Zerstäubern den geringsten Tröpfchendurchmesser und mit 197 Sekunden die längste Sedimentationsdauer auf. Die Abhängigkeit von der Tröpfchengröße wird ebenfalls deutlich, wenn die Werte für den *LHZI* hinzugezogen werden. Die mittlere Tröpfchengröße ist mit 20,92 μm ungefähr sechsmal größer als die der anderen Zerstäuber. Die Sedimentationszeit ist mit 20 Sekunden circa achtmal kürzer.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der *AW-Typ II* die größte Aerosoldichte, die höchste „Kondensatmenge“ und daraus resultierend die höchste Zerstäubungsleistung

aufweist. Als nachteilig stellen sich das bereits in Kapitel 4.4.1 ermittelte häufige Auftreten großer Tröpfchen und die relativ schnelle Sedimentationszeit des Aerosols heraus. Der *TDK-NB80* weist hingegen, aufgrund der kleineren Tröpfchendurchmesser, eine deutlich längere Sedimentationszeit auf und hat gleichzeitig die geringste Zerstäubungsleistung. Der *AW-Typ I* liegt mit den Werten zwischen dem *AW-Typ II* und dem *TDK-NB80*.

#### 4.5.3.2 Einflüsse auf die Zerstäubungsleistung und die Aerosoldichte

Neben den elektrischen Größen haben ebenfalls äußere Parameter und die Art des Einbaus der US-Zerstäuber Einfluss auf die Zerstäubungsleistung. Hierzu zählen die Höhe US-Zerstäuberleistung, die Temperatur des zu zerstäubenden Mediums, welche über die US-Zerstäuberabkühlung beeinflusst werden kann, und der Abstand des Zerstäubers zur Flüssigkeitsoberfläche.

Praktische Bedeutung haben diese Einflüsse bei der Konstruktion des Nebelkammerreaktors und dessen Optimierung. Zusammen mit den vorherigen Untersuchungen sollte ein Gesamtbild über die Einflüsse auf und durch die Ultraschallzerstäubung erhalten werden und die Möglichkeit bieten im Vorfeld die Auswirkungen durch die Variation einzelner Parameter abschätzen und in Prozessabläufe einplanen zu können. Neben der Temperatur- und Sauerstoffversorgung spielt auch die Nährstoffversorgung eine entscheidende Rolle. Diese hängt neben anderen Faktoren von der Verteilung des Aerosols im Innenraum des Reaktors ab. Wie bereits in Kapitel 4.4.1 beschrieben, ist die Verteilung der Aerosoltröpfchen im senkrechten Schnitt durch den Reaktor nicht gleichmäßig. Dieses Ergebnis wurde durch ein weiteres Experiment ergänzend überprüft.

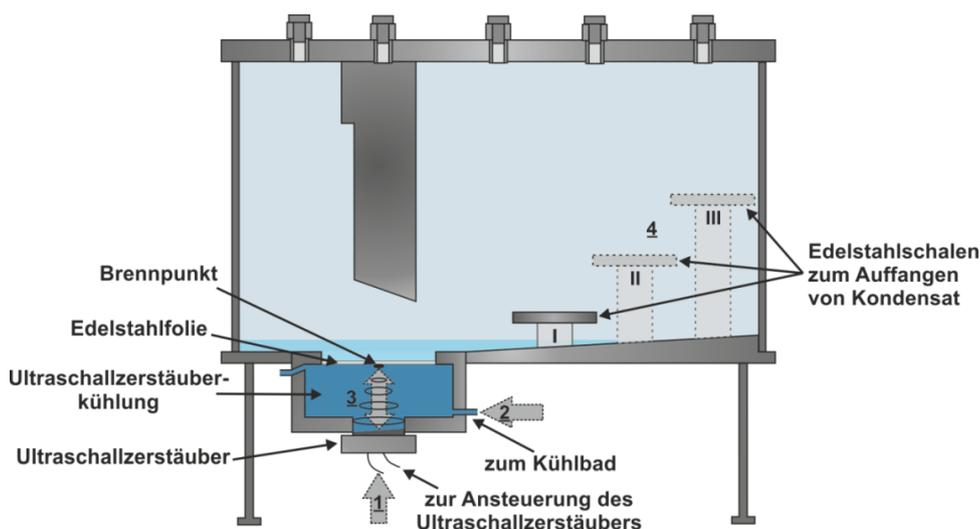


Abbildung 4.29: Schematischer Messaufbau zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Parameter auf die Zerstäubungsleistung des US-Zerstäubers *AW-Typ I*. 1 = Variation der Ansteuerungsspannung; 2 = Variation der Temperatur der US-Zerstäuberabkühlung; 3 = Variation des Abstands der Piezokeramik zur Flüssigkeitsoberfläche; 4 = Verschiedene Abstände der Messpunkte zum Reaktorboden

Der Einfluss der verschiedenen externen Parameter (Leistung des US-Zerstäubers (Abbildung 4.29, 1), Temperatur der US-Zerstäuberkühlung (Abbildung 4.29, 2), Abstand des US-Zerstäubers zur Flüssigkeitsoberfläche, (Abbildung 4.29, 3) auf die Zerstäubungsleistung wurde in einer Experimentreihe untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss des Abstands der Messpunkte zum Reaktorboden (Abbildung 4.29, 4) auf die „Kondensatbildungsrate“ und die Aerosoldichte ermittelt.

Zur quantitativen Bestimmung der Einflüsse wurden in dem Reaktor in einem Abstand von 2,5 cm (Abbildung 4.29, Position I), 5 cm (Abbildung 4.29, Position II) und 7,5 cm (Abbildung 4.29, Position III) zum Reaktorboden Auffangschalen ( $D = 6$  cm) als Teststellen auf einem Ständer platziert. Als flüssiges Medium dienten jeweils 150 ml deionisiertes Wasser. Die Standardeinstellungen für die Experimente waren der Betrieb des US-Zerstäubers bei maximaler Leistung (47,6 W), eine Temperatur der US-Zerstäuberkühlung von 22°C und ein Abstand von 4,5 cm von der Piezokeramik des US-Zerstäubers zur Flüssigkeitsoberfläche. In den ersten drei Teilen der Experimentreihe wurde jeweils einer der genannten Parameter variiert. Bei jeder Messung wurde der Zerstäuber für eine Stunde betrieben und die aufgefangene „Kondensatmenge“ an Position I bestimmt. In einem vierten Teil wurde das Kondensat an Position I – III aufgefangen und somit die der Einfluss des Abstandes des Messpunkts vom Reaktorboden ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.30 zusammengefasst. Für die Messung der „Kondensatmenge“ in Abhängigkeit von der Leistung des US-Zerstäubers und des Einfluss des Abstandes vom Reaktorboden wurde ebenfalls die Aerosoldichte mit dem *Aerosoldichte-Sensor* Kapitel 8.1.2 bestimmt.

Die Ergebnisse der Experimente zum Einfluss der Leistung des US-Zerstäubers sind in Abbildung 4.30 (oben links) aufgetragen. Es zeigt sich, dass zwischen der Leistung des US-Zerstäubers, der „Kondensatmenge“ und der Aerosoldichte ein nahezu linearer Zusammenhang besteht. Ab einer Leistung des US-Zerstäubers von 35 W wird ausreichend Schallenergie erzeugt, um eine Aerosolbildung zu ermöglichen (Kapitel 3.5.2.4). Mit einer Steigerung der Leistung bis zu dem Maximalwert von 47,6 W nehmen die Amplituden der Ultraschallschwingung, die Länge des Ultraschallrüssels und die Zerstäubungsleistung zu. Hierdurch stieg Menge des aufgefangenen Kondensats von 0,8 ml/h (35 W) auf 3,42 ml/h (47,6 W).

Die Variation der Kühltemperatur des US-Zerstäubers hat ebenfalls einen deutlichen Effekt auf die Zerstäubungsleistung (Abbildung 4.30, oben rechts), in dem gemessenen Temperaturbereich die „Kondensatmenge“ von 0 °C (3,05 ml/h) bis 50 °C (3,82 ml/h) nahezu linear anstieg. Entscheidend ist hierbei nicht die Kühlung der Piezokeramik, sondern die damit zusammenhängende indirekte Kühlung der zu zerstäubenden Flüssigkeit im Reaktorinnenraum. Ein Wärmeaustausch findet primär über die dünne Edelstahlfolie (0,05  $\mu\text{m}$ ), aber auch den Reaktorboden (Kapitel 4.2), statt. Zum Lösen eines Tröpfchens aus der Oberfläche muss thermodynamische Arbeit geleistet werden. Nach Formel 13

fließt die Oberflächenspannung der zu zerstäubenden Flüssigkeit direkt in den Prozess der Tröpfchenbildung ein. Die Oberflächenspannung sinkt bei steigender Temperatur, wodurch eine Destabilisierung der Oberfläche erleichtert wird. Alle weiteren Werte die in Formel 13 einfließen bleiben konstant, wodurch theoretisch ein proportionaler Zusammenhang zwischen Flüssigkeitstemperatur und Zerstäubungsleistung bestehen sollte, welcher die Ergebnisse erklärt.

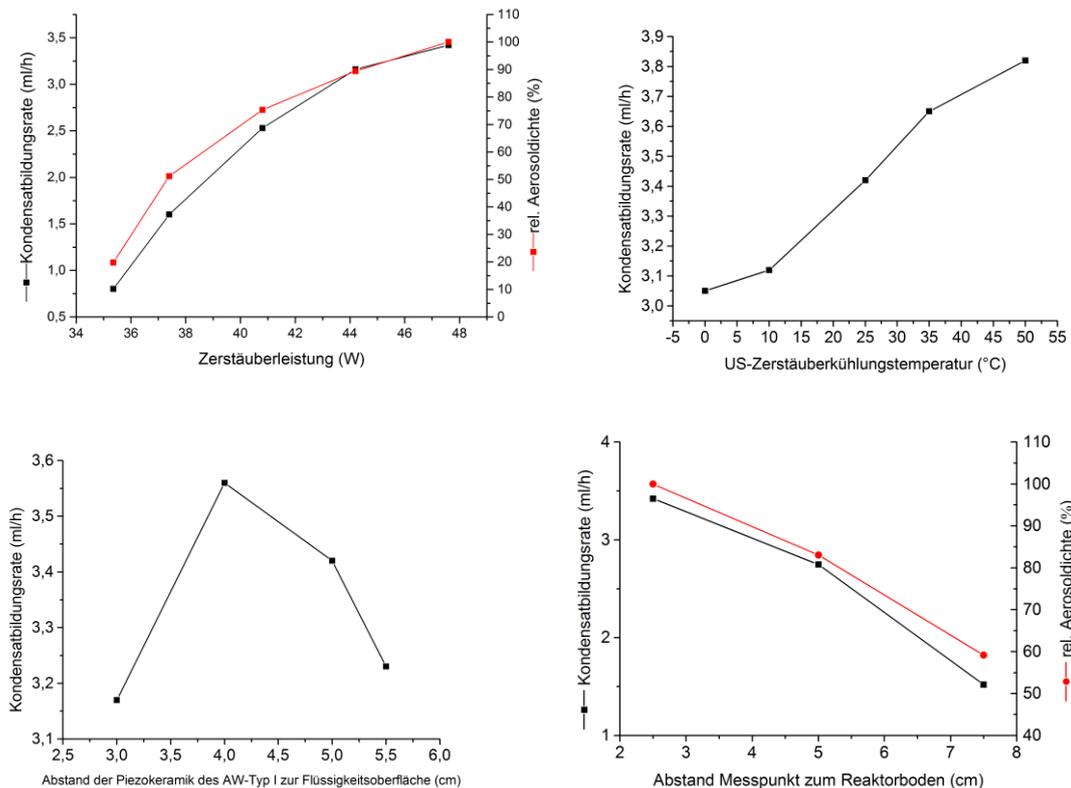


Abbildung 4.30: oben links: Auftragung der „Kondensatmenge“ und Aerosoldichte in Abhängigkeit von der Ansteuerungsspannung des US-Zerstäubers; oben rechts: Auftragung der „Kondensatmenge“ in Abhängigkeit von der Temperatur der US-Zerstäuberkühlung; unten links: Auftragung der „Kondensatmenge“ in Abhängigkeit des Abstandes der Piezokeramik des US-Zerstäubers zur Flüssigkeitsoberfläche; unten rechts: Auftragung der „Kondensatmenge“ und Aerosoldichte in Abhängigkeit von dem Abstand des Messpunkts zum Reaktorboden. Als US-Zerstäuber diente jeweils der AW-Typ I

Mit Hilfe speziell angefertigter Testflansches aus Kunststoff wurde die Zerstäubungsleistung bei unterschiedlichen Abständen zur Flüssigkeitsoberfläche ermittelt (Abbildung 4.30, unten links). Bei einem Abstand von 4 cm konnte die höchste „Kondensatmenge“ (3,56 ml/h) aufgefangen werden. Bei einer Variation des Abstands um einen Zentimeter sank die „Kondensatmenge“ auf 3,17 ml/h (3 cm) bzw. 3,42 ml/h (5 cm) ab. Abweichungen von mehreren Zentimetern führten zu einer kompletten Aussetzung der Zerstäubung.

Die Piezokeramiken der Ultraschallzerstäuber sind so gefertigt, dass die Schallwellen in einem Punkt mit definiertem Abstand von der Keramik zusammenlaufen (Brennpunkt), an dem die Ultraschallenergie am höchsten ist (Kapitel 3.4.1). Laut Herstellerangaben

liegt der Brennpunkt des *AW-Typ I* bei einem Abstand von ca. 4 cm. In dem *NKR-Typ I* wird der Abstand durch den Aufbau des Flansches auf 4,5 cm gehalten. Diese Abweichung vom Idealwert war beabsichtigt, da der Brennpunkt direkt unter der Metallfolie liegen sollte. Dieses ist wichtig, um die mediumschädigenden Effekte, wie z.B. die Aufheizung des Mediums in der Reaktorkammer und die Auswirkungen der starken Interferenzen und Intensitätsspitzen, welche im Nahfeld des US-Zerstäubers (Kapitel 3.4.2) auftreten, zu minimieren.

Die Ergebnisse zeigten, dass bereits geringe Verschiebungen des Brennpunkts von der Flüssigkeitsoberfläche deutliche Einflüsse auf die Zerstäubungsleistung hatten.

In einem weiteren Experiment wurde die Aerosoldichte in verschiedenen Abständen zum Reaktorboden untersucht. Zur Durchführung der Messung wurden die Schalen in Position I, II, III (Abbildung 4.29) als Messpunkte verwendet. Neben der Bestimmung der „Kondensatmengen“ wurde eine Aerosoldichtemessung mit dem in Kapitel 8.1.2 beschriebenen Aerosoldichte-Sensor durchgeführt.

In Abbildung 4.30 (unten rechts) sind die aufgefangene „Kondensatmengen“ an den verschiedenen Positionen und die relative Aerosoldichte (bezogen auf den Maximalwert) gegen den Abstand zum Reaktorboden aufgetragen. Wie in Kapitel 8.1.2 beschrieben, ist das Messsignal des *Aerosoldichte-Sensors* über einen großen Bereich direkt proportional zur Aerosoldichte. Die in Abbildung 4.30 (unten links) dargestellten Kurven für die „Kondensatmengen“ und die Aerosoldichten zeigten denselben Verlauf. Hieraus ließ sich folgern, dass je größer der Abstand zum Reaktorboden, desto geringer die Aerosoldichte und die „Kondensatmenge“.

Als Erklärung dient, dass mit dem Durchmesser der Tröpfchen die Masse und die Sedimentationsgeschwindigkeit zunehmen. Größere Tröpfchen werden zudem aufgrund der höheren Masse bei der Aerosolbildung schwächer gegen die Gravitation beschleunigt und sammeln sich in Reaktorbodennähe. Wie schon in Kapitel 4.4.1 gezeigt, sank der mittlere Tröpfchendurchmesser mit steigendem Abstand zum Reaktorboden. Da sich das Volumen eines Tröpfchens in der dritten Potenz zum Radius vergrößert, lag in Bodennähe bereits bei geringer Vergrößerung des mittleren Durchmessers ein erheblich größeres Flüssigkeitsvolumen als Aerosol vor. Zusätzlich konnte davon ausgegangen werden, dass in Bodennähe aufgrund der kontinuierlichen Sedimentation aller Tröpfchen eine höhere Gesamtzahl an Tröpfchen vorlag.

**Fazit:**

Die Ergebnisse zeigen, dass die Temperatur des zu zerstäubenden Mediums und der Abstand des US-Zerstäubers zur Flüssigkeitsoberfläche deutlichen Einfluss auf die Zerstäubungsleistung haben. Bei der Planung von Experimenten und Optimierungen bzw. Umbauten an dem Nebelkammerreaktor müssen diese Aspekte beachtet werden, um bei einem möglichst geringen Energieeintrag eine hohe Zerstäubungsleistung zu erhalten. Die Quantifizierung der Abnahme der Aerosoldichte mit steigendem Abstand zum Reaktorboden gibt wichtige Auskünfte für eine optimale Positionierung von Proben im Reaktorinneren und muss bei der Regelung der Ansteuerungsspannung (Ultraschallintensität) beachtet werden, um z.B. eine Nährstofflimitierung zu vermeiden.

Diese Faktoren und Einflüsse im Zusammenhang mit dem Effekt des Ultraschalls auf Proteine im Folgenden Kapitel 4.6.2.2 und weitere Biomoleküle (Kapiteln 4.6) sind besonders in Hinblick auf die Wahl des geeigneten Zerstäubers und dem Bau eines optimierten Nebelkammerreaktor von großer Bedeutung.

#### **4.5.4 Untersuchungen zur Frequenzabhängigkeit der Stabilität von Penicillin G-Acylase**

Die ermittelten technischen Daten der US-Zerstäuber (siehe Kapitel 4.4.1 – 4.4.3) bilden die Grundlage für die Beurteilung ihrer Einsetzbarkeit in dem Nebelkammerreaktor. Zusätzlich hierzu spielen die chemisch-biologischen Einflüsse des Ultraschalls eine entscheidende Rolle. Der Auswirkungen der US-Zerstäubung auf Biomoleküle und Nährmedien wird in Kapitel 4.6 beschrieben. Als geeignetes Beispielmolekül für den Einfluss des Ultraschalls auf Biomoleküle stellte sich das Enzym Penicillin G-Acylase (PGA) heraus. Folglich wurde der NIPAB-Assay zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PGA (Kapitel 4.6.2.2) als repräsentativer Standard-Assay für die Überprüfung der Auswirkungen des eingesetzten Ultraschalls auf Bestandteile von Nährmedien etabliert. Eine genaue Beschreibung der Experimente mit PGA findet sich in Kapitel 4.6.2.2. Um eine abschließende Beurteilung der US-Zerstäuber zu ermöglichen, wird an dieser Stelle schon auf einige der Ergebnisse vorgegriffen.

Es stellte sich heraus, dass ein Aktivitätsverlust der PGA durch das Ultraschallzerstäuben auftreten kann. Dieser hängt maßgeblich mit der eingebrachten Ultraschalleistung und -frequenz zusammen. Die für dieses Kapitel relevanten Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Zeiträume bis zum Erreichen einer 20 %igen Restaktivität einer mit verschiedenen US-Zerstäubern zerstäubten PGA-Lösung bei der jeweiligen Arbeitsfrequenz des US-Zerstäubers und maximaler Leistung

	<i>AW-Typ I</i>	<i>AW-Typ II</i>	<i>TDK-NB80</i>	<i>CH12V</i>	<i>CH24V</i>	<i>LHZI</i>
<b>Zeitraum bis Aktivität von PGA &lt;20%</b>	4,5 h	2,5 h	65 h	27 h	10 h	>90 h
<b>Frequenz experimentell</b>	1,690 MHz	1,694 MHz	2,48 MHz	2,45 MHz	1,75 MHz	100 kHz

Beim Betrachten der Ergebnisse fällt zunächst die deutlich längere Aktivität des Enzyms bei den Zerstäubern *TDK-NB80* (65 h), *CH12V* (27 h) und *LHZI* (90 h) gegenüber den Zerstäubern *AW-Typ I* (4,5 h), *AW-Typ II* (2,5 h) und *CH24V* (10 h) auf. Wird die Arbeitsfrequenz der Zerstäuber hinzugezogen zeigt sich, dass die Zerstäuber mit höheren Frequenzen eine deutlich längere Aktivität des Enzyms garantieren konnten. Ausnahme hiervon ist der Zerstäuber *LHZI*, bei dem es sich um einen „angeregten Flüssigkeitsstrahlzerstäuber“ mit einem anderen Zerstäubungsprinzip (Kapitel 3.5.2.5) handelt. Es gibt keinen direkten Kontakt der Flüssigkeit mit dem piezokeramischen Schwingungsgeber, wodurch eine Deaktivierung des Enzyms deutlich verlangsamt wird. In dieser Hinsicht haben angeregte Flüssigkeitsstrahlzerstäuber Vorteile gegenüber den Submers-Zerstäubern.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass es bei Submers-Zerstäubern von Vorteil ist eine möglichst hohe Frequenz zu wählen, um eine Deaktivierung des Enzyms zu vermeiden. Aber auch zwischen den Zerstäubern mit sehr ähnlichen Frequenzen *AW-Typ I/AW-Typ II* (ca. 1,69 MHz) und *TDK-NB80/CH12V* (ca. 2,45 MHz) bestehen deutliche Unterschiede, sodass nicht nur die Frequenz ausschlaggebend für die Wirkungen auf das Enzym ist, sondern ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren besteht.

#### 4.5.5 Fazit des Kapitels

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente und Berechnungen dienten der vergleichenden Untersuchung verschiedener US-Zerstäuber bezüglich ihrer charakteristischen technischen und elektrischen Daten, mit dem Ziel, die geeigneten Parameter für den Einsatz in dem Nebelkammerreaktor zu ermitteln und um einen optimalen US-Zerstäuber auszuwählen bzw. anfertigen zu lassen. Als wichtige Rahmenbedingungen dienten eine möglichst kleine Tröpfchengröße bei ausreichender Zerstäubungsleistung, eine einfache Handhabung und ein unkomplizierter Auf- und Einbau und als entscheidendes Kriterium ist die Auswirkung auf Biomoleküle und Nährmedienbestandteile. Zur Beurteilung wurden die gewonnenen Ergebnisse in Bezug zu den Auswirkungen auf das Enzym Penicillin-G-Acylase (PGA) als repräsentatives Biomolekül gesetzt.

Bei den empirischen Untersuchungen der US-Zerstäuber wurden die charakteristischen Kenngrößen Tröpfchendurchmesser, Frequenz, Wirkleistung, spezifischer Wirkungsgrad und Aerosoldichte evaluiert. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Als Ergebnis der durchgeführten Experimente zur Tröpfchengrößenbestimmung (Kapitel 4.4.1) kann festgehalten werden, dass die Frequenz einen signifikanten Einfluss auf die Tröpfchengröße hatte und diese mit steigender Frequenz sinkt. Wie in Kapitel 3.5.2.4 beschrieben, wird die verwendete Formel 13 bei höheren Frequenzen zwar ungenauer, ist aber trotzdem geeignet um eine ungefähre Vorhersage zu treffen. Herauszuheben ist die Genauigkeit beim *LHZI* mit einer relativ geringen Frequenz (100 kHz). Der berechnete Wert weicht lediglich um 8 % von dem experimentell bestimmten Wert ab. Die Zerstäuber *AW-Typ II* und *AW-Typ I* arbeiten mit dem gleichen Schwingungsgeber (Piezokeramik), allerdings mit verschiedenen Ansteuerungselektroniken. Die Bestimmung der Tröpfchengrößen ergab einen deutlich größeren mittleren Tröpfchendurchmesser des *AW-Typ II*. Dieses lag an dem breiteren Tröpfchengrößenspektrum, in dem eine höhere Anzahl großer Tröpfchen als in dem des *AW-Typ I* auftraten.

Die Schwingung des Anregungssignals (Kapitel 4.4.2.1) zeigte im Hochfrequenzbereich (Ultraschall) kaum Unterschiede zwischen den beiden Zerstäubern. Allerdings weist die Hüllkurve eine deutlich unterschiedliche Form auf. Dieses in Kombination mit der leicht abweichenden Frequenz kann Einfluss darauf haben, dass die Piezokeramik inhomogener schwingt und somit im Falle des *AW-Typ II* größere Tröpfchen produziert werden. Im vertikalen Schnitt ist die Verteilung der kleinen Tröpfchen relativ gleichmäßig, wobei durch ihre höhere Sedimentationsgeschwindigkeit in der Nähe des Reaktorbodens vermehrt größere Tröpfchen zu finden sind. Durch Vermindern der Leistung und somit auch der Amplitude der Schwingung, konnte keine Veränderung der Tröpfchengröße festgestellt werden. Dieses bestätigt die Formel 8, in die die Amplitude der Anregungsschwingung nicht einfließt und somit keinen Einfluss auf die Tröpfchengrößen zu erwarten war.

Die Ergebnisse der Tröpfchengrößenmessung spiegeln sich auch in den Daten zur Nebeldichtemessung und den Aufbau- und Sedimentationszeiten der Aerosole wieder (Kapitel 4.4.3). Große Tröpfchen sedimentieren generell schneller, wodurch bei Aerosolen mit einem hohen mittleren Tröpfchendurchmesser die Standzeit abnimmt. Anhand der Messdaten ließ sich zeigen, dass bei größeren mittleren Tröpfchendurchmessern, wie z.B. beim *AW-Typ II* gegenüber dem *AW-Typ I*, die Sedimentationszeit für das Aerosol sinkt. Für die Anwendung in der Zellkultivierung und den Bau zukünftiger Nebelkammerreaktoren ergibt sich aus den empirischen Daten, dass ein Aerosol mit einem möglichst geringen mittleren Tröpfchendurchmesser produziert werden sollte, damit z.B. bei einer gepulsten Zerstäubung das Aerosol lange bestehen bleibt. Zudem gilt, dass je kleiner die Tröpfchen, desto stärker die Bewegung gegen die Schwerkraft bzw. in horizontaler Richtung. Somit kann bei möglichst geringen Tröpfchengrößen die

Nährstoffversorgung von z.B. im Reaktor platzierten dreidimensionalen Zellproben verbessert werden. Des Weiteren bergen schnell sedimentierende Tröpfchen mit einer hohen kinetischen Energie die Gefahr der Schädigung oder Abwaschung der Zellen auf Trägermaterialien.

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Beurteilung eines US-Zerstäubers ist die Menge an Medium die pro Zeit transportiert wird bzw. wie viel „Kondensat“ sich auf einer definierten Fläche pro Zeit bildet. Dieser Wert sollte im direkten Zusammenhang mit der Menge an produziertem Aerosol und der Tröpfchendichte stehen. Anhand der durchgeführten Experimente können die theoretischen Überlegungen bestätigt werden. Dem US-Zerstäuber mit der höchsten „Kondensatbildungsrate“ (*AW-Typ II*) konnte ebenfalls die höchste Aerosoldichte zugeordnet werden. Der *TDK-NB80* weist in beiden Fällen um den Faktor 2-3 kleinere Werte auf, wobei auch hier die produzierte Aerosolmenge ausreichend war um den Reaktor zu füllen und im Aerosol platzierte Flächen in kürzester Zeit zu benetzen.

Die ermittelte Wirkleistung (Kapitel 4.4.2.2) des *AW-Typ I* war ca. doppelt so groß wie die des *AW-Typ II* und des *TDK-NB80*. Ein direkter Zusammenhang mit der Zerstäubungsleistung (Kapitel 4.4.3.1) kann aufgrund der Daten nicht abgeleitet werden. Ein wichtiger mit der Wirkleistung zusammenhängender Parameter ist die durch den Ultraschallzerstäuber eingebrachte Wärme in das Medium. In Nährmedien kann dieses aufgrund der hohen Anzahl an Proteinen und anderer Biomoleküle zu kritischen lokalen Temperaturmaxima führen. Die Zerstäuber *AW-Typ I* und *TDK-NB80* geben nur etwa 20 % ihrer Leistung in Form von Wärmeenergie in das Medium ab, bei dem *AW-Typ II* sind es dagegen ca. 50 %.

Als Modellsystem für Biomoleküle bzw. Proteine wurde der Einfluss des Ultraschalls auf die Aktivität des Enzyms Penicillin G-Acylase (PGA) überprüft (Kapitel 4.4.4). Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Arbeitsfrequenz der Zerstäuber und der Deaktivierung (Denaturierung) des Enzyms. Während bei den hochfrequenten Zerstäubern *TDK-NB80* und *CHI2V* (ca. 2,45 MHz) eine komplette Deaktivierung nach 65 bzw. 27 Stunden festgestellt wurde, trat dieses bei den niederfrequenten Zerstäubern (ca. 1,69 MHz) *AW-Typ I* und *AW-Typ II* bereits nach 4,5 bzw. 2,5 Stunden ein. In der Literatur [104] werden lokale Temperaturmaxima und Kavitation als Gründe für Schädigung von Proteinen durch Ultraschall angegeben. Da diese vornehmlich bei Frequenzen unter 2 MHz auftreten, können sie als Erklärungen des stark destruktiven Effekts der Zerstäuber *AW-Typ I* und *AW-Typ II* herangezogen werden. Zudem bestätigt die bei dem *AW-Typ II* am stärksten auftretende Deaktivierung des Enzyms die oben genannten Vermutungen, dass durch eine nicht optimale Ansteuerung zwar eine hohe Zerstäubungsleistung erzielt wurde, allerdings ein zu breites Tröpfchenspektrum produziert wurde und der hohe Ultraschallenergie- und Wärmeeintrag den destruktivsten Effekt auf PGA hatte.

Der *LHZI* hat den geringsten deaktivierenden Effekt auf das Enzym. Dieses lässt sich damit erklären, dass das Medium bei diesem Zerstäuber indirekt zerstäubt wird und somit nicht direkt mit der Piezokeramik in Kontakt kommt. Als nachteilig erweist sich aber zum einen die schwierigere Handhabung, da das Medium ständig vom Mediumreservoir in den Zerstäuber gepumpt werden muss und zum anderen ist der ermittelte Tröpfchendurchmesser von ca. 20  $\mu\text{m}$  für den Einsatz im Nebelkammerreaktor nicht geeignet, da der Großteil der Tröpfchen direkt sedimentiert und keine ausreichende Aerosoldichte im Reaktor entsteht. Zusätzlich können z.B. verstärkt Schädigungen und Abwaschungen von Zellen durch die hohe kinetische Energie der Tröpfchen auftreten.

Als Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen kann festgehalten werden, dass der *TDK-NB80* von den getesteten US-Zerstäubern für weitere Arbeiten mit dem Nebelkammerreaktor am geeignetsten ist, da er unter Berücksichtigung der wichtigen Kenngrößen die besten Eigenschaften aufweist. Explizit zu nennen ist die Produktion der kleinsten Tröpfchen bei ausreichender Zerstäubungsleistung und als größter Vorteil der um den Faktor 15 geringere deaktivierende Effekt auf das Enzym. Bei der Planung und dem Bau eines optimierten Systems müssen ebenfalls die Anforderungen der US-Zerstäuber an äußere Parameter (wie z.B. die Temperatur des zu zerstäubenden Mediums und der Abstand des US-Zerstäubers zu Flüssigkeitsoberfläche) (Kapitel 4.4.3) beachtet werden, um ein optimales Zerstäubungsergebnis zu erzielen.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der relevanten Daten aller untersuchten US-Zerstäuber. Werden die ermittelten Anforderungen hinzugezogen erweist sich der *TDK-NB80* (entscheidende Daten sind hervorgehoben) als Favorit für weitere Arbeiten gegenüber dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten *AW-Typ I*. Für die US-Zerstäuber *CH12V*, *CH24V* und *LHZ1* konnten einige Daten aufgrund des Aufbaus der US-Zerstäuber nicht ermittelt werden, diese sind mit „n.e.“ gekennzeichnet.

	<i>AW-Typ I</i>	<i>AW-Typ II</i>	<u><i>TDK-NB80</i></u>	<i>CH12V</i>	<i>CH24V</i>	<i>LHZ1-Zerstäuber</i>
<b>mittlerer Tröpfchendurchmesser (gemessen)</b>	3,73 µm	4,73 µm	<u>3,2 µm</u>	3,57 µm	5,01 µm	20,92 µm
<b>mittlerer Tröpfchendurchmesser (berechnet)</b>	2,92 µm	2,92 µm	2,27 µm	2,28 µm	2,85 µm	19,25 µm
<b>Zeit bis zum Aerosolmaximum</b>	43 s	47 s	51 s	n.e.	n.e.	n.e.
<b>Sedimentationszeit des Aerosols</b>	160 s	151 s	<u>197 s</u>	n.e.	n.e.	20 s
<b>Maximale Aerosoldichte (ΔU)</b>	546 mV	369 mV	228 mV	n.e.	n.e.	n.e.
<b>Wirkleistung</b>	47,63 Watt	23,66 Watt	<u>19,72 Watt</u>	n.e.	n.e.	n.e.
<b>Spez. Wirkungsgrad</b>	0,803	0,469	0,782	n.e.	n.e.	n.e.
<b>maximale Amplitude</b>	200 V	120 V	70 V	50 V	100 V	n.e.
<b>Frequenz Herstellerangabe</b>	1,600 - 1,750 MHz	1,600 - 1,750 MHz	2,350 - 2,600 MHz	n.e.	n.e.	100 kHz
<b>Frequenz experimentell</b>	1,690 MHz	1,694 MHz	<u>2,475 MHz</u>	2,451 MHz	1,752 MHz	n.e.
<b>Aufgefangenes Aerosol</b>	4,03 ml/h	3,42 ml/h	2,28 ml/h	2,69 ml/h	n.e.	n.e.
<b>Maße Piezokeramik (d x D)</b>	1,3 mm x 20 mm	1,3 mm x 20 mm	0,87 mm x 20 mm	0,84 mm x 16 mm	1,25 mm x 20 mm	n.e.
<b>Zeit bis zur Deaktivierung von PGA</b>	4,5 h	2,5 h	<u>65 h</u>	27 h	10 h	ca. 90 h
<b>Externe Regelung möglich</b>	+	+	+	-	-	-
<b>Regelung der Zerstäubungsleistung möglich</b>	+	+	+	-	-	-
<b>Separierte Keramik und Elektronik</b>	+	+	+	-	-	+

## 4.6 Reaktionstechnische Charakterisierung des *NKR-Typ I*

Eine reaktionstechnische Charakterisierung eines neu entwickelten Bioreaktorsystems ist sinnvoll, um grundlegende technische Daten und Kennzahlen zu ermitteln und so eine Vergleichbarkeit mit anderen Systemen zu ermöglichen. Im Fall des Nebelkammerreaktors war es durch die neuartige Funktionsweise besonders wichtig die Einflüsse des ultraschallgestützten Zerstäubens auf den Wärmeübergang und die Temperaturverteilung, den Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase, den pH-Wert von Nährmedien und das Mischverhalten zu identifizieren und zu verstehen. Zusätzlich wurde getestet ob sich die Aerosoltröpfchen als Transportsystem und für die gleichmäßige Verteilung von Nährstoffen im Reaktor eignen.

In allen Experimenten dieses Kapitels wurde, wenn nicht anders erwähnt, der *NKR-Typ I* in Kombination mit dem US-Zerstäuber *AW-Typ I* bei maximaler Leistung (47,6 W) verwendet.

### 4.6.1 Wärmeübertragung und Temperaturverteilung

Ein wichtiger Parameter bei der Kultivierung von Mikroorganismen ist die Temperatur innerhalb des Reaktors bzw. die Temperatur der Nährmedien in denen sie wachsen. Da bereits geringe Abweichungen von der Idealtemperatur oder Temperaturschwankungen zu einer Wachstumshemmung führen können, ist es wichtig, die Temperatur innerhalb eines Bioreaktors zu kontrollieren. In dem Nebelkammerreaktor ist der Raum zwischen den Aerosoltröpfchen mit Gas (Luft) gefüllt, welches im Gegensatz zu den meisten Flüssigkeiten und Feststoffen einen relativ schlechten Wärmeleiter darstellt. Durch die Beheizung von außen, besteht das Risiko, dass die Temperatur nicht effektiv auf das Reaktorinnere übertragen wird. Dieses Problem soll durch die große Anzahl an kleinen Aerosoltröpfchen minimiert werden, da eine Wärmeübertragung je schneller erfolgt, desto kleiner die Tröpfchen sind. Grundsätzlich sind bei dem Nebelkammerreaktor mehrere Parameter zu beachten, die einen direkten Einfluss auf die Innentemperatur des Reaktors haben: 1. Die Kühlung des US-Zerstäuber kühlt ebenso den Reaktorboden sowie das Medium im Reservoir. 2. Aufgrund von Wärmestrahlung kann der Innenraum durch das Kühlwasser beheizt oder gekühlt werden, wodurch bei einer von der Umgebungsabweichenden Kühltemperatur die Innenraum- nicht gleich der Umgebungstemperatur ist. 3. Unklar ist auch die Auswirkung der durch die Aerosoltröpfchen transportierten Wärmeenergie auf die Innenraumtemperatur des Reaktors.

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, induziert Ultraschall in dem zerstäubten Medium durch Anregung von Molekülbewegung, und der damit verbundenen Reibung, Wärme. Auch Kavitation und besonders in der Nahfeldzone lokal auftretende Temperaturmaxima (Kapitel 3.4.1) können auf temperaturempfindliche Moleküle, wie z.B. Proteine, einen denaturierenden Effekt haben und die Bioaktivität reduzieren. Diesen Effekten soll mit einer möglichst starken Kühlung der Piezokeramik und damit verbunden auch des

Mediums im Mediumreservoir entgegengewirkt werden. In Betracht dieser Einflüsse ist eine theoretische Vorhersage der Innentemperatur äußerst schwierig.

Neben der Temperaturverteilung im Reaktorrinnen, sind die Aufwärm- und Abkühlzeiten des Reaktors sowie der Einfluss der Kühlung und des Ultraschalls auf den Temperaturverlauf im Reaktor wichtige Faktoren, die bei der Planung von Prozessabläufen berücksichtigt werden müssen. Auf die Höhe und den benötigten Zeitraum bis zum Erreichen einer konstanten Innentemperatur des Reaktors haben drei Parameter Einfluss. Hierzu zählt der Energieeintrag des Ultraschalls, die Temperatur der Ultraschallkühlung und die Umgebungs- bzw. Inkubator Temperatur. Eine definierte Innentemperatur des Reaktors kann durch verschiedene Kombinationen der genannten Parameter erreicht werden.

Exemplarisch wurden im ersten Teil der Versuchsreihe drei Experimente durchgeführt, die den Einfluss auf die Reaktortemperatur durch das Zusammenspiel zwischen der Temperatur der Umgebung (Inkubator) und der US-Zerstäuber kühlung aufzeigten.

Im zweiten Teil der Versuchsreihe wurde der reine Einfluss des Ultraschalls auf die Temperatur innerhalb des Reaktors untersucht. Hierzu wurde der Nebelkammerreaktor bei 37 °C in den Inkubator überführt, wobei unterschiedliche Einstellungen für die Ultraschallkühlung getestet wurden. Ziel war es die in Kapitel 4.4.2.3 erhaltenen Ergebnisse, bei denen im Rahmen der Ermittlung des Wirkungsgrads der Wärmeeintrag der Zerstäuber in deionisiertes Wasser untersucht wurde, zu erweitern. Bedingt durch den experimentellen Aufbau konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die entstehende Wärme durch Verluste an der Piezokeramik oder durch schallinduzierte Reibungswärme im Medium entstehen. Durch die Ultraschallkühlung können die Wärmeverluste an der Piezokeramik eliminiert werden, die Wärmeentwicklung ist somit lediglich auf schallinduzierte Erwärmung zurückzuführen. Zusätzlich wurde im Rahmen der Experimente evaluiert, ob eine Ultraschallkühlung bei einer Weiterentwicklung des Nebelkammerreaktors notwendig ist (Kapitel 4.2.2) und veranschaulicht, welche Auswirkungen ein Ausfall der Kühlung hätte.

Ziel des dritten Teils der Versuchsreihe war es ein Abbild der Temperaturverteilung zu erhalten nachdem sich eine konstante Temperatur in dem gesamten Reaktorrinnenraum eingestellt hatte. Erstellt wurde ein Konturplot, der den Bereich mit einer optimalen Temperatur aufzeigt. Hieraus konnten Rückschlüsse für die Platzierung von Proben im Reaktor und mögliches Optimierungspotential bezüglich des Reaktordesigns identifiziert werden.

Für die Aufnahme von Aufwärm- und Abkühlkurven wurden stabförmige Pt100-Temperaturfühler verwendet. Die Erfassung der Daten erfolgte mit dem *LogMessage*-Datenlogger (Kapitel 4.35). Es wurde jeweils ein Temperaturfühler im Aerosol in der

Reaktormitte (Abbildung 4.31, S1) und im Mediumreservoir (Abbildung 4.31, S2) platziert.

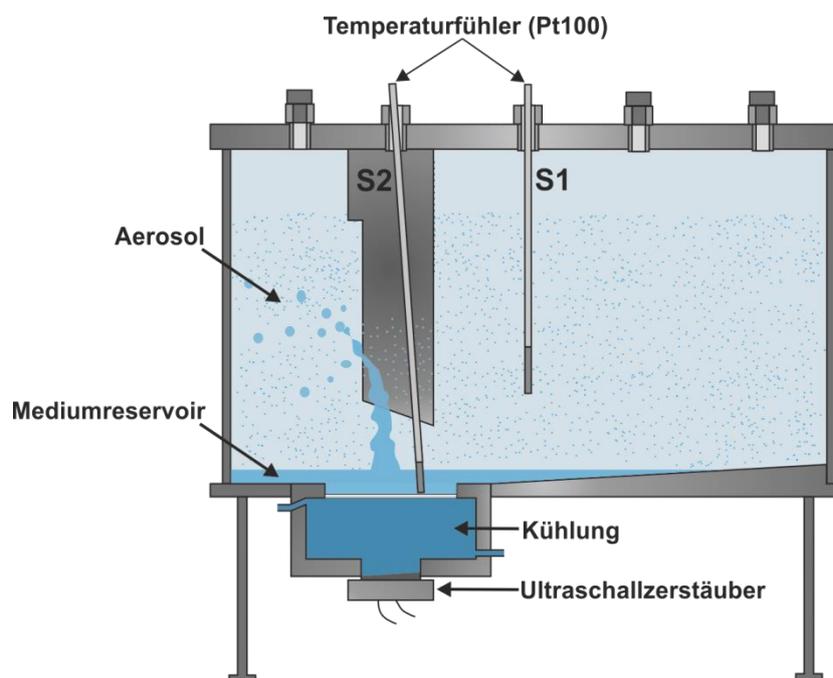


Abbildung 4.31: Messaufbau für die Aufnahme von Temperaturprofilen. Es wurde jeweils ein Pt-100-Temperaturfühler im Aerosol (S1) und im Mediumreservoir (S2) platziert.

Als zerstäubtes Medium wurden 150 ml deionisiertes Wasser eingesetzt. Zunächst wurde der Innenraum des Reaktors im Bereich des Sensors S1 (Abbildung 4.31) mit ausgeschaltetem US-Zerstäuber auf 37 °C geheizt (in Abbildung 4.32 und Tabelle 4.7 als TP1 bezeichnet). Zusätzlich wurde zwei unterschiedlichen Kombinationen der Temperatur des Inkubators und der US-Zerstäuber kühlung gewählt, um den Innenraum des Reaktors bei aktiviertem US-Zerstäuber auf 37 °C zu heizen. Aufgrund der Ergebnisse von Vorversuchen, wurde für eine minimale Temperaturdifferenz der Inkubator auf 38 °C und die US-Zerstäuber kühlung auf 33 °C (in Abbildung 4.32 und Tabelle 4.7 als TP2 bezeichnet) geregelt und für eine maximale Temperaturdifferenz der Inkubator auf 41,5 °C und die US-Zerstäuber kühlung auf 30 °C (in Abbildung 4.32 und Tabelle 4.7 als TP3 bezeichnet).

Die Temperaturaufzeichnung wurde mit der Überführung des Nebelkammerreaktors in den Inkubator gestartet. Nachdem sich eine konstante Temperatur an den beiden Messpunkten eingestellt hatte, wurde der Reaktor aus dem Inkubator entnommen und die Temperatur über die Zeit bis zur vollständigen Abkühlung aufgezeichnet. Die relevanten Parameter und Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

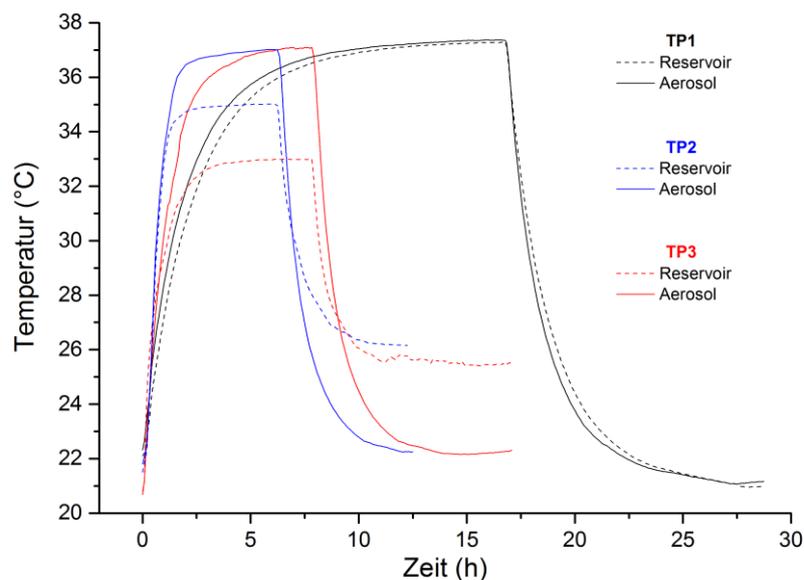


Abbildung 4.32: Aufnahme der Temperaturprofile des *NKR-Typ I* in Kombination mit dem US-Zerstäuber *AW-Typ I*. Aufgetragen sind die Temperaturprofile der Experimente TP1, TP2 und TP3 beim Aufheizen bis 37 °C und anschließender Abkühlung bei RT

In Abbildung 4.32 sind die Temperaturverläufe im Aerosol (blau) und Mediumreservoir (blau gestrichelt) für das Experiment TP2 dargestellt. Auffällig ist die Temperaturdifferenz zwischen den beiden Messbereichen. Während im Aerosol mit den gewählten Einstellungen 37 °C erreicht wurden, lag die Temperatur im Mediumreservoir bei maximal 35 °C und somit deutlich unter der für viele Biomoleküle kritischen Temperatur von 40 °C. Der Grund für die Temperaturdifferenz lag bei der US-Zerstäuberkühlung (auf 33 °C geregelt), die gleichzeitig den Reaktorboden und das Medium im Reservoir kühlt. Die angestrebten 37 °C wurden dabei im Aerosol (Reaktormitte) nach ca. 5,6 h erreicht, 36 °C bereits nach ca. 1,6 h. Werden hierzu vergleichend die Daten des Experiments TP3 hinzugezogen, zeigt sich eine stärkere Temperaturdifferenz zwischen Aerosol (Abbildung 4.32, rote Linie) und dem Reservoir (Abbildung 4.32, rot gestrichelte Linie) von 4 °C. Somit konnte belegt werden, dass trotz einer starken Kühlung des Mediums im Reservoir (33 °C) 37 °C im Aerosol realisiert werden können. Der Zeitraum bis zum Erreichen einer stabilen Temperatur war hier jedoch größer (37 °C im Aerosol nach ca. 7,5 h und 36 °C nach 3 h). Verglichen hierzu benötigt der Reaktor für das Aufheizen mit deaktiviertem US-Zerstäuber (TP1 (Abbildung 4.32, schwarze und schwarz-gestrichelte Kurve)) mit ca. 15 h auf 37 °C (7 h für 36 °C) deutlich länger. Eine vollständige Abkühlung des *NKR-Typ I* erfolgte mit allen Konfigurationen nach ca. 6 h. Aufgrund der höheren Temperatur der Ultraschallkühlung (33 °C bzw. 30 °C) der Experimente TP2/TP3 sank die Temperatur im Reservoir lediglich auf 26 °C/25,5 °C ab und war somit 4 °C/3,5 °C höher als in TP1 (22 °C = RT). Die Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Zur Ermittlung des reinen Einflusses des Ultraschalls auf die Temperatur im Reaktor wurden zwei ergänzende Experimente durchgeführt. Zunächst wurde der Inkubator, wie in Experiment TP3, auf 41,5 °C geregelt, die Ultraschallkühlung deaktiviert (in Abbildung 4.33 und Tabelle 4.7 als TP4 bezeichnet) und der Temperaturanstieg im Aerosol und Mediumreservoir bei eingeschaltetem US-Zerstäuber über die Zeit aufgezeichnet. Für das zweite Experiment wurden die Temperaturen des Inkubators und der US-Zerstäuberabkühlung auf 37 °C geregelt (in Abbildung 4.33 und Tabelle 4.7 als TP5 bezeichnet). Die Aufheizkurven sind in Abbildung 4.33 dargestellt.

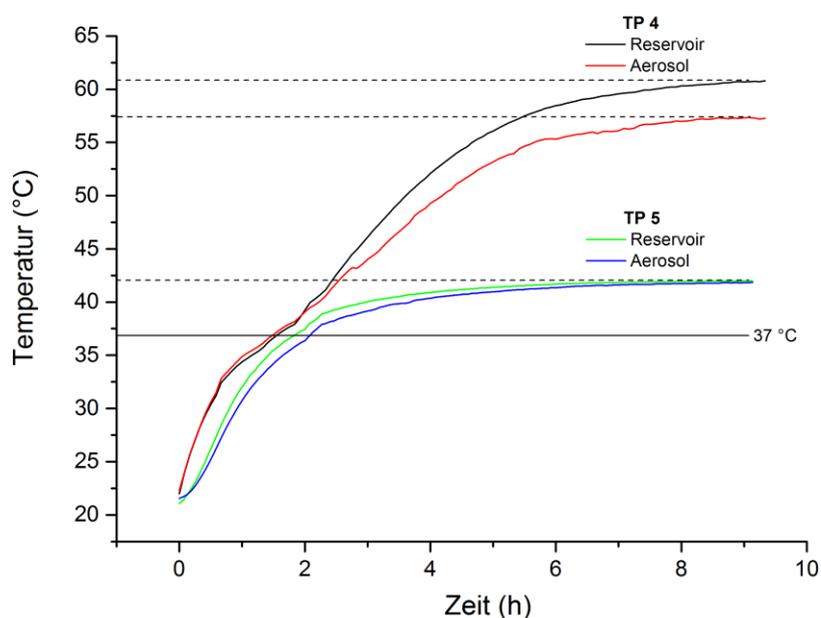


Abbildung 4.33: Aufnahme der Temperaturprofile des *NKR-Typ I* in Kombination mit dem US-Zerstäuber *AW-Typ I*. Aufgetragen sind die Temperaturprofile der Experimente TP4 und TP5 beim Aufheizen. Bestimmt wurde der Einfluss des Ultraschalls auf die Gesamttemperatur des Reaktors.

Durch die Deaktivierung der US-Zerstäuberabkühlung (Abbildung 4.33 / Tabelle 4.8, TP4) stieg die Temperatur im Aerosol innerhalb von 9 h auf ca. 57 °C und im Mediumreservoir auf 62 °C und lag somit um 20 °C bzw. 29 °C höher als mit auf 30 °C geregelter US-Zerstäuberabkühlung (siehe Abbildung 4.32 / Tabelle 4.8, TP3). Bei einer Regelung der Temperatur von Inkubator und US-Zerstäuberabkühlung auf 37 °C in Experiment TP5 (Abbildung 4.33 / Tabelle 4.8, TP5) stieg die Temperatur im Aerosol und im Mediumreservoir auf 42 °C nach 7 h.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Kühlung des Ultraschalls notwendig ist, um 1. die Temperatur des Reaktorinnenraums kontrollieren zu können und 2. eine Überhitzung des Mediums im Reservoir zu vermeiden.

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der relevanten Parameter und Ergebnisse der Experimente TP1-TP5. Alle Experimente wurden in einem Inkubator durchgeführt

Experiment	Temperatur Inkubator/ US-Zerstäuberkühlung	US- Zerstäuber	Temperatur Reservoir/Aerosol	36 °C / 37 °C erreicht nach
TP1	37 °C / 37 °C	Aus	37 °C / 37 °C	7 h / 15 h
TP2	38 °C / 33 °C	Ein	35 °C / 37 °C	1,6 h / 5,6 h
TP3	41,5 °C / 30 °C	Ein	33 °C / 37 °C	3 h / 7,5 h
TP4	41,5 °C / aus	Ein	62 °C / 57 °C	-
TP5	37 °C / 37 °C	Ein	42 °C / 42 °C	-

Für einen Überblick über die Temperaturverteilung innerhalb der Reaktorkammer, wurden fünf Pt100-Dünnschicht-Temperaturfühler zu einem Sensor-Array zusammengeschlossen und mit dem *LogMessage*-Datenlogger verbunden (Kapitel 8.1.1). Direkt unter dem Reaktordeckel wurde ein Drahtnetz gespannt, an dem das Array befestigt und eine genaue Positionierung der Sensoren an jeder beliebigen Stelle des Reaktors ermöglicht wurde. Der Abstand der Messpunkte zueinander betrug zwei Zentimeter in alle Raumrichtungen (Abbildung 4.34).

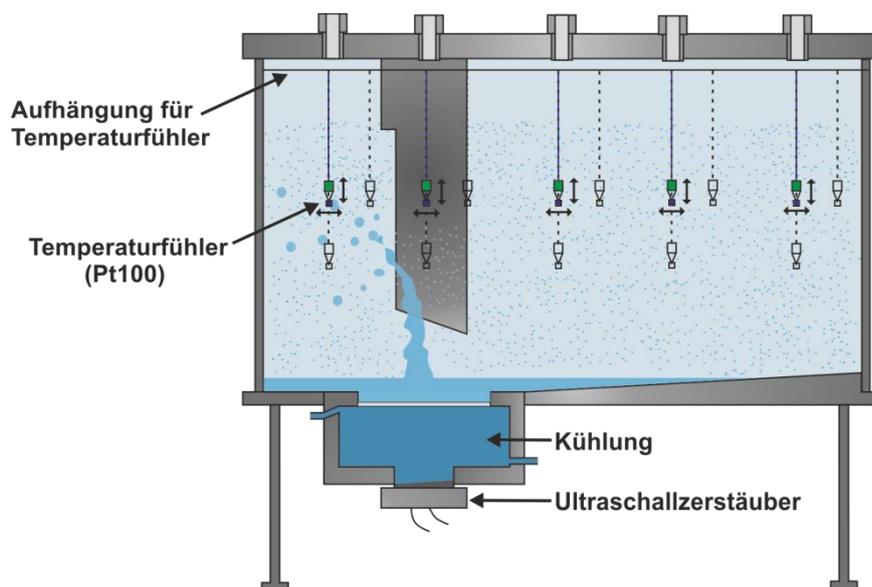


Abbildung 4.34: Messaufbau für die Bestimmung der Temperaturverteilung innerhalb der Reaktorkammer. Verwendet wurde ein Sensorarray aus fünf Pt-100-Temperaturfühlern, welches frei variierbar in der Reaktorkammer platziert werden konnte (gestrichelte Umrisse)

Die Aufnahme der Messwerte erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den Experimenten TP2 und TP3. Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse der Experimente zu Temperaturverteilung im weiteren Verlauf als TP2\* und TP3\* bezeichnet. Die Temperatur wurde an allen Punkten aufgezeichnet, nachdem sich eine konstante Temperatur eingestellt hatte. Aus den erhaltenen Messwerten wurde eine Matrix erstellt und Konturplots mit der Software *MatLab* generiert. Für die Darstellung wurden ein

horizontaler und ein vertikaler Schnitt durch die Mitte des Reaktors gewählt. In Abbildung 4.35 wurden die Konturplots in schematische Querschnitte des Reaktors eingepasst. Die Farbskala reicht von Blau bei relativ tiefen Temperaturen über Grün, Gelb, bis zu Rot bei höheren Temperaturen.

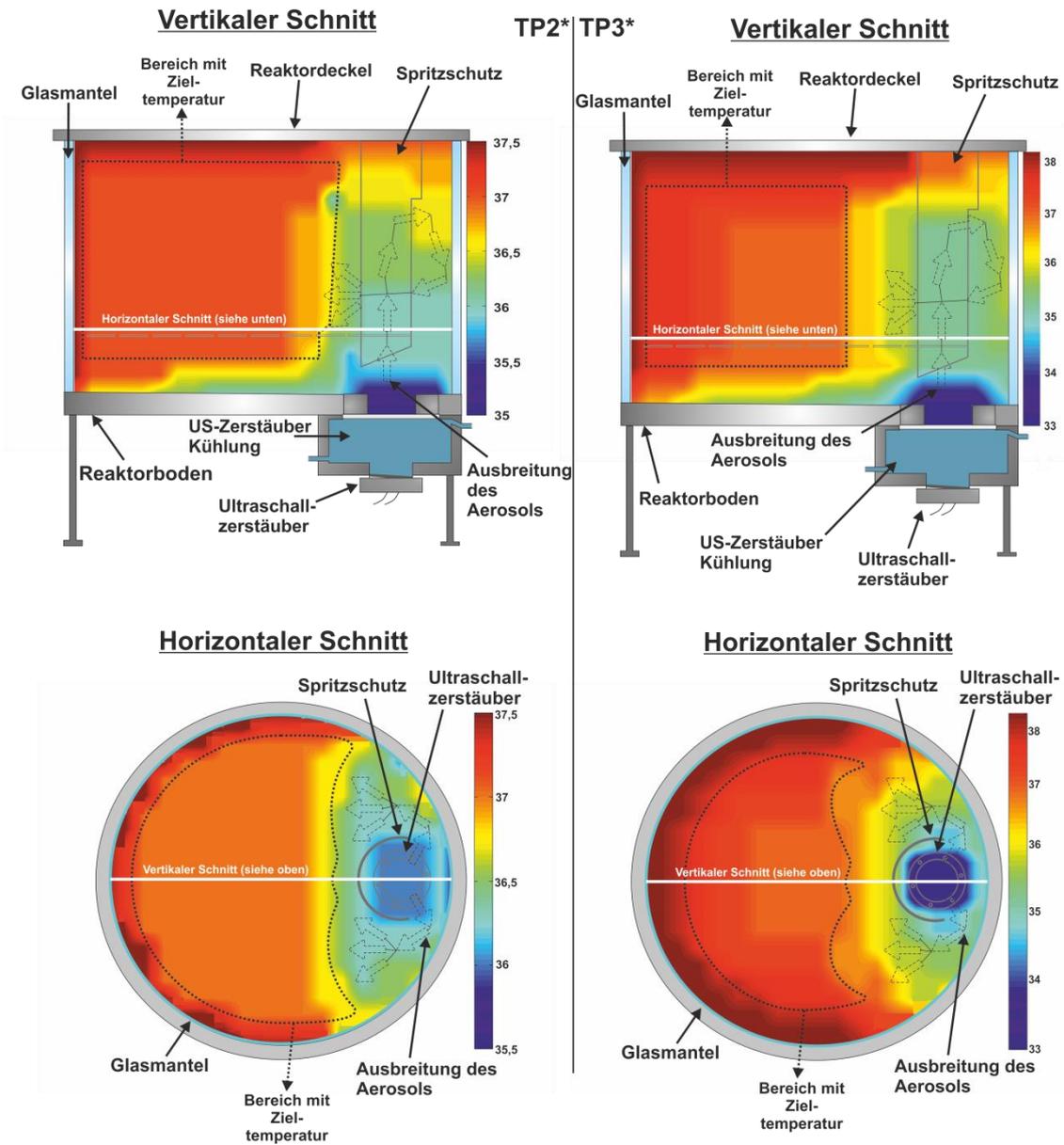


Abbildung 4.35: Darstellung der Temperaturverteilung innerhalb des *NKR-Typ I* während der Experimente TP2\* (links) und TP3\* (rechts). Es wurden in der gesamten Reaktorkammer im Abstand von 2 cm Messpunkte aufgenommen, aus denen mit der Software „MatLab“ ein Konturplot erstellt wurde. Die Abstufung der Farben von Rot bis Blau zeigt Bereiche hoher bzw. niedriger Temperatur an. Dargestellt ist für jedes Experiment ein vertikaler und ein horizontaler Schnitt (weiße Linie) durch den Reaktor. Die gestrichelten Pfeile stellen die Ausbreitungsbewegung des Aerosols dar, mit gestrichelter Linie ist der Bereich in dem die Zieltemperatur von 37 °C erreicht wurde markiert

Bei beiden Experimenten zeigt der vertikale Schnitt durch den Reaktor, dass die Temperatur im Bereich der Kühlung, über dem US-Zerstäuber, mit 33 °C bzw. 35 °C (Abbildung 4.35) am geringsten war. Der gesamte Reaktorboden wurde von der Ultraschallkühlung gekühlt, wodurch die direkte Umgebung eine geringere Temperatur als der Rest der Kammer aufwies. Die höchsten Temperaturen herrschten aufgrund der Umgebungs-/Inkubator Temperatur von 38 °C (TP2\*) bzw. 41,5 °C (TP3\*) mit 37,5 °C bzw. 39 °C an dem am weitesten von US-Zerstäuber entfernten Teil der Reaktorwand (siehe Horizontalschnitt in Abbildung 4.35) und am Reaktordeckel. In Abbildung 4.35 ist anhand von gestrichelten Pfeilen schematisch die Ausbreitungsbewegung der Aerosoltröpfchen dargestellt. Es wird deutlich, dass die durch die geringere Temperatur im Reservoir vorgekühlten Aerosoltröpfchen während ihrer Bewegung in das Innere der Reaktorkammer die über die Reaktorwände eindringende thermische Energie aufnehmen und schließlich soweit erwärmt wurden, dass sie die Zieltemperatur von 37 °C erreichten. Die Differenz der Größe der Bereiche zwischen den Experimenten TP2\* und TP3\* in denen konstant die Zieltemperatur (Abbildung 4.35 gestrichelte Linien) vorliegt beruht auf den Differenzen zwischen der Temperatur im Mediumreservoir und der Zieltemperatur. So müssen die frischen gebildeten Tröpfchen bei TP2\* um 2 °C und bei TP3\* um 4 °C erwärmt werden, wodurch eine längere Strecke für die Temperatureaufnahme der Tröpfchen benötigt wurde (siehe auch mathematische Begründung weiter unten). Zudem war bei dem Experiment TP3\* die Inkubator Temperatur deutlich höher, sodass nahe der Reaktorwände die Zieltemperatur um 1 °C überschritten wurde. Es lässt sich folgern, dass eine geringere Kühlung des Ultraschalls zwar zu einem größeren Anteil des Reaktorvolumens mit optimaler Temperatur führt, aber auch mit starker Kühlung des US-Zerstäubers die gewünschte Innentemperatur erzielt werden kann. Für spätere Experimente bzw. Kultivierungen sollten Proben und Temperaturfühler in den in Abbildung 4.35 markierten Bereichen platziert werden.

Die erzielten Ergebnisse lassen sich anhand des Wärmeübergangs in die kleinen Aerosoltröpfchen auch mathematisch begründen:

Der Wärmestrom  $q_A$  von der Umgebungsluft in ein Tröpfchen ist abhängig von dem Wärmeüberganskoeffizienten  $h$ , der Oberfläche des Tropfens  $A_T$  und der Temperaturdifferenz zwischen der Gasphase  $T_g$  und der Flüssigkeit des Tröpfchens  $T_T$ :

$$q_A = h \cdot A_T \cdot (T_g - T_T) \quad (14)$$

Die Gleichung setzt die Annahmen voraus, dass

die Temperatur des Tropfens  $T_T$  im Inneren homogen ist,

die Temperatur des Gases  $T_g$  homogen und konstant ist,

die Wärmestrahlung vernachlässigbar ist,

und die spez. Wärmekapazität  $c_T$  der Tröpfchenflüssigkeit konstant ist.

Für die sich aus dem Ultraschallrüssel lösenden Aerosoltröpfchen wurde eine relative Geschwindigkeit von 10 cm/s zu der Luft innerhalb des Reaktors angenommen. Über die Phasengrenzfläche findet somit ein Wärmeaustausch zwischen Luft und Tröpfchen (erzwungene Konvektion) statt. Zur Berechnung des Wärmestroms wird neben den bekannten Größen der Wert für den Wärmeübergangskoeffizienten benötigt. Dieser lässt sich für Tröpfchen nach Ranz und Marschall (1952) [81] über die dimensionslose Gleichung anhand der Nusselt-Zahl  $Nu$  berechnen:

$$Nu \equiv \frac{h \cdot x_T}{\lambda_g} = 2 + 0,6 \cdot Re^{\frac{1}{2}} \cdot Pr^{\frac{1}{3}} \quad (15)$$

mit  $Re$  als Reynolds-Zahl und  $Pr$  als Prandtl-Zahl. Wird für den Tröpfchendurchmesser der in Kapitel 4.4.1 bestimmte mittlere Tröpfchendurchmesser für den *AW-Typ I*-Zerstäuber von 3,73  $\mu\text{m}$  zu Grunde gelegt sowie eine relative Geschwindigkeit von 10 cm/s, ergibt sich für  $Re = 0,0294$  und  $Pr = 0,7077$ . Nach Formel 23 ergibt sich somit  $Nu = 2,08$  und durch umstellen  $h = 1,46 \cdot 10^4 \text{ W/m}^2\text{K}$ . Wird dieser Wert in Formel 15 eingesetzt und von einer Temperaturdifferenz zwischen den frischproduzierten Aerosoltröpfchen und der Luft an den Reaktorwänden ( $T_g - T_T$ ) = 4 K (siehe Abb. 234) ausgegangen, so ergibt sich ein Wärmestrom  $q_T = 2,55 \cdot 10^{-6}$  W pro Tröpfchen. Besonders aussagekräftig wird dieses Ergebnis, wenn es auf 0,5 ml Wasser, das als Aerosol mit einem Tröpfchendurchmesser von 3,73  $\mu\text{m}$  vorliegt, und einem Tröpfchen mit einem Volumen von 0,5 ml verglichen wird. Laut Tabelle 4.9 (Kapitel 4.5.2) liegen unter diesen Bedingungen  $18,4 \cdot 10^9$  Aerosoltröpfchen mit einer Oberfläche von 0,8043  $\text{m}^2$  vor, wodurch sich für das Aerosol ein theoretischer Wärmeübergangskoeffizient von  $q_{A,0,5 \text{ ml}} = 47052$  W ergibt. Für einen Tropfen mit einem Gesamtvolumen von 0,5 ml und einer Oberfläche von ca.  $3 \cdot 10^{-4}$   $\text{m}^2$  ergibt sich unter gleichen Bedingungen ein Wert von  $q_{T,0,5 \text{ ml}} = 0,02$  W. Die Begründung für diesen deutlichen Unterschied liegt in der geringen Reynolds-Zahl der Aerosoltröpfchen, was auf eine gleichmäßige laminare Umströmung hinweist, bei der ein Wärmeübergang effizienter stattfindet und in der signifikant größeren Gesamtoberfläche der Aerosoltröpfchen im Vergleich zum einzelnen Tropfen [81].

Für die Berechnungen dieser Werte wurden einige Annahmen gemacht, die zu einer starken Vereinfachung der tatsächlichen physikalischen Verhältnisse führt. Die Berechnungen unterstreichen jedoch die experimentell ermittelten Daten und liefern eine Bestätigung des guten Wärmetransports der Aerosoltröpfchen, ohne das Rührer oder aktive Begasung eingesetzt werden müssen.

#### Fazit:

Die Ergebnisse aus dem ersten Teil der Versuchsreihe zeigen, dass bei den Experimenten mit eingeschalteter Ultraschallzerstäubung (TP2 und TP3) eine deutlich schnellere

Einstellung (5,6 h bzw. 7,5 h) der gewünschten 37 °C in der Reaktormitte gegenüber dem Experiment (TP1) mit deaktivierter Zerstäubung (15 h) stattfand. Der Hauptgrund hierfür lag, wie rechnerisch belegt, bei dem effektiven Wärmeübergang (Abbildung 4.35) auf die Aerosoltröpfchen. Werden die erhaltenen Daten der Experimente TP2, TP3 und TP1 (Abbildung 4.32) zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.2.3 betrachtet, wird deutlich, dass ein erheblicher Anteil der von den US-Zerstäubern erzeugten Wärme (Abbildung 4.25) nicht durch Leistungsverluste an der Piezokeramik, sondern durch Reibungen bei schallinduzierten Molekülbewegungen in der Flüssigkeit, entsteht. Dabei ist die von dem US-Zerstäuber eingebrachte Energiemenge ausreichend, um das Medium im Reservoir und den gesamten Reaktorboden trotz Kühlung um ca. 5 °C (TP5), bezogen auf die Umgebungstemperatur, zu erhöhen. Bei deaktivierter Kühlung (TP4) stieg die Reaktortemperatur ca. 20 °C höher als die Umgebungstemperatur.

Die Kühlung des US-Zerstäubers ist somit notwendig um ein unkontrolliertes Aufheizen und die damit verbundene Gefahr einer thermischen Schädigung von Nährmediumbestandteilen zu minimieren. Die induzierte Wärme variiert, wie in Kapitel 4.4.2.3 gezeigt, bei unterschiedlichen US-Zerstäubern und ist, gestützt durch die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse, ein wichtiger Faktor zur Beurteilung der Eignung verschiedener US-Zerstäuber für den Einsatz im Nebelkammerreaktor (Kapitel 4.4.2).

Grundsätzlich konnte die Zieltemperatur in großen Bereichen des Reaktors stabil gehalten werden. Lediglich in der direkten Umgebung des US-Zerstäubers, des US-Rüssels und im frisch produzierten Aerosol traten Temperaturabweichungen auf. Anhand der Konturplots (Abbildung 4.35) konnten die Bereiche mit der konstanten Zieltemperatur und die geeigneten Stellen zur Platzierung von Proben und Sensoren ermittelt werden. Optimierungspotential lag bei der Reduzierung der Aufwärmzeiten des Reaktors. Aufgrund des hohen ultraschallinduzierten thermischen Energieeintrags empfahl sich zudem eine Reduzierung der Ultraschalleistung.

#### **4.6.2 Bestimmung des Sauerstoffeintrags anhand des volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten ( $k_{La}$ -Wert)**

Sauerstoff ist für Zellen und Mikroorganismen ein wichtiger Nährstoff und hat einen starken Effekt auf das Zellwachstum. Im Hinblick auf biotechnologische Prozesse ist besonders die geringe Löslichkeit von Sauerstoff in Zellkulturmedien ein problematischer Faktor. Im Gleichgewicht mit der Umgebungsluft liegt die Sauerstoffkonzentration bei nur ca. 0,2 mmol/l [2]. Somit ist die unzureichende Sauerstoffversorgung der Zellen, besonders bei hohen Zelldichten, häufig ein limitierender Faktor in Bioprozessen. Wie in Kapitel 4.5 beschrieben, ist die Begasung und somit die Sauerstoffversorgung der Zellen ein wichtiges Thema bei der Konstruktion und/oder Optimierung von Bioreaktoren. Die geringe Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Medien, wie auch die Empfindlichkeit vieler (tierischer) Zellen gegenüber Rühren und dem damit verbundenen Scherstress, sowie die

Gefahr der Schaumbildung und der Schädigung der Zellen durch platzende Bläschen bei der Begasung, stellen große Herausforderungen bei der Entwicklung von Bioreaktoren dar [121, 122].

Ziel des in dieser Arbeit getesteten Nebelkammerreaktors ist es diese Probleme durch ein neuartiges Konzept zu umgehen. Durch die Bildung eines Aerosols mittels Ultraschallzerstäubung wird die Phasengrenzfläche deutlich vergrößert, wodurch mehr Sauerstoff in das flüssige Medium diffundieren soll, um eine Sauerstofflimitation zu verhindern. Zudem soll durch das Benetzen von Proben durch die Aerosoltröpfchen konstant ein dünner Film aus Nährmedium die Proben bedecken, in dem schnell eine Sauerstoffsättigung erreicht werden kann. Die erhofften Vorteile des Nebelkammerreaktors in Bezug auf einen hohen und schonenden Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase wurden anhand der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente überprüft.

Zur Charakterisierung des Sauerstoffeintrags in die Flüssigphase wurde eine dreiteilige Versuchsreihe durchgeführt. Im ersten Teil wurde die Leistung des US-Zerstäubers variiert, um den Einfluss des Zerstäubens eines flüssigen Mediums auf den Sauerstoffeintrag in das Medium zu ermitteln. Die Leistungen wurden so gewählt, dass die einleitende Frage beantwortet werden konnte, welchen Anteil die Aerosoltröpfchen bei dem Sauerstoffeintrag in das System besitzen.

In dem zweiten Teil der Versuchsreihe sollte „kondensiertes“ Aerosol zusätzlich in einer auf dem Lochgitter in der Reaktorkammer platzierten Schale aufgefangen werden. In das aufgefangene „Kondensat“ kann Sauerstoff lediglich über Oberflächenbegasung und die Aerosoltröpfchen gelangen. Dieses soll zum einen weitere Auskunft über den Sauerstofftransport mittels Aerosoltröpfchen und zum anderen zur Sauerstoffversorgung von im Aerosol platzierter Proben geben.

In dem dritten Versuchsteil wurde mit einer gepulsten Zerstäubung eine alternative Betriebsart der US-Zerstäuber getestet, die eine Möglichkeit zur Reduktion der in die zu zerstäubenden Medien eingebrachten Ultraschallenergie eröffnete (Kapitel 4.6.2.2).

Zu Bewertung des Sauerstoffeintrags wurde in jedem Experiment der volumenbezogene Sauerstoffübergangskoeffizient ( $k_{La}$ -Wert) bestimmt, der in der Bioreaktortechnik häufig als Kennzahl für die Effizienz des Sauerstoffeintrags in flüssige Phase eines Bioreaktorsystems verwendet wird [123, 124] (ergänzende Informationen in Kapitel 8.2.1). Anhand des  $k_{La}$ -Werts lassen sich unterschiedliche Begasungssysteme und Bioreaktoren miteinander vergleichen. Zur Bestimmung des  $k_{La}$ -Werts wurde die Sulfit-Methode angewandt.

Von besonderem Interesse war es Rückschlüsse auf die Anteile der Oberflächenbegasung, des Ultraschallrüssels und der Aerosoltröpfchen auf den Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase zu erhalten. Hierzu wurde im ersten Teil der Versuchsreihe der  $k_{La}$ -Wert zunächst bei deaktiviertem US-Zerstäuber (Abbildung 4.36, reine Oberflächenbegasung)

und anschließend bei einer Leistung von 35,4 W (Abbildung 4.36, 2 (Ausbildung des Ultraschallrüssels ohne Aerosolproduktion)) und 39,5 W, 40,8 W und 47,6 W (Abbildung 4.36, 3-5) des US-Zerstäubers ermittelt.

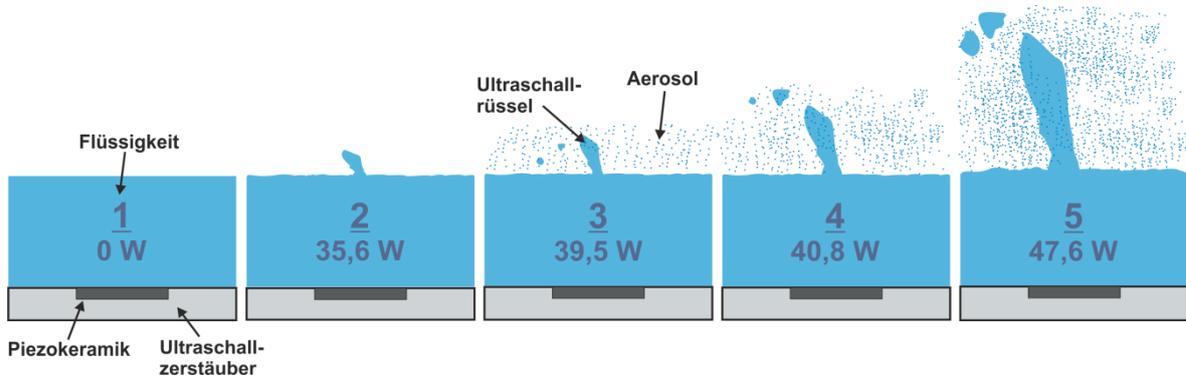


Abbildung 4.36: Schematische Darstellung des Ultraschallrüssels und der Aerosolproduktion bei den für die Bestimmung des  $k_La$ -Werts (Abbildung 4.38) gewählten Leistungen des US-Zerstäubers AW-Typ I

Die Messung des Gelöstsauerstoffs erfolgte über faseroptische Sensoren (*Oxy-4*) der Firma *PreSens* (Kapitel 8.1.2). Für den Einsatz der Sensoren in dem Nebelkammerreaktor wurden spezielle Sonden (Kapitel 8.1.3) angefertigt, die es ermöglichten den Sauerstoffpartialdruck an nahezu jeder Stelle des Reaktors (Flüssigphase, Aerosol und Gasphase) zu ermitteln. Die Messungen wurden jeweils im Mediumreservoir durchgeführt (Abbildung 4.37). Begast wurde indirekt über zwei Sterilfilter (Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ ).

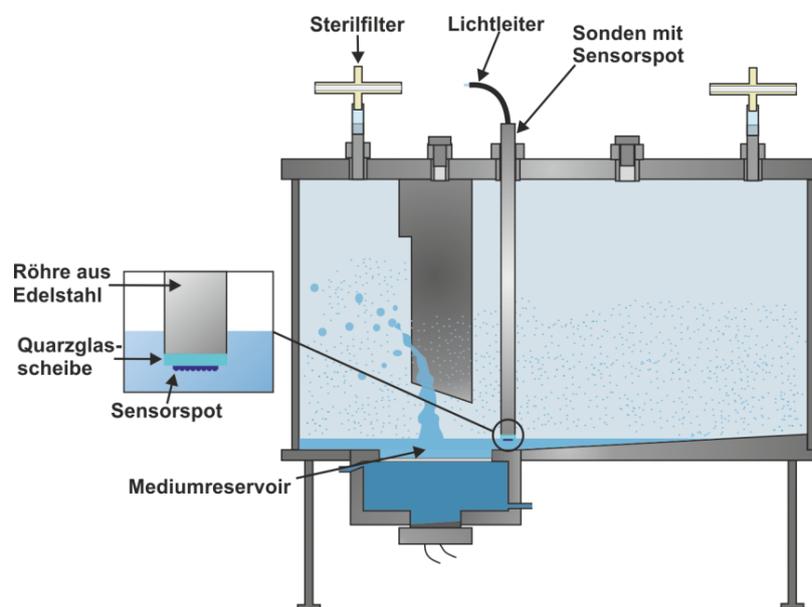


Abbildung 4.37: Schematische Darstellung des Messaufbaus zur Bestimmung der Effizienz des Sauerstoffübergangs in die flüssige Phase mithilfe einer speziell angefertigten Sonde für faseroptische Sensoren

Abbildung 4.38 zeigt die ermittelten  $k_La$ -Werte bei unterschiedlichen Leistungen des US-Zerstäubers. Für reine Oberflächenbegasung, d.h. bei ausgeschaltetem US-Zerstäuber, lag

der Wert bei  $1,65 \text{ h}^{-1}$ . Durch die Steigerung der Leistung bis zum Auftreten eines Ultraschallrüssels ohne Aerosolproduktion (Abbildung 4.36, 2) konnte ein Anstieg auf ca.  $6,7 \text{ h}^{-1}$  verzeichnet werden. Eine weitere Steigerung der Leistung führte zu einer Vergrößerung des Ultraschallrüssels und zu einsetzender Aerosolbildung (Abbildung 4.36, 3-5). Hierbei nahm der  $k_{La}$ -Wert bis zu einem Maximalwert von ca.  $39 \text{ h}^{-1}$  zu und war somit um den Faktor 24 höher als der Wert für reine Oberflächenbegasung.

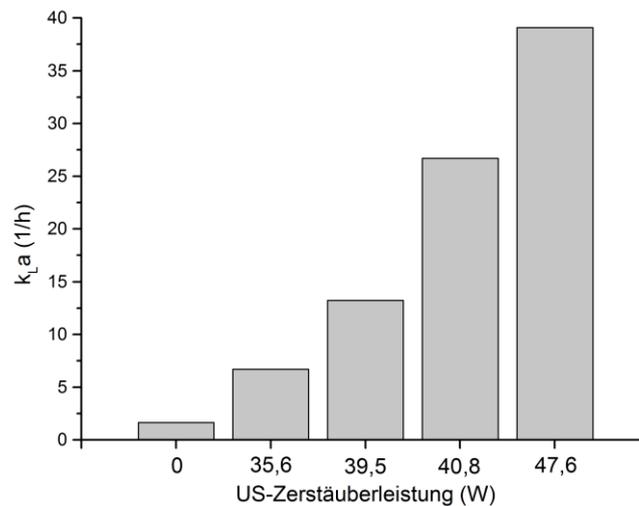


Abbildung 4.38: Auftragung der ermittelten  $k_{La}$ -Werte Nebelkammerreaktor in Abhängigkeit von der verwendeten Leistung des US-Zerstäubers.

Um den Sauerstofftransport mit dem Aerosoltröpfchen zu überprüfen, wurden kondensierte Aerosoltröpfchen auf einer Schale, mit einem Fassungsvermögen von 10 ml, aufgefangen (Abbildung 4.39). Das Experiment wurde mit zwei verschiedenen Einstellungen der Leistung des US-Zerstäubers, 37,42 W und 47,63 W, durchgeführt.

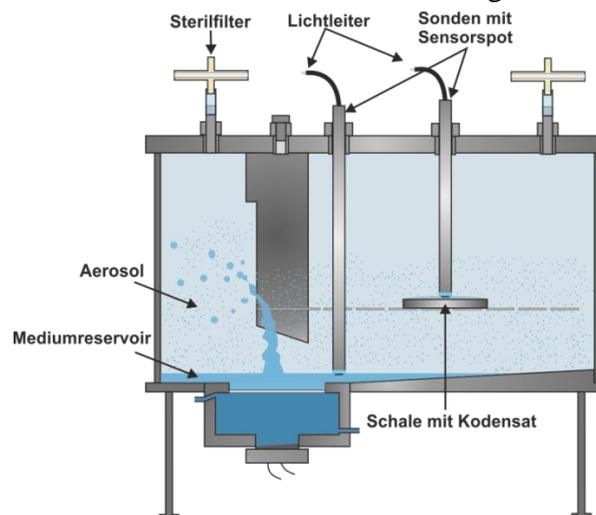


Abbildung 4.39: Schematischer Messaufbau zur Bestimmung der Effizienz des Sauerstoffeintrags in einer Schale aufgefangenem Aerosoltröpfchen

Es zeigte sich, dass die Natriumsulfidlösung als Aerosoltröpfchen zu der Schale transportiert wurde und dort kondensierte. Als die Schale komplett mit Flüssigkeit gefüllt war, erfolgte der Sauerstoffeintrag lediglich über Oberflächenbegasung und dem eingebrachten Sauerstoff über die Aerosoltröpfchen. Der  $k_{La}$ -Wert bei reiner Oberflächenbegasung der Schale betrug  $0,85 \text{ h}^{-1}$ , bei einer Leistung von  $37,42 \text{ W}$   $5,85 \text{ h}^{-1}$  und bei  $47,63 \text{ W}$   $14,38 \text{ h}^{-1}$  (Abbildung 4.40). Das Ergebnis belegt die Erkenntnisse aus dem ersten Teil der Versuchsreihe und zeigt, dass auch hier die Effizienz des Sauerstoffeintrags durch den Sauerstofftransport mit den Aerosoltröpfchen um das 17-fache gesteigert werden konnte. Es kann die wichtige Erkenntnis abgeleitet werden, dass im Aerosol platzierte Proben effektiv mit Sauerstoff versorgt werden.

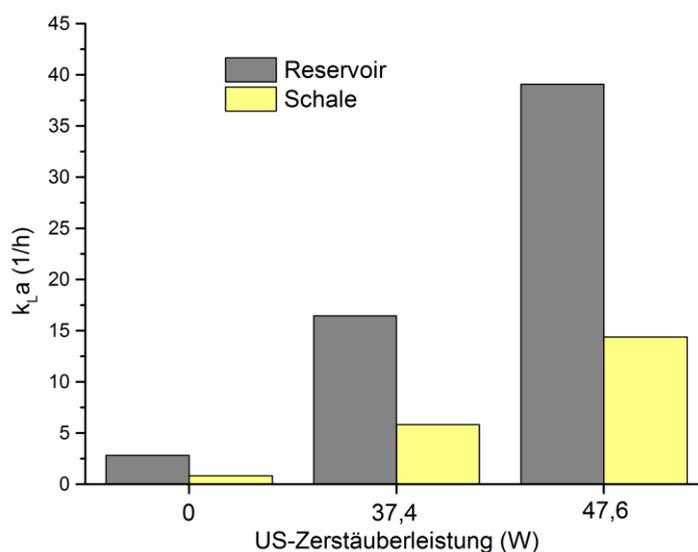


Abbildung 4.40: Auftragung der ermittelten  $k_{La}$ -Werte bei unterschiedlichen Leistungen des Ultraschallzerstäubers. Gemessen wurde im Mediumreservoir (grau) und im „Kondensat“ in einer im Aerosol platzierten Schale (gelb).

Zur Überprüfung der Auswirkungen einer gepulsten Ultraschallzerstäubung auf den Sauerstoffeintrag wurden in Vorversuchen verschiedene Einstellungen getestet. Gesucht wurde die Einstellung, bei der der US-Zerstäuber möglichst lange ausgeschaltet ist, der Reaktor jedoch konstant mit ausreichend Aerosol gefüllt ist. Diesen Kriterien entsprach die Einstellung „5 s an und 10 s aus“ (P 5 s / 10 s). Getestet wurde die gepulste Ultraschallzerstäubung bei einer Leistung des US-Zerstäubers von  $37,42 \text{ W}$  und  $47,63 \text{ W}$ . In Abbildung 4.41 sind die ermittelten  $k_{La}$ -Werte bei gepulster Zerstäubung und kontinuierlichem Betrieb gegen die US-Zerstäuberleistung aufgetragen. Es zeigt sich, dass die  $k_{La}$ -Werte durch die Pulsung (5 s / 10 s) der Ultraschallzerstäubung bei  $37,4 \text{ W}$  auf  $6,8 \text{ h}^{-1}$  und bei  $47,6 \text{ W}$  auf  $14,28 \text{ h}^{-1}$  sanken. Eine Abnahme der Werte war zu erwarten, da durch die gepulste Zerstäubung weniger Aerosol produziert wurde. Bei den gewählten Einstellungen der Pulsung ist der US-Zerstäuber ca. 30 % eines Zeitraums aktiviert.

Werden die Ergebnisse hinzugezogen fällt auf, dass sich der  $k_{La}$ -Wert ebenfalls um ca. 30 % verringerte.

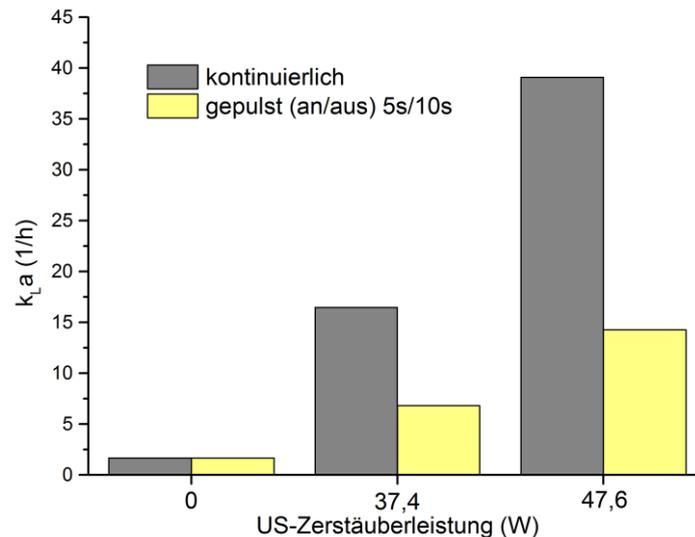


Abbildung 4.41: Auftragung der ermittelten  $k_{La}$ -Werte bei unterschiedlichen Leistungen des US-Zerstäubers im gepulsten (gelb) und kontinuierlichen Betrieb (grau)

Festzuhalten ist, dass zwar durch eine gepulste Zerstäubung im Verhältnis zu einer kontinuierlichen Zerstäubung die Effizienz des Sauerstoffübergangs in das flüssige Medium geringfügig niedriger war, jedoch relativ vergleichbare Werte lieferte und somit als alternative Betriebsform der US-Zerstäuber geeignet ist.

In dem folgenden Abschnitt werden die experimentellen Ergebnisse durch mathematische Berechnungen untermauert, mit anderen Bioreaktorsystemen verglichen und in ein Verhältnis zu dem Sauerstoffbedarf unterschiedlicher Zellen gesetzt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Aerosoltröpfchen für den effizienteren Sauerstoffeintrag in das System verantwortlich sind. Der geringe Tröpfchendurchmesser von einigen Mikrometern sorgt für eine signifikante Steigerung der Oberfläche des flüssigen Mediums. Zur Erklärung kann Formel 16 zur Berechnung des Stoffstroms  $\eta_{O_2}$  (hier bezogen auf Sauerstoff aus der Gas- in die Flüssigphase) herangezogen werden [125]:

$$\eta_{O_2} = k_L \frac{A_g}{V} (c^*_{O_2} - c_{O_2}) \quad (16)$$

$\eta_{O_2}$  ist proportional zum treibenden Konzentrationsgefälle ( $c^*_{O_2} - c_{O_2}$ ), mit  $c_{O_2}$  als Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit und  $c^*_{O_2}$  als Sättigungskonzentration für den Stofftransport und der Phasengrenzfläche  $A_g$  zwischen Gas und Flüssigkeit über die der Transport stattfindet. Als Proportionalitätsfaktor wird der Stofftransportkoeffizient  $k_L$

eingeführt. Die Phasengrenzfläche  $A_g$  steigt deutlich an wobei das Flüssigkeitsvolumen  $V$  konstant bleibt. Da  $A_g/V$  zusammengefasst als  $a$  in den  $k_L a$ -Wert einfließen und  $k_L$  und  $(c^*_{O_2} - c_{O_2})$  unverändert bleiben, muss  $a$  und somit auch der  $k_L a$ -Wert größer werden. Es folgt eine Steigerung des Sauerstoffstroms  $\eta_{O_2}$  aus der Gas- in die Flüssigphase. Eine weitere Möglichkeit der Steigerung des  $k_L a$ -Werts ist die Begasung mit reinem Sauerstoff. Es entsteht eine höhere Differenz der Sauerstoffkonzentrationen zwischen Gas- und Flüssigphase und somit die Steigerung der Triebkraft für die Diffusion durch die Phasengrenze. Diese wird durch den Ausdruck  $k_L(c^*_{O_2} - c_{O_2})$  beschrieben.

Eine weitere Erklärung des signifikant höheren  $k_L a$ -Werts durch die Zerstäubung ist die Sauerstoffdiffusion von der Gas- in die Flüssigphase. Anhand der in Kapitel 4.4.1 ermittelten mittleren Tröpfchengröße, der technischen Daten und den Messungen zur Aerosoldichte (Kapitel 4.4.3) lassen sich Berechnungen zur Sauerstoffdiffusion und der Oberfläche durchführen, zunächst müssen allerdings einige Annahmen gemacht werden. Laut technischem Datenblatt hat der Zerstäuber *AW-Typ I* eine Aerosolproduktionsrate von 0,125 ml/s. Durch die im Reaktor verbaute Edelstahlfolie wird dieser Wert leicht verringert. Werden die Sedimentationsrate aus den Aerosoldichtemessungen und die Verschmelzungen der Tröpfchen berücksichtigt, kann davon ausgegangen werden, dass in dem Reaktor im Gleichgewicht zwischen 0,3 ml und 0,5 ml des flüssigen Mediums als Aerosoltröpfchen vorliegen. Der experimentell bestimmte mittlere Tröpfchendurchmesser des US-Zerstäubers *AW-Typ I* beträgt 3,73  $\mu\text{m}$ , wobei Abbildung 4.17 zeigt, dass die Tröpfchen aufgrund ihres geringen Durchmessers komplett rund waren, wodurch die Formeln zur Berechnung des Volumens und der Oberfläche einer Kugel herangezogen werden können. Tabelle 4.8 fasst die auf diesem Weg berechneten Daten zusammen. Ein Aerosol mit einem Flüssigkeitsvolumen von 0,5 ml besteht demnach aus ca.  $18,5 \cdot 10^9$  Tröpfchen und hat eine Oberfläche von 8042  $\text{cm}^2$ , welches im Vergleich zu der nicht zerstäubten Flüssigkeitsoberfläche der mehr als 16-fache Wert ist.

Tabelle 4.8: Zusammenfassung der berechneten Werte bezüglich der Oberfläche, des Volumens und der Gesamtzahl der Aerosoltröpfchen. Als Grundlage diente der gemessene mittlere Tröpfchendurchmesser des *AW-Typ I* und die Aufnahmen der Aerosoltröpfchen mittels ISM (Kapitel 4.4.1). Da die Aerosoltröpfchen eine komplett runde Form zeigten, wurden die Formeln für die Berechnungen der physikalischen Größen einer Kugel herangezogen

<b>Mittl. Tröpfchendurchmesser <i>AW-Typ I</i></b>	0,000373 cm
<b>Oberfläche (1 Tröpfchen)</b>	$4,37 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2$
<b>Volumen (1 Tröpfchen)</b>	$2,72 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^3$
<b>Tröpfchen in 0,5 ml Aerosol</b>	$18,40 \cdot 10^9$
<b>Tröpfchen in 0,3 ml Aerosol</b>	$11,04 \cdot 10^9$
<b>Oberfläche der Tröpfchen 0,5 ml</b>	8043 $\text{cm}^2$
<b>Oberfläche der Tröpfchen 0,3 ml</b>	4826 $\text{cm}^2$
<b>Durchmesser <i>NKR-Typ I</i></b>	25 cm
<b>Oberfläche</b>	491 $\text{cm}^2$

Die Größe der Oberfläche/Phasengrenzfläche spielt eine entscheidende Rolle beim diffusiven Übergang des Sauerstoffs von der Gas- in die Flüssigphase, wobei unter gleichen Bedingungen der Stoffübergang bei einer größeren Oberfläche höher ist. Grundsätzlich folgt die molekulare Diffusion dem Fick'schen Gesetz:

$$J = -D \times \frac{dc}{dx} \quad (17)$$

Hier ist  $J$  der diffusive Flux, d.h. die Menge eines Stoffes, die sich über eine Flächeneinheit pro Zeit bewegt,  $D$  der Diffusionskoeffizient (temperaturabhängig und für jede Substanz und jedes Transportmedium verschieden) und  $dc/dx$  die Konzentrationsänderung über die Strecke  $x$ . Für gelösten Sauerstoff in Wasser bei 20°C beträgt  $D = 2,12 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Anhand des Diffusionskoeffizienten lässt sich zudem die Zeit errechnen, die ein Molekül benötigt um diffusiv eine bestimmte Distanz  $l$  zu überwinden [126]:

$$t = \frac{l^2}{2D} \quad (18)$$

Die Diffusionszeit steigt somit proportional zum Quadrat der Entfernung. Diffusion ist nur über sehr kleine Distanzen im Mikrometerbereich ein effektives Transportsystem. Tabelle 4.9 gibt einen Überblick über die theoretischen Diffusionszeiten. Andere Molekülbewegungen werden nicht berücksichtigt.

Tabelle 4.9: Theoretische Diffusionszeiten nach Formel 36 für ausgewählte Distanzen

Distanz $\mu\text{m}$	Zeit $\text{ms}$
1	0,236
<b>1,865</b>	<b>0,820</b>
5	5,896
10	23,58
100	2358
1000	235849
1.000.000	$2,36 \cdot 10^{11}$

Es wird ersichtlich, dass bis zu einer Distanz von 10  $\mu\text{m}$  eine Diffusionszeit im Millisekundenbereich benötigt wird. Ab einer Distanz von 100  $\mu\text{m}$  steigt die benötigte Zeit in den Sekundenbereich, für einen Meter wären ca. 7,5 Jahre erforderlich. Der mittlere Radius der Aerosoltröpfchen beträgt 1,865  $\mu\text{m}$ . Mit Hilfe des Radius kann die theoretische Zeit (0,82 Millisekunden) berechnet werden, die ein Sauerstoffmolekül benötigt um bis

zum Mittelpunkt des Tröpfchens zu diffundieren. Unter der Annahme, dass die Tröpfchen von allen Seiten gleichmäßig mit der sauerstoffhaltigen Gasphase in Kontakt stehen, sollte theoretisch nach 0,82 ms die maximal lösliche Menge Sauerstoff in einem wässrigen Medium erreicht sein.

Die theoretischen Berechnungen und die experimentell ermittelten Werte beweisen, dass durch die geringe Tröpfchengröße im Mikrometerbereich ein signifikant erhöhter Sauerstoffeintrag in das System stattfindet. Begründet ist dieser Effekt mit der Oberflächenvergrößerung der Flüssigkeit durch Zerstäuben und die geringen Diffusionszeiten des Sauerstoffs in die Tröpfchen. Es kann davon ausgegangen werden, dass jedes Aerosoltröpfchen in unter einer Mikrosekunde komplett mit Sauerstoff gesättigt ist. Die gesetzten Ziele bei der Planung des Nebelkammerreaktors konnten somit erreicht und ein hoher Sauerstoffeintrag ohne Rühren und aktiver Begasung realisiert werden.

In mikrobiellen Bioprozessen (z.B. Kultivierung von *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae*) werden hohe Zelldichten erzielt, aus denen hohe Sauerstoffaufnahmeleistungen resultieren. Für diese Anwendungsgebiete werden Bioreaktoren mit  $k_{La}$ -Werten im Bereich von 100-400 h<sup>-1</sup> benötigt [127]. Tierische und humane Zellen sind hingegen häufig deutlich empfindlicher gegenüber starkem Rühren und der Begasung mit Blasen. Der entstehende mechanische Stress kann die Zellen schädigen oder zerstören. Die Sauerstoffaufnahme dieser Zellen ist meist deutlich geringer, als die von Mikroorganismen. Daher werden typischerweise Bioreaktorsysteme mit  $k_{La}$ -Werten zwischen 1 und 25 h<sup>-1</sup> benötigt. Das Hauptaugenmerk wird hier auf die Entwicklung von Systemen zur schonenden Begasung gelegt.

In den meisten Bioreaktorsystemen werden hohe  $k_{La}$ -Werte durch hochentwickelte Rührer und Begasungssysteme realisiert, wobei die Begasung zumeist vom Reaktorboden aus stattfindet. Durch den Rührer werden die Gasblasen zerkleinert und schnell im Reaktor verteilt, so dass eine große Kontaktfläche und ein schneller Gasaustausch zwischen Gas- und Flüssigphase entstehen. In Tabelle 4.10 sind der  $k_{La}$ -Wert des Nebelkammerreaktors und die Werte verschiedener Bioreaktoren zur Kultivierung von tierischen und humanen Zellen zusammengefasst.

Tabelle 4.10: Auftragung des  $k_La$ -Werts verschiedener Bioreaktoren in Abhängigkeit von Volumen und Begasungsart im Vergleich zu den ermittelten Werten des Nebelkammerreaktors [128-136].

Kultursystem	Volumen	Schütteln/Rühren	Begasungsart	$k_La$ ( $h^{-1}$ )
<i>Nebelkammerreaktor</i>	<b>0,15 l</b>	-	<b>Oberflächenbegasung</b>	<b>39</b>
<i>50 ml Tubes</i>	0,01 – 0,02 l	180 - 220 rpm	Oberflächenbegasung	5 - 100
<i>1 l Tubes</i>	0,2 - 0,4 l	110 – 120 rpm	Oberflächenbegasung	5 - 30
<i>250-ml Erlenmeyerkolben</i>	0,1 l	100 rpm	-	5
<i>Spinner-Flasche</i>	1 l		Oberflächenbegasung	1
<i>Superspinner-Flasche</i>	0,7 l	35 rpm	Oberflächenbegasung	0,4
			Membranbegasung	1,9 - 4
<i>Rührkessel-Reaktor</i>	1,5 l	175 rpm	Membranbegasung	5,2
	5 l	100 rpm	Blasenbegasung	10
	5 l	100 rpm	Mikrosparger	50
<i>Gerührter disposable Bioreaktor</i>	10 l	200 rpm	Blasenbegasung	15
	50 l	200 rpm	Mikrosparger	8,34
	250 l	100 rpm	Mikrosparger	7 - 15
<i>Wave Bioreaktor</i>	1 - 100 l	24 - 35 rpm	Oberflächenbegasung	4 - 20

Aus Tabelle 4.10 können drei mit der Theorie übereinstimmende Feststellungen abgeleitet werden:

Je geringer das eingesetzte Flüssigkeitsvolumen, desto höher der  $k_La$ -Wert. Bei geringen Volumina kann leichter eine große Oberfläche in Bezug auf das Gesamtvolumen erzielt werden. Zudem muss der Sauerstoff über geringere Strecken diffundieren um die Flüssigkeit komplett zu sättigen.

Reine Oberflächenbegasung ohne Rühren führt zu den geringsten  $k_La$ -Werten und je stärker gerührt wird, desto höher der  $k_La$ -Wert. Wie in Tabelle 4.9 dargestellt, wächst die Diffusionszeit im Quadrat mit der zurückgelegten Strecke. Ohne Rühren dringt Sauerstoff in die ersten Mikrometer der Flüssigkeit schnell ein, für die restliche Flüssigkeit findet eine sehr langsame Sättigung statt. Durch Rühren wird

die schnell gesättigte oberste Flüssigkeitsschicht ständig durchmischt und ausgetauscht, so dass ständig ein hoher Sauerstoffkonzentrationsunterschied herrscht, wodurch ein starker Stoffübergang stattfindet. Durch die Bewegung des Mediums wird zudem Sauerstoff in die unteren Mediumschichten getragen.

Je kleiner die Blasen bei der Begasung, desto höher der  $k_{La}$ -Wert. Kleinere Blasen bedeuten eine größere Phasengrenzfläche bei gleichem Gasvolumen, wodurch der  $k_{La}$ -Wert steigt. Durch blasenfreie Membranbegasung kann durch Quasivergrößerung der Phasengrenzfläche ebenfalls höhere  $k_{La}$ -Werte als bei der reinen Oberflächenbegasung erzielt werden

Diese Feststellungen lassen sich zwar nicht auf jedes System übertragen, zeigen jedoch deutliche verwertbare Trends auf. Zieht man vergleichend den  $k_{La}$ -Wert von  $39 \text{ h}^{-1}$  des Nebelkammerreaktors hinzu, wird deutlich, dass kein anderes Kultursystem  $k_{La}$ -Werte in dieser Höhe ohne Rühren/Schütteln oder aktive Begasung erreicht. Einzig die Systeme mit sehr geringen Volumina zwischen  $100 \mu\text{l}$  und  $10 \text{ ml}$  (z.B. Tubes) bieten bei starkem Schütteln vergleichbare Werte. Eine weitere Möglichkeit bei höherem Flüssigkeitsvolumen zu einem ähnlichen  $k_{La}$ -Wert zu gelangen ist Rühren und Begasung über Mikrosparger (Rührkessel-Bioreaktor). Die Systeme haben den Nachteil, dass sie durch die geringen Volumina und somit auch geringen Zellzahlen ausschließlich für Kultivierungen im kleinen Maßstab geeignet sind. Zudem wird durch das Schütteln Stress auf die Zellen ausgeübt. Wie schon in Kapitel 4.1 beschrieben, können Rühren und Blasenbegasung einen erheblichen Stress auf Zellen ausüben und zu Schädigungen führen, wodurch diese Form der Kultivierung nicht für alle Zellsysteme geeignet ist. Die Bestimmung des  $k_{La}$ -Werts erlaubt die Berechnung der Sauerstofftransportrate (OTR) (Kapitel 8.2.1) in das flüssige Medium. Werden die bekannten Sauerstoffaufnahmeleistungen von Zellen hinzugezogen lässt sich berechnen, wie viele Zellen in dem *NKR-Typ I* in Verbindung mit dem *AW-Typ I* theoretisch mit Sauerstoff versorgt werden können. In Tabelle 4.11 sind die Werte für verschiedene Zelllinien zusammengefasst. Aufgeführt sind einige weit verbreitete adhärenz Zellen, für deren Kultivierung der Nebelkammerreaktor primär ausgelegt ist. Alle Werte der OTR sind auf die experimentell bestimmten  $k_{La}$ -Werte und  $150 \text{ ml}$  Medium bezogen. Es muss beachtet werden, dass es sich um idealisierte Werte handelt, die unter realen Bedingungen abweichen können.

Wie Tabelle 6 zeigt, könnten durch den Sauerstofftransport in das flüssige Medium bei einem  $k_{La}$ -Wert von  $39 \text{ h}^{-1}$  theoretisch zwischen  $0,68$  und  $11,3$  Milliarden adhärenz Säugetierzellen mit Sauerstoff versorgt werden. Wachsen diese Zellen in einem Monolayer, entspricht dieses einer Fläche von  $1,19$  bis  $7,25 \text{ m}^2$ . Selbst bei der Einstellung mit dem geringsten Sauerstoffeintrag könnten  $0,2$  bis  $1,26 \text{ m}^2$  adhärenz wachsende Säugetierzellen ohne die Gefahr einer Sauerstofflimitierung versorgt werden. Diese Daten belegen

eindrucksvoll die hohe Effektivität des Sauerstoffeintrags als eine der Stärken des Nebelkammerreaktors.

Tabelle 4.11: Theoretische maximale Zellzahlen und –dichten verschiedener adhärenter Säugerzelllinien im Nebelkammerreaktor. Berechnungsgrundlage sind die Sauerstoffaufnahmeleistungen [2, 137, 138] der Zellen und die maximale und minimale ermittelte OTR.

	HeLa	CHO-K1	BHK-21	Melanoma
<b>Sauerstoffaufnahmeleistung</b> $q_{O_2}$ [mmol/(cell·h)]	$5 \cdot 10^{-10}$	$5 \cdot 10^{-10}$	$1,5 \cdot 10^{-10}$	$2,5 \cdot 10^{-9}$
<b>Zelldichte</b> [cells/cm <sup>2</sup> ]	$5,71 \cdot 10^4$	$1,25 \cdot 10^5$	$1,56 \cdot 10^5$	$5,71 \cdot 10^4$
<b>maximale Zellzahl</b> $k_{LA}$ -Wert $39 \text{ h}^{-1}$	$3,40 \cdot 10^9$	$3,40 \cdot 10^9$	$1,13 \cdot 10^{10}$	$6,80 \cdot 10^8$
<b>maximale Zellzahl</b> $k_{LA}$ -Wert $6,8 \text{ h}^{-1}$	$5,89 \cdot 10^8$	$5,89 \cdot 10^8$	$1,96 \cdot 10^9$	$1,18 \cdot 10^8$
<b>maximale mit Zellen besiedelte Fläche (monolayer)</b> [m <sup>2</sup> ] $k_{LA}$ -Wert $39 \text{ h}^{-1}$	5,95	2,72	7,25	1,19

#### Fazit:

Die Bestimmung der Effizienz des Sauerstoffübergangs anhand des  $k_{LA}$ -Werts bestätigte die Theorie, dass der hauptsächliche Sauerstoffübergang an der Phasengrenzfläche der Aerosoltröpfchen stattfindet und im Aerosol platzierte Proben effektiv mit Sauerstoff versorgt werden können. Zusätzlich konnte eine Vergleichbarkeit des Nebelkammerreaktors mit anderen Bioreaktoren hergestellt werden.

Im ersten Teil der Versuchsreihe konnte ein deutlicher Anstieg des  $k_{LA}$ -Werts, und somit der Effizienz des Sauerstoffübergangs, bei steigenden Leistungen des US-Zerstäubers, welches mit einer höheren Aerosolproduktion einhergeht, gemessen werden. Verglichen mit der reinen Oberflächenbegasung bei ausgeschaltetem US-Zerstäuber konnte bei voller Leistung eine 23,5-fache Steigerung des  $k_{LA}$ -Werts erreicht werden. Rechnerisch konnte gezeigt werden, dass der erhöhte Sauerstoffübergang durch die 10- bis 20-fache Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche aufgrund der Bildung von Tröpfchen mit Durchmessern von wenigen Mikrometern und eine schnelle Sauerstoffsättigung der Tröpfchen ermöglicht wird. Wie die Ergebnisse zeigen, spielt auch die Vergrößerung der Oberfläche und die Bewegung bzw. Durchmischung des Mediums durch die Ausbildung des Ultraschallrüssels eine Rolle. Allerdings ist diese deutlich geringer und trägt nur ca. 13 % zum gesamten Sauerstoffeintrag bei. Durch Auffangen des „Kondensats“ in einer Schale konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine erhebliche Menge des Sauerstoffs über die Aerosoltröpfchen transportiert wird. Verglichen mit der reinen Oberflächenbegasung der Schale bei deaktiviertem US-Zerstäuber stieg der Wert um das 17-fache. Im Aerosol

platzierte Proben können somit über die Tröpfchen sehr effektiv mit Sauerstoff versorgt werden.

Durch Pulsung der Zerstäubung sanken wie erwartet die  $k_{La}$ -Werte, da weniger Aerosol pro Zeit produziert wird. Auffällig ist hierbei, dass der  $k_{La}$ -Wert im gleichen Verhältnis ebenfalls ca. 30 % des Referenzwerts beträgt. Die Höhe des  $k_{La}$ -Werts hängt somit direkt von der Menge des produzierten Aerosols ab. Verglichen mit anderen Bioreaktor-Systemen, die ohne Rührer und aktive Begasung bei einem Reaktorvolumen von über einem Liter arbeiten, konnten mit dem Nebelkammerreaktor teilweise um ein vielfaches höhere Werte erzielt werden. Mit dem eingebrachten Sauerstoff könnten theoretisch bis zu  $10^{10}$  Säugerzellen versorgt werden. Für die meisten Kultivierungen würde eine Verminderung des  $k_{La}$ -Werts, z.B. durch Verringerung der Leistung des US-Zerstäubers oder eine gepulste Zerstäubung somit zu keiner Sauerstofflimitierung führen.

### 4.6.3 Einfluss des Ultraschallzerstäubens und auf den pH-Wert des Nährmediums DMEM

Ein Nährmedium für Säugerzellen sollte neben allen wichtigen Nährstoffen für das Zellwachstum eine gewisse Pufferkapazität besitzen, um den pH-Wert zu stabilisieren (pH Optimum meist bei 7,0-7,3) und eine passende Osmolalität bieten um Schädigungen an der Zellmembran zu verhindern. Unter anderen Salzen sind ein oder mehrere Puffersysteme (Natrium-Phosphate-Puffer, HEPES und/oder Bicarbonat) enthalten um den pH-Wert zu regulieren [2]. Der Carbonat-Puffer funktioniert wie das Hauptpuffersystem im menschlichen Blut, wobei Kohlenstoffdioxid nach folgender Teilgleichung eine entscheidende Rolle spielt:



Der pH-Wert eines mittels Carbonat-Puffer gepufferten Mediums (z.B. DMEM) wird über den  $CO_2$ -Gehalt der Umgebungsluft reguliert. Dieser wird üblicherweise auf 5%  $CO_2$  bei 37 °C in der Gasphase geregelt und hält somit den pH-Wert eines unverbrauchten Nährmediums beim pH-Optimum. Wird dieser Wert nach oben gezeigten Gleichgewicht unterschritten steigt der pH-Wert im Medium. Dieser Zusammenhang ermöglicht die indirekte Messung des  $CO_2$ -Eintrags bzw. des  $CO_2$ -Anteils im Reaktor über den pH-Wert des Nährmediums. Anhand der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente sollte neben der Auswirkung des Ultraschallzerstäubens auf den pH-Wert in einem Nährmedium, die Effektivität verschiedener Begasungsmöglichkeiten überprüft werden.

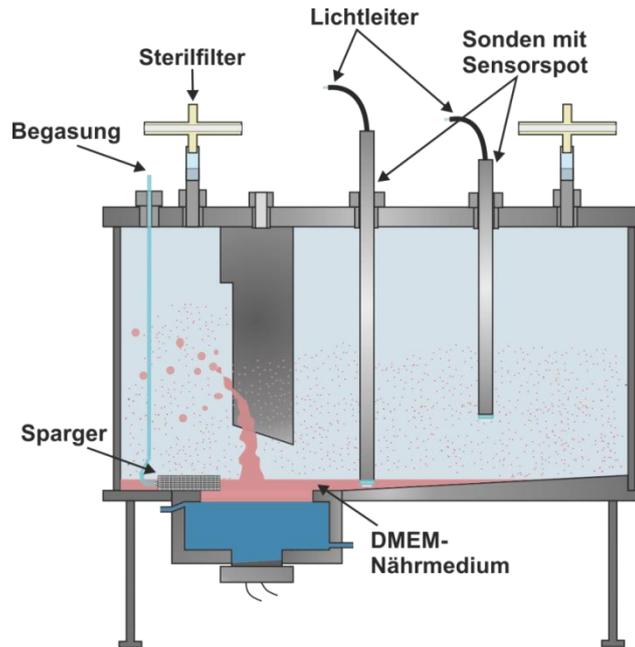


Abbildung 4.42: Schematischer Messaufbau zur Bestimmung des pH-Werts

Aufgrund der flexiblen Einsetzbarkeit (Kapitel 8.1.1) wurden alle Messungen zum pH-Wert mit optischen Sensoren durchgeführt.

Für die Experimente wurde der Reaktor mit 150 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) befüllt. Es wurden zwei Sensoren so platziert, dass einer in das Mediumreservoir am Boden des Reaktors taucht, der zweite wurde im Aerosol positioniert (Abbildung 4.42). Der Verlauf des pH-Werts wurde mit verschiedenen Varianten der Begasung getestet (1 Sterilfilter, 2 Sterilfilter und aktive Begasung über Membranpumpe und Sparger). Die Experimente wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in der Gasphase durchgeführt.

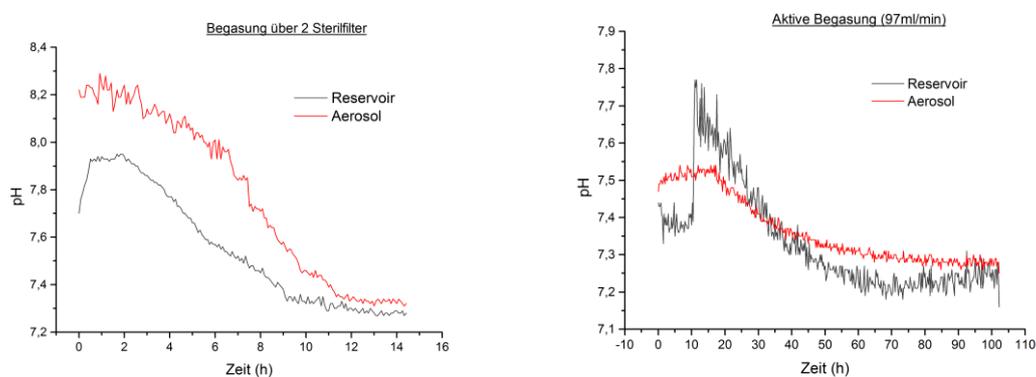


Abbildung 4.43: Auftragung des gemessenen pH-Werts im Reservoir (grau) und Aerosol (rot) gegen die Zeit des Zellkulturmediums DMEM (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>). Rechts: Bei einer passiven Begasung über 2 Sterilfilter. Links: Bei einer aktiven Begasung über einen im Mediumreservoir platzierten Sparger mit einer Pumprate von 97 ml/min

In Abbildung 4.43 sind die Ergebnisse der Messung mit Begasung über zwei Sterilfilter (passiv) und mit an einen der Filter angeschlossenen Pumpe (aktiv), über die Inkubatorluft mit einer Pumprate von 97 ml/min in den Reaktorinnenraum gepumpt wurde, dargestellt. Aufgetragen ist der gemessene pH-Wert im Aerosol und Mediumreservoir gegen die Zeit.

Zu Beginn der Experimente stieg der pH-Wert im Mediumreservoir zunächst an und sank dann auf den Zielwert von pH-Wert ca. 7,3 für DMEM (bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>) ab. Der pH-Wert im Aerosol lag bei allen Messungen zunächst höher, sank anschließend ebenfalls auf einen Wert von ca. 7,3. Deutliche Unterschiede waren in der Geschwindigkeit der Einstellung des pH-Werts (1 Sterilfilter 38,5 h, 2 Sterilfilter 11,5 h, aktive Begasung 1h) und der pH-Wert-Differenz über den betrachteten Zeitraum ( $\Delta\text{pH}$  zwischen 0,5 und 1) zu erkennen. Die relevanten Daten der Messungen sind in Tabelle 4.12 zusammengefasst.

Tabelle 4.12: Zusammenfassung der Messdaten zur Entwicklung des pH-Werts während der Zerstäubung des Zellkulturmediums DMEM (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>)

<i>NKR-Typ I</i>	Passiv (1 Sterilfilter)	Passiv (2 Sterilfilter)	Aktiv (97 ml/min)
pH konstant nach [h]	38,5	11,5	1
max. pH-Wert	9,1	8,3	7,8
$\Delta\text{pH}$	1,8	1	0,5

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.5.2 zeigten eine hohe Sauerstofftransferrate und schnelle Sättigung der Aerosoltröpfchen mit Sauerstoff. Da sich die Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff ( $D_{O_2} = 2,12 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) und Kohlenstoffdioxid ( $D_{CO_2} = 1,8 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) [126] nicht signifikant unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass der Eintrag von Kohlenstoffdioxid in wässrige Lösungen ähnlich effektiv ist wie der von Sauerstoff. Dass sich die Zeiten für die Anpassung des pH-Werts deutlich unterschieden, hing daher wahrscheinlich mit der Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> im Reaktorinnenraum zusammen. Da Kohlenstoffdioxid bei 37°C (1,7 kg/m<sup>3</sup>) eine höhere Dichte als Luft (1,2 kg/m<sup>3</sup>) besitzt, konnte aufgrund der größeren Austauschfläche mit der Erhöhung der Anzahl von Sterilfiltern mehr Kohlenstoffdioxid aus dem Inkubatorinnenraum über die Filter im Deckel des Reaktors absinken. Eine Erklärung für die anfänglich hohen pH-Werte der Messungen ist die in Kapitel 3.4.3 beschriebene Entgasung von Flüssigkeiten mittels Ultraschall. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration war zu Beginn der Messungen in der Gasphase des Reaktors und in der Mediumvorlage noch gleich die der normalen Umgebungsluft (ca. 0,038%). Als durch den Ultraschall zu Beginn der Messung das gelöste Kohlenstoffdioxid aus dem Medium getrieben wurde, verschob sich das Gleichgewicht der Puffergleichung auf die rechte Seite. Durch die damit zusammenhängende Verminderung der Kohlensäurekonzentration steigt der pH-Wert im Medium an. Das ausgetriebene CO<sub>2</sub>

sammelte sich aufgrund der höheren Dichte in Bodennähe des Reaktors und diffundierte nicht in die Aerosoltröpfchen. Dieses war vermutlich ebenfalls verantwortlich für die unterschiedlichen pH-Werte zwischen Mediumvorlage und Aerosol. Das sich in Bodennähe gesammelte CO<sub>2</sub> diffundierte zurück in das Medium, wodurch der pH-Wert nicht so hoch wie im Aerosol stieg. Die den Sensor im Aerosol umgebenden Tröpfchen waren somit (nahezu) CO<sub>2</sub>-frei, wodurch im Aerosol direkt zu Beginn ein hoher pH-Wert gemessen wurde. Erst durch das Eindringen von CO<sub>2</sub> aus der Inkubatorluft und damit verbundener Füllung des Reaktors konnte CO<sub>2</sub> in die Tröpfchen diffundieren, Kohlensäure bilden und ein Absinken des pH-Werts auslösen. Da auch in der Nährmediumvorlage der pH-Wert nach relativ kurzer Zeit sank, schien der entgasende Effekt durch steigende Diffusionsraten des eindringenden CO<sub>2</sub> schnell ausgeglichen zu werden. Es zeigte sich, dass je langsamer CO<sub>2</sub> in den Reaktorinnenraum eindringt, desto mehr CO<sub>2</sub> wurde aus dem Medium ausgetrieben und desto höher war der maximal gemessene pH-Wert und somit auch  $\Delta$  pH (siehe Tabelle 4.12). Bei passiver Begasung liegen die pH-Werte des Aerosols zu Beginn höher als die im Mediumreservoir.

**Fazit:**

Das Zerstäuben des carbonatgepufferten Nährmediums DMEM mittels Ultraschall führte unabhängig von der Art der Begasung (aktiv/passiv) zunächst zu einem Anstieg des pH-Werts. Dieser Effekt kann mit dem entgasenden Effekt des Ultraschalls begründet werden. Nachdem CO<sub>2</sub> in ausreichender Menge in den Reaktor gelangte, sank der pH-Wert auf den gewünschten Wert ab.

Anhand dieser Ergebnisse erwiesen sich die getesteten Aufbauten zur passiven Begasung (1 bzw. 2 Sterilfilter im Deckel) des *NKR-Typ I* als nur bedingt geeignet. Bis ausreichend CO<sub>2</sub> in die Reaktorkammer diffundiert war, waren bei der Begasung über zwei Sterilfilter 11,5 h notwendig, durch aktive Begasung (97 ml/min) mit Inkubatorluft konnte der Zeitraum auf ca. 40-60 min gesenkt werden.

Für Einsätze in der Zellkultur mit passiver Begasung und häufiger Probenahme mit Öffnung des Reaktors, gab es zwei mögliche Optimierungsansätze. Zum einen war es möglich die Austauschfläche zwischen der Gasphase des Inkubators und dem Reaktorinnenraum, z.B. über gasaustauschfördernde Einbauten in den Reaktordeckel, zu steigern. Zum anderen war ein ähnlicher Effekt mit der Reduktion des Reaktorvolumens wahrscheinlich, da zur Einstellung des gewünschten pH-Werts eine geringere Menge CO<sub>2</sub> in die Reaktorkammer diffundieren muss.

Als wichtiges Ergebnis lässt sich festhalten, dass unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) und nachdem ausreichend CO<sub>2</sub> in den Reaktor diffundiert war, der optimale pH-Wert konstant gehalten werden konnte und der Ultraschall keine weiteren Effekte auf den pH-Wert des DMEM hatte. Die aufgetretenen Abweichungen vom idealen pH-Wert waren zudem in einem Bereich, der keine Zellschädigungen hervorruft.

#### 4.6.4 Charakterisierung des Mischverhaltens

Säugerzellen und Mikroorganismen benötigen neben einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff und dem richtigen pH-Wert eine Vielzahl von Nährstoffen, die in Kulturmedien bereitgestellt werden. Im Nebelkammerreaktor stehen die Zellen oder Mikroorganismen lediglich mit dem Aerosol in Kontakt, so dass alle Nährstoffe aus dem Mediumreservoir mit dem Aerosoltröpfchen zu den Zellen transportiert werden müssen. Bei der Planung des Reaktors wurde erwartet, dass alle Bestandteile einer zerstäubten Lösung mit den Aerosoltröpfchen transportiert werden. Grund für diese Annahme war, dass bei der Ultraschallzerstäubung das Aerosol nicht thermisch, sondern mechanisch, erzeugt wird (siehe Kapitel 4.1). Im ersten Teil dieses Kapitels werden Experimente und Ergebnisse zum Transport verschiedener Bestandteile eines Zellkulturmediums mit den Aerosoltröpfchen an unterschiedliche Stellen der Reaktorkammer vorgestellt.

Als Modellmoleküle und häufige Bestandteile von Nährmedien wurden Natriumphosphatpuffer, Glukose und Bovines Serum Albumin (BSA) gewählt. Alle drei Substanzen lassen sich unkompliziert nachweisen und bieten ein breites Spektrum an Molekülgrößen und –gewichten auf. Somit dienten sie als repräsentativer Durchschnitt der im Medium enthaltenen Moleküle. Die Konzentration des Natriumphosphatpuffers wurde über die Leitfähigkeit der Lösung bestimmt, die der Glukose enzymatisch mittels Glukose Analysator (Yellow Stone Instruments) und die des BSA anhand des Bradford-Assays.

Im zweiten Teil wurde die Geschwindigkeit des Konzentrationsangleichs in Abhängigkeit von dem Abstand zum Reaktorboden bei Zugabe eines Dirac-Stoßes einer Tracerverbindung in den laufenden Nebelkammerreaktor untersucht. Als Hauptkriterium wurde ermittelt wie schnell das Aerosol-Transportsystem auf Konzentrationsänderungen in der Mediumvorlage reagiert und eine Angleichung der Konzentration an unterschiedlichen Stellen des Reaktors stattfindet. Die Ergebnisse sind besonders in Hinblick auf mögliche Einsatzgebiete des Nebelkammerreaktors wichtig, bei denen zu bestimmten Zeitpunkten eine definierte Menge eines Wirkstoffs, z.B. in der Medikamenten-Testung, zu den Proben transportiert werden soll. Zusätzlich wurden weitere Erkenntnisse über die optimale Platzierung der Proben im Reaktor und über die Aerosoldichte in Abhängigkeit von dem Abstand zum Reaktorboden erhalten.

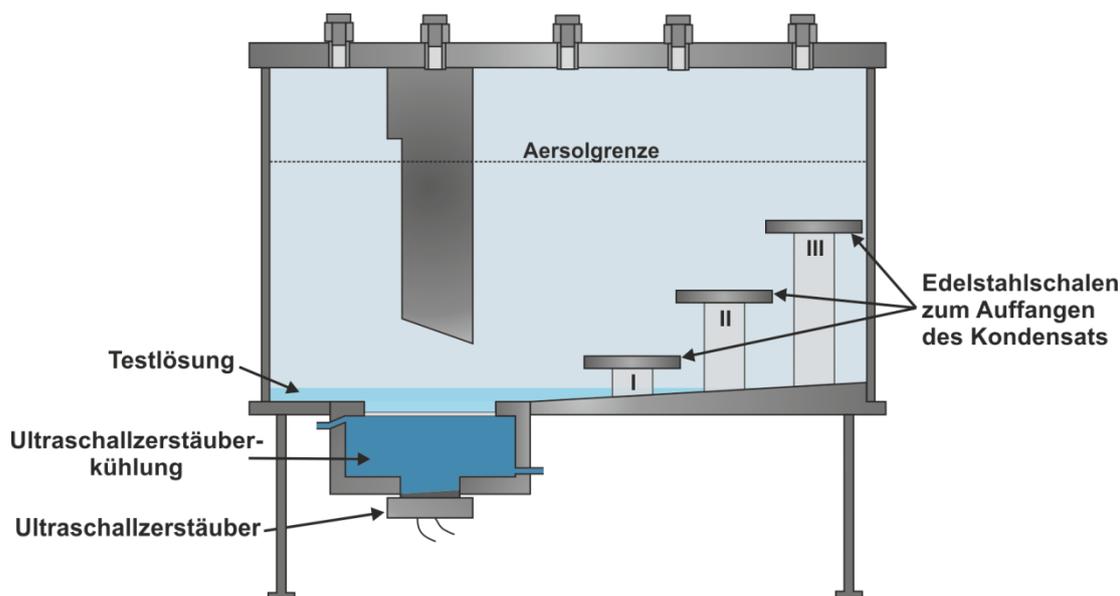


Abbildung 4.44: Schematischer Messaufbau zur Messung der Transportfähigkeit des Aerosols

Für die Experimente wurden in den Reaktor drei Messstellen eingebaut (Abbildung 4.44), wofür auf unterschiedlich hohen Ständern (Abbildung 4.44: 2,5 cm I, 5 cm II, 7,5 cm III) Schalen platziert wurden. Da für die Leitfähigkeitsmessungen ein größeres Volumen notwendig ist, wurden Schalen mit einem Fassungsvermögen von 10 ml verwendet. Für die weiteren Experimente wurden kleinere Schalen mit einem maximalen Fassungsvermögen von 1 ml eingesetzt. Die Versuchsanordnung blieb für alle in diesem Kapitel beschriebenen Experimente unverändert und ist Abbildung 4.44 zu entnehmen.

In drei Experimenten wurden jeweils einmal 150 ml einer Glucose-Lösung (1 g/l in 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7), einer BSA-Lösung (1 g/l in 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7) und eines Natriumphosphat-Puffers (100 mM, pH 7) in den Reaktor gefüllt und die Zerstäubung gestartet. Nach 10 h wurde die Zerstäubung beendet und aus jeder Schale sowie aus dem Mediumreservoir eine Probe entnommen. Die Konzentrationen der Proben der Glucose-Lösung und der BSA-Lösung wurden direkt mit den oben genannten Methoden bestimmt, die Salzkonzentration der Natriumphosphat-Puffer-Lösung wurde indirekt über die Leitfähigkeit (*Sartorius*) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.13 zusammengefasst.

Tabelle 4.13: Messergebnisse der Experimente zur Transportfähigkeit der Aerosoltröpfchen

	Glucose [mg/l]	Natriumphosphatpuffer [mS/cm]	BSA [mg/l]
<b>Reservoir</b>	1023	10,12	1056
<b>Position I</b>	1005	10,09	1034
<b>Position II</b>	1013	10,04	1044
<b>Position III</b>	1025	10,11	1024

Für die drei getesteten Verbindungen konnten nach einer Zerstäubungszeit von 10 h an allen Positionen die gleichen Konzentrationen gemessen werden. In horizontaler und vertikaler Richtung traten ebenfalls keine Konzentrationsunterschiede auf. Es ließ sich der wichtige Fakt ableiten, dass die Aerosoltröpfchen die gleiche Zusammensetzung wie die Stammlösung hatten.

Die Experimente zur Ermittlung des Konzentrationsangleichs wurden mit dem Versuchsaufbau aus Abbildung 4.44 durchgeführt. Der Reaktor wurde mit 150 ml deionisiertem Wasser befüllt. In die Schalen an Position I, II und III wurde das maximale Fassungsvermögen von 10 ml deionisiertem Wasser gegeben. Die US-Zerstäubung wurde gestartet und zu einem definierten Zeitpunkt (in Abbildung 4.45 bei 0 h) ein Dirac-Stoß 100 mM Natriumphosphatpuffer-Lösung (pH 7) als Tracer hinzugegeben. Die Konzentration wurde regelmäßig im Mediumreservoir und an den Positionen 1-3 indirekt über Leitfähigkeitsmessungen bestimmt. Die erhaltenen Antwortfunktionen für alle Positionen sind in Abbildung 4.45 als Leitfähigkeit gegen die Zerstäubungszeit dargestellt.

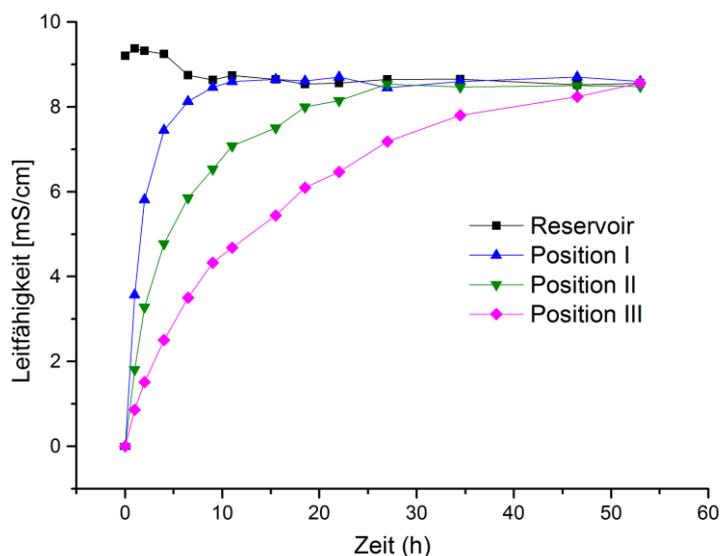


Abbildung 4.45: Auftragung der Leitfähigkeiten des „Kondensats“ an verschiedenen Messstellen (Mediumreservoir und Position I-III in Abb. 15) im *NKR-Typ I* gegen die Zerstäubungszeit nach der Zugabe eines Dirac-Stoßes mit 100mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7) als Tracer

Die Ergebnisse zeigen, dass abhängig von der Messstelle deutlich unterschiedliche Zeiträume zum Angleich der Konzentrationen benötigt wurden. Ein Angleich der Konzentrationen wurde an Position I nach 11 h, an Position II nach 27 h und an Position III nach 53 h erreicht. Anhand des Kurvenverlaufs wird deutlich, dass eine Verteilung des Tracers über die Aerosoltröpfchen direkt nach der Zugabe begann. Die auftretenden zeitlichen Differenzen zwischen den Positionen korrelieren mit den Ergebnissen aus

Kapitel 4.4, in denen bereits festgestellt wurde, dass je größer der Abstand des Messpunkts zum Reaktorboden, desto kleiner der Durchmesser der Tröpfchen und geringer die Aerosoldichte. Es resultiert ein höherer Flüssigkeitstransport in Reaktorbodennähe (Position I), als an der oberen Grenze des Aerosols (Position III) ist.

#### **Fazit:**

Der erfolgreiche Transport aller Testsubstanzen mit den Aerosoltröpfchen zeigte, dass die Aerosoltröpfchen die gleiche Zusammensetzung hatten wie die Mediumvorlage. Die getesteten Substanzen stellten einen möglichst repräsentativen Durchschnitt der Inhaltsstoffe von Nährmedien bezüglich Größe, Gewicht und Ladung dar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass jegliche Bestandteile von Nährmedien mit den Aerosoltröpfchen transportiert werden, wodurch eine Grundbedingung für den Nachweis der Funktionalität des Nebelkammerreaktors erfüllt war.

Die Ergebnisse zum Mischverhalten liefern die wichtige Erkenntnis, dass Proben an jeder Stelle des Reaktors schnell mit Nährstoffen versorgt werden können. Bezüglich der optimalen Platzierung der Proben in dem Reaktor muss beachtet werden, dass je größer der Abstand zum Reaktorboden, desto langsamer erfolgt der Nährstofftransport. Dieses hängt mit der geringeren Aerosoldichte (Kapitel 4.4.3) und somit dem geringeren als Aerosol vorliegenden Flüssigkeitsvolumen zusammen.

Ein Einsatz des Nebelkammerreaktors z.B. bei der Medikamenten-Testung an Gewebeproben, bei der ziel- und zeitgenau Wirkstoffe auf im Aerosol platzierte Proben gegeben werden sollen, wäre somit möglich. Bei vielen weiteren potentiellen Einsatzgebieten des Nebelkammerreaktors werden die Proben im Aerosol platziert und lediglich mit einem feinen Film kondensierter Aerosoltröpfchen überzogen. Da in diesem Fall nur ein sehr geringes Volumen ausgetauscht werden muss, war das gewählte Volumen der Schalen an den Teststellen relativ groß und es kann davon ausgegangen werden, dass ein Konzentrationsangleich an allen Positionen des Reaktors innerhalb kurzer Zeit stattfindet.

#### **4.6.5 Fazit des Kapitels**

Der *NKR-Typ I* wurde reaktionstechnisch charakterisiert und die Einflüsse des ultraschallgestützten Zerstäubens auf den Wärmeübergang und die Temperaturverteilung, den Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase, den pH-Wert von Nährmedien und das Mischverhalten ermittelt. Zusätzlich wurde getestet ob sich die Aerosoltröpfchen als Transportsystem und für die gleichmäßige Verteilung von Nährstoffen im Reaktor eignen. Es konnte gezeigt werden, dass der Reaktor alle reaktionstechnischen Grundvoraussetzungen für einen erfolgreichen Einsatz bei der Kultivierung von Zellen oder Mikroorganismen bietet.

Durch die Bestimmung der Aufwärmzeiten des *NKR-Typ I* (Kapitel 4.5.1) bei unterschiedlichen Regelungen konnte gezeigt werden, dass die Temperatur der US-Zerstäuberüberkühlung, aufgrund der indirekten Kühlung des Mediums im Reservoir, einen verlangsamenden Effekt auf die Aufwärmgeschwindigkeit des Reaktors hatte. Der Vergleich der Aufwärmzeiten bei aktiviertem und deaktiviertem US-Zerstäuber zeigte, dass die Effizienz der Wärmeübertragung durch die Aerosoltröpfchen deutlich gesteigert und die Aufwärmzeit um bis zu 60 % reduziert wurden.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die US-Zerstäuberüberkühlung notwendig ist um ein unkontrolliertes Aufheizen durch die ultraschallinduzierte Aufwärmung des flüssigen Mediums zu verhindern. Es lässt sich ableiten, dass ein erheblicher Anteil der in Kapitel 4.4.2.3 beschriebenen Wärmeentwicklung der US-Zerstäuber durch ultraschallbedingte Molekülbewegungen und nicht durch Verluste an der Piezokeramik des US-Zerstäubers entstanden.

Die Aufnahme der Temperaturverteilung innerhalb des Reaktors zeigt, dass in dem für eine Probenplatzierung vorgesehenen Bereich eine stabile Zieltemperatur erzielt werden konnte. Lediglich im Bereich des frisch erzeugten Aerosols und der Reaktorwände kam es zu Abweichungen. Optimierungspotential lag bei der Verkürzung der Aufwärmzeiten und einer weiteren Verbesserung Temperaturverteilung.

Die bei der Planung des Nebelkammerreaktors gesetzten Ziele bezüglich eines hohen Sauerstoffeintrags konnten anhand der Experimente bestätigt werden. Die Bestimmung des volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten ( $k_La$ -Wert) (Kapitel 4.5.2) belegten mit Werten bis zu  $39 \text{ h}^{-1}$  den effizienten Sauerstoffübergang in das flüssige Medium im Verhältnis zu vergleichbaren Bioreaktorsystemen. Ähnliche oder höhere Werte werden lediglich durch Systeme mit sehr geringen Volumina oder durch Rühren und aktive Begasung erreicht. Zudem konnte rechnerisch und experimentell gezeigt werden, dass der effiziente Sauerstoffübergang in der starken Oberflächenvergrößerung durch die Bildung der Aerosoltröpfchen im Mikrometerbereich begründet lag. Als besonders vorteilhaft ist herauszustellen, dass die hohen  $k_La$ -Werte nahezu scherstressfrei ohne Rühren und aktive Begasung erreicht werden konnten.

Die Aufzeichnung des pH-Werts in dem Zellkulturmedium DMEM unter Standardbedingungen für die Kultivierung von Säugerzellen ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) zeigte, dass es keinen messbaren Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf die Höhe des pH-Werts gab.

In Rahmen der Experimente wurde zusätzlich die Effektivität unterschiedlicher Begasungssysteme getestet (Kapitel 4.5.3). Bei indirekter Begasung stieg der pH-Wert zunächst aufgrund des ultraschallgestützten Entgasens der Flüssigkeit kurzzeitig an. Durch das Eindringen von  $\text{CO}_2$  über die Sterilfilter sank der pH auf den gewünschten Wert. Bei indirekter Begasung kann eine vollständige Angleichung einige Stunden dauern. Eine direkte Begasung ( $97 \text{ ml/min}$ ) verkürzte den Vorgang auf ca. 60 min. Da der Nebelkammerreaktor auf eine passive Begasung ausgelegt ist, bietet es sich an bei

Weiterentwicklungen des Systems einen schnelleren Gasaustausch bei passiver Begasung zu ermöglichen (Die Optimierungsschritte sind in Kapitel 4.7 beschrieben).

Bei der Planung des Reaktors wurde davon ausgegangen, dass die Aerosoltröpfchen aufgrund ihrer mechanischen Erzeugung (Kapitel 4.1) dieselbe Zusammensetzung wie die Stammlösung besitzen. In Kapitel 4.5.4 konnte gezeigt werden, dass verschiedene Arten und Größen von Molekülen (Puffersalze, Glukose und BSA) gleichmäßig mit dem Aerosol zu unterschiedlichen Teststellen im Reaktor transportiert wurden. Wie bereits aus den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen (Kapitel 4.4.3) hervorging, nimmt die Aerosoldichte mit steigendem Abstand zum Reaktorboden ab. Folglich stieg die benötigte Zeit für den Konzentrationsangleich mit steigendem Abstand zum Reaktorboden proportional an. Die Ergebnisse lieferten wichtige Erkenntnisse für die Planung von Kultivierungen und die Platzierung von Proben in dem Reaktor (Kapitel 4.6.4). Für spezielle Einsatzgebiete, wie z.B. in der Medikamententestung, ist die gleichmäßige und sofortige Verteilung eines Wirkstoffs (hier Tracers) von größter Wichtigkeit und zeigt das große und vielseitige Potential des Nebelkammerreaktors.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beschriebenen Experimente die zu Beginn der Arbeit vorgestellten Überlegungen bezüglich der Vorteile des Nebelkammerreaktor-Systems belegen. Das System bietet eine hohe, effektive und scherstressarme Versorgung mit Sauerstoff und in den relevanten Bereichen des Reaktors konnte eine Zieltemperatur stabil gehalten werden. Essentielle Nährstoffe konnten mit den Aerosoltröpfchen gleichmäßig zu mehreren Messstellen innerhalb des Nebelkammerreaktors verteilt werden, so dass eine Versorgung der Zellen oder Mikroorganismen schonend und mediumsparend gesichert ist.

## **4.7 Effekte des ultraschallgestützten Zerstäubens auf Nährmedien**

Parallel zur reaktionstechnischen Charakterisierung des Nebelkammerreaktors wurden Untersuchungen zum Einfluss des im Nebelkammerreaktor angewendeten Ultraschalls auf Nährmedien im Gesamten und einzelne Bestandteile durchgeführt. Da das Zerstäuben von Nährmedien mit einer komplexen Zusammensetzung ein völlig neuartiges Einsatzgebiet für US-Zerstäuber darstellt, war es notwendig mögliche Einflüsse des Ultraschalls auf Nährmedien bzw. deren Bestandteile zu identifizieren.

Untersucht wurden die Einflüsse der Ultraschalleinwirkung auf die Langzeitstabilität von Nährmedien und auf ausgewählte repräsentative Komponenten. Die gewonnenen Erkenntnisse erweiterten die Ergebnisse aus Kapitel 4.4 und halfen, ein grundsätzliches Verständnis der Eigenschaften und Auswirkungen von US-Zerstäubern zu erhalten. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Funktionalität des Nebelkammerreaktors mit Hilfe

der Kultivierung eines einfachen Mikroorganismus überprüft sowie in die Ausbreitung einer gezielten Kontamination des Nährmediums untersucht.

In den Experimenten dieses Kapitels wurde, wenn nicht explizit erwähnt, der US-Zerstäuber *AW-Typ I* (Arbeitsfrequenz = 1,65 MHz) bei maximaler Leistung (47,63 W), einer Temperatur der US-Zerstäuberkühlung von 22 °C und bei RT (22 °C) in Kombination mit dem Nebelkammerreaktor *NKR -Typ I* verwendet (Versuchsaufbau siehe Abbildung 4.46).

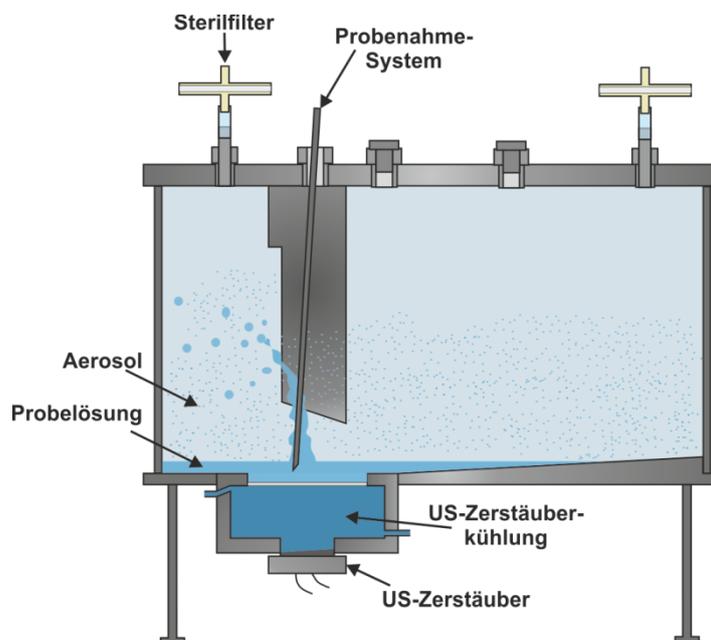


Abbildung 4.46: Schematischer Versuchsaufbau (falls nicht anders erwähnt) für die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente

## 4.7.1 Langzeitstabilitätstests von Nährmedien

Aufgrund der hohen Anzahl für das Zellwachstum essentieller Bestandteile von Nährmedien, können bereits geringe ultraschallbedingte Veränderungen einiger Medienkomponenten Einfluss auf das Zellwachstum haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stabilität des serumhaltigen *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) sowie *Lysogeny Broth-Medium* (LB-Medium) nach ihrer Zerstäubung über mehrere Tage im Nebelkammerreaktor untersucht. Dafür wurden die Nährmedien (DMEM- und LB-Medium) im Reaktor zerstäubt und extern auf ihre Funktionalität getestet. Dieses Vorgehen bot den Vorteil, dass die Experimente deutlich unkomplizierter durchführbar waren, das Zellwachstum unter kontrollierten Standardbedingungen beobachtet werden konnte und potentielle Störungsquellen minimiert wurden.

### 4.7.1.1 Zerstäubung von Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Als Erstes wurde der Einfluss von Ultraschallzerstäubung im Nebelkammerreaktor auf DMEM überprüft, welches als exemplarisches Nährmedium für die Kultivierung von

Säugerzellen diente. Hierzu wurden 150 ml frisch angesetztes DMEM (+10 % FCS, + 1% P/S) in den Reaktor überführt und über 80 h zerstäubt, wobei eine Probenahme alle 5 h erfolgte. Die Proben (5 h - 80 h) wurden anschließend als Nährmedium für *SaOs-2*- und *Hep-G2*-Zellen verwendet. Die Zellen wurden hierfür in 96-Well-Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Aussaatdichten (1600, 3200, 4800 Zellen/Well) ausplattiert und über zwei Tage mit frischem DMEM bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert. Am Tag 3 wurde das Medium in den Mikrotiterplatten gegen die Nährmediumproben aus dem Reaktor getauscht und die Zellen für weitere drei Tage im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die Viabilität mittels MTT-Assay bestimmt. Die Ergebnisse mit der *SaOs-2*-Zelllinie sind in Abbildung 4.47 (Die Ergebnisse finden sich in Kapitel 8.1.7) dargestellt

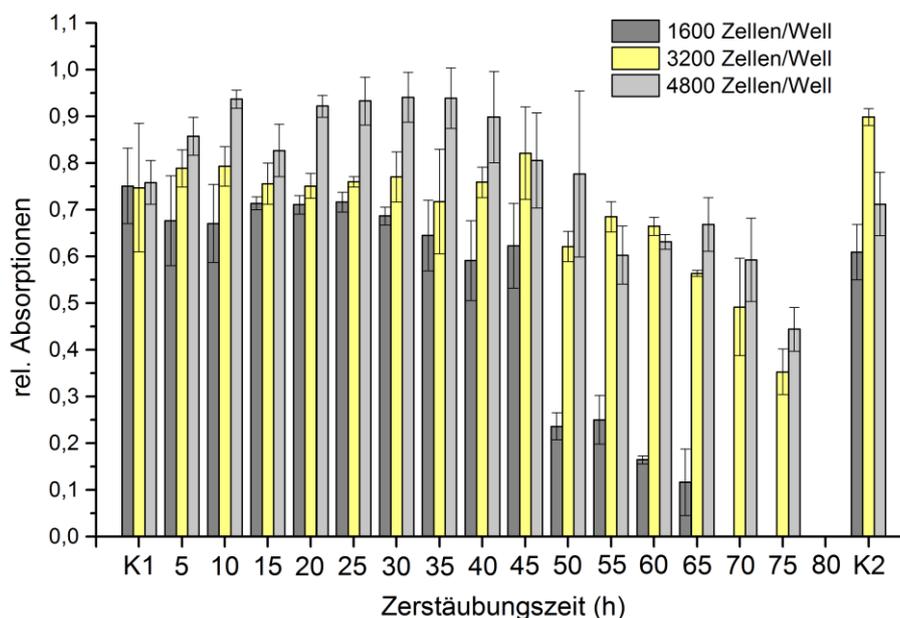


Abbildung 4.47: Ergebnisse der externen Testung von ultraschallzerstäubtem DMEM-Nährmedium mittels *SaOs-2*-Zellen. 150 ml DMEM wurden in dem *NKR-Typ I* bei maximaler Leistung des *AW-Typ I* zerstäubt. Die Probenahme erfolgte alle 5 h. Die Zellen wurden außerhalb des Reaktors unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) bei verschiedenen Aussaatzellichten (1600, 3200, 4800 Zellen/Well) in 96-Well-Lochplatten in einem Inkubator angezüchtet. Nach 2 Tagen wurde das unbehandelte DMEM gegen die Reaktorproben ausgetauscht und für 3 weitere Tage inkubiert. Die Viabilität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Aufgetragen sind die relativen Absorptionen der Reaktorproben bei 570 nm gegen 630 nm, die direkt proportional zur Viabilität der Zellen sind, gegen die Zerstäubungszeit. K1 und K2 sind hierbei Kontrollgruppen im unbehandelten Medium. N = 3

Es zeigt sich, dass bei höheren Zelldichten (Aussaatdichten 3200 und 4800 Zellen/Well) die Zellen in den Reaktorproben bis zu einer Zerstäubungszeit von 40 h gleichmäßig wuchsen. Ab einer Zerstäubungsdauer von 45 h sank die Viabilität der Zellen konstant ab.

In der Reaktorprobe nach 75 h Zerstäubung wiesen die Zellen lediglich eine ca. 50 %ige Viabilität gegenüber der Kontrollgruppe auf, nach 80 h war keine Viabilität mehr messbar. Besonders deutlich ist der Effekt bei der geringsten Aussaatdichte von 1600 Zellen/Well. Hier konnte bereits nach 50 h eine Abnahme der Viabilität um mehr als 50 % zur vorherigen Probe registriert werden, nach 70 h sank diese auf 0 %. Die Ergebnisse der *Hep-G2*-Zelllinie zeigten ein ähnliches Verhaltensbild (siehe Anhang). Ob die entscheidenden Veränderungen hauptsächlich an den Komponenten des DMEM oder des FCS stattfanden müssen zukünftige Untersuchungen klären.

#### 4.7.1.2 LB-Medium

Als exemplarisches Nährmedium für die Kultivierung von Mikroorganismen wurde die Auswirkung des Ultraschallzerstäubens auf LB-Medium untersucht. Hierzu wurden jeweils 150 ml LB-Medium in dem Reaktor überführt und mittels Ultraschall über verschiedene Zeiträume (24 h, 72 h und 168 h) zerstäubt. Anschließend wurden die Mediumproben in 500 ml Schüttelkolben überführt und mit jeweils 100 µl einer *E. coli-K12* Vorkultur ( $OD_{600} = 2$ ) inokuliert und bei 37°C und 130 RPM in einem Brutschrank inkubiert. Das Wachstum wurde anhand der  $OD_{600}$  der Kultur verfolgt. Als Referenz diente nicht zerstäubtes LB-Medium. Die Ergebnisse der Kultivierungen sind in Abbildung 4.48 dargestellt.

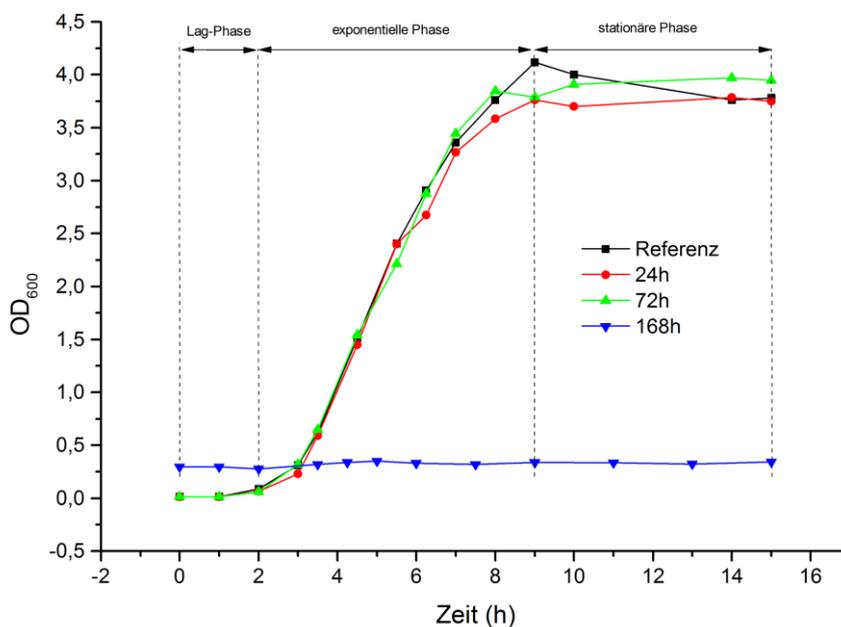


Abbildung 4.48: Auftragung der optischen Dichte von *E. coli K12*-Kulturen in LB-Medium gegen die Zeit. Jeweils 150 ml LB-Medium wurde für 24 h, 72 h und 168 h im Nebelkammerreaktor mittels Ultraschall zerstäubt, als Referenz diente unbehandeltes LB-Medium. Die vier Schüttelkolben ( $V = 500$  ml) wurden mit 100 µl einer Vorkultur ( $OD_{600} = 2$ ) inokuliert und bei 37 °C und 130 RPM für 15 h kultiviert. Während Kulturen in den Proben nach 24 h, 72 h und die Referenz normales Wachstumsverhalten zeigten, konnte in der Probe nach 168 h kein Wachstum festgestellt werden.

Die Kultivierung der Zellen mit dem zerstäubten Medium über 24 h bzw. 72 h sowie der Referenz zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten, wobei die typischen Wachstumsphasen der Bakterien deutlich zu erkennen waren. Erreicht wurde jeweils eine maximale  $OD_{600}$  von 4. In der Mediumprobe, die für 168 h zerstäubt wurde, konnte keine Änderung der optischen Dichte und kein Wachstum der Bakterien verzeichnet werden. Visuell konnte eine deutliche Farbveränderung des Mediums von gelblich zu dunkelbraun festgestellt werden.

Während des Experimentes über 168 h wurde täglich eine Probe entnommen und ein UV/Vis-Absorptionsspektrum (Cary 50) für den Wellenlängenbereich von 190 - 800 nm aufgenommen. Abbildung 4.49 zeigt die Differenzspektren der erhaltenen Absorptionskurven. Zur Erstellung des Differenzspektrums wurden die Absorptionen der Referenz nach 0 h von den restlichen Proben abgezogen. Der Vorteil dieser Darstellungsform ist, dass lediglich die in diesem Fall relevanten Veränderungen gegenüber der Referenz hervortreten. Die stärkste Änderung der Absorptionen fand zunächst bei einer Wellenlänge von 265 nm (nach 24 h) statt. Das Maximum des Peaks verschob sich mit zunehmender Zerstäubungszeit zu 397 nm, während die relativen Absorptionen von 0,16 auf 1,06 zunahmen.

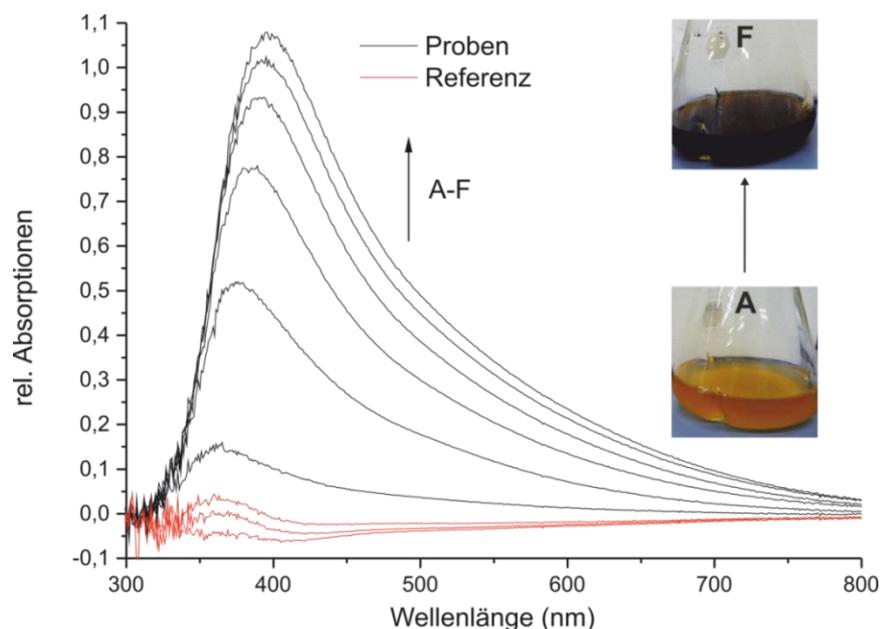


Abbildung 4.49: Differenz-Absorptionsspektrum des LB-Mediums nach 24 h (A), 72 h (B), 96 h (C), 120 h (D), 144 h (E) und 160 h (F) Zerstäubungszeit als schwarze Kurven, die roten Kurven stellen die Absorptionen der Referenz dar. Zur Erstellung des Differenzspektrums wurde das Spektrum der Referenz nach 0 h von allen anderen Spektren abgezogen. Aufgetragen sind die relativen Absorptionen gegen die Wellenlänge. Es kann mit fortschreitender Zerstäubungszeit eine deutlich Zunahme der Absorptionen von 350 nm bis in den sichtbaren Bereich (ab 400 nm) beobachtet werden, welches durch die Verfärbung der Proben (siehe Fotos) unterstützt wird.

Das Absorptionsmaximum bei 397 nm (nach 168 h Zerstäubungszeit) liegt an der Grenze zwischen UV- und sichtbaren-Bereich. Zunehmende Absorptionen in diesem Bereich sind

Hinweise auf die Bildung neuer konjugierter  $\pi$ -Systeme oder Oxidationsreaktionen an bestehenden  $\pi$ -Systemen bzw. lichtabsorbierender Gruppen. Aufgrund der Vielzahl an Inhaltsstoffen und möglichen Reaktionen sind zur Klärung der Frage eingehende Untersuchungen nötig und im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig zu beantworten. Die dunklere Färbung der Lösung lässt sich mit steigenden Absorptionen im sichtbaren Bereich zwischen 400 nm und 800 nm erklären.

### **Fazit:**

Die Langzeitstabilitätstests von DMEM und LB-Medium ergaben, dass die Nährmedien über mehrere Tage (2-3 Tage bei DMEM und 6-7 Tage bei LB-Medium) mittels Ultraschall in dem Nebelkammerreaktor zerstäubt werden konnten, ohne dass signifikante Veränderungen an der Mediumzusammensetzung oder -qualität auftraten. Dieses konnte durch externe Testkultivierungen von *E.coli-K12* Bakterien in den LB-Medium- und *SaOs-2*-Zellen in den DMEM-Reaktorproben belegt werden. Nach einer längeren Zerstäubungszeit konnte eine Abnahme der Mediumqualität anhand eines ausbleibenden Wachstums der *E.coli K12*-Bakterien bzw. abnehmender Viabilität der *SaOs-2*-Zellen festgestellt werden. Das LB-Medium zeigte eine deutliche Verfärbung von gelblich zu braun, welche durch die Zunahme der Absorptionen im sichtbaren Bereich unterstrichen werden konnte. Zusätzlich traten gesteigerte Absorptionen im UV-Bereich auf, wodurch auf eine chemische Veränderung der Inhaltsstoffe geschlossen werden konnte.

## **4.7.2 Einfluss des Ultraschalls auf Nährmediumkomponenten**

Auf Grundlage der im vorherigen Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurde der mögliche Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf Komponenten von Nährmedien (Salze und Kohlenhydrate (Kapitel 4.6.2.1), Proteine (Kapitel 4.6.2.2), Aminosäuren (Kapitel 4.6.2.3) und Antibiotika (Kapitel 4.6.2.4) genauer untersucht. Es wurde ermittelt, ob und wie schnell die Komponenten durch den Ultraschall verändert werden. Hierdurch wurde mögliches Optimierungspotential an dem Nebelkammerreaktorsystem bezüglich des Reaktordesigns und des eingesetzten US-Zerstäubers abgeleitet, mit dem Ziel eine längere Stabilität der Medien zu erzielen bzw. die verändernden Effekte komplett zu eliminieren.

### **4.7.2.1 Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf Glucose und Salze**

Als Beispielmolekül aus der Stoffklasse der Kohlenhydrate sollte der Effekt des Ultraschallzerstäubens auf die Konzentration einer Glucoselösung untersucht werden. Glucose ist ein wichtiges Molekül bei der Energiegewinnung von Zellen (Glykolyse) und häufiger Bestandteil von Nährmedien. Des Weiteren sollte der Effekt auf Salze, anhand einer Natrium-Phosphatpuffer-Lösung (NPP) überprüft werden. Die experimentelle Durchführung erfolgte in zwei Teilen, wobei jeweils 150 ml einer Glucose- (1 g/l) und

einer Natriumphosphatpufferlösung (NPP) (100 mM, pH 7 in deionisiertem Wasser) in den Reaktor gefüllt und für sieben Tage zerstäubt wurden. Es erfolgte eine regelmäßige Probenahme. Die Glucosekonzentration wurde enzymatisch (*Glucose Analyser, Yellow Stone Instruments*), die Salzkonzentration indirekt über die Leitfähigkeit der Proben und des pH-Werts offline mittels pH-Meter bestimmt.

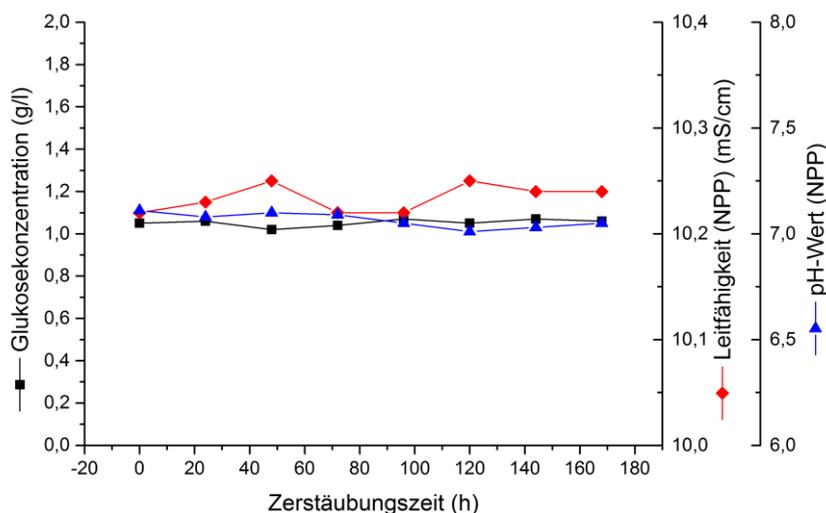


Abbildung 4.50: Auftragung der gemessenen Glucosekonzentration, der Leitfähigkeit und des pH-Werts der NPP-Lösung (100 mM, pH 7) gegen die Zerstäubungszeit

Wie in Abbildung 4.50 veranschaulicht, konnten über einen Zeitraum von sieben Tagen keine signifikanten Änderungen der Glucosekonzentration und der Leitfähigkeit der Lösungen gemessen werden. Ebenso blieb der pH-Wert der NPP-Lösung konstant. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass durch die Ultraschallzerstäubung keine signifikanten Veränderungen oder Zersetzungen von Glucose- oder Phosphat-Molekülen stattfanden und die Ionenkonzentration unverändert blieb.

#### 4.7.2.2 Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf Proteine

Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben kann Ultraschall, abhängig von Leistung und Frequenz, sehr unterschiedliche Einflüsse auf Moleküle haben. Besonders empfindlich gegenüber chemischen Veränderungen sind demnach z.B. Proteine, bei denen es zur Entfaltung (Denaturierung) bzw. den Verlust der Tertiärstruktur aufgrund des Brechens von Wasserstoff- und/oder Disulfidbrücken kommen kann [139-141]. Die Strukturänderungen führen zumeist auch zu einem Verlust der biologischen Funktionalität. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese möglichen Einflüsse des im Nebelkammerreaktor eingesetzten Ultraschalls anhand der exemplarischen Proteine Rinderalbumin (BSA) und Penicillin-G-Acylase (PGA) untersucht. BSA kommt in großen Mengen in Rinderserum vor. Grundsätzlich sind Albumine z.B. für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen

Druckes und für den Transport von wasserunlöslichen Substanzen im Blut verantwortlich. In biotechnologischen Anwendungen werden sie häufig als Standardsubstanz z.B. beim Bradford-Assay eingesetzt. PGA ist ein Enzym, das eine wichtige Rolle bei der Herstellung halbsynthetischer Antibiotika spielt [142]. Untersucht wurde, welchen Einfluss der Ultraschall auf die Proteinfaltung und im Fall der PGA zusätzlich auf die enzymatische Aktivität besitzt. Durch die Aufnahme von Absorptions- und Fluoreszenzspektren sollten Hinweise auf den Faltungszustand der Proteine gewonnen werden. Für das Rinderserumalbumin (BSA) wurde zusätzlich eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, um das Protein zu detektieren. Für das Enzym Penicillin-G-Acylase wurde neben der spektroskopischen Untersuchung die enzymatische Aktivität anhand des fotometrischen NIPAB-Assays überprüft. Die Experimente werden im Folgenden für beide Substanzen einzeln diskutiert.

## BSA

Als Testlösung dienten 200 ml einer BSA-Lösung (1 mg/ml in 50 mM KPP-Puffer (pH 7,1)). 150 ml der Lösung wurden in den Reaktor überführt, die restlichen 50 ml wurden als Referenzlösung verwendet und bei RT gelagert. Die Laufzeit des Experiments betrug 168 h, in der regelmäßig Proben entnommen wurden. Von jeder Probe wurde ein UV/Vis-Absorptionsspektrum (200 – 800 nm) und ein Fluoreszenzspektrum (Ex 278 nm, Em 280 nm – 450 nm) aufgenommen und ein SDS-PAGE (Abbildung 4.52) durchgeführt.

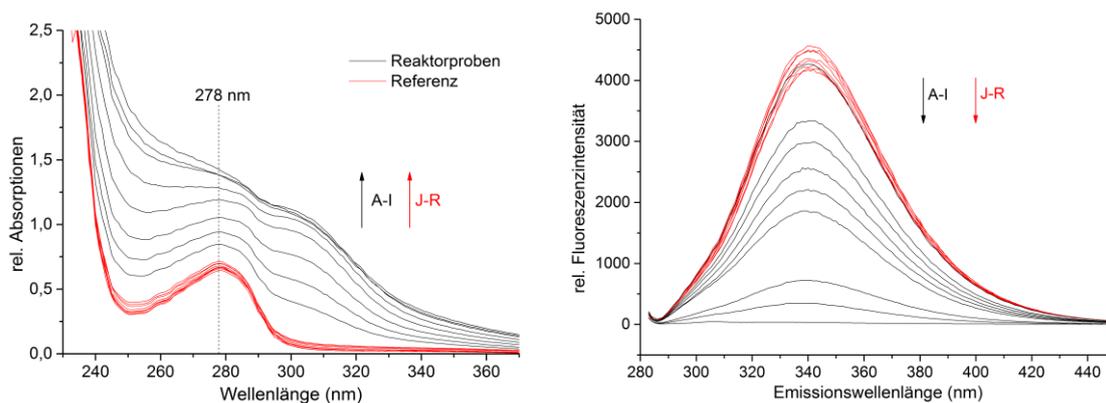


Abbildung 4.51: Absorptionsspektren (links) und Fluoreszenzspektren (rechts) (Ex 278 nm, EM 280 nm – 450 nm) von BSA-Lösungen (1 mg/ml) in 50 mM KPP (pH 7,4) nach 0 h (A) 16 h (B), 29 h (C), 42 h (D), 66 h (E), 96 h (F), 124 h (G), 150 h (H) und 168 h (I) Zerstäubungszeit als schwarze Linien und der Referenz 0 h (J) 16 h (K), 29 h (L), 42 h (M), 66 h (N), 96 h (O), 124 h (P), 150 h (Q) und 168 h (R) als rote Linien. Der Anstieg der Absorptionen bei 278 nm und die Abnahmen der relativen Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm sind ein Hinweis auf die Denaturierung des Proteins

Wang et al. (2006) [143] berichten, dass BSA unter Ultraschalleinwirkung bei 40-80 kHz innerhalb mehrerer Stunden denaturiert werden kann, wobei eine deutliche Steigerung der

Absorptionen bei 278 nm auftritt. Die in Abbildung 4.51 (links) dargestellten Absorptionsspektren zeigen, dass die relativen Absorptionen der Reaktorproben (Abbildung 4.51 schwarze Linien) für den charakteristischen Peak bei 278 nm mit voranschreitender Zerstäubungszeit (A→I) von 0,7 auf 1,4 anstiegen. Der Peak entsteht vornehmlich durch Absorptionen der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan des Proteins. Die durch Kavitation auftretenden OH- und O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Radikale können z.B. die Schwefelatome von Disulfidbrücken (kovalente Bindungen zwischen zwei Cystein-Einheiten) oxidieren und die Bindungen aufbrechen. Da diese mitverantwortlich für die Erhaltung der Sekundär – und Tertiärstruktur sind, kann eine Entfaltung (Denaturierung) des BSA auftreten. Hierdurch werden zunehmend im Zentrum des Proteins liegende aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin) exponiert und es tritt ein hyperchromer Effekt (Steigerung der relativen Absorption) auf. Gleichzeitig findet eine leichte Verschiebung des Peaks zu geringeren Wellen (hypsochromer Effekt) statt. Der Grund hierfür sind die durch die Entfaltung sinkenden elektronischen Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Ringen der Aminosäuren.

Parallel zu der Steigerung der Absorptionen nahm die relative Fluoreszenzintensität bei ca. 340 nm mit zunehmender Zerstäubungszeit ab (Abbildung 4.51 rechts schwarze Linien). Die Fluoreszenzintensität von Tyrosin und Tryptophan ist abhängig von ihrer chemischen Umgebung. In einer hydrophoben Umgebung (im Inneren des gefalteten Proteins) wird eine hohe Quantenausbeute und somit hohe Fluoreszenzintensitäten erzielt. Im entfalteten Zustand liegt dagegen eine hydrophile Umgebung (wässriges Lösungsmittel) vor, die zu einer Verringerung der Quantenausbeute führt [139-141]. In den Spektren der Referenzprobe (Abbildung 4.51 rechts rote Linien) treten die gleichen Tendenzen auf, jedoch sind die Änderungen hier deutlich geringer. Die hohen Energien oder OH-Radikale können ebenfalls zur Spaltung anderer kovalenter Bindungen oder Oxidationsreaktionen führen. Abbildung 4.52 zeigt Zusätzlich das Coomassie-gefärbte SDS-Gel der BSA-Proben aus dem Nebelkammerreaktor im Vergleich zu unbehandeltem BSA-Proben. In allen unbehandelten Proben ist lediglich eine gleichbleibend intensive Bande bei ca. 66,5 kDa sichtbar, die dem BSA zugeordnet werden kann. In den Reaktorproben ist bereits nach 16 h Zerstäubungszeit eine deutliche Abnahme der Intensität der Bande des BSA zu erkennen, die in den Proben nach 29 h und 42 h weiter verringert und nach 66 h nicht mehr sichtbar ist.

Die Abnahme der Intensität der BSA-Bande ohne Ausbildung neuer Banden, lässt zwei mögliche Erklärungen zu. Zum einen können die basischen Seitenketten der Aminosäuren oxidiert worden sein, so dass sich der Coomassie Farbstoff nicht mehr an diese binden konnte. Zum anderen könnten ultraschallbedingte chemische Veränderungen an den BSA-Molekülen zu einer veränderten Löslichkeit geführt haben, wodurch ein Großteil des Proteins aus der Lösung ausgefällt wurde. Für die zweite Möglichkeit spricht eine leichte

Trübung der Reaktorproben, wobei beide Effekte parallel auftreten können. Eine abschließende Klärung der auftretenden Reaktionen war nicht Bestandteil dieser Arbeit.

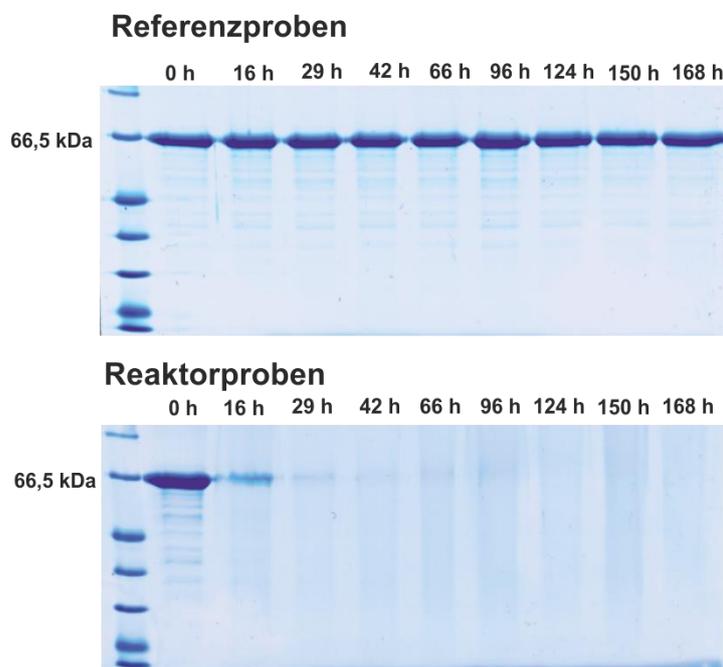


Abbildung 4.52: Coomassiegefärbtes SDS-PAGE-Gele der Referenzproben (oben) und der Reaktorproben (unten). Die Bande des BSA zeigt sich bei 66,5 kDa

### Penicillin-G-Acylase

Da sich im Laufe dieser Arbeit herausstellte, dass der Effekt des Ultraschallzerstäubens auf die getesteten Bestandteile von Nährmedien am schnellsten und effektivsten anhand des Aktivitätsverlusts von PGA über den NIPAB-Assay zu quantifizieren war, wurde diese Methode als Standard-Assay etabliert, um die Auswirkungen verschiedener US-Zerstäuber-Modelle (Kapitel 4.4.4) und unterschiedlicher Regelungen und Betriebsformen der US-Zerstäuber, wie in diesem Kapitel beschrieben, zu evaluieren. Getestet wurden unterschiedliche Temperaturregelungen der US-Zerstäuber kühlung, verschiedene Leistungen des US-Zerstäubers und eine Pulsung der Zerstäubung.

Für die Experimente wurde eine Stammlösung von PGA (1  $\mu$ l natives Enzym (ca. 800 U/ml) in 10 ml 50 mM KPP-Puffer (pH 7,4)) vorbereitet. Jeweils 150 ml wurden in den Reaktor überführt und 50 ml dienten als Referenz, die bei RT gelagert wurde. Die PGA-Lösungen wurden über verschiedene Zeiträume im Reaktor zerstäubt. Es wurden regelmäßig Proben aus dem Reaktor und der Referenz entnommen und die Volumenaktivität des Enzyms anhand des fotometrischen NIPAB-Assays bestimmt. Die Experimente wurden für unterschiedliche Leistungen des US-Zerstäubers *AW-Typ I* (47,63 W, 40,83 W und 37,42 W), bei gepulster Zerstäubung (US-Zerstäuber an / aus

5 s / 10 s) und bei verschiedenen Temperaturen der US-Zerstäuberkühlung (5 °C, 25 °C und 32 °C) durchgeführt.

In Abbildung 4.53 ist die relative Volumenaktivität bezogen auf den Startwert des jeweiligen Experiments aufgetragen. Die Ergebnisse für verschiedene US-Zerstäuber-Modelle sind in Kapitel 4.4.4 (Tabelle 4.5) zu finden.

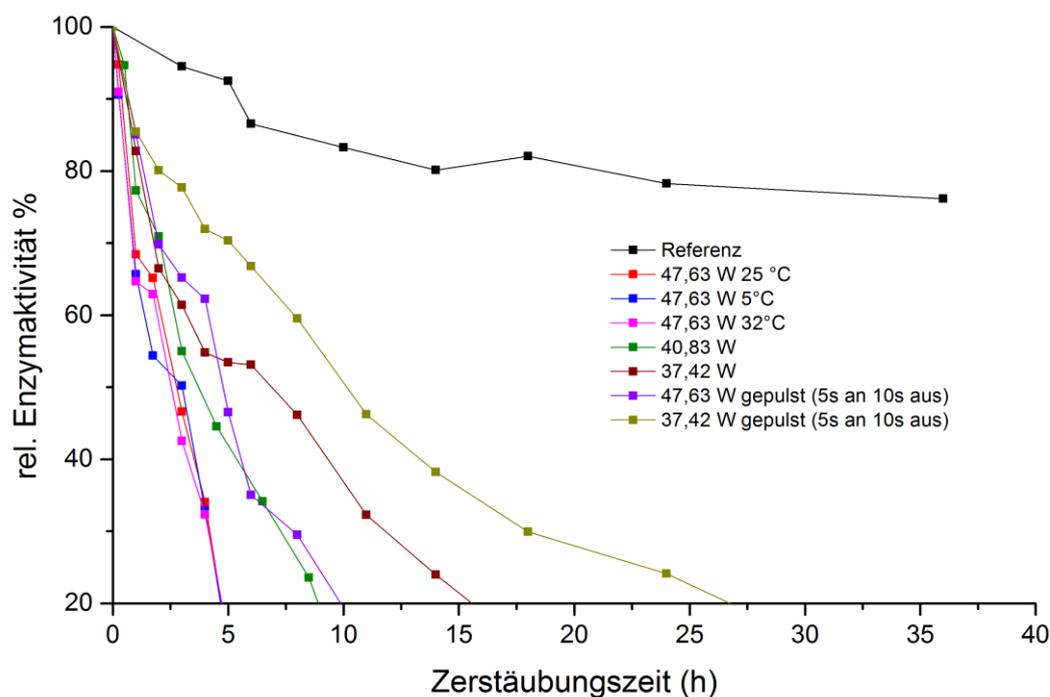


Abbildung 4.53: Auftragung der relativen Enzymaktivität, bezogen auf die Volumenaktivität zu Beginn jedes Experiments, bei unterschiedlichen Leistungen (in W), gepulster Zerstäubung, bei unterschiedlichen Temperaturen US-Zerstäuberkühlung (rote, blaue und rosa Linie) und einer Referenzlösung gegen die Zerstäubungszeit.

Es wird deutlich, dass die enzymatische Aktivität der Reaktorproben bei allen getesteten Einstellungen schneller abnahm als die der Referenzproben. Als unterer Grenzwert (kompletter Aktivitätsverlust) wurde eine 20%ige relative Enzymaktivität der PGA festgelegt, da bei den Messungen mit einer Aktivität unterhalb von 20% ein zu starkes Messrauschen für eine verlässliche Auswertung auftrat. Die Variation der Leistung des US-Zerstäubers zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Aktivitätsverlusts von PGA. So wurde der Grenzwert bei einer Leistung von 47,6 W bereits nach ca. 5 h, bei 40,8 W nach 8 h und bei 37,42 W 16 h erreicht. Durch die Pulsung der Zerstäubung (an / aus = 5 s / 10 s) konnte der Aktivitätsverlust ebenfalls verlangsamt werden, wodurch z.B. bei einer Leistung von 47,6 W der Zeitraum bis zum kompletten Aktivitätsverlust verdoppelt werden konnte (8 h gegenüber 4 h). Kein Einfluss konnte

durch die Variation der Temperatur der US-Zerstäuberkühlung zwischen 5 °C, 25 °C und 32 °C festgestellt werden.

Ergänzend wurde durch die Aufnahme von Absorptionsspektren überprüft ob die Aktivitätsabnahme mit einer Denaturierung des Enzyms einherging. Hierzu wurde von den Proben ein Absorptionsspektrum über einen Wellenlängenbereich von 190 – 800 nm aufgenommen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 4.54 dargestellt. Wie bereits für das BSA beschrieben, ist die Zunahme der relativen Absorption bei 278 nm von 0,07 nach 0,4 nach 240 min ein deutliches Indiz für die Denaturierung des Proteins.

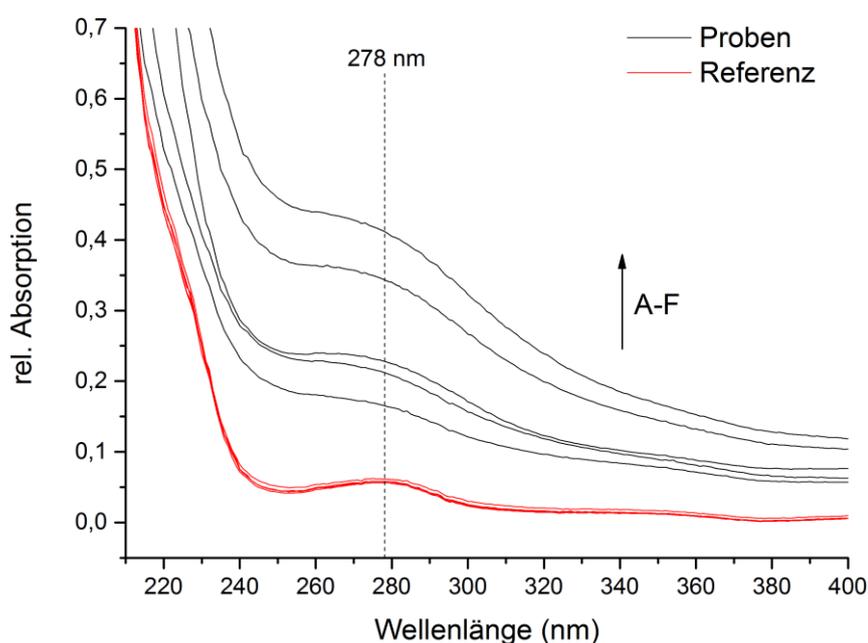


Abbildung 4.54: Absorptionsspektren von PGA-Lösungen (1 µl/ml) in 50 mM KPP (pH 7,4) nach 30 min (A), 60 min (B), 120 min (C), 180 min (D) und 240 min (E) Zerstäubungszeit als schwarze Linien und der Referenz als rote Linien. Der Anstieg der Absorptionen bei 278 nm ist ein deutliches Indiz auf die Denaturierung des Proteins

### Fazit:

Es konnte durch die Aufnahme von Absorptions- und Fluoreszenzspektren gezeigt werden, dass die Proteine BSA und PGA durch die Ultraschalleinwirkung während des Zerstäubens im Nebelkammerreaktor über einen Zeitraum von mehreren Tagen (BSA) bzw. mehreren Stunden (PGA) denaturieren. Bei PGA konnte begleitend ein Verlust der enzymatischen Aktivität festgestellt werden.

Durch die Abnahme der Intensität der BSA-Bande in dem SDS-Gel wurde deutlich, dass im Reaktor chemische Veränderungen an dem BSA zu einem Ausfällen des Proteins und/oder einer Oxidation der Seitenketten der Aminosäuren führte. Da diese mit den Daten zur Schädigung der Zellkulturmedien LB und DMEM (Kapitel 4.6.1) korreliert und

abhängig von Leistung und Arbeitsfrequenz des US-Zerstäubers ist, wurde der im diesem Kapitel vorgestellte NIPAB-Assay im Rahmen dieser Arbeit als repräsentativer Standardtest genutzt, um die Auswirkungen verschiedener US-Zerstäuber bzw. unterschiedliche Regelungen der US-Zerstäuber auf Biomoleküle zu quantifizieren und somit vergleichbar zu machen. Dabei zeigte sich, dass die Stärke bzw. Geschwindigkeit des Aktivitätsverlusts primär von der eingebrachten Ultraschallenergie und –frequenz abhängt, wobei die Temperatur der US-Zerstäuberabkühlung keinen Einfluss hat (siehe Tabelle 4.5 und Abbildung 4.53).

#### 4.7.2.3 Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf die Aminosäuren L-Glutamin und L-Phenylalanin

Als Grundbausteine für die Proteinsynthese sind Aminosäuren essentieller Bestandteil von Nährmedien. Werden durch ultraschallgestützte Reaktionen Konzentrationsänderungen einer oder mehrerer Aminosäuren hervorgerufen, kann der Metabolismus der Mikroorganismen oder Zellen empfindlich gestört werden.

In dieser Arbeit wurden exemplarisch die Auswirkungen des Ultraschallzerstäubens auf die Aminosäuren L-Glutamin und L-Phenylalanin untersucht. L-Glutamin nimmt eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung von Zellen ein und ist in wässrigen Lösungen instabil [144], wobei es sich in sich in Pyroglutaminsäure (zyklisiertes inneres Amid der L-Glutaminsäure) und Ammoniak, welches im Verdacht sich negativ auf das Zellwachstum auszuwirken [145], zersetzt. Die Geschwindigkeit der Zersetzung ist abhängig von dem pH-Wert und der Temperatur der Lösung, zu Einflüssen einer ultraschallgestützten Zerstäubung finden sich keine Angaben.

Zur Durchführung der Experimente wurde der Reaktor mit 150 ml einer Lösung von L-Glutamin (8 mg/l) bzw. L-Phenylalanin (20 mg/l) in 50 mM KPP pH 7,1 befüllt und die Zerstäubung gestartet. Während des Experiments wurden regelmäßig Proben entnommen und bei -20°C gelagert. Nach Beendigung der Versuche wurde mit den Proben eine Konzentrationsbestimmung mittels Ninhydrin-Assay [146] durchgeführt.

In Abbildung 4.55 sind die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen für L-Glutamin und L-Phenylalanin gegen die Zerstäubungszeit aufgetragen. Die Konzentration von L-Glutamin nahm über einen Zeitraum von 308 h um ca. 60 % ab. Hierbei wurde kein eindeutiger Unterschied zwischen den Proben aus dem Reaktor und der Referenz sichtbar. Die Konzentration von L-Phenylalanin blieb in dem Reaktor über einen Zeitraum von 55 h relativ konstant. Danach nahm sie gleichmäßig bis zur Beendigung des Experiments nach 168 h um ca. 30 % ab. Die Konzentration der Referenz blieb über den gesamten Zeitraum konstant.

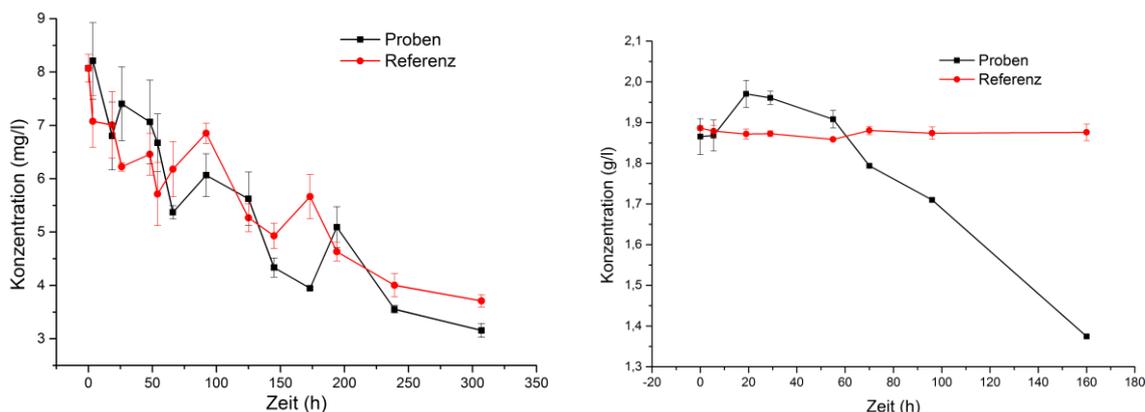


Abbildung 4.55: Links: Auftragung der Konzentration von L-Glutamin in den Reaktor- (schwarze Linie) und Referenzproben (rote Linie) gegen die Zerstäubungszeit. Rechts: Auftragung der Konzentration von L-Phenylalanin in den Reaktor- (schwarze Linie) und Referenzproben (rote Linie) gegen die Zerstäubungszeit.

Tritsch et al. (1962) [147] berichten von einer 25 %igen Zersetzung des L-Glutamins unter ähnlichen Bedingungen zu Pyroglutaminsäure und Ammonium nach 168 h. Die Ergebnisse der Experimente stimmen mit diesen Daten gut überein (30 % nach 7 Tagen). Da die Referenzproben einen gleichen Konzentrationsverlauf zeigten wie die Proben aus dem Reaktor, konnte gezeigt werden, dass durch das Zerstäuben mittels Ultraschall keine beschleunigte Zersetzung des L-Glutamins stattfindet. Das Ninhydrin reagiert lediglich mit primären Aminen, wodurch zwar Reaktionen an der Aminogruppe (z.B. Peptidbildung) der Aminosäuren detektiert werden können, allerdings werden Reaktionen an den Seitenketten und der Carboxygruppe nicht erfasst und sind somit nicht vollständig auszuschließen.

Im Gegensatz zum L-Glutamin unterscheiden sich die ermittelten Konzentrationen der Reaktor- und der Referenzproben beim L-Phenylalanin ab einer Zerstäubungszeit von 50 h deutlich. Während die Konzentration der Referenz konstant bleibt, nimmt sie in den Proben um ca. 20 % ab, welches ein deutlicher Hinweis für Reaktionen an der primären Amino-Gruppe ist. Das  $\pi$ -Elektronen-System des Phenylrings L-Phenylalanin besitzt im Absorptions- sowie im Fluoreszenzspektrum charakteristische Peaks. Daher wurde für weitere Untersuchungen von den Proben des L-Phenylalanins jeweils ein Absorptionsspektrum im Bereich von 190 nm – 800 nm und ein 3D-Fluoreszenzspektrum bei einer Anregungswellenlänge (Ex) von 200 nm – 600 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 200 nm - 600 nm aufgenommen.

In Abbildung 4.56 sind die Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben dargestellt. Für die Erstellung wurden die Werte des Spektrums der Referenz nach 0 h von den Werten aller Spektren der Reaktorproben abgezogen. Das Spektrum der Reaktorprobe nach 5,5 h Zerstäubungszeit zeigt den charakteristischen Peak (rel. Absorption = 0,18) für Phenylalanin bei 257 nm, welcher aus dem  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang des Phenolrings der Seitenkette (Absorptionsmaximum Benzol bei 256 nm) resultiert. Die Peaks zwischen 220 nm und 240 nm entstehen aus  $n \rightarrow \pi^*$  und  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Elektronenübergängen der Amin-

Funktion. Mit fortschreitender Zerstäubungszeit tritt in den Spektren ein weiterer Peak mit einem Maximum nach 168 h bei 273 nm (rel. Absorption = 1,24) auf.

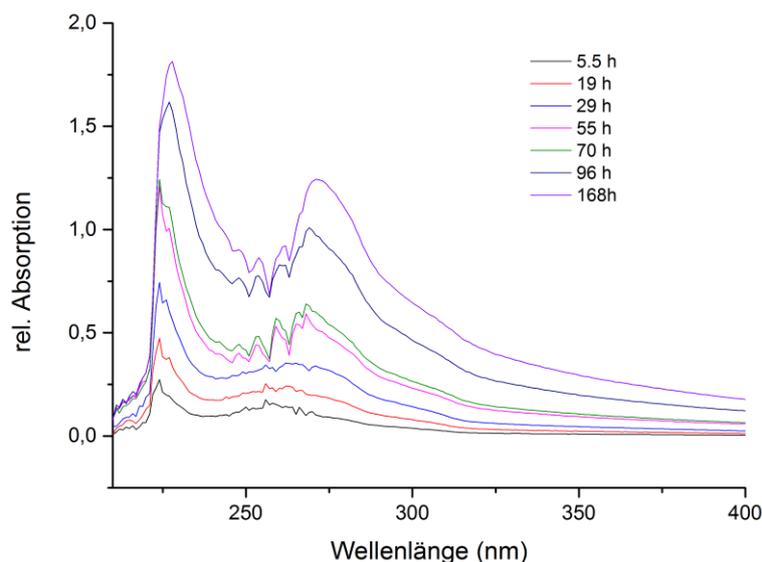


Abbildung 4.56: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben von L-Phenylalanin nach unterschiedlichen Zerstäubungszeiten. Für die Erstellung der Differenzspektren wurden die Werte der Referenzprobe nach 0 h von den Werten der Reaktorproben abgezogen

Anhand der fluoreszenzspektroskopischen Vermessung (Abbildung 4.57) der Proben konnte der Peak mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 250 nm und einer (Fluoreszenz)-Emissionsmaximum bei 290 nm L-Phenylalanin (Ex 257 nm / Em 303 nm) zugeordnet werden. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums des neu entstehenden Peaks auf 270 nm könnten mit dem hypsochromen Effekt durch das Einführen einer Hydroxy-Gruppe als Elektronendonator an den Benzol-Ring des L-Phenylalanins erklärt werden. Vergleichend können die Absorptionsmaxima von Phenol (271 nm) und Benzol (254 nm) herangezogen werden. Diese Vermutung konnte durch die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erhärtet werden, da der Absorption bei 273 nm eine Fluoreszenz bei ca. 300 - 310 nm (Abbildung 4.57 P2) zugeordnet werden konnte. Die Werte des Peaks P2 stimmen somit mit denen des L-Tyrosin (Ex 274 nm / Em 303) sehr gut überein (Abbildung 4.58), welches sich von L-Phenylalanin lediglich durch eine Hydroxy-Gruppe am Phenylring unterscheidet [148, 149].

Wie aus Abbildung 4.57 weiterhin deutlich wird, nahm die Fluoreszenzintensität des Phenylalanin-Peaks (P1) kontinuierlich ab, die Fluoreszenzintensität von Peak P2 dagegen stark zu. Eine Hydroxy-Gruppe führt neben der bathochromen ebenfalls zu einer hyperchromen Verschiebung der Absorptionen, wodurch L-Tyrosin bei gleicher

Konzentration einen ca. 7-fach größeren Absorptionskoeffizienten aufweist als L-Phenylalanin. Die Quantenausbeute  $\Theta$  der Fluoreszenz von Tyrosin ( $\Theta = 0,14$ ) ist ca. 6-mal größer als die von Phenylalanin ( $\Theta = 0,024$ ), womit die deutlich stärkere relative Fluoreszenzintensität (RFI) bei 300 – 310 nm (3200 RFI) gegenüber 280 nm (435 RFI) zu erklären wäre [149].

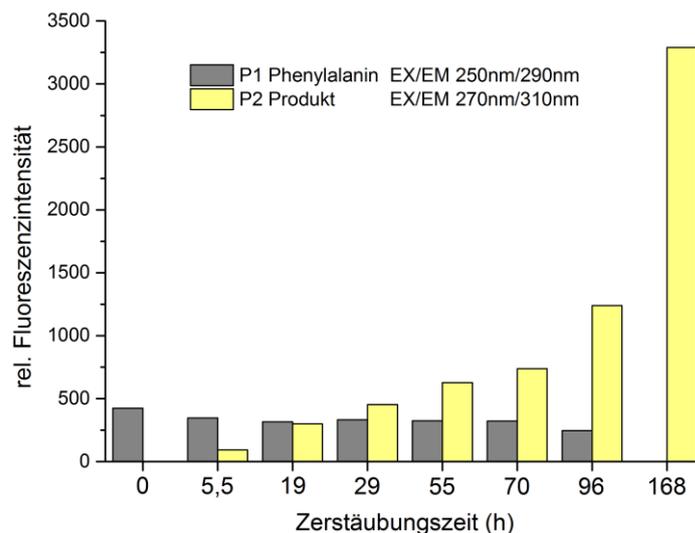


Abbildung 4.57: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten der in den zerstäubten L-Phenylalanin-Proben auftretenden Peaks P1 (L-Phenylalanin) und P2 (unbekanntes Produkt)

Unter Betracht der spektroskopischen Daten und durch hinzuziehen der typischen Absorptionen für Benzol und Phenol und der charakteristischen Fluoreszenzdaten für L-Phenylalanin und L-Tyrosin, ist die Oxidation des Phenylrings durch das Einführen einer Hydroxy-Gruppe an Phenylring des L-Phenylalanins wahrscheinlich.

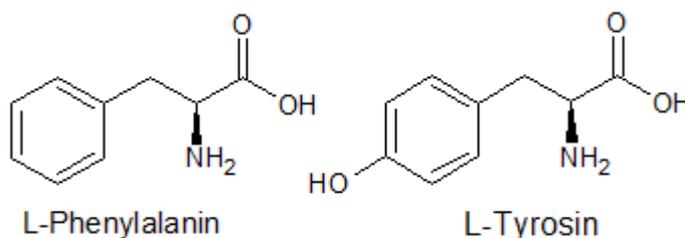


Abbildung 4.58: Struktureller Aufbau der Moleküle L-Phenylalanin und L-Tyrosin

Nach 168 h trat in dem Fluoreszenzspektrum ein weiterer schwacher Peak bei Ex 372 und Em 430 nm auf (Daten nicht gezeigt). Im Absorptionsspektrum konnte in diesem Bereich eine breite Bande zwischen 310 und 430 nm beobachtet werden. Da die Absorptionen bis in den sichtbaren Bereich des Lichts reichten, war eine gelbliche Verfärbung der Lösung sichtbar. Absorptionen und Fluoreszenz in diesen hohen Wellenlängenbereichen deuten auf

lange konjugierte  $\pi$ -Systeme und/oder auf Phenylringe mit elektronenliefernden- oder mesomeren Effekt hin [148].

Die mit dem Ninhydrin-Assay bestimmte Abnahme der Konzentration von L-Phenylalanin kann auf Reaktionen an der Aminofunktion (z.B. Peptidbindungen) zurückgeführt werden, wodurch das primäre Amin umgewandelt wird und die Verbindung mit dem Ninhydrin-Assay nicht mehr detektierbar ist.

#### **Fazit:**

Es lässt sich festhalten, dass die Ultraschallzerstäubung einer L-Glutamin-Lösung über sieben Tage möglich war, ohne dass eine deutliche Abweichung der Konzentration von den Referenzlösung auftrat. Bei einer L-Phenylalanin-Lösung war dieses für drei Tage ebenfalls möglich, danach konnte nach eine Abnahme der Konzentration im Verhältnis zur Referenzlösung festgestellt werden. Durch weiterführende spektroskopische Untersuchungen wurde eine kontinuierliche Abnahme um ca. 20 % der RFI des charakteristischen Peaks von L-Phenylalanin innerhalb der ersten 70 h festgestellt. Grund hierfür war vermutlich die Einführung einer Hydroxyl-Gruppe an den Phenylring, welches durch die Ausbildung eines neuen Peaks mit charakteristischen Absorptions- und Fluoreszenzwerten bekräftigt wurde. Ab einer Zerstäubungszeit von 70 h traten zusätzlich Reaktionen an der Aminofunktion auf, die mit dem Ninhydrin-Assay nachgewiesen wurden. Die Strukturklärung der Produkte wurde nicht weiter betrieben, da diese Nebenreaktionen für das Ziel dieser Arbeit nicht relevant sind.

#### **4.7.2.4 Einfluss des Ultraschallzerstäubens auf Antibiotika**

Antibiotika sind in der Biotechnologie wichtige Verbindungen, die z.B. in Zellkulturmedien als Schutz vor bakteriellen Kontaminationen eingesetzt werden oder selbst Produkte von Biosynthesen darstellen. Besonders ihr Potential zur Abwehr von bakteriellen Kontaminationen stellt einen wichtigen Faktor dar. Wie bereits gezeigt, kann die eingesetzte ultraschallgestützte Zerstäubung chemische Reaktionen hervorrufen bzw. beschleunigen. Da bekannt ist, dass einige Antibiotika in wässrigen Lösungen instabil sind und sich mit der Zeit zersetzen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen der Ultraschallzerstäubung auf die antibiotische Aktivität und die Struktur verschiedener Antibiotika überprüft. Hierzu gehörten die als Nährmediumzusatz häufig verwendete Mischung von Penicillin G und Streptomycin (P/S), Ampicillin und Tetrazyklin (Abbildung 4.59). Die Antibiotika wurden so gewählt, dass zwei strukturell ähnliche (Penicillin G und Ampicillin) und zwei dazu strukturell unterschiedliche Moleküle (Streptomycin und Tetrazyklin) getestet wurden. Laut Herstellerangaben haben die Antibiotika in wässrigen Lösungen eine Halbwertszeit bei RT von einigen Tagen. Die antibiotische Wirkung wurde über Hemmhot-Tests bestimmt und strukturelle Veränderungen anhand von UV/Vis-Absorptions- und 3D-Fluoreszenzspektren detektiert.

Der Hemmhof-Test wird üblicherweise verwendet um die Empfindlichkeit bestimmter Bakterien gegenüber verschiedener Antibiotika zu überprüfen. Dazu wird eine Bakteriensuspension auf einem Nährboden (hier LB-Agarplatte in einer Petrischale) ausgestrichen. Auf dieser werden kleine Filterpapierscheibchen platziert, auf die jeweils eine bestimmte Antibiotikumlösung gegeben wird. Die Lösung diffundiert in den Agar und bei einer Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber dem Antibiotikum entsteht eine Wachstumshemmung, durch die sich kreisförmige (unbewachsene) Hemmhöfe ausbilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Hemmhof-Test verwendet um mögliche Änderungen der Konzentration der Antibiotika durch natürliche Zersetzung oder durch die Ultraschallzerstäubung hervorgerufen qualitativ darzustellen. Dieses wurde ermöglicht, da durch die Diffusion der Wirkstoffe durch den Agar ihre Konzentration mit steigender Entfernung zu den Filterpapieren verringert und somit bei einer sinkenden Konzentration der Durchmesser der Hemmhöfe abnimmt. Als Teststamm dienten *E.coli* K12-Bakterien, die keine Resistenzen gegenüber Antibiotika besitzen.

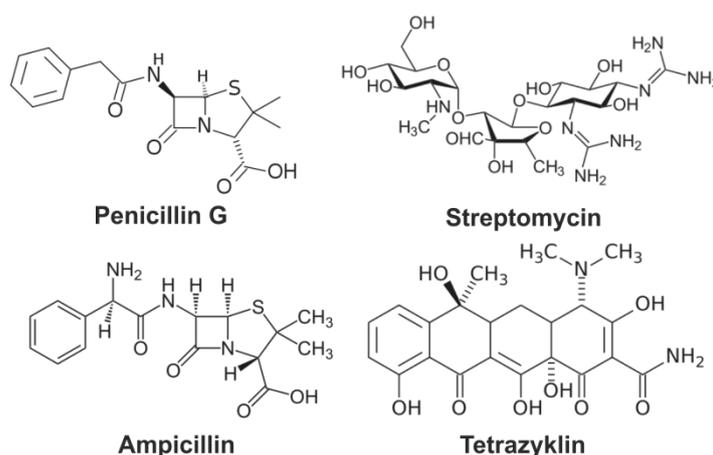


Abbildung 4.59: Strukturformeln der getesteten Antibiotika

### Hemmhof-Test

Es wurden jeweils 500 ml der Antibiotika-Lösungen vorbereitet. Hierfür wurde die üblicherweise in Zellkulturmedien eingesetzte Konzentration von P/S verdoppelt. Dieses entsprach 10  $\mu\text{g/ml}$  Penicillin-G und 10  $\text{mg/ml}$  Streptomycin, welche in 50 mM KPP-Puffer bei pH 7,3 gelöst wurden. Für Ampicillin wurde eine 50  $\mu\text{g/ml}$  Lösung in 50 nM KPP-Puffer bei 7,3 hergestellt. Um eine zu schnelle Zersetzung von Tetracyclin zu verhindern wurde von dem physiologischen pH-Wert abgewichen und die Tetracyclin-Lösung (17,5  $\mu\text{g/ml}$ ) in 50 nM Acetat-Puffer bei pH 5 angesetzt.

Der Reaktor wurde jeweils mit 150 ml einer Antibiotika-Lösung befüllt und die Ultraschallzerstäubung gestartet. Als Referenz dienten 150 ml der jeweiligen Lösung, die über den gleichen Zeitraum bei RT gelagert wurden. Die Experimente wurden über sieben

Tage (P/S, Ampicillin) bzw. fünf Tage (Tetrazyklin) durchgeführt, wobei regelmäßig Proben entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

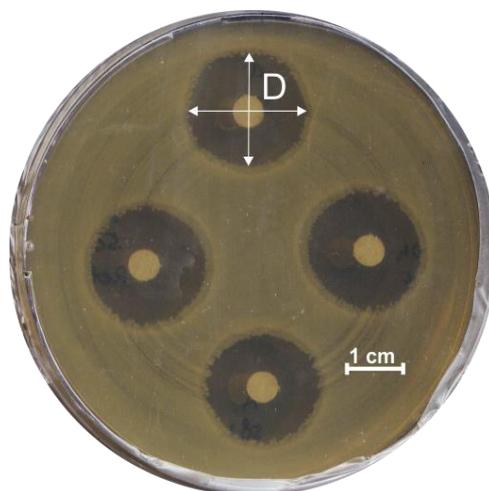


Abbildung 4.60: Exemplarisches Foto einer Agarplatte mit einem *E.coli K12*-Bakterienrasen nach zweitägiger Kultivierung ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Deutlich zu erkennen sind die Hemmhöfe um die Filterpapiere auf die  $10\ \mu\text{l}$  einer Antibiotikallösung gegeben wurden. Der Durchmesser des Hemmhofs (unbewachsene Fläche) lässt Rückschlüsse auf die antibiotische Wirksamkeit der getesteten Verbindung zu

Zur Durchführung der Hemmhof-Tests wurden vorbereitete Agarplatten mit  $100\ \mu\text{l}$  einer *E.coli K12*-Suspension ( $\text{OD}_{600} = 2$ ) ausgestrichen. Auf die Platten wurden kreisförmige Filterpapierausschnitte ( $D = 4\ \text{mm}$ ) platziert, auf die jeweils  $10\ \mu\text{l}$  einer Probe gegeben wurde. Die Platten wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  für zwei Tage inkubiert, wobei an jedem Tag der Durchmesser der Hemmhöfe gemessen wurde (Abbildung 4.60). Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten und den Effekt ungleichmäßig wachsender Bakterienrasen zu minimieren, wurden die Reaktor- und die Referenzprobe des gleichen Zeitpunkts der Probenahme auf derselben Platte getestet. Zur Auswertung wurde der Durchmesser ( $D$ ) der Hemmhöfe der jeweiligen Reaktor- und Referenzprobe eines Zeitpunkts ermittelt und durch Dividieren ( $D_{\text{Reaktorprobe}}/D_{\text{Referenzprobe}}$ ) in ein Verhältnis gesetzt. Dieses ermöglichte eine Aussage über die relative antibiotische Wirkung der Reaktor- gegenüber den Referenzproben. Der Durchmesser der Hemmhöfe wurde mit Hilfe der Software „ImageJ“ ausgemessen.

In Abbildung 4.61 sind die erhaltenen Durchmesser-Verhältnisse der Hemmhöfe zwischen Referenz- und Reaktorprobe gegen die Zerstäubungszeit aufgetragen. Es wird deutlich, dass bei allen getesteten Substanzen die antibiotische Wirkung im Vergleich zur Referenz über die Zeit abnahm. Am deutlichsten war der Effekt bei Tetrazyklin zu erkennen (siehe auch Tabelle 1). Der Durchmesser der Hemmhöfe nach 120 h Zerstäubungszeit war um 65 % geringer als die Referenz. Bei P/S nahm der Wert um ca. 25 % und bei Ampicillin um ca. 10 % ab. Die visuelle Kontrolle der Hemmhöfe zeigte, dass die antibiotische Wirkung der Referenzproben über die gesamte Dauer des Experiments lediglich leicht

abnahm. Zudem wiesen alle Proben, ausgenommen die des Tetrazyklins nach 100 h und 120 h, eine ausreichende antibiotische Wirkung auf, um deutliche Hemmhöfe zu bilden.

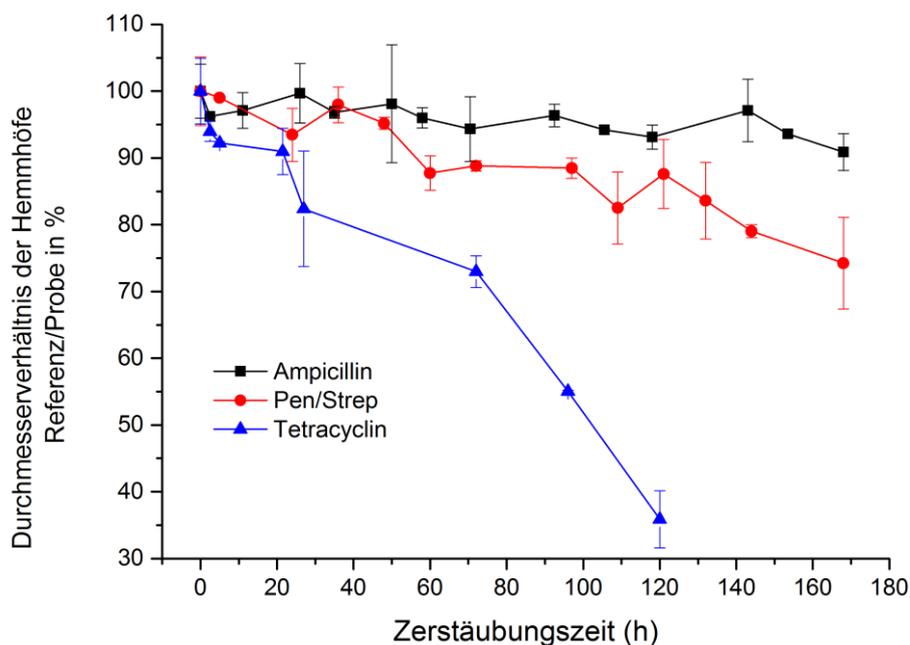


Abbildung 4.61: Auftragung des Durchmesserverhältnisses der Hemmhöfe von den Referenz- und Reaktorproben gegen die Zerstäubungszeit verschiedener Antibiotikallösungen. N = 3

In Tabelle 4.14 sind die wichtigsten Ergebnisse der Hemmhof-Tests zusammengefasst. Aufgelistet sind die Durchmesserverhältnisse der Hemmhöfe der entnommenen Referenz- und Reaktorproben zu Beginn (S) und nach Beendigung der Experimente (E). Durch den ungleichmäßigen Bakterienbewuchs war ein Vergleich der Platten und somit der Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nur bedingt möglich. Daher zeigen die ersten beiden Spalten eher Tendenzen als verlässliche Werte auf und sind mit einem \* gekennzeichnet.

Tabelle 4.14: Durchmesserverhältnisse der Hemmhöfe der entnommenen Referenz- und Reaktorproben zu Beginn (S) und nach Beendigung der Experimente (E). Durch ungleichmäßigen Bakterienbewuchs war ein Vergleich der Platten und somit der Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nur bedingt möglich. Daher zeigen die ersten beiden Spalten eher Tendenzen als verlässliche Werte auf und sind mit einem \* gekennzeichnet

	Durchmesser Verhältnis Referenz S / E	Durchmesser Verhältnis Reaktor S / E	Durchmesser Verhältnis Referenz E / Reaktor E
<b>Ampicillin</b>	84 %*	76 %*	90 %
<b>P/S</b>	81 %*	59 %*	74 %
<b>Tetrazyclin</b>	94 %*	34 %*	36 %

Der Verlust der antibiotischen Aktivität der Lösungen lässt vermuten, dass chemische Veränderungen (Oxidation, Zersetzung, Einführung funktioneller Gruppen) der Moleküle stattfanden, die die antibiotische Wirkung einschränkten oder verhindern. Sinnlogisch war in Folge zu untersuchen, ob die natürlichen Zersetzungsreaktionen aufgrund der Ultraschalleinwirkung schneller abliefen. Zur Beantwortung dieser Fragen, wurden von allen Proben Absorptions- (190 – 800 nm) sowie 3D-Fluoreszenzspektren (Ex 200 – 600 nm / Em 200-600 nm) aufgenommen. Die Ergebnisse werden im Folgenden für jede Antibiotikum-Lösung einzeln diskutiert.

### Penicillin G / Streptomycin

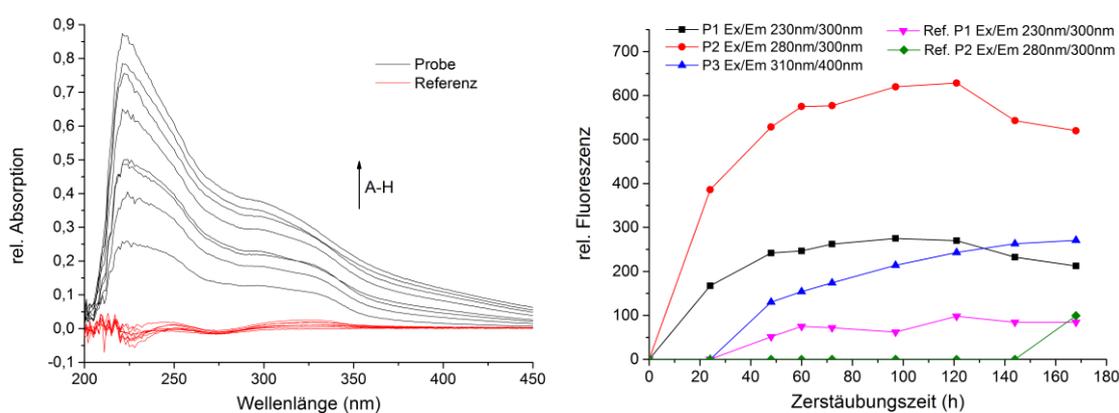


Abbildung 4.62: Links: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 10 µg/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycin in 50 mM KPP (pH 7,3) nach einer Zerstäubungszeit von 24 h (A), 48 h (B), 60 h (C), 72 h (D), 97 h (E), 121 h (F), 144 h (G), 168 h (H) als schwarze Linien und die Referenzproben als rote Linien. Zur Erstellung des Differenzspektrums wurde Spektrum der Referenzprobe nach 0 h von allen Referenz- und Reaktorproben abgezogen. Rechts: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Zerstäubungszeit der im 3D-Fluoreszenzspektrum auftretenden Peaks

Die Moleküle Penicillin G sowie Streptomycin besitzen Amin-, Sulfid- und Carbonylgruppen, die im Absorptionsspektrum zu deutlichen Banden führen. Die meisten dieser funktionellen Gruppen absorbieren im Bereich von 190-230 nm, wodurch in diesem Bereich eine sehr starke Bande im Absorptionsspektrum (Kapitel 8.1.8) detektiert wurde. Die Kombination mehrerer Gruppen in einem Molekül kann die Absorptionsmaxima der einzelnen Gruppen unterschiedlich beeinflussen, wobei durch z.B. elektronenliefernde Nachbargruppen ein bathochromer Effekt auftritt. Hierdurch zeigte das Absorptionsspektrum eine breite Bande bis ca. 350 nm (ANHANG), aus der aber wenige Informationen gezogen werden konnten. Zur besseren Darstellung der Änderungen der Absorptionseigenschaften zwischen den Proben wurde ein Differenzspektrum erstellt, bei dem die Referenz bei 0 h von allen Spektren der Referenz- und Reaktorproben abgezogen wurde (Abbildung 4.62 links). Das Differenzspektrum der Probe nach 24 h (Abbildung 4.62 links A) zeigte ein Maximum bei ca. 225 nm und eine Schulter bei 300 nm. Im Bereich von 350 – 450 nm konnten nur noch sehr leichte Absorptionzunahmen gemessen

werden. Mit zunehmender Zerstäubungszeit konnte über den gesamten Bereich von 225 – 500 nm eine stetige Zunahme der Absorptionen verzeichnet werden (Abbildung 4.62 links A-H), wobei sich der Verlauf der Spektren nicht grundlegend änderte. Auffällig war der starke Anstieg (350 %) bei 225 nm und 300 nm (300%), sowie die zunehmende Absorption im sichtbaren Bereich, die eine leichte Gelbfärbung der Lösung erklärte. Streptomycin erweist sich anhand der angegebenen Halbwertszeit als relativ stabil und die Zersetzungsprodukte finden in der Literatur keine große Beachtung. Für Penicillin werden viele verschiedene Abbaumechanismen und –produkte beschrieben. Häufig genannte Produkte sind *Benzylpenicillenic acid*, *Benzylpenillic acid*, *Benzylpenicilloic acid* und *Penicillic acid* (Penicillinsäure) [150, 151]. Diese Verbindungen sind vermutlich nur Zwischenprodukte, die weiter zerfallen. Einzig Penicillinsäure erweist sich als ein stabiles Molekül mit einem Absorptionsmaximum bei 224 nm [152]. Somit war die beobachtete Zunahme der Absorptionen bei 225 nm ein Hinweis auf die fortschreitende Bildung des Zerfallsprodukts des Penicillin Gs. Der Vergleich mit den Referenzproben zeigte ebenfalls eine Zunahme der Absorption bei 225 nm und 300 nm, die jedoch deutlich geringer ausfiel als die der Reaktorproben.

Weder Streptomycin noch Penicillin-G weisen Fluoreszenzeigenschaften auf, welches durch das Ergebnis des 3D-Fluoreszenzspektrums nach 0 h (Abbildung 4.62 rechts) deutlich wurde. Mit steigender Zerstäubungszeit bildeten sich Peaks (Ex/Em) bei 230/300 nm (Abbildung 4.62 rechts, P1), 270/310 nm (Abbildung 4.62 rechts, P2), 310/400 nm (Abbildung 4.62 rechts, P4) aus. Die Fluoreszenzintensität von P1 und P2 nahmen von 0 h bis 121 h exponentiell zu, danach war ein leichter Rückgang zu erkennen. P4 konnte zum ersten Mal nach 48 h identifiziert werden und stieg bis zu einer Zerstäubungszeit von 168 h stetig an. In der Referenzlösung wurden P1 nach 48 h und P2 nach 144 h erstmals deutlich, P4 trat während der Laufzeit des Experiments nicht auf.

### Ampicillin

Für Ampicillin wurden ebenfalls Differenz-Absorptionsspektren erstellt. Abbildung 4.63 (links) zeigt, dass mit zunehmender Zerstäubungszeit die Absorptionen über den Wellenlängenbereich von 230 - 400 nm um den 8-fachen Wert zunahm. Zusätzlich bildeten sich Maxima bei 255 nm, 287 nm und 350 nm [153]. Das Absorptionsmaximum von Ampicillin liegt bei 320 – 322 nm, dieses ist deutlich in den Absorptionsspektren der Referenz und der Reaktorprobe nach 24 h (Kapitel 8.1.8) zu finden. Nach längeren Zerstäubungszeiten (Abbildung 4.63 links B-G) wurde das Maximum von den neu auftretenden Peaks bei 287 nm und 350 nm überlagert. Die Absorptionen der Referenz (Abbildung 4.63 links H-N) zeigten den gleichen Trend, allerdings mit einem geringeren Anstieg der Absorptionen. Im Fluoreszenzspektrum waren zwei Peaks (Ex/Em) bei 260 nm / 430 nm (Abbildung 4.63 rechts P1) und 350 / 430 nm (Abbildung 4.63 rechts P2) in den Spektren der Reaktorproben sowie der Referenzproben zu erkennen. Die relative

Fluoreszenzintensität von P1 und P2 der Reaktorproben stieg von 140 bzw. 220 bei 0 h auf 1558 bzw. 2460 bei 168 h und somit um mehr als das 10-fache an. Ein deutlich geringerer Anstieg war bei den Referenzproben mit Werten nach 168 h bei 485 bzw. 731 zu verzeichnen.

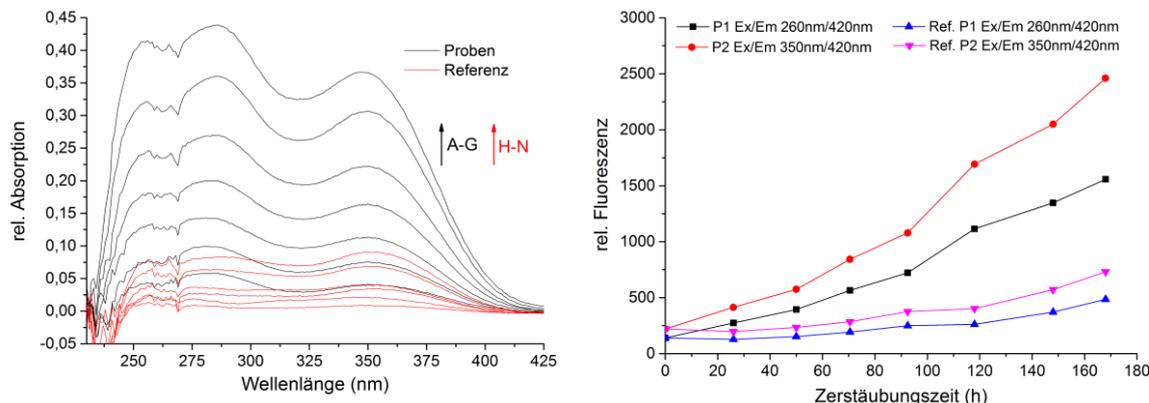


Abbildung 4.63: Links: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 50 µg/ml Ampicillin in 50 mM KPP (pH 7,3) nach einer Zerstäubungszeit von 26 h (A), 50 h (B), 70,5 h (C), 92,5 h (D), 118 h (E), 143 h (F) und 168 h (G), als schwarze Linien und die Referenzproben nach 26 h (H), 50 h (I), 70,5 h (J), 92,5 h (K), 118 h (L), 143 h (M) und 168 h (N) als rote Linien. Zur Erstellung des Differenzspektrums wurde Spektrum der Referenzprobe nach 0 h von allen Referenz- und Reaktorproben abgezogen. Rechts: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Zerstäubungszeit der im 3D-Fluoreszenzspektrum auftretenden Peaks

In der Literatur werden für Ampicillin, in Abhängigkeit von den Bedingungen wie pH-Wert und Temperatur, eine Vielzahl von Zersetzungswegen und -produkten beschrieben. Hierzu gehören z.B. *Ampicillin penicilloic acid (APC)*, *Ampicillin peniellic acid (APE)*, *Ampicillin penamalic acid (APENAM)* und *Ampicillin penilloic acid (APO)* [153-155]. Die meisten dieser Zerfallsprodukte sind aufgrund des penicillin-ähnlichen Aufbaus in leichter Veränderung bei den Zersetzungsprodukten von Penicillin-G zu finden. Ein für die Analytik entscheidendes Produkt im Vergleich zu Penicillin ist das Diketopiperazin [154] (Abbildung 4.64) von Ampicillin das aufgrund der zusätzlichen Amin-Funktion in der Seitenkette stattfindende Kondensation entsteht.

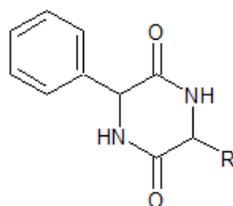


Abbildung 4.64: Strukturformel der Diketopiperazin-Funktion, eines Zersetzungsproduktes von Ampicillin [154].

Die Fluoreszenzeigenschaften (Ex 346 / Em 422) dieser Verbindung können genutzt werden um den Zersetzungsgrad von Ampicillin zu ermitteln. Die Peaks P1 und P2

(Abbildung 4.63 rechts) im Fluoreszenzspektrum ließen sich aufgrund ihrer Anregungs- und Emissionswellenlänge dem Diketopiperazon zuordnen.

### Tetrazyklin

Die Absorptionsspektren der Reaktorproben des Tetrazyklins (Kapitel 8.1.8) wiesen die charakteristischen Maxima bei 220 nm, 272 nm und 361 nm auf [156]. In den Absorptions-Differenz-Spektren ist eine deutliche Abnahme der Absorptionen bei ca. 360 nm (Abbildung 4.65 links, schwarze Linien) bei den Reaktorproben erkennbar. Eine weitere Bande trat zwischen 237 und 410 nm, die sich mit steigender Zerstäubungszeit bathochrom bis 430 nm verschob. Zusätzlich vergrößerte sich die Breite der Bande, so dass nach 120 h eine Steigerung der Absorptionen im gesamten sichtbaren Bereich gemessen wurde. Die Proben wiesen eine zunehmende Gelbfärbung auf, die sich nach einer Zerstäubungszeit von 96 h und 120 h ins Braune verschob.

In der Literatur wird für Tetrazyklin ein Fluoreszenzmaximum (Ex/Em) bei 390 nm / 515 nm angegeben [157]. In den Fluoreszenzspektren (Abbildung 4.65 rechts) der Proben konnte der Peak bei 390 nm / 510 nm (Abbildung 4.65 rechts P1) somit Tetrazyklin zugeordnet werden. Mit steigender Zerstäubungszeit nahm die relative Fluoreszenzintensität (RFI) des Peaks von 41 (0 h) bis 33 (120 h) kontinuierlich ab. In den Referenzproben blieb der Wert nahezu konstant. Die RFI des Peaks bei 315 nm / 420 nm (Abbildung 4.65 rechts P2) nahm von anfänglich 12 auf 160 nach 120 h Zerstäubungszeit zu. Die RFI eines dritten Peaks (Abbildung 4.65 rechts P3) bei 240 nm / 420 nm nahm von 0 h bis 96 h von 18 auf 75 zu und zwischen 96 h und 120 h von 75 auf 68 leicht ab. In der Referenz blieben die RFI für P1 und P2 nahezu konstant, einzig die RFI für P3 stieg von 18 (0 h) auf 47 (96 h) und sank auf 34 bei 120 h.

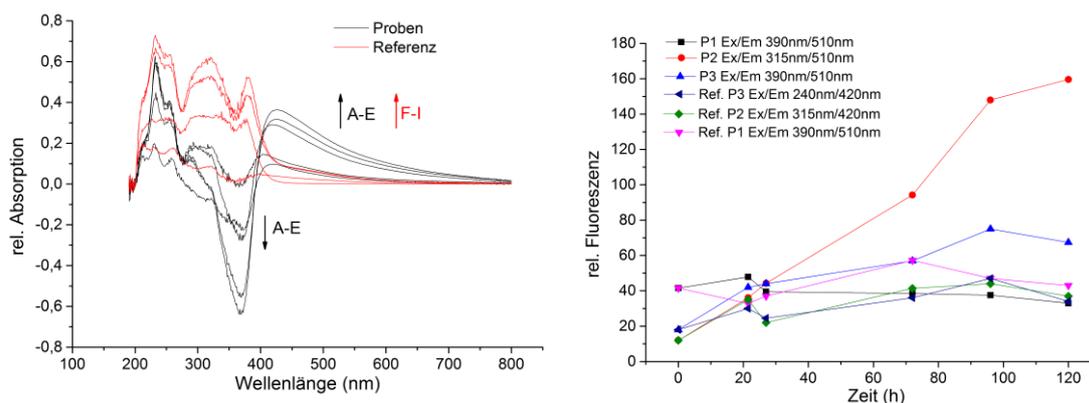


Abbildung 4.65: Links: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 17,5 µg/ml Tetrazyklin in 50 nM Acetat-Puffer (pH 5) nach einer Zerstäubungszeit von 21,5 h (A), 27 h (B), 72 h (C), 96 h (D) und 120 h (E), als schwarze Linien und die Referenzproben nach 27 h (F), 72 h (G), 96 h (H) und 120 h (I) als rote Linien. Zur Erstellung des Differenzspektrums wurde Spektrum der Referenzprobe nach 0 h von allen Referenz- und Reaktorproben abgezogen. Rechts: Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Zerstäubungszeit der im 3D-Fluoreszenzspektrum auftretenden Peaks

Der im Absorptionsdifferenzspektrum deutlich sichtbare Rückgang der für Tetrazyklin charakteristischen Bande bei 360–370 nm und die Abnahme der RFI des charakteristischen Peaks P1 (Abbildung 4.65 rechts) [158] wiesen auf eine schnellere Zersetzung des Wirkstoffs in den Reaktor- als in den Referenzproben hin. Die Zunahme der Absorptionen bei 230 nm, 420 nm und im sichtbaren Bereich deuteten auf die Bildung neuer Moleküle hin, diese Annahme wurde durch den deutlich stärkeren Anstieg der Intensität von P2 (Abbildung 4.65 rechts) und P3 (Abbildung 4.65 rechts) in den Reaktorproben im Vergleich zur Referenz verstärkt. Der genaue Zersetzungsweg von Tetrazyklin und die dabei entstehenden Zwischen- und Endprodukte ist noch nicht abschließend geklärt und in der Literatur werden verschiedene Zersetzungswegen beschrieben. Als Zwischen- und/oder Endprodukte entstehen u.a. *AnhydroTetrazyklin (ATC)*, *4-Epitetrazyklin (ETC)*, *4-Epianhydrotetrazyklin (EATC)*,  *$\alpha$ -Apo-Oxytetrazyklin ( $\alpha$ -Apo-TC)* [159, 160]. Da es sich bei den Verbindungen um Tetrazyklinderivate handelt und der Unterschied meist nur durch kleine Veränderungen der Molekülstruktur entsteht, erweist es sich als schwierig, diese Verbindungen in Absorptions- und Fluoreszenzspektren zu unterscheiden.

#### Fazit:

Es konnte gezeigt werden, dass die ultraschallgestützte Zerstäubung unterschiedlich starke Einflüsse auf die getesteten Antibiotika hatte. So war bei Ampicillin der Durchmesser der Hemmhöfe der Reaktorproben nach 168 h Zerstäubungszeit lediglich ca. 10 % geringer als der der Reaktorproben. Hieraus konnte geschlossen werden, dass die antibiotische Aktivität beider Proben nahezu gleich war und eine Zersetzung im Nebelkammerreaktor nur geringfügig schneller ablief. Diese konnte ebenfalls in den Fluoreszenzspektren beobachtet werden, wobei eine erhöhte Konzentration eines Diketopiperazins, einem Zersetzungsprodukt von Ampicillin, in den Reaktorproben nachgewiesen werden konnte. Bei einer Antibiotika-Mischung von Penicillin-G und Streptomycin lag die Differenz zum Durchmesser der Hemmhöfe nach 168 h bei ca. 25 %. In den Absorptionsspektren ist bei den Reaktorproben eine Zunahme der Absorptionen im Bereich von 210 - 500 nm mit einem Maximum bei 225 nm mit längerer Zerstäubungszeit zu erkennen. Die Zunahme der Absorptionen im Bereich von 225 nm deutete auf die Bildung von Penicillinsäure, einem Abbauprodukt von Penicillin, hin. Verglichen zu den Referenzproben ist dieser Effekt bei den Proben aus dem Reaktor stärker ausgeprägt. Nach einer Zerstäubungszeit von 24 h traten neu gebildete Peaks in den 3D-Fluoreszenzspektren auf. Diese konnten auch in den Spektren der Referenzproben festgestellt werden, die Intensitäten fielen aber deutlich geringer aus. Aufgrund der Hemmhof-Tests und der spektroskopischen Messungen konnte auch bei der Pen/Strep-Lösung von einer schnelleren Zersetzung der Komponenten im Nebelkammerreaktor ausgegangen werden.

Der höchste antibakterielle Wirkungsverlust im Vergleich zu den Referenzproben konnte bei Tetracyclin festgestellt werden. Nach 120 h Zerstäubungszeit betrug der Durchmesser der Hemmhöfe der Reaktorproben lediglich 25 % von denen der Referenzproben. Die spektroskopische Analyse der Proben zeigte ein Rückgang der für Tetracyclin charakteristischen Absorption und der RFI des charakteristischen Peaks. Visuell konnte bei den Reaktorproben eine intensiver werdende Gelbfärbung wahrgenommen werden. Die Auswertung der 3D-Fluoreszenzspektren zeigte neu gebildete Peaks mit fortschreitender Zerstäubungszeit. Die gleichen Veränderungen waren in abgeschwächter Form in der Referenz erkennbar. Eine genaue Analyse der entstandenen Produkte konnte mit den angewendeten Methoden nicht durchgeführt werden, ist aber auch nicht für diese Arbeit relevant, da die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen alle benötigten Informationen um die Einschätzung und Weiterentwicklung des Nebelkammerreaktors lieferten. Gründe für die schnellere Zersetzung können neben der Ultraschallenergie und der Bildung von Radikalen durch Kavitation (Kapitel 3.4.2.1) auch oxidative Effekte durch die große Oberfläche und den effektiven Sauerstoffeintrag in die Aerosoltröpfchen (Kapitel 4.5.2) sein. Der Einsatz von Antibiotika zur Verringerung des Kontaminationsrisikos ist den Ergebnissen nach über eine Woche durchaus möglich, bei der Wahl des Antibiotikums sollte aber auf die Langzeitstabilität im Nebelkammerreaktor geachtet werden.

### 4.7.3 Aktive Verkeimung

Kontaminationen mit Fremdorganismen stellen ein ständiges Risiko für Kultivierungen von Säugerzellen dar, da sie deutlich geringe Teilungsraten (zwischen 24 und 48 h) im Gegensatz zu den meisten Bakterien (Teilungsrate bis zu 20 min (exponentielle Phase)) aufweisen und somit schnell überwachsen werden. In dem Nebelkammerreaktor sollen die Proben nicht wie in anderen Bioreaktoren direkt mit dem Medium im Reservoir in Kontakt stehen, sondern indirekt über das Aerosol. Als Fragestellung ergibt sich hieraus, ob dem Ultraschall ausgesetzte Kontaminationen im Mediumreservoir überleben und ob Mikroorganismen aufgrund ihrer relativ hohen Masse mit dem Aerosol transportiert werden können. Durch den Energieeintrag des Ultraschalls und zusätzliche Effekte wie z.B. Kavitation und der Entgasung (Kapitel 3.4.2) herrschen im Mediumreservoir schlechte Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen. Im Modellexperiment sollte eine Kontamination mit *E.coli K12*-Bakterien nachgestellt und die Ausbreitung verfolgt werden.

Für die Simulation der Kontamination wurde der Reaktor mit 140 ml DMEM-Medium befüllt. Parallel wurde eine *E.coli-K12* Vorkultur angezüchtet. Bei einer OD von 1 (600 nm) wurden 10 ml der Vorkultur in den Reaktor überführt. Als Probenersatz wurde eine Schale (max. Volumen = 10 ml) auf dem Lochgitter platziert. Der Reaktor wurde bei 38 °C im Inkubator und einer US-Kühltemperatur von 33°C bei zwei US-Zerstäuberleistung (37,4 W, 47,6 W) betrieben. Es erfolgte eine Probenahme nach 1,5 h, 3 h, 4 h, 5 h und

11 h. Von den Proben wurde die optische Dichte bei 600 nm und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

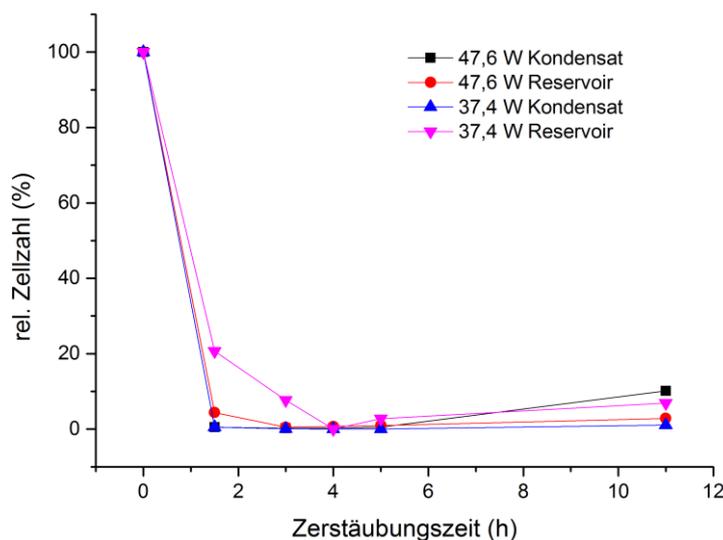


Abbildung 4.66: Auftragung der relativen Zellzahl, bezogen auf die Zellzahl zu Beginn des Experiments, einer simulierten Kontamination des Nebelkammerreaktors mit *E.coli-K12*-Bakterien gegen die Zerstäubungszeit.

In Abbildung 4.66 ist die prozentuale Zellzahl im Verhältnis zu der Zellzahl nach dem Inokulieren gegen die Zeit für das Mediumreservoir und die Schale bei einer US-Zerstäuberleistung von 37,4 W und 47,6 W aufgetragen. Bereits bei einer Leistung von 37,4 W ging die Zellzahl nach 1,5 h auf 20 %, nach 3 h auf 8 % zurück, und zwischen 4 h und 11 h hielt sich der Wert bei ca. 5 %. In dem „Kondensat“ auf der Schale wurde zu jedem Zeitpunkt eine geringe Zellzahl von ca. 1 % des Ausgangswerts ermittelt. Bei einer US-Zerstäuberleistung von 47,6 W lag die Zellzahl nach 1,5 h unter 5 % und im weiteren Verlauf lag der Wert bei unter 3 %. In dem „Kondensat“ liegt die Zellzahl zwischen 1,5 h und 5 h bei 0 %, zwischen 5 h und 11 h steigt der Wert auf ca. 10 %.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich eine Kontamination mit *E.coli-K12* Bakterien durch den Aufbau und die Funktionsweise des Nebelkammerreaktors eindämmen ließ. Bei längerer Ultraschallexposition sank, vermutlich wegen einer Schädigung bzw. Zerstörung der Zellwand (Lyse) durch Kavitationsbläschen, die Zahl der lebenden *E.coli K12*-Bakterien. Zudem könnte Ultraschall den Zellmetabolismus stören und so zu einer Wachstumshemmung und zum Absterben der Zelle führen (Kapitel 3.4.3). Eine weitere mögliche Ursache ist die in Kapitel 3.4.2 beschriebene Entgasung von Flüssigkeiten durch Ultraschall, sodass eine für das Überleben/Wachstum zu geringe Sauerstoffkonzentration im Medium vorhanden gewesen sein könnte. Da die Größe des Inokulums im Vergleich zu dem bei ungewollten Kontaminationen relativ hoch war, kann eine „natürliche“ Kontamination mit *E.coli-K12* vermutlich komplett verhindert werden. Das Ergebnis kann

nicht für alle Mikroorganismen verallgemeinert werden und müsste ggf. durch weitere Untersuchungen evaluiert werden. Als weiteres wichtiges Ergebnis kann festgestellt werden, dass mit dem Aerosol relativ schwere Objekte wie Bakterien transportiert werden können. Daher können die Ergebnisse aus Kapitel 4.5.4 erweitert und davon ausgegangen werden, dass alle in Medien gelösten Moleküle mit dem Aerosol transportiert werden.

#### 4.7.4 Kultivierung von *Aspergillus niger* im Nebelkammerreaktor-Typ I

In den vorherigen Kapiteln wurden die Stärken des Nebelkammerreaktors, wie z.B. ein effizienter Sauerstoffeintrag (Kapitel 4.5.2 und eine konstante Temperatur im Reaktorinneren (Kapitel 4.5.1) beschrieben. Weiterhin wurde die grundlegende Funktionalität des Prinzips der ultraschallgestützten Tröpfchen-/Aerosolbildung aus Nährmedien zur Versorgung von im Aerosol platzierten Proben bestätigt werden, da z.B. der Transport von Nährstoffen mit dem Aerosol (Kapitel 4.5.4) und der Stabilität von Nährmedien über mehrere Tage (Kapitel 4.6.1), bewiesen wurde.

Entscheidend für die Evaluierung des Nebelkammerreaktors ist jedoch, dass die in Einzelexperimenten herausgearbeiteten Eigenschaften im Zusammenspiel eine physikalisch und chemisch Umgebung bieten, die es ermöglicht eine Kultivierung von Mikroorganismen und/oder Säugerzellen erfolgreich durchzuführen. Hierbei ist es von primärer Wichtigkeit, dass ein stabiles Wachstum über mehrere Tage garantiert werden kann. Bevor kostenintensivere Kultivierungen mit Säugerzellen sinnvoll waren, sollte eine Kultivierung mit dem biotechnologisch wichtigen Expressionsstamm *Aspergillus niger* (*A.niger*) durchgeführt werden. Im Gegensatz zu Säugerzellen ist dieser relativ unempfindlich gegenüber den Kultivierungsbedingungen. *A.niger* wächst normalerweise in Suspension, kann aber z.B. in Alginate immobilisiert werden. Im Nebelkammerreaktor ist es notwendig immobilisierte Zellen bzw. Mikroorganismen, die im Aerosol platziert werden zu verwenden. Eine Abwaschung oder ein Eintragen von Zellen in das Mediumreservoir sollte somit vermieden werden.

Für die Immobilisierung wurden die *A.niger*-Sporen in einer 3 % igen sterilen Natrium-Alginatlösung suspendiert, so dass sich eine Konzentration von  $10^9$  Sporen/ml ergab. Die Lösung wurde in eine speziell angefertigte Apparatur gegeben, die eine hohe Anzahl möglichst gleichgroßer Alginatkugeln produziert. Wie Abbildung 4.67 zeigt, besteht die Apparatur aus einem druckbeständigen Gefäß aus Edelstahl, an das über ein Ventil im Deckel Druckluft gegeben werden kann. Durch den Überdruck wird die Alginatlösung durch die auswechselbaren Düsen (Kanülen) gedrückt, wodurch Tropfen geformt werden, die in die bereitgestellte 2 %ige  $\text{CaCl}_2$ -Lösung tropfen und aushärten können.

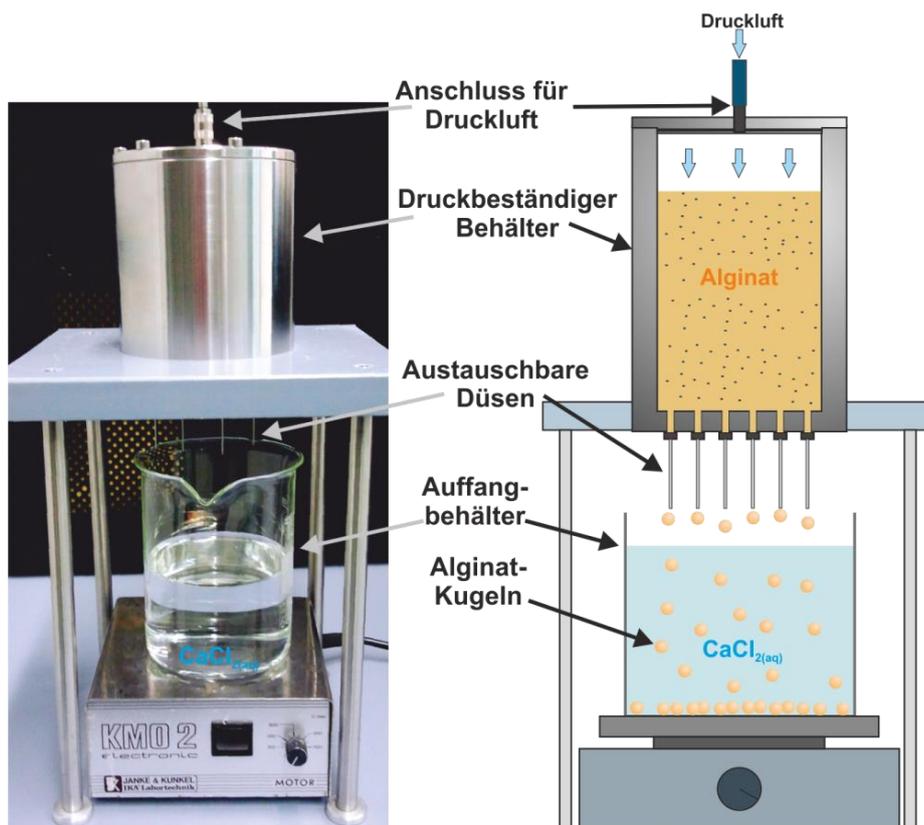


Abbildung 4.67: Foto (links) und schematische Abbildung (rechts) des verwendeten Aufbaus zur Herstellung großer Mengen Na-Alginatkugeln. Der Druckbeständige Behälter aus Edelstahl wurde für diese Aufgabe explizit angefertigt.

Für das hier beschriebene Experiment wurden Kanülen mit einem Durchmesser von 0,8 mm und ein Überdruck von 0,4 bar verwendet. Die erhaltenen „Alginatkugeln“ mit einem Durchmesser von ca. 2 mm wurden für zwei Stunden in der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung ausgehärtet und anschließend jeweils ca. 30 Alginatkugeln in zwei Metallnetze überführt (siehe Abbildung 4.68). Die Metallnetze wurden auf einem Ständer in dem *NKR-Typ I* platziert, der es zum einen ermöglicht, dass das überflüssige Nährmedium zurück in das Reservoir fließen kann. Zum anderen wurde ein Abstand von 2,5 cm zum Reaktorboden garantiert, so dass die Alginatkugeln in dem Reaktorbereich mit einer hohen Aerosoldichte (Kapitel 4.4.3) und optimalen Temperaturbedingungen (Kapitel 4.5.1) platziert waren.

Für die Kultivierung wurden 150 ml FM-Medium (10 g/l Glucose) in den Reaktor gefüllt. Die Inkubortemperatur wurde auf 31 °C geregelt, die Ultraschallkühlung auf 27 °C, so dass eine Reaktorinnenraumtemperatur von 30 °C herrschte. Der US-Zerstäuber *AW-Typ I* wurde bei maximaler Leistung (47,6 W) betrieben.

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration und des pH-Werts wurden regelmäßig entnommene Mediumproben vermessen. Für mikroskopische Aufnahmen wurden bei einigen Probenahmen aus den Metallnetzen zusätzlich Alginatkugeln entnommen und das Wachstum und die Mycelbildung verfolgt.

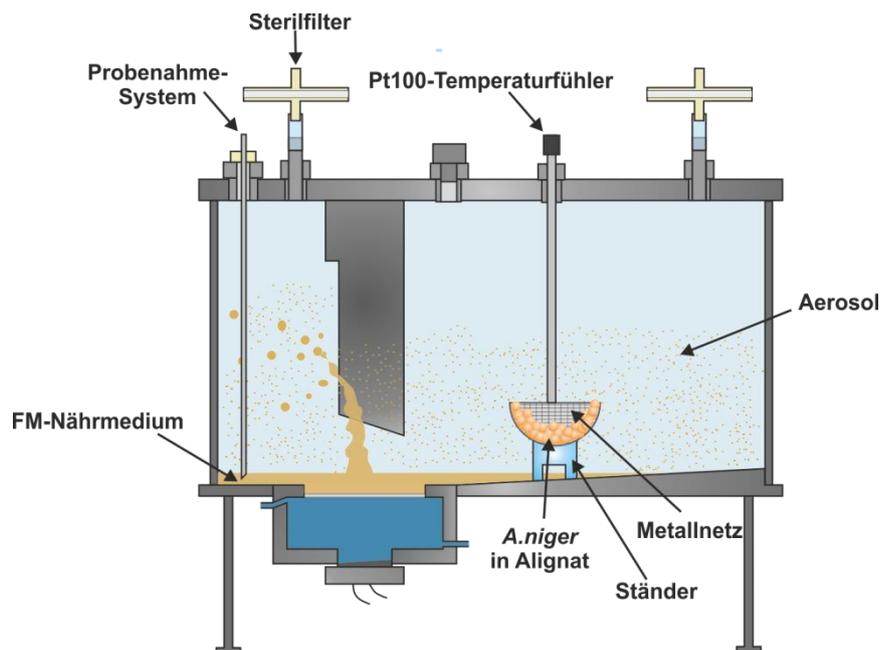


Abbildung 4.68: Schematische Abbildung des Aufbaus für die Kultivierung von in Na-Alginat immobilisiertem *A.niger*

Abbildung 4.69 zeigt die Daten der Prozessüberwachung, Abbildung 4.70 die mikroskopischen Aufnahmen der mit *A.niger* besiedelten Alginatkugeln nach 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 60 h und 96 h Kultivierungszeit. Da die Ultraschallzerstäubung keinen Einfluss auf die Glucosekonzentration im Reaktor hat (Kapitel 4.6.2.1) deutete die abnehmende Glucosekonzentration auf eine Umsetzung durch den *A.niger* hin.

Die Daten der Prozessüberwachung werden durch die mikroskopischen Aufnahmen gestützt, auf denen die Ausbildung eines Mycel deutlich zu erkennen ist. Zu Beginn der Kultivierung lagen lediglich *A.niger*-Sporen (als schwarze Punkte in Abbildung 4.70, 0 h zu erkennen) in den Alginatkugeln vor. Bis zu einer Kultivierungsdauer von 24 h (Abbildung 4.70, 24 h) breitet sich das Mycel vornehmlich innerhalb der Alginatkugeln aus. In diesem Zeitraum war eine relativ geringe Abnahme der Glucosekonzentration von 10,2 g/l auf 8,1 g/l im Medium zu beobachten. Wie bereits auf der Aufnahme nach 24 h zu erkennen, wuchs das Mycel aus dem Alginat heraus und bis zum Ende der Kultivierung nach 96 h bildet sich ein dichtes externes Mycel aus. Während dieser Phase nahm der Glucoseverbrauch (von 8,1 g/l nach 24 h auf 1,3 g/l nach 72 h) stark zu. Nach 96 h wurde die Kultivierung beendet, da sich die Glucosekonzentration bei ca. 1 g/l hielt und verhindert werden sollte, dass durch eine Nährstofflimitierung Sporen oder auch Mycelfragmente in das Mediumreservoir gelangen.

Der pH-Wert stieg im Laufe der Kultivierung von 5,9 auf 6,3 (Abbildung 4.69).

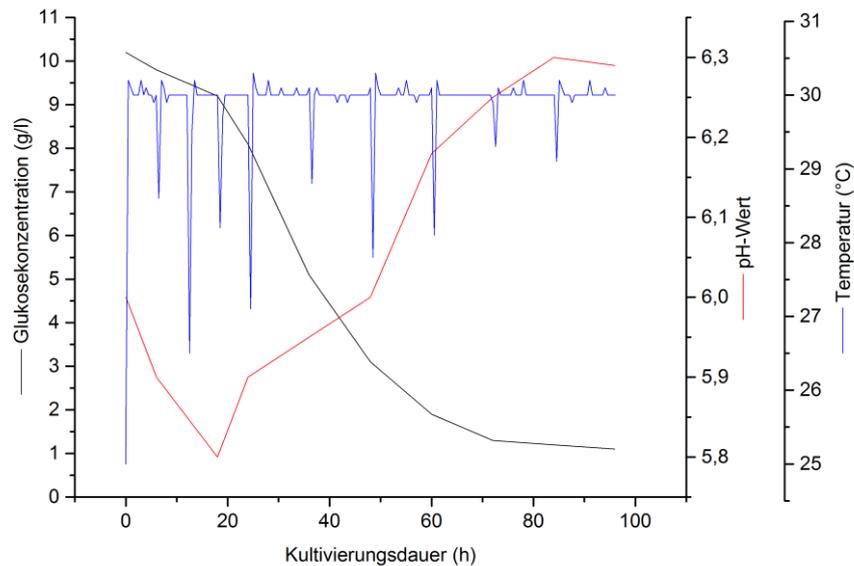


Abbildung 4.69: Daten der Prozessüberwachung der Kultivierung im Nebelkammerreaktor von in Na-Alginat immobilisiertem *A.niger* in FM-Medium

Die Temperatur konnte in der Reaktormitte während der gesamten Kultivierung konstant bei den gewünschten 30 °C gehalten werden, es traten lediglich kurzfristige Abweichungen bei der Probenahme auf, deren Höhe abhängig davon war ob eine Alginatkugelprobe ( $\Delta T$  bis zu 3,5 °C) oder lediglich eine Mediumprobe ( $\Delta T$  bis 1,5 °C) entnommen wurde.

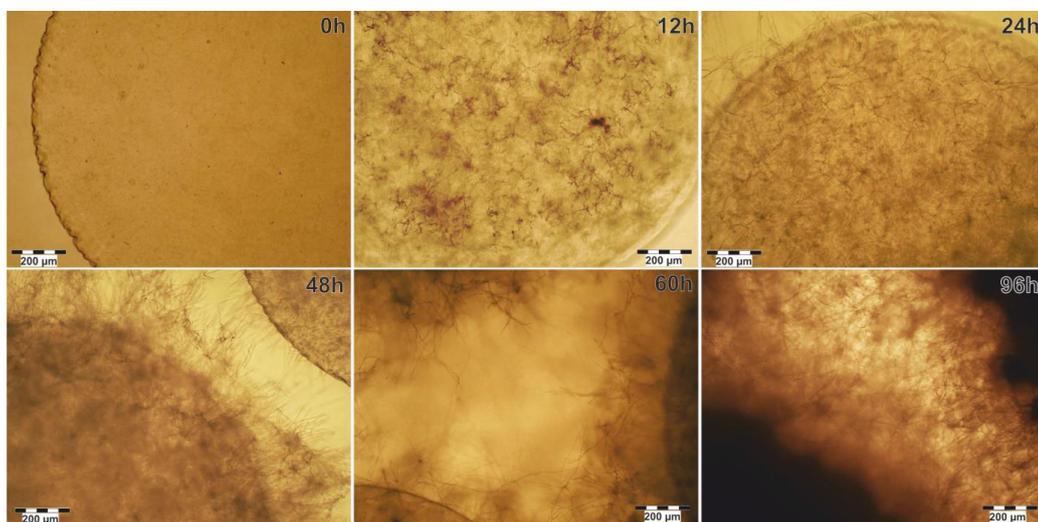


Abbildung 4.70: Mikroskopische Aufnahmen von in Na-Alginat immobilisiertem *A.niger*. Abgebildet sind aus dem Nebelkammerreaktor entnommene Proben nach einer Kultivierungsdauer von 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 60 h und 96 h. Die Aufnahme der Probe nach 0 h zeigt die immobilisierten *A.niger*-Sporen in einer Na-Alginatkugel. Nach 12 h hat sich in den Kugeln bereits ein Mycel ausgebildet, das nach ca. 24 h aus den Na-Alginatkugeln herauswächst und nach 96 h ein dichtes externes Mycelgeflecht gebildet hat.

Die erfolgreiche Kultivierung des *A.nigers* belegt die Funktionalität des Nebelkammerreaktors. In Einzelexperimenten konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass Bestandteile des Nährmediums mit dem Aerosoltröpfchen zu allen Stellen des

Nebelkammerreaktors transportiert werden können (Kapitel 4.5.4). Das Wachstum des *A.niger* und die damit verbundene Versorgung der in immobilisierten Zellen über das Aerosol mit Nährstoffen zeigen, dass dieses auch für komplexe Lösungen (Nährmedien) zutrifft. In Kapitel 4.5.1 wurden Untersuchungen zur Temperaturverteilung innerhalb des Nebelkammerreaktors durchgeführt und der optimale Bereich für die Platzierung von Proben, hier Alginatkugeln, definiert. Während der Kultivierung konnte die Temperatur konstant bei den benötigten 30°C gehalten werden und somit ein schnelles Wachstum ermöglicht werden. Als weitere wichtige Kriterien konnte bewiesen werden, dass die Aerosoldichte (siehe auch Kapitel 4.4.3) an den gewählten Stelle im Nebelkammerreaktor hoch genug ist um ein ausreichendes Volumen Medium als Aerosoltröpfchen zu der *A.niger*-Kultur zu transportieren und mit Nährstoffen zu versorgen. Bereits in Kapitel 4.6.1 wurde dargestellt, dass Nährmedien über mehrere Tage stabil zerstäubt werden können. Auch das zur Kultivierung des *A.nigers* eingesetzte FM-Medium blieb für die Dauer der Kultivierung (96 h) intakt. Der Vergleich mit einer Kultivierung unter gleichen Bedingungen in einem 500 ml Schüttelkolben (Daten der Prozessüberwachung in Kapitel 8.1.9) zeigt zwar ein schnelles Verbrauch der Glucose und ein schnelleres Wachstum des *A.nigers*, allerdings hing dieses mit dem Ablösen von Mycelfragmenten von den Alginatkugeln und einer Ausbildung von für *A.niger* typischen Mycelkugeln außerhalb des Alginats ab und ist daher nicht direkt vergleichbar.

#### 4.7.5 Fazit des Kapitels

In diesem Teil der Arbeit wurden die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich des Einflusses des eingesetzten Ultraschalls auf Nährmedien und einzelne Bestandteile vorgestellt. Zunächst konnte anhand der Nährmedien DMEM und LB gezeigt werden, dass diese über mehrere Tage (DMEM 2-3 Tage und LB-Medium 3-4 Tage) mittels Ultraschall in dem Nebelkammerreaktor zerstäubt werden konnten, ohne dass signifikante Veränderungen an der Mediumzusammensetzung oder Qualität auftraten. (Kapitel 4.6.1) Dieses wurde durch externe Testkultivierungen von *E.coli-K12*-Bakterien und *SaOs-2*-Zellen in dem jeweiligen zerstäubten Medium (LB-Medium und DMEM-Medium) überprüft. Längere Zerstäubungszeit führte zu einer Abnahme der Mediumqualität, welches anhand eines schlechteren Wachstums von *E.coli K12*-Bakterien bzw. der Abnahme der Viabilität von *SaOs-2*-Zellen deutlich wurde. Beim LB-Medium konnte eine Verfärbung von gelblich zu braun festgestellt werden, welche durch die Zunahme der Absorptionen im sichtbaren Bereich unterstrichen werden konnte. Zusätzlich traten zunehmende Absorptionen im UV-Bereich auf, die auf eine chemische Veränderung der Inhaltsstoffe hindeuteten. Zur weiteren Klärung dieser Effekte und zur Ermittlung von möglichem Optimierungspotential bezüglich des eingesetzten US-Zerstäubers und des Reaktordesigns, wurden ausgewählte Bestandteile von Nährmedien (Proteine, Aminosäuren, Salze, Glucose und Antibiotika) untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Energieeinwirkung durch das ultraschallgestützte Zerstäuben über sieben Tage keine signifikanten Veränderungen an Glucose und einem Phosphatpuffersystem hervorrief (Kapitel 4.6.2.1).

Als exemplarische Aminosäuren wurden das in wässrigen Lösungen relativ instabile L-Glutamin und das aromatische L-Phenylalanin (Kapitel 4.6.2.3) untersucht. Im Falle des L-Glutamins konnte keine schnellere Zersetzung im Reaktor als in der Referenzlösung festgestellt werden. Bei L-Phenylalanin konnten weiterführende spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass aufgrund der Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften der Lösung während der ersten 72 h Zerstäubungszeit vermutlich die Einführung einer Hydroxyl-Gruppe an dem Phenylrest stattfand, wobei die Aminofunktion zunächst intakt blieb. Ab einer Zerstäubungszeit von 80 h konnte ein kontinuierlicher Rückgang der verfügbaren Aminofunktionen und eine Abnahme der für L-Phenylalanin charakteristischen Fluoreszenz gemessen werden, was auf weitere strukturverändernde Reaktionen schließen ließ.

Im Rahmen der Testung des Einflusses des Ultraschallzerstäubens auf die Antibiotika Ampicillin, Tetrazyklin und Penicillin/Streptomycin (P/S) (Kapitel 4.6.2.4) wurde ihre antibiotische Wirkung mittels Hemmhof-Test nach verschiedenen Zerstäubungszeiten an *E.coli-K12*-Bakterien getestet. Während der Wirkungsverlust bei der getesteten P/S-Lösung mit ca. 20 % und Ampicillin-Lösung mit ca. 10 % gegenüber der natürlichen Zersetzung nach sieben Tagen Zerstäubungszeit relativ gering war, lag die Differenz bei der Tetrazyklin-Lösung bei ca. 65 %. Anhand zusätzlicher spektroskopischer Untersuchungen der Proben konnten vermehrte Zersetzungsprodukte in den Reaktorproben identifiziert werden, welches die Ergebnisse des Hemmhoftests bestätigte.

Bei den getesteten Proteinen BSA und dem Enzym Penicillin-G-Acylase (PGA) konnte mittels Absorptionsspektroskopie eine fortschreitende Denaturierung festgestellt werden. Einhergehend nahm die enzymatische Aktivität der PGA innerhalb von 4 h stark ab (Kapitel 4.6.2.2). Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass proteinhaltige komplexe Lösungen wie Nährmedien deutlich länger intakt blieben. Grund hierfür können stabilisierende Effekte oder das Abfangen der Ultraschallenergie anderer Moleküle sein. Da der Effekt des Ultraschallzerstäubens die schnellsten und eindeutigsten Auswirkungen auf PGA hatte wurde der in Kapitel 4.6.2.2 vorgestellte NIPAB-Assay als repräsentativer Standardtest etabliert, um die Auswirkungen verschiedener US-Zerstäuber (Kapitel 4.4.4) bzw. unterschiedlicher Regelungen der US-Zerstäuber (Kapitel 4.6.2.2) auf Biomoleküle zu quantifizieren und somit vergleichbar zu machen. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass die Geschwindigkeit des Aktivitätsverlustes durch eine Verminderung der Leistung, eine Pulsung der Zerstäubung oder eine höhere Frequenz (siehe Kapitel 4.4.4) zu signifikant verlangsamten Aktivitätsverlusten von PGA führten  
Tabelle 4.15.

Tabelle 4.15: Auflistung der unterschiedlichen Zeiträume bis zum kompletten Aktivitätsverlusts von PGA bei unterschiedlichen US-Zerstäubern bzw. verschiedenen Regelungen der Zerstäuber. Es wird deutlich, dass eine Reduzierung der Leistung, eine höhere Arbeitsfrequenz des US-Zerstäubers und eine gepulste Zerstäubung einen deutlich verlangsamen Effekt auf den Aktivitätsverlust der PGA haben.

US-Zerstäuber	<i>AW-Typ I</i>	<i>TDK-NB80</i>				
Frequenz	1,69 MHz	2,48 MHz				
Leistung	47,6 W	40,8 W	37,4 W	47,6 W	37,4 W	19,7 W
Pulsung (an/aus)	-	-	-	5 s / 10 s	5 s / 10 s	-
Zeitraum bis zum kompletten Aktivitätsverlust von PGA	4 h	8 h	16 h	10 h	26,5 h	65 h

Wird davon ausgegangen, dass sich diese Tendenz auf alle durch ultraschallbeeinflussten Moleküle übertragen lässt, könnten durch Änderungen an der US-Zerstäubereinheit (Kapitel 4.3) und dem Reaktordesign eine deutlich verlängerte Langzeitstabilität der Medien erzielt werden.

Anhand einer aktiven Verkeimung sollte getestet werden ob und auf welchem Weg sich Kontaminationen im Nebelkammerreaktor verbreiten können. Eine simulierte Kontamination von DMEM mit *E.coli K12*-Bakterien zeigte, dass sich die Bakterien im Reservoir nicht vermehren konnten und lediglich eine geringe Menge lebender Bakterien zu Beginn des Experiments mit dem Aerosol transportiert wurden. Als zusätzlich Erkenntnis konnten die Ergebnisse aus Kapitel 4.4.3 bestätigt werden, da selbst relativ schwere Objekte, wie z.B. Bakterien und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit alle in Nährmedien vorkommenden Verbindungen mit dem Aerosol transportiert werden können. Abschließend wurde erfolgreich eine Kultivierung des biotechnologisch relevanten Pilzes *Aspergillus niger* (*A.niger*), welcher in Na-Alginat immobilisiert wurde, durchgeführt und das Wachstum über 96 h verfolgt (Kapitel 4.6.4). Hierdurch konnten die vielversprechenden, in Einzelexperimenten gewonnen Ergebnisse dieser Arbeit, bestätigt und die Funktionalität des Nebelkammerreaktors als Bioreaktor belegt werden. Entscheidend war hierbei, dass das Nährmedium über die Kultivierungsdauer von 96 h stabil blieb, ausreichend Nährstoffe und Gase über die Aerosoltröpfchen zu der *A.niger*-Kultur transportiert wurden und eine konstante Temperatur gehalten werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der *NKR-Typ I* in Kombination mit dem US-Zerstäuber *AW-Typ I* bereits geeignet ist mehrtägige Kultivierungen einfacher Mikroorganismen durchzuführen. Als nachteilig erweisen sich die nach mehreren Tagen auftretende Unbrauchbarkeit von Nährmedien bzw. die chemischen Veränderungen an deren Bestandteilen, im Besonderen an Proteinen. Erste vielversprechende Schritte zur Optimierung konnten anhand des Enzyms PGA aufgezeigt werden. Hierbei gilt es primär die ins Nährmedium eingebrachte Ultraschallenergie, z.B. durch eine Verringerung der Leistung des US-Zerstäubers oder einer gepulsten Zerstäubung, zu verringern und/oder US-Zerstäuber mit möglichst hohen Arbeitsfrequenzen von ca. 2,5 MHz zu verwenden.

## 4.8 Weiterentwicklung des Nebelkammerreaktor-Typ I zu einem optimierten Nebelkammerreaktor-Typ II

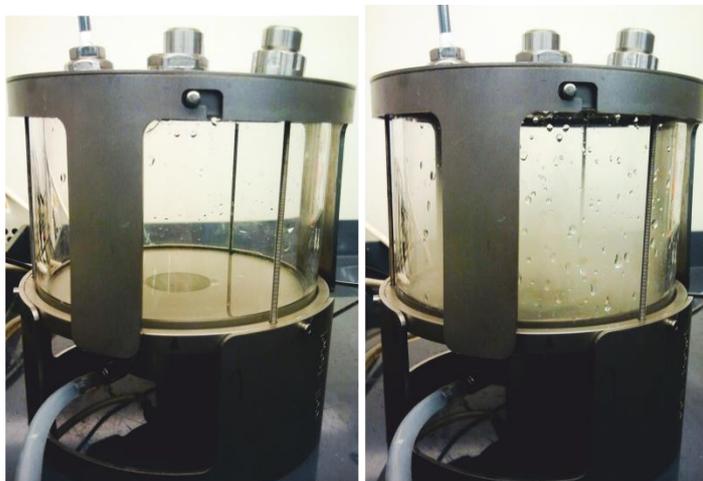


Abbildung 4.71: *NKR-Typ II* als Seitenansicht mit deaktiviertem US-Zerstäuber (links) und während des Betriebs mit 50%iger Aerosolfüllung (rechts)

Die in Kapitel 4.5 beschriebenen Experimente zur reaktionstechnischen Charakterisierung des *NKR-Typ I* konnten die erhofften Vorteile eines Nebelkammerreaktors grundsätzlich bestätigen. Optimierungspotential konnte bei den Aufwärmzeiten und der Temperaturverteilung (Kapitel 4.5.1), dem  $\text{CO}_2$ -Eintrag (Kapitel 4.5.3) bei passiver Begasung des Reaktors und der Handhabung bzw. dem Gewicht des *NKR-Typ I* aufgezeigt werden. Als Lösung boten sich die Reduzierung des Reaktorvolumens und eine abweichende Positionierung der US-Zerstäubereinheit an. Als Schwachpunkt des Nebelkammerreaktors (*NKR-Typ I* + *AW-Typ I*) erwies sich der nach mehrtägiger Zerstäubungszeit auftretende destruktive Effekt auf Bestandteile von Nährmedien (Kapitel 4.6), der primär von der verwendeten Leistung und Frequenz des US-Zerstäubers abhängt. Durch die Reduzierung des Reaktorvolumens sollte ermöglicht werden die US-Zerstäuber bei geringerer Leistung oder gepulst einzusetzen und somit die Stabilität der Nährmedien über deutlich längere Zeiträume zu gewährleisten.

### 4.8.1 Aufbau

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen ein komplett überarbeiteter *NKR-Typ II* (Abbildung 4.71) geplant und in der Feinmechanikwerkstatt des TCI gefertigt.

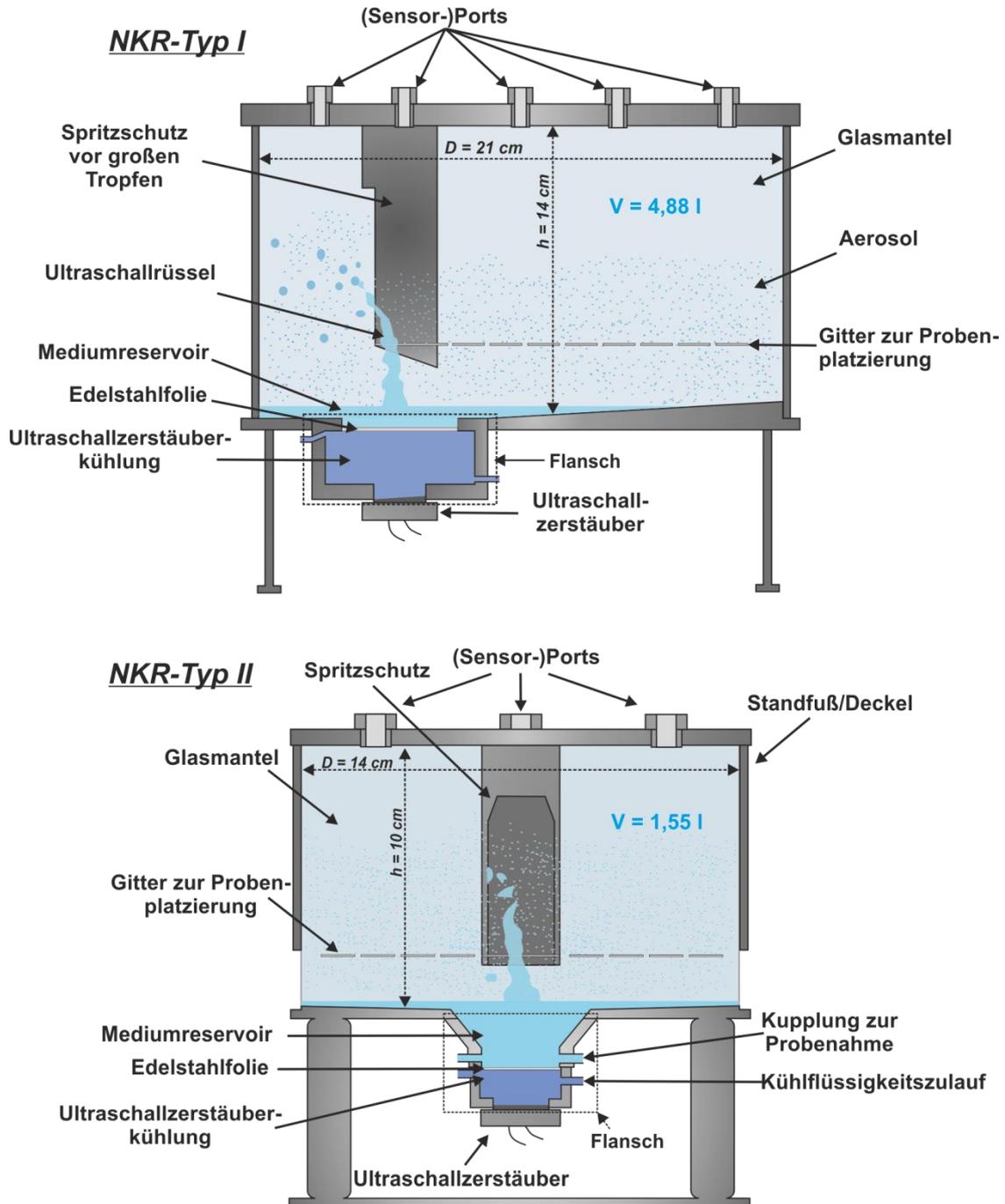


Abbildung 4.72: Schematischer Aufbau des *NKR-Typ II* (unten). Im Vergleich zum *NKR-Typ I* (oben) wurde u.a. das Volumen ( $V$ ) verringert, die Materialstärke am Reaktordeckel und -boden verringert und der Flansch zur Kopplung des US-Zerstäubers in die Mitte des Reaktorbodens verlegt

Der Deckel und der Boden des *NKR-Typ II* bestehen komplett aus Edelstahl, der Mantel aus Borosilikat-Glas ( $h \times D = 10 \text{ cm} \times 14 \text{ cm}$ ). Das Reaktorvolumen wurde auf  $1,55 \text{ l}$  reduziert (Abbildung 4.72). Der Boden weist in der Mitte eine Öffnung mit einem Durchmesser von fünf Zentimetern auf. An der Unterseite des Reaktorbodens kann unterhalb der Öffnung ein Flansch verschraubt werden, an dem, wie beim *NKR-Typ I* (Kapitel 4.2.2), der Ultraschallzerstäuber befestigt wird. Im Gegensatz zum *NKR-Typ I*

besteht der Flansch aus zwei Teilen. Hierbei dient der untere Teil als US-Zerstäuberkühlung und wird auf der Unterseite mit dem US-Zerstäuber und auf der Oberseite mit einer 0,5 mm dicken Edelstahlfolie verschlossen. Der obere Teil des Flansches läuft kegelförmig in Richtung der Edelstahlfolie zusammen und ist direkt mit dem Innenraum des Reaktors verbunden. Diese veränderte Konstruktion im Vergleich zu *NKR-Typ I* bietet die Vorteile, dass zum einen der benötigte Abstand des US-Zerstäubers von ca. fünf Zentimetern eingehalten werden kann, ohne dass eine große Menge flüssiges Medium eingesetzt werden muss und zum anderen konnte die Dicke des Reaktorbodens deutlich vermindert werden. Zusätzlich wurden zwei weitere Anschlüsse hinzugefügt, die eine einfache automatisierte Probenahme ermöglichen. Der Deckel wurde im Vergleich zum *NKR-Typ I* deutlich dünner gestaltet, so dass zusammen mit der allgemein kompakteren Bauweise eine signifikante Gewichtsreduktion um ca. 9 kg (von ca. 15 kg auf 4 kg) erzielt werden konnte. Zudem sollte durch die deutliche Verringerung des verbauten Edelstahls das Aufwärmen des Reaktors beschleunigt werden. Da beim *NKR-Typ I* der US-Zerstäuber am Rand platziert war (Kapitel 4.2.2), kondensierte ein Teil des erzeugten Aerosols direkt wieder an der Reaktorwand. Dieser Effekt sollte beim *NKR-Typ II* durch die Verlegung des US-Zerstäubers in die Mitte des Reaktorbodens reduziert werden, wodurch eine effizientere Zerstäubung erreicht werden sollte. Damit kondensiertes und abgetropftes Medium wieder in das Mediumreservoir zurückfließen kann wurde der Boden des Reaktors zur Mitte hin leicht angeschrägt.

In dem Reaktordeckel sind mehrere Bohrungen für diverse Sonden und Sensoren vorhanden und die Mitte des Reaktordeckels weist einen Metallring auf, an dem verschiedenste Spritzschutze befestigt werden können. Diese sollen das unkontrollierte Eindringen großer Tropfen in die Reaktorkammer verhindern. In Abbildung 4.72 ist als Spritzschutz ein zu einer Seite ausgesägtes Metallrohr dargestellt. Weiterhin möglich sind diverse andere Formen, wie z.B. ein höhenverstellbarer Spritzschutz in Form eines umgekehrten Trichters oder ein engmaschiges Metallgitter. Die Spritzschutze bieten zusätzlich die Möglichkeit zur Befestigung diverser Halterungen für Proben (Metallgitter in Abbildung 4.72).

## 4.8.2 Reaktionstechnische Charakterisierung des *NKR-Typ II*

Durch eine reaktionstechnische Charakterisierung des *NKR-Typ II* konnten die entscheidenden technischen Daten mit denen des *NKR-Typ I* verglichen werden und so der Erfolg der Optimierungsschritte evaluiert werden.

### 4.8.2.1 Wärmeübertragung und Temperaturverteilung

Wie bereits erwähnt, sollte die Wärmeübertragung beim *NKR-Typ II* im Vergleich zu dem *NKR-Typ I* durch eine kompaktere Bauweise verbessert werden. Um eine Vergleichbarkeit

herzustellen, sollte die gleiche Versuchsreihe wie für den *NKR-Typ I* durchgeführt werden. Die für die Experimente zu Grunde liegenden Überlegungen und Problemstellungen sind in Kapitel 4.5.1 beschrieben. Ziel der Experimente war auch hier die Aufnahme der Aufwärmkurven bei einer möglichst großen und einer möglichst geringen Temperaturdifferenz zwischen Inkubator und US-Zerstäuberkühlung und bei ausgeschaltetem US-Zerstäuber und deaktivierter US-Zerstäuberkühlung. Anhand ergänzender Experimente wurde die Temperaturverteilung innerhalb des *NKR-Typ II* überprüft und mit der im *NKR-Typ I* verglichen.

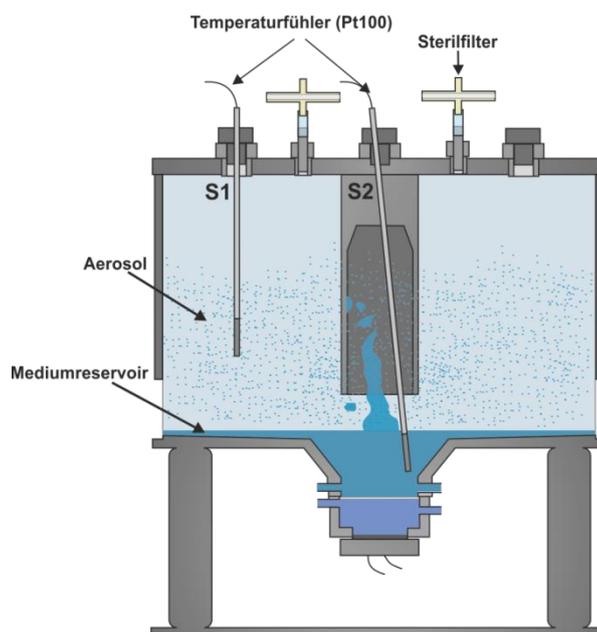


Abbildung 4.73: Messaufbau für die Aufnahme von Temperaturprofilen. Es wurde jeweils ein Pt-100-Temperaturfühler im Aerosol (S1) und im Mediumreservoir (S2) platziert.

Zur Aufnahme der Aufwärmkurven wurde jeweils ein Pt100-Temperaturfühler in dem Aerosol (Abbildung 4.73, S1) und Mediumreservoir (Abbildung 4.73 S2) platziert. Um den Effekt des geänderten Designs zunächst ohne den Einfluss des Ultraschallzerstäubens deutlich zu machen, wurde der *NKR-Typ II* in einem ergänzenden Experiment ohne US-Zerstäuber und mit deaktiviertem US-Zerstäuber bei 37 °C im Inkubator erwärmt (siehe vergleichend Experiment TP1 in Kapitel 4.5.1). Für die weiteren Experimente wurden durch Vorversuche die Einstellungen ermittelt, mit denen die oben genannten Vorgaben erfüllt werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei exakt gleicher Regelung der Temperaturen, wie in den Experimenten TP2 und TP3 (Kapitel 4.5.1 / Tabelle 4.7) mit dem *NKR-Typ I*, das Aerosol in der Reaktorkammer des *NKR-Typ II* um ca. 2 °C (auf 39 °C) stärker erhitzt wird. Daher wurden für die Experimente TP7 und TP8 die Temperatureinstellungen leicht verändert. Als geeignete Versuchsparameter ergaben sich eine Kombination aus der Temperatur von Inkubator-/US-Zerstäuber von 37,5 °C / 34 °C (Tabelle 4.16 TP7) und 40,5 °C / 28 °C (Tabelle 4.16 TP8).

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse, sind in Tabelle 4.16 die Parameter und Ergebnisse der Experimente mit dem *NKR-Typ II* und dem *NKR-Typ I* dargestellt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse anhand ihrer unterschiedlichen Vorgaben/Parameter gruppiert.

Aus Tabelle 4.16 wird deutlich, dass mit dem *NKR-Typ II* die Zieltemperatur bei allen Experimenten schneller erreicht werden konnte als beim *NKR-Typ I*. Der Vergleich der Experimente TP1 und TP6 zeigt, dass im *NKR-Typ II* eine Halbierung des Zeitraums zum Aufheizen auf 37 °C erreicht werden konnte. Bei dem Experiment mit der geringsten Temperaturdifferenz zwischen Inkubator und US-Zerstäuber kühlung (TP7) konnten 36 °C im Aerosol nach 0,5 h und die Zieltemperatur von 37 °C nach 1,8 h erzielt werden, bei den Experimenten mit einer möglichst großen Temperaturdifferenz (TP8) 36 °C nach 1 h und 37 °C nach 2,3 h, welches einem Drittel des Zeitraums für den *NKR-Typ I* entspricht.

Tabelle 4.16: Zusammenfassung der relevanten Parameter und Ergebnisse der Experimente zur Charakterisierung des Wärmeübergangs der Reaktoren *NKR-Typ I* und *NKR-Typ II*. Zusätzlich wurden die Ergebnisse anhand ihrer unterschiedlichen Vorgaben/Parameter gruppiert.

Experiment	Temperatur Inkubator/ US-Zerstäuber kühlung	US- Zerstäuber	Temperatur Reservoir/Aerosol	36 °C / 37 °C erreicht nach
<b>TP1 (<i>NKR-Typ I</i>)</b>	37 °C / 37 °C	Aus	37 °C / 37 °C	7 h / 15 h
<b><u>TP6 (<i>NKR-Typ II</i>)</u></b>	37 °C / 37 °C	Aus	37 °C / 37 °C	3,7 h / 7,5 h
<b>TP2 (<i>NKR-Typ I</i>)</b>	38 °C / 33 °C	Ein	35 °C / 37 °C	1,6 h / 5,6 h
<b><u>TP7 (<i>NKR-Typ II</i>)</u></b>	37,5 °C / 34 °C	Ein	36,5 °C / 37 °C	0,5 h / 1,8 h
<b>TP3 (<i>NKR-Typ I</i>)</b>	41,5 °C / 30 °C	Ein	33 °C / 37 °C	3 h / 7,5 h
<b><u>TP8 (<i>NKR-Typ II</i>)</u></b>	40,5 °C / 28 °C	Ein	31 °C / 37 °C	1 h / 2,3 h

Der Vergleich der Daten zeigt, dass das Ziel erreicht werden konnte und durch die kompaktere Bauweise des *NKR-Typ II* eine Verkürzung der Aufwärmzeiten gegenüber dem *NKR-Typ I* um bis zu 70% erzielt werden konnte. Die Vorteile sind zum einen die verminderte Gefahr einer Wachstumshemmung bei einer Kultivierung von Mikroorganismen und Zellen durch längerfristiges Unterschreiten der idealen Temperatur während der Aufwärmphase und zum anderen der geringere Energieverbrauch. Zusätzlich kann bei Bedarf eine stärkere Kühlung des US-Zerstäubers und des Mediums im Reservoir realisiert werden.

### Temperaturverteilung

Zur Erfassung der Temperaturverteilung innerhalb des Reaktors wurde, wie bereits für den *NKR-Typ I* (Kapitel 4.5.1), ein Sensorarray aus fünf Pt100-Temperaturfühlern verwendet.

Dieses wurde an einem Drahtgitter unterhalb des Reaktordeckels befestigt und konnte frei in alle Raumrichtungen bewegt werden (Abbildung 4.74). Für die Messungen wurden dieselben Einstellungen wie für die Experimente TP7 und TP8 (Tabelle 4.16) verwendet und werden im Folgenden als TP7\* und TP8\* bezeichnet. Die Aufnahme der Messpunkte erfolgte in einem Abstand von zwei Zentimetern in alle Raumrichtungen zum nächsten Messpunkt nachdem sich eine konstante Temperatur eingestellt hatte.

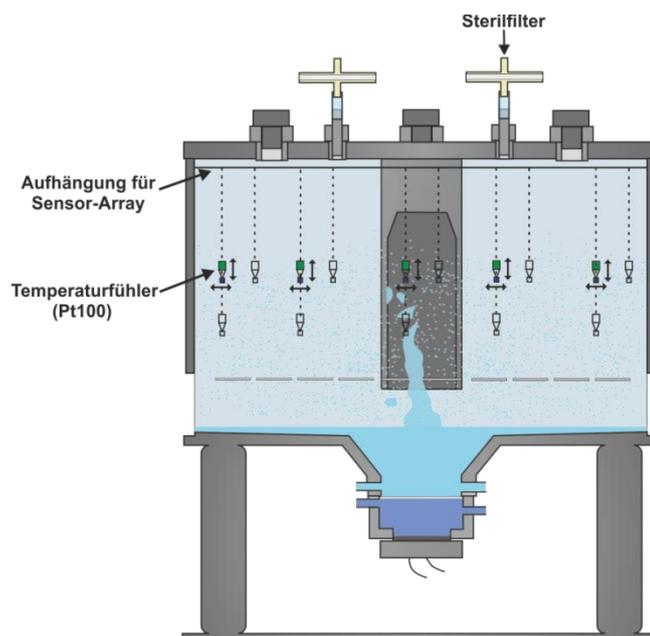


Abbildung 4.74: Messaufbau für die Bestimmung der Temperaturverteilung innerhalb der Reaktorkammer. Verwendet wurde ein Sensorarray aus fünf PT-100-Tempetaurfühlern, welches frei variierbar in der Reaktorkammer platziert werden konnte (gestrichelte Umrisse)

Aus den Messdaten wurde mit Hilfe der Software *MatLab* ein Konturplot erstellt. Dieser wurde zur besseren Übersichtlichkeit in ein schematisches Modell des Reaktors eingepasst. Anhand der Einfärbungen lassen sich Bereiche mit hoher Temperatur (rot) und Bereiche geringerer Temperatur (blau) und Zwischenbereiche (hellblau – orange) identifizieren.

Der vertikale Schnitt durch den Reaktor (Abbildung 4.75 oben) zeigt, dass die niedrigste Temperatur im Bereich der Edelstahlfolie im Mediumreservoir vorlag. Die Temperatur des frisch produzierten Aerosols (Ausbreitungsbewegung siehe Abb. 345 gestrichelte Pfeile) lag durch die Vorkühlung im Mediumreservoir ebenfalls unter der Zieltemperatur. Der senkrechte Schnitt (Abbildung 4.75 oben) ist so gewählt, dass die Öffnung des Spritzschutzes nach rechts gerichtet ist. Über diese trat das frisch produzierte Aerosol in die Reaktorkammer ein. Da das Aerosol noch nicht komplett aufgewärmt war, lagen die Temperaturen in diesem Bereich bei 31 – 34 °C (TP8\*) bzw. 35,5 °C – 36,5 °C (TP7\*). Der horizontale Schnitt durch den Reaktor (Abbildung 4.75 unten) veranschaulicht, dass die niedrigen Temperaturen nur an der geöffneten Seite des Spritzschutzes auftraten. Im restlichen Teil des Reaktors herrschte ab einem Abstand von einigen Millimetern zu den

Reaktorwänden die Zieltemperatur (Abbildung 4.75 gestrichelte Linie). Grundsätzlich konnte durch die Einstellungen des Experiments TP7\* die Temperaturdifferenz im Reaktor mit Ausnahme des Mediumreservoirs auf max. 1 °C reduziert werden.

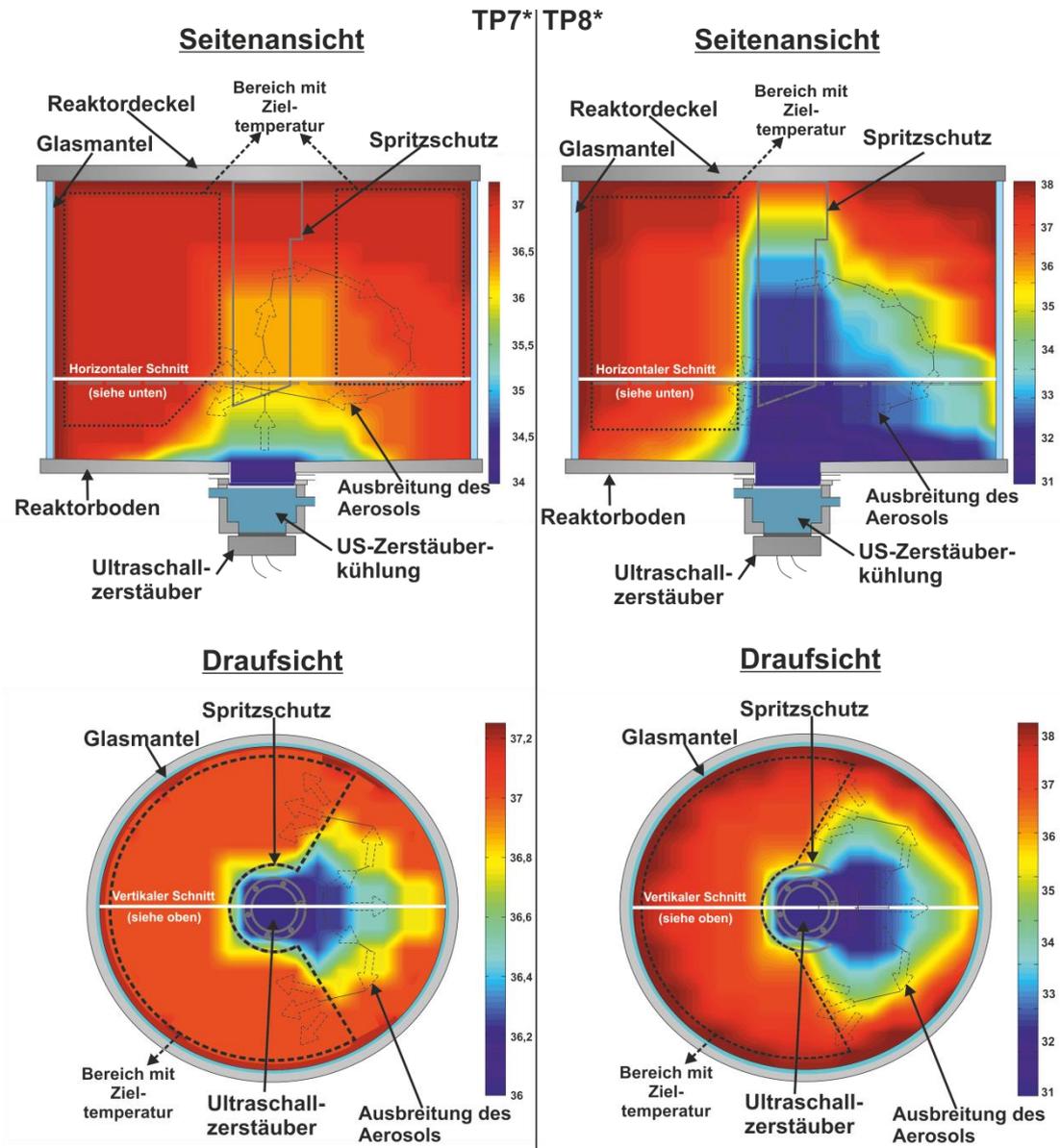


Abbildung 4.75: Darstellung der Temperaturverteilung innerhalb des *NKR-Typ II* während der Experimente TP7\* (links) und TP8\* (rechts). Es wurden in der gesamten Reaktorkammer im Abstand von 1,5 cm in alle Raumrichtungen Messpunkte aufgenommen, aus denen mit der Software „MatLab“ ein Konturplot erstellt wurde. Die Abstufung der Farben von Rot bis Blau zeigt Bereiche hoher bzw. niedriger Temperatur an. Dargestellt ist für jedes Experiment ein vertikaler und ein horizontaler Schnitt (weiße Linie) durch den Reaktor. Die gestrichelten Pfeile stellen die Ausbreitungsbewegung des Aerosols dar, mit gestrichelter Linie ist der Bereich in dem die Zieltemperatur von 37 °C erreicht wurde markiert

Durch die veränderte Platzierung des US-Zerstäubers in der Mitte des Reaktorbodens und die kompaktere Bauweise konnten kürzere Aufwärmzeiten und geringere Temperaturdifferenzen innerhalb des Reaktors erzielt werden. Im Vergleich zum *NKR-*

*Typ I* wurde hierdurch eine stärkere Kühlung des Mediums im Reservoir (TP8\*) bzw. eine geringere Temperaturdifferenz zwischen US-Zerstäuberkühlung und Inkubator (TP7\*) ermöglicht. Mit dem Einsatz unterschiedlicher Spritzschutze kann die Ausbreitung des Aerosols und die Temperaturverteilung gesteuert und an die individuellen Bedürfnisse spezieller Anwendung angepasst werden.

#### 4.8.2.2 Bestimmung des Sauerstoffeintrags anhand des volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten ( $k_{La}$ -Wert)

Die Effizienz des Sauerstoffeintrags in wässrige Medien in dem *NKR-Typ II* wurde anhand des Sauerstoffübergangskoeffizienten ( $k_{La}$ -Wert) mit den gleichen Regelungen des *AW-Typ I*-Zerstäubers wie für den *NKR-Typ I* (Kapitel 4.5.2) bestimmt.

Der *AW-Typ I* wurde auf 39,5 W, 40,8 W und 47,6 W geregelt und der  $k_{La}$ -Wert mit der Sulfit-Methode bestimmt. In Tabelle 4.17 sind zur besseren Vergleichbarkeit die  $k_{La}$ -Werte für den *NKR-Typ I* und *NKR-Typ II* aufgeführt.

Tabelle 4.17: Vergleich der ermittelten  $k_{La}$ -Werte im *NKR-Typ I* und *NKR-Typ II* bei unterschiedlichen Leistungen des *AW-Typ I*-Zerstäubers

<i>AW-Typ I</i> -Zerstäuber Leistung [W]	<i>NKR-Typ I</i> $k_{La}$ -Wert [ $\text{h}^{-1}$ ]	<u><i>NKR-Typ II</i></u> $k_{La}$ -Wert [ $\text{h}^{-1}$ ]
39,5	13,2	<u>10,8</u>
40,8	26,7	<u>25,5</u>
47,6	39,1	<u>30,3</u>

Bei einer Leistung von 39,5 W liegt der  $k_{La}$ -Wert des *NKR-Typ II* ca. 20 % unter dem des *NKR-Typ I*. Diese Tendenz setzte sich auch bei höheren Leistungen des US-Zerstäubers fort. Der damit verbundene Rückgang der Effizienz des Sauerstoffeintrags ist mit der Verkleinerung des Reaktorvolumens zu begründen. Wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben, wird der Großteil des Sauerstoffs über die Aerosoltröpfchen in die flüssige Phase eingetragen. Da es pro Volumeneinheit eine maximale Anzahl Aerosoltröpfchen gibt, wird nach einigen Sekunden ein Maximum erreicht. Aufgrund der Verkleinerung des Gesamtvolumens verringert sich somit auch die Gesamtzahl der Aerosoltröpfchen, wodurch der auf einen Liter flüssiges Medium bezogene  $k_{La}$ -Wert kleiner wird. Die Ergebnisse zeigen zusätzlich, dass bei einer Leistung von 40,8 W im *NKR-Typ II* bereits 84 % des maximalen  $k_{La}$ -Werts erreicht wurden (68 % bei *NKR-Typ I*). Dieses deutet darauf hin, dass ein Ziel realisiert werden konnte und im *NKR-Typ II* weniger US-Leistung notwendig ist um den Reaktor komplett mit Aerosol zu füllen. Weitere Experimente zur Aerosoldichte werden in Kapitel 4.4.3 beschrieben. Zwar liegt der maximale  $k_{La}$ -Wert des *NKR-Typ II* (30,3  $\text{h}^{-1}$ ) unter dem des *NKR-Typ I* (39,1  $\text{h}^{-1}$ ), im Verhältnis zu der Differenz der Volumina der

Reaktorkammern (*NKR-Typ I* = 4,88 l / *NKR-Typ II* = 1,55 l) ist die Abnahme jedoch relativ gering.

#### 4.8.2.3 Eintrag von Kohlenstoffdioxid in die Reaktorkammer

Die Verringerung des Reaktorvolumens sollte eine schnellere Angleichung des CO<sub>2</sub>-Gehalts und die Einstellung des gewünschten pH-Wertes von carbonatgepufferten Nährmedien (Kapitel 4.5.3) bei passiver Begasung gegenüber dem *NKR-Typ I* ermöglichen. Dafür wurden für den *NKR-Typ II* dieselben Experimente wie in Kapitel 4.5.3 für den *NKR-Typ I* durchgeführt.

Getestet wurden eine passive Begasung über ein bzw. zwei am Deckel angebrachte Sterilfilter, sowie eine aktive Begasung über einen *Sparger* mit einer Begasungsrate von 97 ml/min. Der Reaktor wurde mit 150 ml des Nährmediums DMEM befüllt und in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in der Gasphase betrieben. Die Ergebnisse beider Reaktoren sind in Tabelle 4.18 zusammengefasst.

Tabelle 4.18: Zusammenfassung der Messdaten zur Entwicklung des pH-Werts 7,2 während der Zerstäubung des Zellkulturmediums DMEM (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) im *NKR-Typ I* und *NKR-Typ II*

<u><i>NKR-Typ II</i></u>	Passiv (1 Sterilfilter)	Passiv (2 Sterilfilter)	Aktiv (97 ml/min)
pH konstant nach [h]	28	6,5	0,3
max. pH-Wert	9,0	7,9	7,5
Δ pH	1,7	0,7	0,3
<u><i>NKR-Typ I</i></u>	Passiv (1 Sterilfilter)	Passiv (2 Sterilfilter)	Aktiv (97 ml/min)
pH konstant nach [h]	38,5	11,5	1
max. pH-Wert	9,1	8,3	7,8
Δ pH	1,8	1	0,5

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Reduzierung des Reaktorvolumens der Zeitraum bis zur Einstellung des gewünschten pH-Werts bei einer passiver Begasung über einen Sterilfilter um 27 %, über zwei Sterilfilter um 43 % und bei aktiver Begasung um 70 % verringert werden konnte.

#### 4.8.2.4 Vergleichende Messungen der Aerosoldichte und „Kondensatbildungsrate“

Die in den Kapiteln 4.6 beschriebenen Experimente belegen, dass die durch den Ultraschall eingebrachte Energie einen destruktiven Effekt auf Nährmediumbestandteile haben kann. Wie Abbildung 4.53 zeigt wurde die Deaktivierung des Enzyms Penicillin G-Acylase (PGA) bei einer Verringerung der Ultraschallleistung von 47,6 W auf 37,42 W um ca.

70 % verlangsamt. Da die Aerosolmenge und die Nährstoffversorgung der Zellen/Mikroorganismen proportional zu der Ultraschallenergie sind, sollte durch die Verkleinerung des Reaktorvolumens die zum Füllen der Reaktorkammer mit Aerosol benötigte Ultraschallenergie bei gleichwertiger Nährstoffversorgung reduziert werden.

Um die Effektivität des Umbaus zu überprüfen wurden die Aerosoldichte und die „Kondensatbildungsrate“ innerhalb des *NKR-Typ I* und des *NKR-Typ II* bei verschiedenen Leistungen des US-Zerstäubers bestimmt. Das Kondensat wurde auf einer Schale, die in einem Abstand von 2,5 cm über dem Reaktorboden in der Reaktorkammer platziert wurde, aufgefangen. Nach einstündiger Zerstäubung wurde die Menge des aufgefangenen Kondensats ermittelt. Die Aerosoldichte wurde mit dem *Aerosoldichtesensor* (Beschreibung siehe Kapitel 8.1.2) detektiert. Als zu zerstäubendes Medium dienten jeweils 150 ml deionisiertes Wasser. Der US-Zerstäuber *AW-Typ I* wurde bei verschiedenen Ultraschalleistungen (35,4 W, 37,4 W, 40,8 W, 44,2 W und 47,63 W) betrieben. In Abbildung 4.76 sind die „Kondensatmenge“ nach einer Zerstäubungszeit von einer Stunde und die Aerosoldichte in beiden Reaktoren gegen die Leistung des US-Zerstäubers *AW-Typ I* aufgetragen.

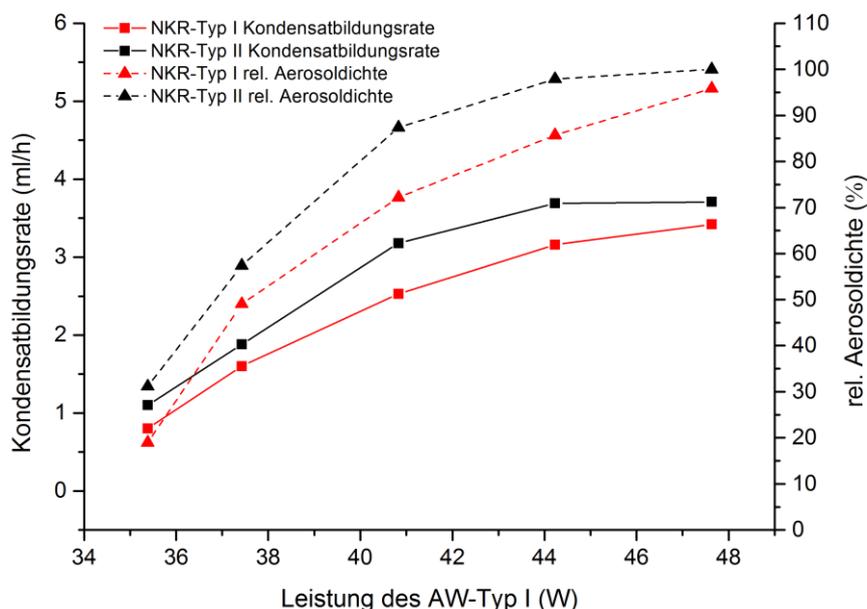


Abbildung 4.76: Auftragung der „Kondensatbildungsrate“ und der relativen Aerosoldichten bei unterschiedlichen Leistungen des US-Zerstäubers *AW-Typ I*

Beim Vergleich der Aerosoldichten in Abhängigkeit von der Leistung (Abbildung 4.76 rote und schwarze Linie) des US-Zerstäubers fällt auf, dass das Maximum bei 47,6 W in dem *NKR-Typ II* um 8 % höher lag als beim *NKR-Typ I*. Ein wichtiger Unterschied wurde bei der Verringerung der Leistung auf 40,8 W sichtbar. Die Aerosoldichte sank bei dem *NKR-Typ II* um 1% bei dem *NKR-Typ I* dagegen um 10% ab. Der gleiche Trend war auch

bei den „Kondensatmengen“ (Abbildung 4.76 gestrichelte Linien) erkennbar. Allgemein zeigte sich, dass die Aerosoldichte sowie „Kondensatmenge“ bei sinkender US-Leistung beim *NKR-Typ II* konstant höhere Werte aufwiesen als im *NKR-Typ I*. Anhand der Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die maximale Tröpfchenzahl in dem *NKR-Typ II* bereits mit geringerer Leistung des US-Zerstäubers erzielt wurde. Die maximale Aerosoldichte wurde im *NKR-Typ II* bereits bei einer Leistung von 40,8 W erreicht, wobei im *NKR-Typ I* 47,6 W nötig waren. Hieraus resultiert ebenfalls, dass die Aerosoldichte bei gleicher Leistung im *NKR-Typ II* stets höher war als im *NKR-Typ I*. Die Ergebnisse belegen, dass ein wichtiges Ziel erreicht werden konnte. Es wurde eine geringere Leistung der US-Zerstäuber benötigt, welches im Hinblick auf die Verbesserung der Langzeitstabilität von Nährmedien eine entscheidende Optimierung darstellt.

### 4.8.3 Fazit des Kapitels

Aus den gesammelten Daten von *NKR-Typ I* resultierte die Erkenntnis, dass bauliche Veränderungen bezüglich der Größe und der Materialien sich als Optimierungsschritt anboten. Für die erfolgreiche Umsetzung wurde bei dem *NKR-Typ II* das Reaktorvolumen bei gleichzeitigen Materialeinsparungen am Reaktordeckel und –boden verkleinert und die US-Zerstäubereinheit in die Mitte des Reaktorbodens verlegt (Kapitel 4.8.1). Wie die Ergebnisse zeigten, konnten die oben formulierten Optimierungen der Reaktoreigenschaften, schnelleres Aufheizen, geringere Temperaturdifferenzen innerhalb des Reaktors (Kapitel 4.8.2.1) und ein schnellerer Konzentrationsangleich von CO<sub>2</sub> (Kapitel 4.8.2.3) realisiert werden. Als wichtigster Effekt ist die Verringerung der benötigten Ultraschalleistung zur Füllung des Reaktors mit einer maximalen Aerosolmenge (Kapitel 4.8.2.4) zu nennen. So können in diesem Reaktormodell die US-Zerstäuber mit deutlich verbesserten Werten bezüglich der Deaktivierung des Enzyms PGA (z.B. *TDK-NB80* (Kapitel 4.4) effektiver eingesetzt werden, da diese ebenfalls eine leicht verringerte Zerstäubungsleistung aufwiesen.

Die Umgestaltung des Flansches (Kapitel 4.8.1 Abbildung 4.72) führte dazu, dass deutlich weniger Medium benötigt wird, um den benötigten Abstand zwischen US-Zerstäuber und Flüssigkeitsoberfläche herzustellen (Kapitel 3.5.2.5). Für eine stabile Zerstäubung werden im *NKR-Typ II* lediglich 50 ml flüssiges Medium benötigt. Somit kann auch in diesem Reaktormodell sehr mediumsparend ein relativ großes Volumen (Reaktorkammer) mit Nährmedium in Form eines Aerosols gefüllt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die technische und biologische Funktionalität eines völlig neuartigen Bioreaktorsystems (Nebelkammerreaktor), welches sich grundlegend von den bisher verwendeten Kultur- und Bioreaktorverfahren unterscheidet, erfolgreich nachgewiesen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten und Ergebnisse bildeten die Basis zur Konstruktion sowie den Bau eines komplett überarbeiteten zweiten optimierten Nebelkammerreaktor-Modells.

Bei dem getesteten Kultursystem, wurden die Zellen nicht in Flüssigkeit suspendiert oder überschichtet, sondern in einer nebelartigen Umgebung gehalten und über sich absetzende Aerosoltröpfchen mit Substraten versorgt. Edukte und Reaktionsprodukte „tropfen“ dabei von dem Gewebe ab, wodurch lediglich ein dünner Film aus Nährmedium die Proben bedeckt. Somit wird im Nebelkammerreaktor der z.B. im Membran-Reaktor vielversprechend getestete Kultivierungsansatz an der Luft-/Medium-Phasengrenze [161, 162] mit einer großen Unabhängigkeit von der Form und Größe der eingesetzten Trägermaterialien oder dreidimensionalen Zellkonstrukte und einem geringen Bedarf an Nährmedium erweitert. So liegen in dem als Testreaktor verwendeten Prototyp *NKR-Typ I* (mit dem Ultraschallzerstäuber *AW-Typ I*) lediglich ca. 0,4 ml des flüssigen Mediums (optimales Arbeitsvolumen 150 ml) als Aerosol vor, mit denen das gesamte Reaktorvolumen von ca. 4,5 l mit einem dichten Aerosol gefüllt werden kann.

In einem Bioreaktor sollen reproduzierbare und kontrollierbare Reaktionsbedingungen vorliegen und optimale Bedingungen für Mikroorganismen oder Zellen herrschen. Für die Kultivierung sind besonders eine konstante Temperatur und ausreichende Versorgung mit Sauerstoff notwendig, um ein homogenes Wachstum zu gewährleisten. Zum Nachweis der Funktionalität wurde der *NKR-Typ I* umfangreich getestet und charakterisiert (Kapitel 4.5). Dazu wurden alle wichtigen Parameter (Verteilung der Nebelphase, Temperatur- und Konzentrationsverteilung, Sauerstoffeintrags in die Flüssigphase, Stabilität des pH-Werts und die Mischzeiten) bestimmt. Zur Beurteilung der biologischen Funktionalität wurde zudem der Einfluss des Ultraschalleintrags auf die Stabilität von Nährmediumkomponenten (Kohlenhydrate, Salze, Proteine, Aminosäuren und Antibiotika) ermittelt und die Langzeitstabilität von Nährmedien überprüft.

Der Aufbau einer Messtechnik (Kapitel 8.1) für den Nebelkammerreaktor erfordert spezielle Eigenschaften der Sensoren, so müssen sie in dem Aerosol, als Mischung aus Gas- und Flüssigphase verlässliche Daten liefern. Als geeignet erwiesen sich neben Pt100-Temperaturfühlern, faseroptische Sauerstoff- und pH-Sensoren, die sich durch eine gute Funktionalität in der Gas- und Flüssigphase sowie eine hohe Flexibilität als besonders geeignet herausstellten. Für die Messung der Aerosoldichte wurde ein Streulichtsensor (Aerosoldichtesensor) an die Anforderungen adaptiert. Zum Auslesen und Auswerten der unterschiedlichen Sensorensignale wurde ein zentraler Datenlogger installiert und

dahingehend programmiert, dass die Daten aller Sensoren erfasst und bereitgestellt wurden. Der Datenlogger bietet zudem die Möglichkeit, alle relevanten Prozessparameter zu überwachen und zu steuern, so dass z.B. eine gepulste Zerstäubung in Abhängigkeit von Aerosoldichte möglich wäre.

Als Ergebnis der Charakterisierung zeigte sich als besondere Stärke des Nebelkammerreaktors der hohe Sauerstoffeintrag in die Flüssigphase bei reiner Oberflächenbegasung und ohne Rühren oder Schütteln der Flüssigphase. Dieser wurde anhand des in der Bioreaktortechnik häufig als Kennzahl verwendeten  $k_{La}$ -Werts (volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizient) bestimmt. Die Messungen ergaben bei deaktiviertem US-Zerstäuber einen  $k_{La}$ -Wert von  $1,65 \text{ h}^{-1}$ , der vergleichbar mit anderen statischen Systemen bei reiner Oberflächenbegasung ( $1 - 2 \text{ h}^{-1}$ ) [130, 132] ist. Eindrucksvoll ist jedoch die hohe Effektivität des Sauerstoffeintrags bei aktiviertem US-Zerstäuber ( $k_{La}$ -Werte bis zu  $39 \text{ h}^{-1}$ ). In herkömmlichen dynamischen Zellkultursystemen (Wave-Bioreaktor  $4 - 20 \text{ h}^{-1}$ , Rührkesselreaktor  $5 - 50 \text{ h}^{-1}$ , Superspinner  $0,4 - 4 \text{ h}^{-1}$ ) [62, 131, 135] werden vergleichbare Werte lediglich mit aktiver Begasung und/oder Rühren erzielt. Da ein hoher scherstressfreier Sauerstoffeintrag insbesondere bei der Kultivierung von dreidimensionalen Gewebekonstrukten von größter Bedeutung ist, zeigen die ermittelten Daten das große Potential eines Nebelkammerreaktors gegenüber vergleichbaren Systemen.

Als Unterschied und entscheidender Einflussfaktor ist die Aerosolbildung zu nennen. Die 24-fache Steigerung des  $k_{La}$ -Werts bei aktiviertem gegenüber deaktiviertem US-Zerstäuber kann mit der deutlichen Steigerung der Phasengrenzfläche durch das Bilden der Aerosoltröpfchen begründet werden. Aus den Messdaten konnte berechnet werden, dass durch die Zerstäubung von  $0,4 \text{ ml}$  flüssigem Medium die Oberfläche um den 15-fachen Wert auf ca.  $7500 \text{ cm}^2$  erhöht wird und somit ein wichtiger Faktor für einen effektiven Stoff- und Wärmeübergang gegeben ist.

Zur vollständigen Charakterisierung wurden auch die weiteren relevanten Eigenschaften des Reaktors überprüft. So zeigte sich, dass der Transport von Nährmedienbestandteilen in den Aerosoltröpfchen zu jeder Stelle des Reaktors problemlos möglich ist und in den wichtigen Bereichen eine konstante, gleichmäßige und kontrollierbare Temperatur vorlag. Ebenfalls konnte bewiesen werden, dass die Ultraschallzerstäubung keinen Einfluss auf die Langzeitstabilität des pH-Werts hat.

Die erfolgreiche Kultivierung des Mikroorganismus *Aspergillus niger* (immobilisiert in Na-Alginat) belegte, dass über die gesamte Kultivierungsdauer von  $96 \text{ h}$  konstant gute Wachstumsbedingungen vorlagen (Kapitel 4.6.4). In einem ergänzenden Experiment konnte zudem gezeigt werden, dass sich eine Kontamination mit *E.coli* K12-Bakterien im Reaktor nahezu komplett eindämmen lässt und die im Aerosol platzierten Proben nicht belastet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Nebelkammerreaktor deutliche Vorteile durch einen hohen Sauerstoffeintrag und eine gleichmäßigen Nährstoffverteilung im gesamten Reaktor ohne Rühren und aktive Begasung gegenüber anderen Systemen bietet. Zudem erfüllt der Reaktor alle Bedingungen, die für einen erfolgreichen Einsatz bei der Kultivierung von Zellen und Mikroorganismen erforderlich sind.

In Bezug auf die biologische Funktionalität bestand Optimierungsbedarf bei einer verbesserten Langzeitstabilität von Nährmedien. Wie gezeigt werden konnte, bleiben diese zwar über mehrere Tage (DMEM 2-3 Tage, LB-Medium 6-7 Tage) stabil, jedoch ist besonders in Hinblick auf länger andauernde Kultivierungen von Säugerzellen eine Stabilität über noch längere Zeiträume erstrebenswert. Als wichtigster Einflussfaktor erwiesen sich hierbei die Eigenschaften der Ultraschallzerstäuber. Zur Bestimmung der optimalen physikalischen Größen wurden die charakteristischen Kenngrößen verschiedener US-Zerstäuber (Arbeitsfrequenz, Tröpfchendurchmesser, Wirkleistung, Wärmeeintrag in Flüssigkeiten und Zerstäubungsleistung) bestimmt (Kapitel 234). Da das Ultraschallzerstäuben die deutlichsten Auswirkungen auf Proteine zeigte, wurde ein Enzym-Assay als repräsentativer Standardtest etabliert, um die Auswirkungen verschiedener Ultraschallzerstäuber bzw. unterschiedlicher Regelungen der Ultraschallzerstäuber auf Nährmedien zu quantifizieren. Es wurde deutlich, dass die entscheidenden Einflussgrößen die Arbeitsfrequenz und die Leistung des Ultraschallzerstäubers darstellen. So führte die Kombination aus einer geringeren Leistung und einer hohen Frequenz (2,475 MHz) des Ultraschallzerstäuber *TDK-NB80* (1,69 MHz) zu einer 20-fach verlangsamten Deaktivierung als bei dem *AW-Typ I* (Kapitel 4.4). Eine weitere Verbesserung der Werte konnte mit einer gepulsten Zerstäubung als alternative Betriebsform der Zerstäuber erzielt werden.

Durch eine Optimierung des Kulturraums sollten die verhältnismäßig langen Aufwärmzeiten (7 h) gegenüber Flüssigphasenreaktoren mit Mantelheizung (2,5 h [118]) reduziert werden. Weiterhin traten Limitierungen bei der Geschwindigkeit der CO<sub>2</sub>-Diffusion in den Reaktorinnenraum auf, woraus eine relativ langsame pH-Wert-Regelung bei carbonatgepufferten Medien und passiver Begasung resultierte (Kapitel 345).

Zur Minimierung der genannten Problematiken wurde ein neuer, komplett überarbeiteter Nebelkammerreaktor (*NKR-Typ II*) geplant und am TCI gebaut. Für eine weitere Verbesserung der Kultivierungsbedingungen wurde das Reaktorvolumen bei gleichzeitigen Materialeinsparungen am Reaktordeckel und -boden um ca. 70 % auf 1,55 l verkleinert und die US-Zerstäubereinheit in die Mitte des Reaktorbodens verlegt (Kapitel 4.7). Erste Experimente bestätigten, dass die Aufwärmzeit um 70 % und die Zeit bis zum Konzentrationsangleich von CO<sub>2</sub> zwischen Umgebung und Reaktorinnenraum bei passiver Begasung um 43 % reduziert werden konnten. Als wichtigstes Resultat konnte die Verringerung der benötigten Leistung des Ultraschallzerstäubers (beim beispielhaft getesteten *AW-Typ I* um 10 %, welches um 30 % verbesserten Ergebnis bei dem Enzym-

Assay entspricht) zur Füllung des Reaktors mit einer maximalen Aerosolmenge zu nennen. Zusätzlich wurde durch den veränderten Reaktoraufbau wurden lediglich 50 ml flüssiges Medium für eine stabile Zerstäubung benötigt. Somit konnten anhand erster Untersuchungen des *NKR-Typ II* bestätigt werden, dass die gesetzten Ziele erreicht wurden. Für eine abschließende Beurteilung des Systems sind in weiteren Arbeiten Tests mit der Kombination aus optimierten Nebelkammerreaktor und Ultraschallzerstäuber notwendig.

## 6 Ausblick

Die steigende Weltbevölkerung und die zunehmende Lebenserwartung der Menschen führten in den letzten Jahren zu einem ständig steigenden Bedarf an Ersatzorganen und -geweben. Da nicht im ausreichenden Umfang Spenderorgane zur Verfügung stehen, stellt die Regenerative Medizin zur Herstellung von *in vitro* gezüchteter Gewebe eine große Chance dar, diese Probleme zu lösen. Für eine erfolgreiche und effektive Nachzucht von funktionalem Gewebe sind Spezialreaktoren notwendig, die die spezifischen Bedingungen für die Gewebe bereitstellen. So ist in herkömmlichen Kultursystemen speziell die Sauerstoffversorgung bei statischen, submers kultivierten Geweben oft nicht ausreichend gelöst. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden für unterschiedlichste Anwendungen im Bereich der Zell- und Gewebekultur diverse dynamische Bioreaktorsysteme (z.B. Superspinner-Flaschen, *Rotating Vessel*-Reaktoren, Rollerflaschen, Perfusionsreaktoren) [7, 163-168] entwickelt. So konnte die Versorgung zwar deutlich verbessert werden, allerdings können Zellschädigungen durch Scherstress auftreten.

Das in dieser Arbeit erfolgreich getestete und optimierte Nebelkammerreaktorsystem kombiniert die Vorteile einer scherstressfreien, effektiven und gleichmäßigen Nährstoff- und Sauerstoffversorgung mit einer großen Unabhängigkeit von der Form und Größe dreidimensionaler Konstrukte. Somit bietet der Reaktor ein großes Potential für verbesserte Ergebnisse bei der Gewebenachzucht und -lagerung. Auch bei der Medikamententestung, bietet das Funktionsprinzip des Reaktors große Vorteile, da gezielt und zeitlich fein regulierbar Pharmaka oder zellbeeinflussende Faktoren zerstäubt und die Auswirkungen an im Aerosol platzierten Geweben effektiv beobachtet werden könnten. So könnte auch die Zahl der Tierversuche reduziert werden. Durch das Integrieren einer Kamera oder eines *in-situ (Video) Mikroskops* in das Reaktorsystem wären zusätzlich *Realtime*-Untersuchungen an Zellen und Geweben möglich.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und Optimierungen bedeuten einen großen Schritt in Richtung Serienreife des Nebelkammerreaktorsystems. In weiterführenden Arbeiten sollte anhand erster Experimente mit Zellen und einfachen Geweben das Potential des Nebelkammerreaktor-Typ II evaluiert und ggf. notwendige

---

Optimierungen durchgeführt werden. Für eine weitere Verbesserung der Langzeitstabilität von Nährmedien oder den Einsatz von Substanzen, die sehr empfindlich auf das Ultraschallzerstäuben reagieren, könnten als Alternative Zerstäubungsmethode *Mesh-Zerstäubern* getestet werden, die vom Deckel des Reaktors betrieben werden müssen und sehr geringe Einflüsse auf Biomoleküle besitzen sollen. [104]. Als nachteilig erweist sich bei diesen Modellen allerdings ihre geringe Zerstäubungsleistung und die komplizierte Handhabung. Für einen automatisierten Betrieb des Nebelkammerreaktors sollte die Messtechnik überarbeitet und erweitert werden, um z.B. eine Regelung der Prozessgrößen und eine automatisierte Probenahme und -analyse zu ermöglichen. In dem Nebelkammerreaktor ist zudem die Probenplatzierung nicht ausreichend gelöst, so müssen geeignete Spritzschutze mit daran befestigten Probenhalterungen entworfen und getestet werden.

Da in dem Nebelkammerreaktor-Typ II lediglich eine geringe Menge Nährmedium für eine stabile Zerstäubung benötigt wird und gleichzeitig die Bedingungen für eine verbesserte Langzeitstabilität von Nährmedien deutlich verbessert werden konnten, bietet der Reaktor neben einem hohen wissenschaftlichen auch ein wirtschaftliches Potential im gesamten Bereich der Regenerativen Medizin.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Schügerl, K., *Bioreaktionstechnik Band 2: Bioreaktoren und ihre Charakterisierung*. Salle-Sauerländer Verlag, Frankfurt, 1991.
2. Eibl, R., et al., *Cell and tissue reaction engineering*. 2008.
3. Gomes, M.E. and R.L. Reis, *Tissue engineering: key elements and some trends*. *Macromol Biosci*, 2004. **4**(8): p. 737-42.
4. Minuth, W.W.S., Raimund / Schumacher, Karl, *Zukunftstechnologie Tissue Engineering*. 2003: Wiley-VCH.
5. Purdue, G.F., et al., *A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds*. *J Burn Care Rehabil*, 1997. **18**(1 Pt 1): p. 52-7.
6. Safinia, L., N. Panoskaltzis, and A. Mantalaris, *Haematopoietic culture systems*, in *Bioreactors for Tissue Engineering*. 2005, Springer. p. 309-334.
7. Martin, I., D. Wendt, and M. Heberer, *The role of bioreactors in tissue engineering*. *Trends Biotechnol*, 2004. **22**(2): p. 80-6.
8. Ratcliffe, A. and L.E. Niklason, *Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **961**: p. 210-5.
9. Barron, V., et al., *Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review*. *Ann Biomed Eng*, 2003. **31**(9): p. 1017-30.
10. Darling, E.M. and K.A. Athanasiou, *Articular cartilage bioreactors and bioprocesses*. *Tissue Eng*, 2003. **9**(1): p. 9-26.
11. Gerlach, J.C., *Development of a hybrid liver support system: a review*. *Int J Artif Organs*, 1996. **19**(11): p. 645-54.
12. Jasmund, I. and A. Bader, *Bioreactor developments for tissue engineering applications by the example of the bioartificial liver*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002. **74**: p. 99-109.
13. Kulig, K.M. and J.P. Vacanti, *Hepatic tissue engineering*. *Transplant Immunology*, 2004. **12**(3): p. 303-310.
14. Legallais, C., E. Dore, and P. Paullier, *Design of a fluidized bed bioartificial liver*. *Artif Organs*, 2000. **24**(7): p. 519-25.
15. Prenosil, J.E. and P.E. Villeneuve, *Automated production of cultured epidermal autografts and sub-confluent epidermal autografts in a computer controlled bioreactor*. *Biotechnol Bioeng*, 1998. **59**(6): p. 679-83.
16. Altman, G.H., et al., *Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering*. *J Biomech Eng*, 2002. **124**(6): p. 742-9.
17. Bilodeau, K. and D. Mantovani, *Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(8): p. 2367-83.
18. Gokorsch, S., et al., *Hydrodynamic stimulation and long term cultivation of nucleus pulposus cells: a new bioreactor system to induce extracellular matrix synthesis by nucleus pulposus cells dependent on intermittent hydrostatic pressure*. *Int J Artif Organs*, 2004. **27**(11): p. 962-70.
19. Hoerstrup, S.P., et al., *New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves*. *Tissue Eng*, 2000. **6**(1): p. 75-9.
20. Guo, X.M., et al., *Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells*. *Circulation*, 2006. **113**(18): p. 2229-37.

21. Marolt, D., et al., *Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors*. *Biomaterials*, 2006. **27**(36): p. 6138-49.
22. Ohyabu, Y., et al., *Cartilaginous tissue formation from bone marrow cells using rotating wall vessel (RWV) bioreactor*. *Biotechnol Bioeng*, 2006. **95**(5): p. 1003-8.
23. Okamura, A., et al., *In-vitro reconstitution of hepatic tissue architectures with neonatal mouse liver cells using three-dimensional culture*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007. **7**(3): p. 721-5.
24. Song, K., et al., *Fabrication and detection of tissue-engineered bones with bio-derived scaffolds in a rotating bioreactor*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2006. **45**(Pt 2): p. 65-74.
25. Suck, K., et al., *Cultivation of MC3T3-E1 cells on a newly developed material (Sponceram) using a rotating bed system bioreactor*. *J Biomed Mater Res A*, 2007. **80**(2): p. 268-75.
26. van Griensven, M., et al., *Mechanical Strain Using 2D and 3D Bioreactors Induces Osteogenesis: Implications for Bone Tissue Engineering*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009. **112**: p. 95-123.
27. Jagodzinski, M., et al., *Tissue-Engineering von Röhrenknochen mit einer vaskularisierten Matrix in einem Bioreaktor*. *Der Orthopäde*, 2004. **33**(12): p. 1394-1400.
28. Kaspar, D., et al., *Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain*. *Journal of biomechanics*, 2002. **35**(7): p. 873-880.
29. Thomas, S.H., et al., *Pulmonary deposition of nebulised amiloride in cystic fibrosis: comparison of two nebulisers*. *Thorax*, 1991. **46**(10): p. 717-21.
30. Quarles, L.D., et al., *Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1992. **7**(6): p. 683-692.
31. Concaro, S., F. Gustavson, and P. Gatenholm, *Bioreactors for tissue engineering of cartilage*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009. **112**: p. 125-43.
32. Freyria, A.M., et al., *Optimization of dynamic culture conditions: effects on biosynthetic activities of chondrocytes grown in collagen sponges*. *Tissue Eng*, 2005. **11**(5-6): p. 674-84.
33. Bancroft, G.N., et al., *Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 12600-5.
34. Minuth, W.W., et al., *Long term culture of epithelia in a continuous fluid gradient for biomaterial testing and tissue engineering*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2001. **12**(3): p. 353-65.
35. Strehl, R., et al., *Long-term maintenance of human articular cartilage in culture for biomaterial testing*. *Biomaterials*, 2005. **26**(22): p. 4540-9.
36. Chen, H.C. and Y.C. Hu, *Bioreactors for tissue engineering*. *Biotechnol Lett*, 2006. **28**(18): p. 1415-23.
37. Mironov, V., et al., *Cardiovascular tissue engineering I. Perfusion bioreactors: a review*. *J Long Term Eff Med Implants*, 2006. **16**(2): p. 111-30.
38. Niklason, L.E., et al., *Functional arteries grown in vitro*. *Science*, 1999. **284**(5413): p. 489-93.
39. Mertsching, H. and J. Hansmann, *Bioreactor technology in cardiovascular tissue engineering*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009. **112**: p. 29-37.

40. Breuer, H., *dtv-Atlas Physik, Band 1. Mechanik, Akustik, Thermodynamik. Optik*, 1996. **2**.
41. Feng, H., G.V. Barbosa-Câanovas, and J. Weiss, *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*. 2011: Springer.
42. Kuttruff, H., *Akustik: Eine Einführung*. 2004: S. Hirzel.
43. Schaaffs, W., *Landolt-Börnstein, Zahlenwerte und Funktionen. Gruppe II, Banda, "Molekularakustik"*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967: p. 89-125.
44. Mason, T., L. Paniwnyk, and J. Lorimer, *The uses of ultrasound in food technology. Ultrasonics sonochemistry*, 1996. **3**(3): p. S253-S260.
45. GmbH, P.C. *Piezo Materials Tutorial: The Piezoelectric Effect*. [cited 2013 26.07.2013]; Available from: [http://www.piceramic.com/piezo\\_effect.php](http://www.piceramic.com/piezo_effect.php).
46. GmbH, P.C., *Piezo Effect: Parameter Definitions*.
47. Debus, J., K.-V. Jenderka, and S. Delorme, *Duale Reihe Sonografie*. 2012: Georg Thieme Verlag.
48. Kohlrausch, F., *Praktische Physik 1: Mechanik, Akustik, Wärme, Elektrizität*. Teubner, Stuttgart, 1996. **2424**.
49. Capelo-Martínez, J.-L., *Ultrasound in chemistry*. 2009: Wiley. com.
50. Kuttruff, H., *Physik und Technik des Ultraschalls*. 1988: Hirzel Stuttgart.
51. Leighton, T., *The acoustic bubble*. 1994: Access Online via Elsevier.
52. Mason, T.J. and J.P. Lorimer, *An introduction to sonochemistry*. Endeavour, 1989. **13**(3): p. 123-128.
53. O'Brien, W.D., *Ultrasound-biophysics mechanisms*. Progress in biophysics and molecular biology, 2007. **93**(1-3): p. 212-255.
54. Ferrari, F., et al., *Comparison of lung tissue concentrations of nebulized ceftazidime in ventilated piglets: ultrasonic versus vibrating plate nebulizers*. Intensive Care Med, 2008. **34**(9): p. 1718-23.
55. Yasui, K., *Influence of ultrasonic frequency on multibubble sonoluminescence*. J Acoust Soc Am, 2002. **112**(4): p. 1405-13.
56. Margulis, M.A., *Fundamental aspects of sonochemistry*. Ultrasonics, 1992. **30**(3): p. 152-155.
57. Mason, T., *Industrial sonochemistry: potential and practicality*. Ultrasonics, 1992. **30**(3): p. 192-196.
58. Mason, T.J., *Developments in ultrasound--non-medical*. Prog Biophys Mol Biol, 2007. **93**(1-3): p. 166-75.
59. Riley, N., *Steady streaming*. Annual Review of Fluid Mechanics, 2001. **33**(1): p. 43-65.
60. Sullivan, C., *SONOCHEMISTRY-A SOUND INVESTMENT*. 1992, SOC CHEMICAL INDUSTRY 14 BELGRAVE SQUARE, LONDON, ENGLAND SW1X 8PS.
61. Suslick, K.S., *Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects*. 1988: VCH Publishers.
62. Adewuyi, Y.G., *Sonochemistry: environmental science and engineering applications*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2001. **40**(22): p. 4681-4715.
63. Riesz, P., D. Berdahl, and C.L. Christman, *Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions*. Environ Health Perspect, 1985. **64**: p. 233-52.

64. Serpone, N. and P. Colarusso, *Sonochemistry I. Effects of ultrasounds on heterogeneous chemical reactions—a useful tool to generate radicals and to examine reaction mechanisms*. Research on Chemical Intermediates, 1994. **20**(6): p. 635-679.
65. Suslick, K.S., *The chemical effects of ultrasound*. Scientific American, 1989. **260**(2): p. 80-86.
66. Suslick, K.S., *Sonochemistry*. Science, 1990. **247**(4949): p. 1439-45.
67. Stock, N.L., et al., *Combinative sonolysis and photocatalysis for textile dye degradation*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(9): p. 1747-1750.
68. Vinodgopal, K., et al., *Ultrasonic mineralization of a reactive textile azo dye, remazol black B*. Water research, 1998. **32**(12): p. 3646-3650.
69. Sinisterra, J.V., *Application of ultrasound to biotechnology: an overview*. Ultrasonics, 1992. **30**(3): p. 180-5.
70. Qi, A., L.Y. Yeo, and J.R. Friend, *Interfacial destabilization and atomization driven by surface acoustic waves*. Physics of Fluids, 2008. **20**: p. 074103.
71. Rokhina, E.V., P. Lens, and J. Virkutyte, *Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(5): p. 298-306.
72. Santos, H.M. and J.L. Capelo, *Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment*. Talanta, 2007. **73**(5): p. 795-802.
73. Crum, L.A. and A.I. Eller, *Motion of bubbles in a stationary sound field*. The Journal of the Acoustical Society of America, 1970. **48**: p. 181.
74. Grosch, M., et al., *Ultrasonic separation of suspended particles-Part III: Application in biotechnology*. Acta Acustica united with Acustica, 1998. **84**(5): p. 815-822.
75. Benes, E., et al. *Ultrasonic separation of suspended particles*. in *Ultrasonics Symposium, 2001 IEEE*. 2001. IEEE.
76. Gaida, T., et al., *Selective retention of viable cells in ultrasonic resonance field devices*. Biotechnol Prog, 1996. **12**(1): p. 73-6.
77. Groschl, M., *Ultrasonic separation of suspended particles-Part II: Design and operation of separation devices*. Acta Acustica united with Acustica, 1998. **84**(4): p. 632-642.
78. Trampler, F., et al., *Acoustic cell filter for high density perfusion culture of hybridoma cells*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(3): p. 281-4.
79. Holz, S., *Entwicklung einer Ultraschallsensorik zur Online-Charakterisierung der Aufreinigung von Proteinen*, in *Institut für Technische Chemie*. 2011, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
80. Stierstadt, K., W.T. Hering, and T. Dorfmueller, *Mechanik, Relativität, Wärme, Band 1 der Reihe Bergmann-Schaefer: Lehrbuch der Experimentalphysik*. Walther de Gruyter. Berlin-New York, 1998.
81. Wozniak, G., *Zerstaubungstechnik: Prinzipien, Verfahren, Geräte*. 2002: Springer DE.
82. Wood, E. and A.L. Loomis, *XXXVIII. The physical and biological effects of high-frequency sound-waves of great intensity*. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1927. **4**(22): p. 417-436.
83. Dessanges, J.F., *A history of nebulization*. J Aerosol Med, 2001. **14**(1): p. 65-71.
84. Söllner, K., *Experiments to demonstrate cavitation caused by ultrasonic waves*. Transactions of the Faraday Society, 1936. **32**: p. 1537-1539.
85. Boguslavskii, Y.Y. and O. Eknadiosyants, *Physical mechanism of the acoustic atomization of a liquid*. Soviet Phys. Acoust, 1969. **15**(14): p. 1122.

86. Eknadiosyants, O., *The kinetics of ultrasonic fog formation*. Sov Phys Acoust, 1963. **9**: p. 201-2.
87. Gershenzon, E. and O. Eknadiosyants, *The nature of liquid atomization in an ultrasonic fountain*. Sov Phys Acoust, 1964. **10**: p. 127-132.
88. Flament, M., P. Leterme, and A. Gayot, *Study of the technological parameters of ultrasonic nebulization*. Drug development and industrial pharmacy, 2001. **27**(7): p. 643-649.
89. Boulton-Stone, J. and J. Blake, *Gas bubbles bursting at a free surface*. Journal of Fluid Mechanics, 1993. **254**(1): p. 437-466.
90. Barreras, F., H. Amaveda, and A. Lozano, *Transient high-frequency ultrasonic water atomization*. Experiments in fluids, 2002. **33**(3): p. 405-413.
91. Eisenmenger, W., *Dynamic properties of the surface tension of water and aqueous solutions of surface active agents with standing capillary waves in the frequency range from 10 kc/s to 1.5 Mc/s*. Acustica, 1959. **9**(4): p. 227-240.
92. Lang, R.J., *Ultrasonic atomization of liquids*. The journal of the acoustical society of America, 1962. **34**: p. 6.
93. Fogler, H.S. and K.D. Timmerhaus, *Ultrasonic atomization studies*. The Journal of the Acoustical Society of America, 1966. **39**: p. 515.
94. Yule, A. and Y. Al-Suleimani, *On droplet formation from capillary waves on a vibrating surface*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2000. **456**(1997): p. 1069-1085.
95. Topp, M.N., *Ultrasonic atomization-a photographic study of the mechanism of disintegration*. Journal of Aerosol Science, 1973. **4**(1): p. 17-25.
96. Qi, A., et al., *Miniature inhalation therapy platform using surface acoustic wave microfluidic atomization*. Lab Chip, 2009. **9**(15): p. 2184-93.
97. Rajan, R. and A. Pandit, *Correlations to predict droplet size in ultrasonic atomisation*. Ultrasonics, 2001. **39**(4): p. 235-255.
98. Kurosawa, M., A. Futami, and T. Higuchi. *Characteristics of liquids atomization using surface acoustic wave*. in *Solid State Sensors and Actuators, 1997. TRANSDUCERS'97 Chicago., 1997 International Conference on*. 1997. IEEE.
99. McCallion, O.N., et al., *Nebulization of fluids of different physicochemical properties with air-jet and ultrasonic nebulizers*. Pharmaceutical research, 1995. **12**(11): p. 1682-1688.
100. Tarr, M.A., G. Zhu, and R.F. Browner, *Fundamental aerosol studies with an ultrasonic nebulizer*. Applied spectroscopy, 1991. **45**(9): p. 1424-1432.
101. Faraday, M., *On a peculiar class of acoustical figures; and on certain forms assumed by groups of particles upon vibrating elastic surfaces*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1831. **121**: p. 299-340.
102. Alvarez, M., J.R. Friend, and L.Y. Yeo, *Surface vibration induced spatial ordering of periodic polymer patterns on a substrate*. Langmuir, 2008. **24**(19): p. 10629-32.
103. Yeo, L.Y. and J.R. Friend, *Ultrafast microfluidics using surface acoustic waves*. Biomicrofluidics, 2009. **3**(1): p. 12002.
104. Qi, A., et al., *The extraction of liquid, protein molecules and yeast cells from paper through surface acoustic wave atomization*. Lab Chip, 2010. **10**(4): p. 470-6.
105. Piezoproducts, J.M. *Ultraschallzerstäuber*. 27.08.2013]; Available from: <http://www.piezoproducts.com/index.php?id=119&L=1>.
106. Biskos, G., et al., *Generation and sizing of particles for aerosol-based nanotechnology*. KONA Powder Particle J, 2008. **26**: p. 13-35.

107. Yeo, L.Y., et al., *Ultrasonic nebulization platforms for pulmonary drug delivery*. Expert Opin Drug Deliv, 2010. **7**(6): p. 663-79.
108. Knoch, M. and M. Keller, *The customised electronic nebuliser: a new category of liquid aerosol drug delivery systems*. Expert opinion on drug delivery, 2005. **2**(2): p. 377-390.
109. Lass, J.S., A. Sant, and M. Knoch, *New advances in aerosolised drug delivery: vibrating membrane nebuliser technology*. Expert Opin Drug Deliv, 2006. **3**(5): p. 693-702.
110. Touw, D.J., et al., *Pharmacokinetics of aerosolized tobramycin in adult patients with cystic fibrosis*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(1): p. 184-7.
111. Kisch, G.L. and F.P. Paloucek, *Metered-dose inhalers and nebulizers in the acute setting*. Ann Pharmacother, 1992. **26**(1): p. 92-5.
112. Shanks, J.V. and J. Morgan, *Plant 'hairy root' culture*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(2): p. 151-5.
113. Guillon, S., et al., *Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(9): p. 403-9.
114. Wysokinska, H., K. Lisowska, and K. Floryanowicz-Czekalska, *Transformation of *Catalpa ovata* by *Agrobacterium rhizogenes* and phenylethanoid glycosides production in transformed root cultures*. Z Naturforsch C, 2001. **56**(5-6): p. 375-81.
115. Weathers, P., et al., *Mist reactors: principles, comparison of various systems, and case studies*. Electronic Journal of Integrative Biosciences, 2008. **3**(1): p. 29-37.
116. Dreimann, J., *Evaluierung eines Bioreaktorsystems mit Ultraschallvernebelung*, in *Institut für Technische Chemie*. 2009, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
117. Lindner, P., *Entwicklung von Software-Systemen zur Planung, Datenaufnahme und -auswertung von Bioprozessen*. 2006, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
118. Bluma, A., *Adaption inline mikroskopischer Verfahren an die Überwachung und Charakterisierung biotechnologischer Kristallisationsprozesse*. 2009, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
119. Conrads, D., et al., *Handbuch Elektrotechnik: Grundlagen und Anwendungen für Elektrotechniker*. 2008: Springer DE.
120. Eichler, H.J., H.-D. Kronfeldt, and J. Sahm, *Das neue physikalische Grundpraktikum*. 2006: Springer DE.
121. Cherry, R.S., *Animal cells in turbulent fluids: details of the physical stimulus and the biological response*. Biotechnol Adv, 1993. **11**(2): p. 279-99.
122. Papoutsakis, E.T., *Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors*. Trends Biotechnol, 1991. **9**(12): p. 427-37.
123. Maier, U. and J. Büchs, *Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors*. Biochemical Engineering Journal, 2001. **7**(2): p. 99-106.
124. Zhang, H., et al., *Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks*. Biotechnology and applied biochemistry, 2005. **41**(1): p. 1-8.
125. Schügerl, K., *Bioreaktionstechnik. I. Grundlagen, Formalkinetik, Reaktortypen und Prozeßführung*. 1985: Salle.
126. Fuchs, G. and H.-G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie: Begründet von Hans-Günter Schlegel*. 2006: Georg Thieme Verlag.
127. Eibl, R. and D. Eibl, *Disposable Bioreactors*. Disposable Bioreactors, 2010. **1**.

128. Czermak, P., et al., *A ceramic microsparging aeration system for cell culture reactors*. Publication Series of IBPT-University of Applied Sciences Giessen-Friedberg, 2005. **1**: p. 1-6.
129. Ducos, J.-P., B. Terrier, and D. Courtois, *Disposable bioreactors for plant micropropagation and mass plant cell culture*, in *Disposable bioreactors*. 2010, Springer. p. 89-115.
130. Heidemann, R., et al., *The Super-Spinner: a low cost animal cell culture bioreactor for the CO<sub>2</sub> incubator*. Cytotechnology, 1994. **14**(1): p. 1-9.
131. Kunas, K. and J. Keating, *Stirred tank single-use bioreactor-comparison to traditional stirred tank bioreactor*. Biologic Europe, 2005.
132. Singh, V., *Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation*. Cytotechnology, 1999. **30**(1-3): p. 149-58.
133. Terrier, B., et al., *Two new disposable bioreactors for plant cell culture: the wave and undertow bioreactor and the slug bubble bioreactor*. Biotechnology and bioengineering, 2007. **96**(5): p. 914-923.
134. Amoabediny, G. and J. Büchs, *Modelling and advanced understanding of unsteady-state gas transfer in shaking bioreactors*. Biotechnology and applied biochemistry, 2007. **46**(1): p. 57-67.
135. Gupta, A. and G. Rao, *A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor*. Biotechnology and bioengineering, 2003. **84**(3): p. 351-358.
136. Wittmann, C., et al., *Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O<sub>2</sub> in shake-flasks*. Biotechnology Letters, 2003. **25**(5): p. 377-380.
137. Henzler, H.-J. and D. Kauling, *Oxygenation of cell cultures*. Bioprocess Engineering, 1993. **9**(2-3): p. 61-75.
138. GmbH, L.-I.D.-D.S.v.M.u.Z. *Catalogue of human and animal cell lines*. 20.06.2013]; Available from: <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines.html>.
139. Gao, J., et al., *Spectroscopic investigation on assisted sonocatalytic damage of bovine serum albumin (BSA) by metronidazole (MTZ) under ultrasonic irradiation combined with nano-sized ZnO*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2010. **77**(4): p. 895-901.
140. Wang, J., et al., *Spectroscopic study on interaction of bovine serum albumin with sodium magnesium chlorophyllin and its sonodynamic damage under ultrasonic irradiation*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2010. **75**(1): p. 366-74.
141. Zou, M., et al., *Sonodynamic and sonocatalytic damage of BSA molecules by Cresol Red, Cresol Red-DA and Cresol Red-DA-Fe under ultrasonic irradiation*. Ultrason Sonochem, 2013. **20**(2): p. 685-95.
142. Chandel, A.K., et al., *The realm of penicillin G acylase in  $\beta$ -lactam antibiotics*. Enzyme and Microbial Technology, 2008. **42**(3): p. 199-207.
143. Wang, J., et al., *Sonocatalytic damage of bovine serum albumin (BSA) in the presence of nanometer anatase titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)*. Ultrasound in Medicine and Biology, 2006. **32**(1): p. 147-152.
144. Arii, K., et al., *Degradation kinetics of L-glutamine in aqueous solution*. Eur J Pharm Sci, 1999. **9**(1): p. 75-8.
145. Heeneman, S., N.E. Deutz, and W.A. Buurman, *The concentrations of glutamine and ammonia in commercially available cell culture media*. J Immunol Methods, 1993. **166**(1): p. 85-91.

146. Moore, S., *Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction*. J Biol Chem, 1968. **243**(23): p. 6281-3.
147. Tritsch, G.L. and G.E. Moore, *Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media*. Exp Cell Res, 1962. **28**: p. 360-4.
148. Hesse, M., H. Meier, and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 1991: Thieme Stuttgart.
149. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2009: Springer.
150. Kessler, D.P., et al., *Investigation of a proposed penicillin G acidic degradation scheme using high-pressure liquid chromatography and optimization techniques and mechanistic considerations*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1983(9): p. 1699-1703.
151. Li, D., et al., *Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river*. Water Res, 2008. **42**(1-2): p. 307-17.
152. Blaha, J.M., A.M. Knevel, and S.L. Hem, *High-pressure liquid chromatographic analysis of penicillin G potassium and its degradation products*. J Pharm Sci, 1975. **64**(8): p. 1384-6.
153. Hou, J.P. and J.W. Poole, *Kinetics and mechanism of degradation of ampicillin in solution*. J Pharm Sci, 1969. **58**(4): p. 447-54.
154. Jusko, W.J., *Fluorometric analysis of ampicillin in biological fluids*. J Pharm Sci, 1971. **60**(5): p. 728-32.
155. Robinson-Fuentes, V.A., T.M. Jefferies, and S.K. Branch, *Degradation pathways of ampicillin in alkaline solutions*. J Pharm Pharmacol, 1997. **49**(9): p. 843-51.
156. Schneider, S., et al., *Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>*. Photochem Photobiol Sci, 2003. **2**(11): p. 1107-17.
157. Rost, F.W., *Fluorescence microscopy*. 2. Vol. 2. 1995: Cambridge University Press.
158. Wang, Y., et al., *Ozonation combined with ultrasound for the degradation of tetracycline in a rectangular air-lift reactor*. Separation and Purification Technology, 2012. **84**: p. 138-146.
159. Jia, A., et al., *Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(22): p. 4655-62.
160. Liang, Y., M.B. Denton, and R.B. Bates, *Stability studies of tetracycline in methanol solution*. J Chromatogr A, 1998. **827**(1): p. 45-55.
161. Just, L., et al., *Glutamatergic control of the expression of the proenkephalin gene in rat frontoparietal cortical slice cultures*. Cereb Cortex, 1998. **8**(8): p. 702-9.
162. Pouliot, R., et al., *Influence of endothelial cells on structure, biochemistry and functionality of epidermis reconstructed on synthetic porous membrane*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 1998. **11**(4-5): p. 193-206.
163. Khaoustov, V.I., et al., *Induction of three-dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(9): p. 501-9.
164. Li, S., et al., *NASA-approved rotary bioreactor enhances proliferation and osteogenesis of human periodontal ligament stem cells*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(9): p. 1273-82.

- 
165. Sauer, I.M., et al., *Extracorporeal liver support based on primary human liver cells and albumin dialysis--treatment of a patient with primary graft non-function*. J Hepatol, 2003. **39**(4): p. 649-53.
  166. She, Z.S., et al., *Scalings and structures in turbulent Couette-Taylor flow*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2001. **64**(1 Pt 2): p. 016308.
  167. Sucosky, P., et al., *Fluid mechanics of a spinner-flask bioreactor*. Biotechnol Bioeng, 2004. **85**(1): p. 34-46.
  168. Wendt, D., et al., *Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity*. Biotechnol Bioeng, 2003. **84**(2): p. 205-14.
  169. GmbH, P.S. *Non-Invasive Oxygen Sensors*. [cited 2013 13.12.]; Available from: [http://www.presens.de/fileadmin/user\\_upload/products/Sensor\\_Probes/Non-invasive\\_oxygen\\_sensors/130801\\_SP-NonInvOx-13-02\\_w.pdf](http://www.presens.de/fileadmin/user_upload/products/Sensor_Probes/Non-invasive_oxygen_sensors/130801_SP-NonInvOx-13-02_w.pdf).
  170. GmbH, P.S. *Non-Invasive pH Sensors*. [cited 2013 13.12.]; Available from: [http://www.presens.de/fileadmin/user\\_upload/products/Sensor\\_Probes/Non-invasive\\_pH\\_Sensors/110715\\_SP-NonInvpH-11-01\\_w.pdf](http://www.presens.de/fileadmin/user_upload/products/Sensor_Probes/Non-invasive_pH_Sensors/110715_SP-NonInvpH-11-01_w.pdf).
  171. Angelova, M., P. Sheremetska, and M. Lekov, *Enhanced polymethylgalacturonase production from Aspergillus niger 26 by calcium alginate immobilisation*. Process Biochemistry, 1998. **33**(3): p. 299-305.
  172. Peart, P.C., et al., *Entrapment of mycelial fragments in calcium alginate: a general technique for the use of immobilized filamentous fungi in biocatalysis*. Steroids, 2012. **77**(1-2): p. 85-90.

## 8 Anhang

### 8.1 Ergänzende Graphen

#### 8.1.1 Tröpfchengrößenspektrum der Zerstäuber CH12V und CH24V

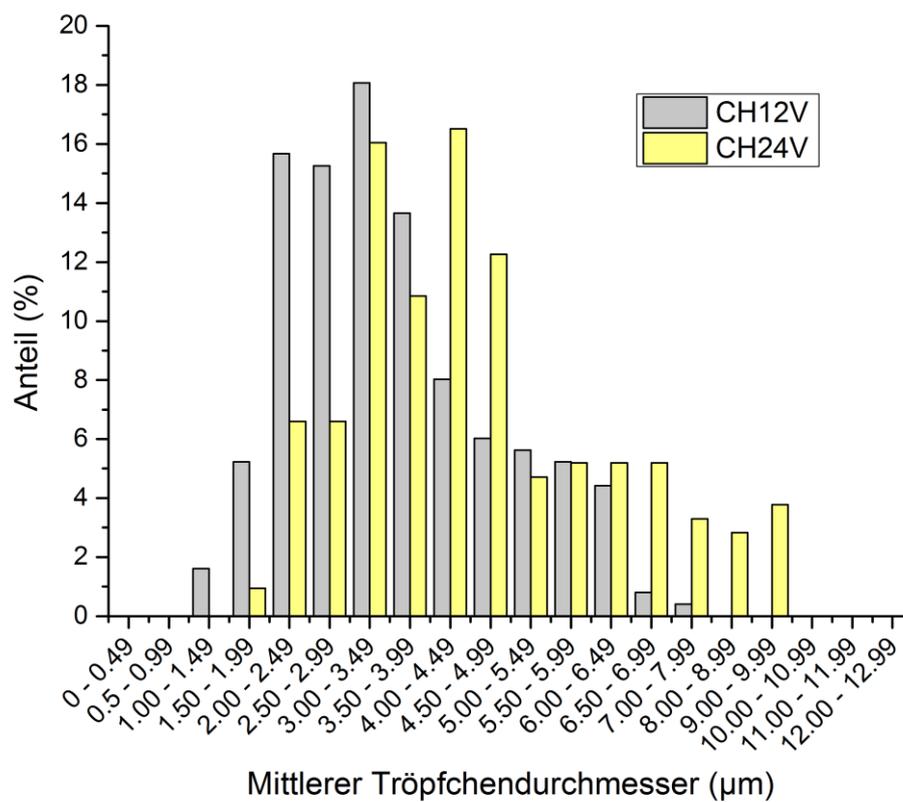


Abbildung 8.1: Tröpfchengrößenspektrum der US-Zerstäuber CH12V und CH24 V. Aufgetragen ist der mittlere Tröpfchendurchmesser (in definierten Bereichen zusammengefasst) gegen den Gesamtanteil in % aller Tröpfchen des jeweiligen US-Zerstäubers

### 8.1.2 Tröpfchengrößenspektrum des Zerstäuber LHZ1

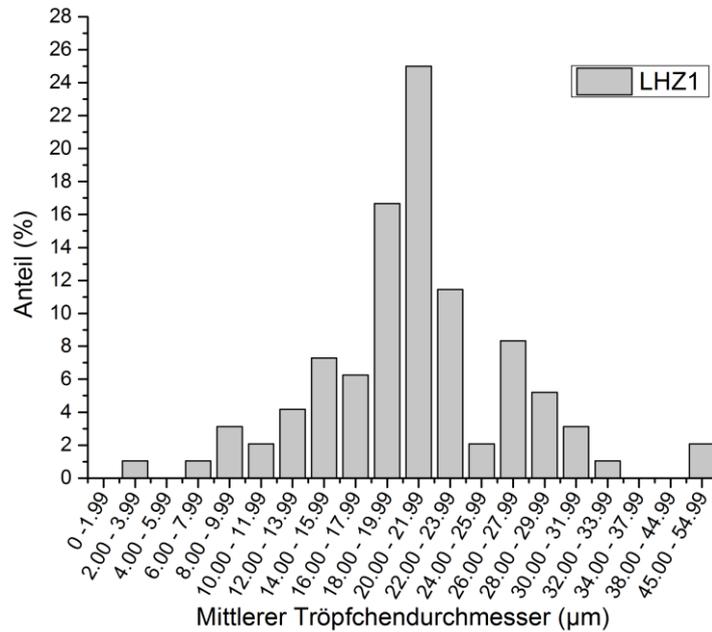


Abbildung 8.2: Tröpfchengrößenspektrum des US-Zerstäubers LHZ1. Aufgetragen ist der mittlere Tröpfchendurchmesser (in definierten Bereichen zusammengefasst) gegen den Gesamtanteil in % aller Tröpfchen des jeweiligen US-Zerstäubers

### 8.1.3 Tröpfchengrößenspektrum des US-Zerstäubers AW-Typ II bei unterschiedlichen Regelungen

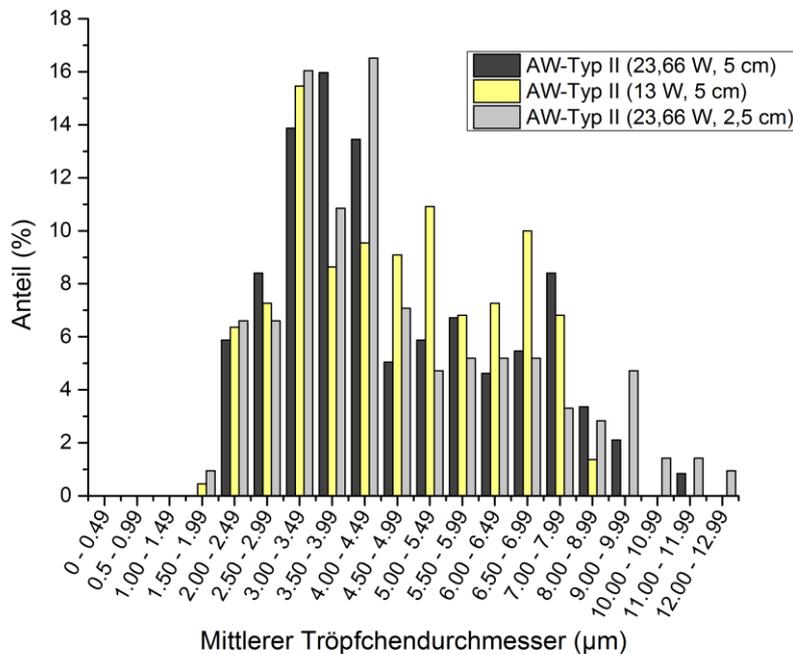


Abbildung 8.3: Tröpfchengrößenspektrum des US-Zerstäubers AW-Typ II bei unterschiedlichen Leistungen und Abständen des ISM zum Reaktorboden. Aufgetragen ist der mittlere Tröpfchendurchmesser (in definierten Bereichen zusammengefasst) gegen den Gesamtanteil in % aller Tröpfchen des jeweiligen US-Zerstäubers

### 8.1.4 Spannungsschwingungen weiterer US-Zerstäuber

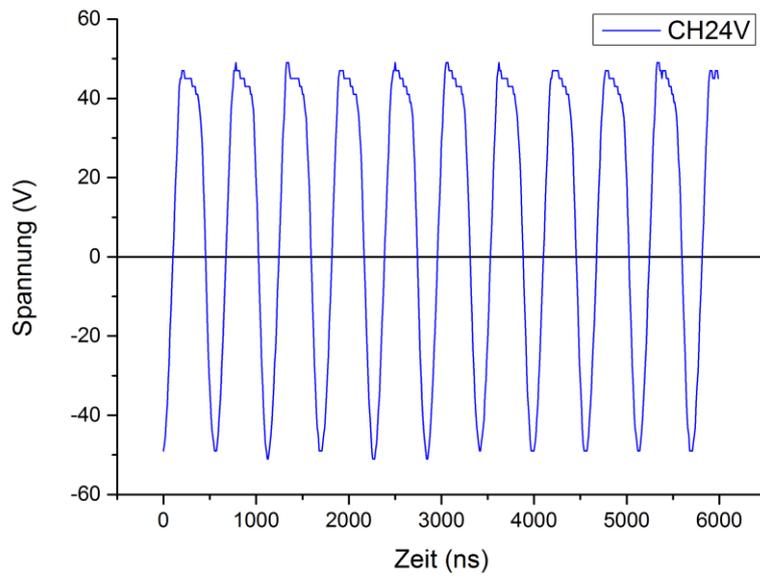


Abbildung 8.4: Auftragung der Spannungsschwingungen des US-Zerstäubers *CH24V* gegen die Zeit.

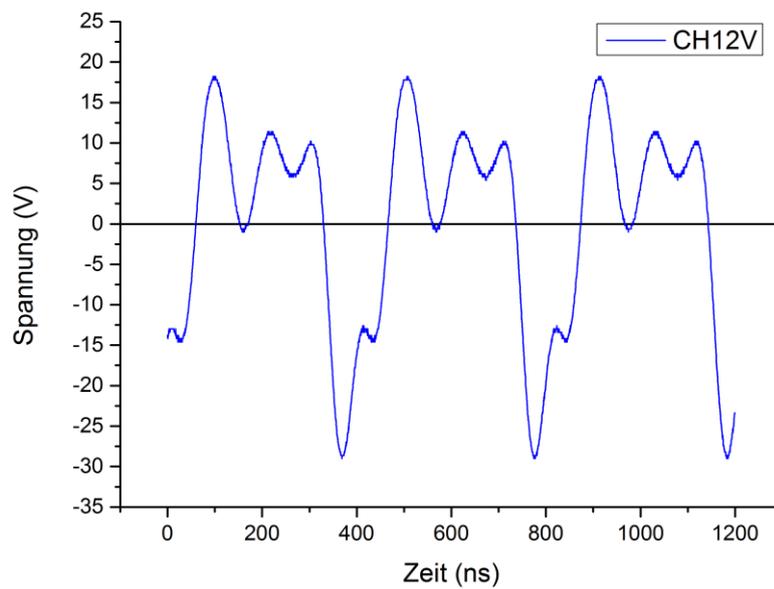


Abbildung 8.5: Auftragung der Spannungsschwingungen des US-Zerstäubers *CH12V* gegen die Zeit.

### 8.1.5 Hüllkurven weiterer US-Zerstäuber

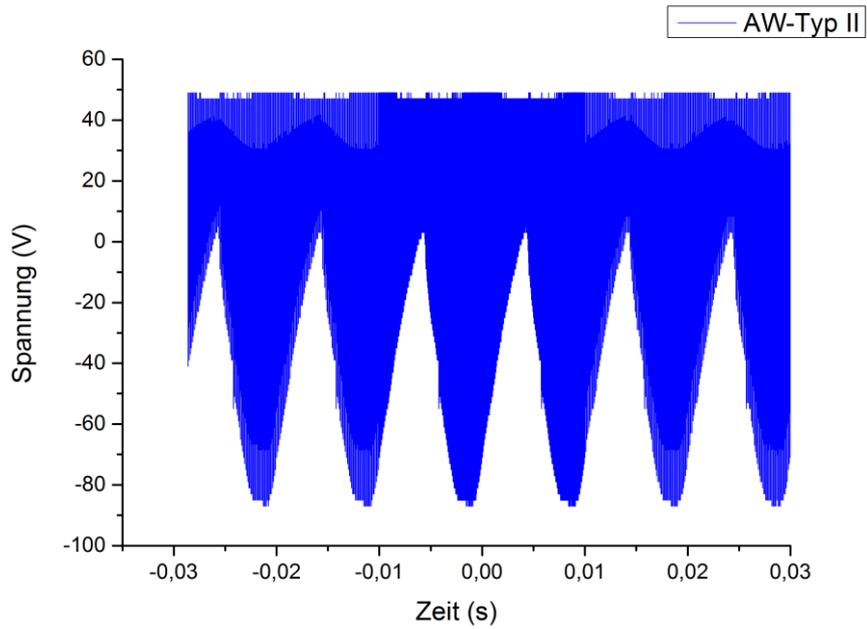


Abbildung 8.6: Darstellung der Hüllkurve der Spannungsschwingung gegen die Zeit des US-Zerstäubers *AW-Typ II*.

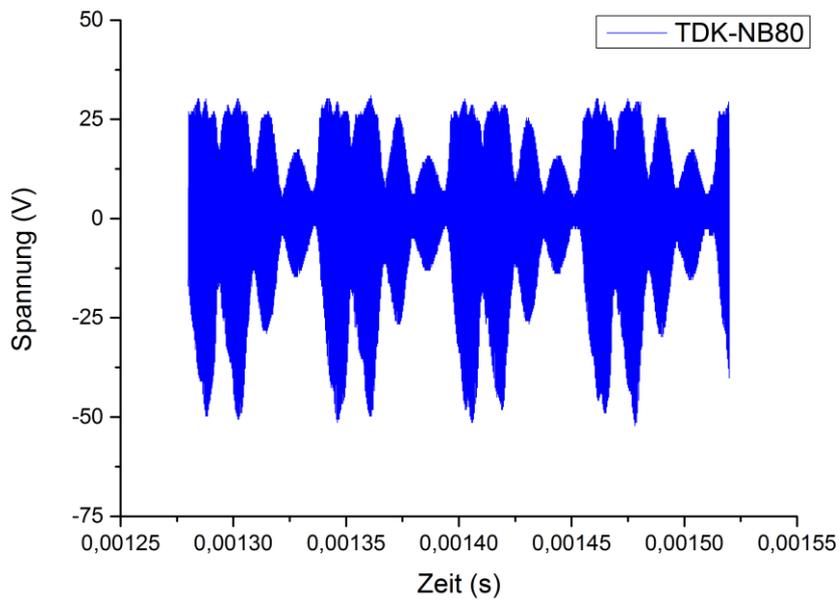


Abbildung 8.7: Darstellung der Hüllkurve der Spannungsschwingung gegen die Zeit des US-Zerstäubers *TDK-NB80*.

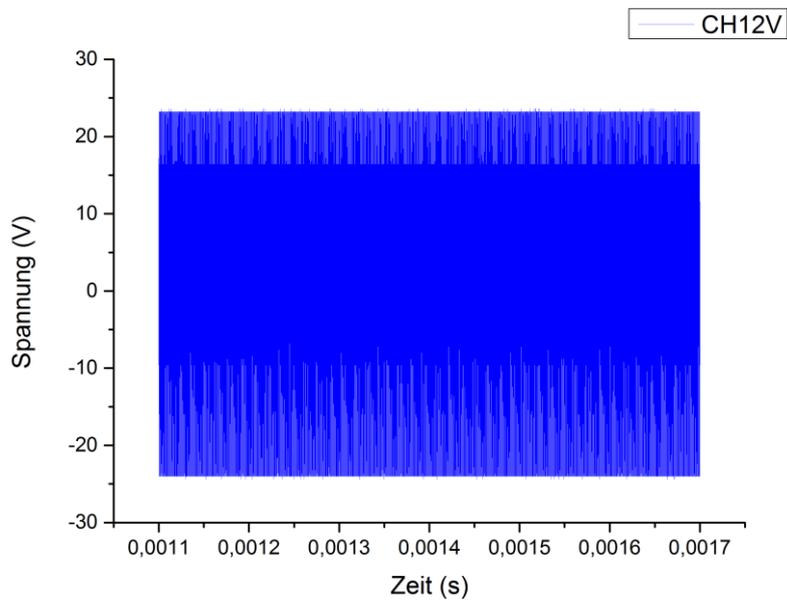


Abbildung 8.8: Darstellung der Hüllkurve der Spannungsschwingung gegen die Zeit des US-Zerstäubers CH12V.

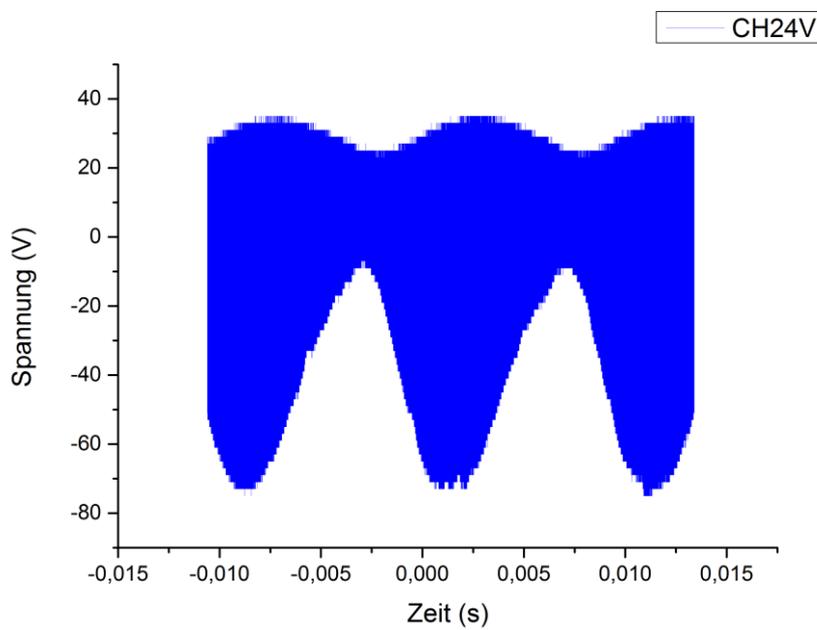


Abbildung 8.9: Darstellung der Hüllkurve der Spannungsschwingung gegen die Zeit des US-Zerstäubers CH24V.

### 8.1.6 Ergebnisse der Aerosoldichtemessung der weiteren US-Zerstäuber

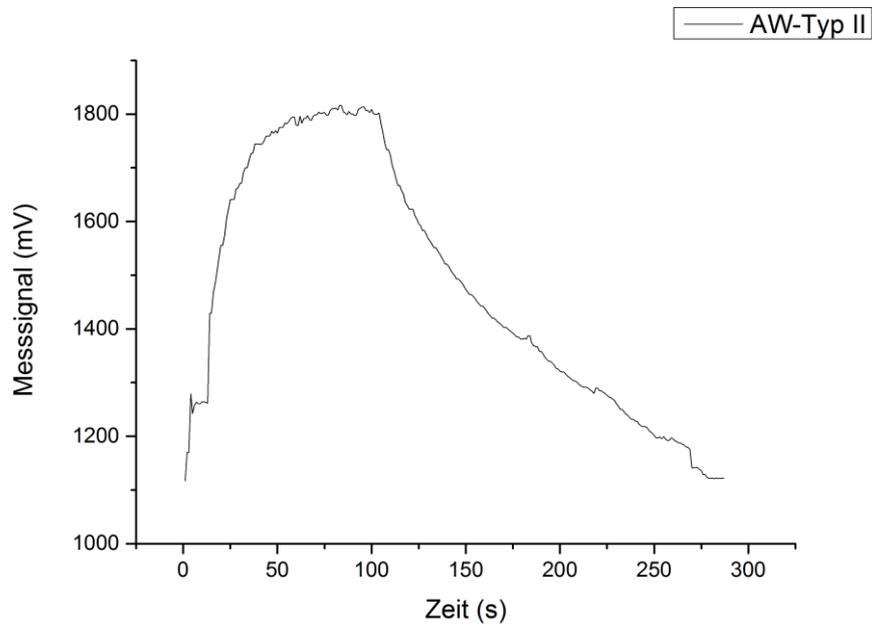


Abbildung 8.10: Messung der Aerosoldichte von Starten bis zum Ausschalten des US-Zerstäubers und der vollständigen Sedimentation des Aerosols des *AW-Typ II*. Aufgetragen ist das zur Aerosoldichte proportionale Messsignal gegen die Zeit.

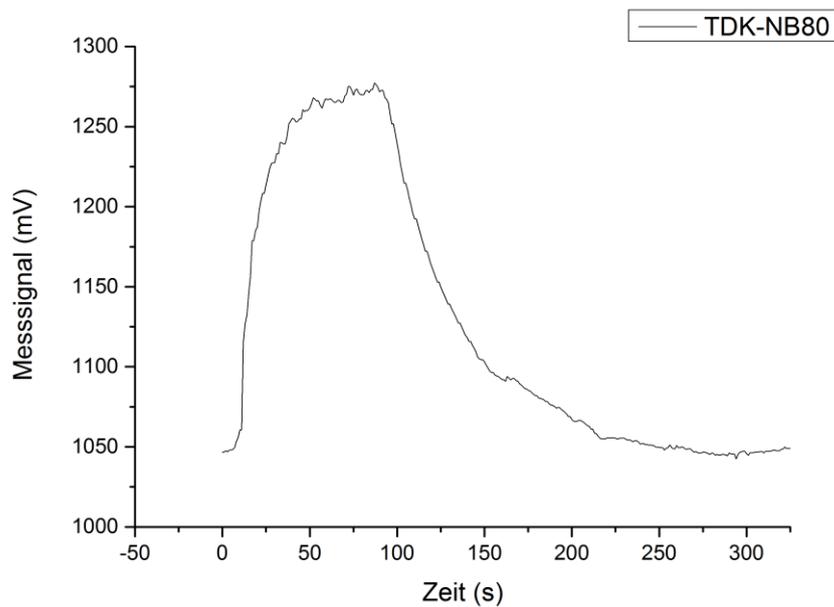


Abbildung 8.11: Messung der Aerosoldichte von Starten bis zum Ausschalten des US-Zerstäubers und der vollständigen Sedimentation des Aerosols des *TDK-NB80*. Aufgetragen ist das zur Aerosoldichte proportionale Messsignal gegen die Zeit.

### 8.1.7 Ergebnisse der externen Testung von ultraschallzerstäubtem DMEM-Nährmedium mittels NiH-3T3-Zellen

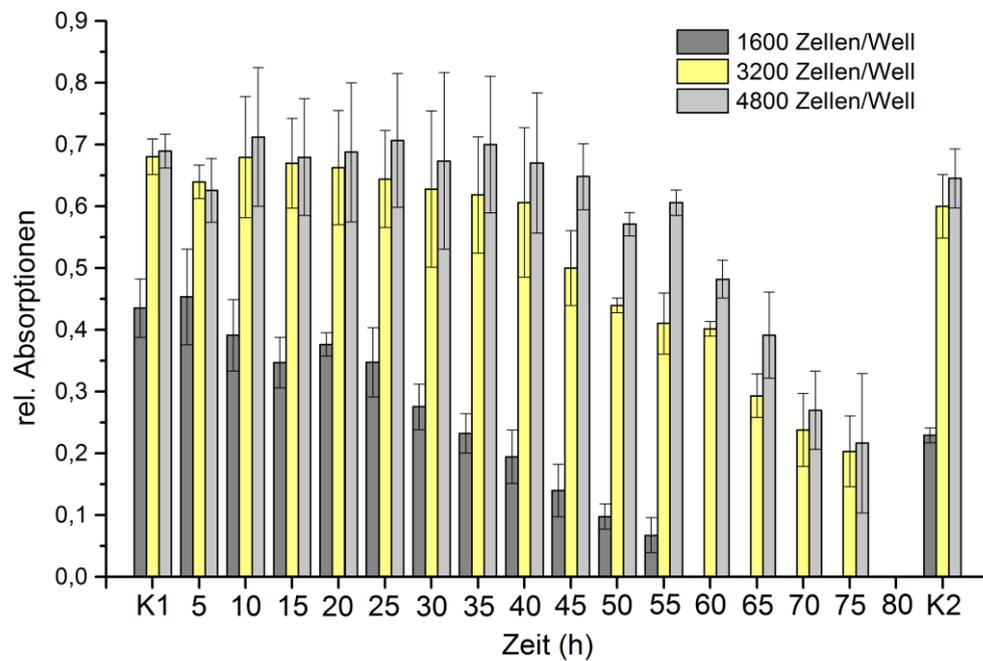


Abbildung 8.12: Ergebnisse der externen Testung von ultraschallzerstäubtem DMEM-Nährmedium mittels NiH-3T3-Zellen. 150 ml DMEM wurden in dem *NKR-Typ I* bei maximaler Leistung des *AW-Typ I* zerstäubt. Eine Probenahme erfolgte alle 5 h. Die Zellen wurden außerhalb des Reaktors unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) bei verschiedenen Aussatzedichten (1600, 3200, 4800 Zellen/Well) in 96-Well-Lochplatten in einem Inkubator angezchtet. Nach 2 Tagen wurde das unbehandelte DMEM gegen die Reaktorproben ausgetauscht und für 3 weitere Tage inkubiert. Die Viabilität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Aufgetragen sind die relativen Absorptionen der Reaktorproben bei 570 nm gegen 630 nm, die direkt proportional zur Viabilität der Zellen sind, gegen die Zerstäubungszeit. K1 und K2 sind hierbei Kontrollgruppen im unbehandelten Medium. N = 3

### 8.1.8 Ergänzende Absorptionsspektren

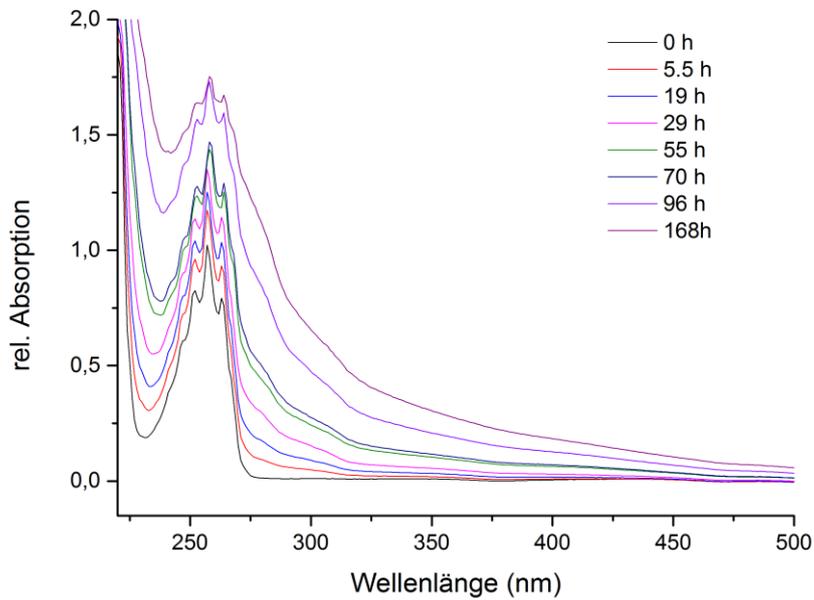


Abbildung 8.13: Absorptionsspektrum von L-Phenylalanin. Vermessen wurden die Proben nach unterschiedlichen Zerstäubungszeiten im Reaktor.

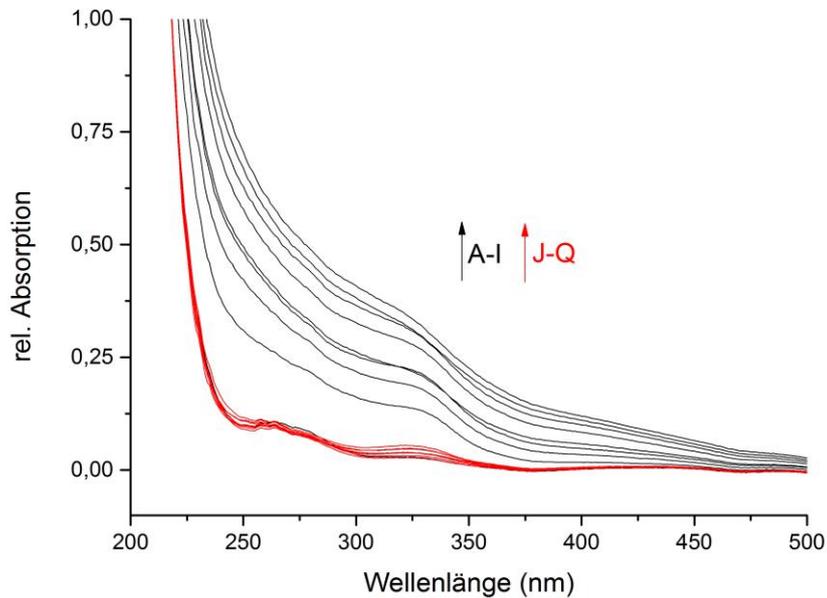


Abbildung 8.14: Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 10 µg/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycin in 50 mM KPP (pH 7,3) nach einer Zerstäubungszeit von 0 h (A) 24 h (B), 48 h (C), 60 h (D), 72 h (E), 97 h (F), 121 h (G), 144 h (H), 168 h (I) als schwarze Linien und die Referenzproben als rote Linien

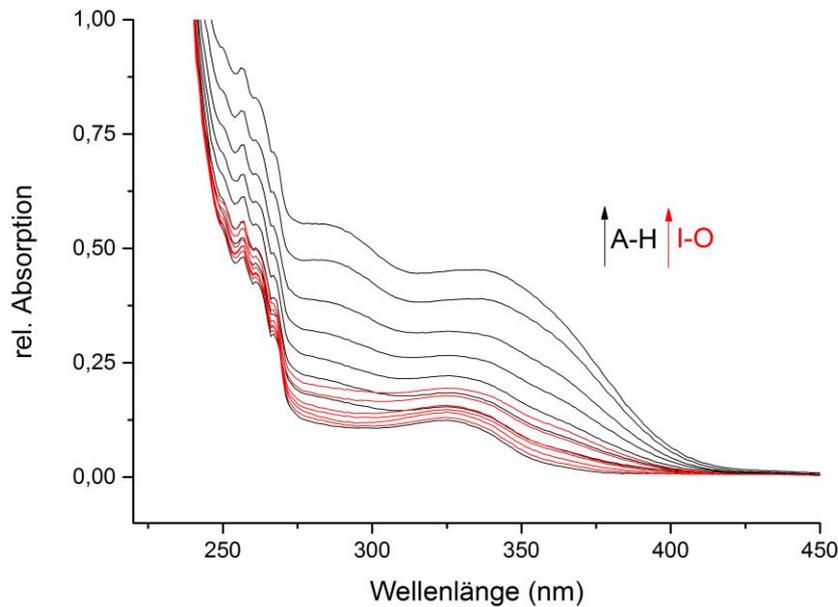


Abbildung 8.15: Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 50 µg/ml Ampicillin in 50 mM KPP (pH 7,3) nach einer Zerstäubungszeit von 0h (A), 26 h (B), 50 h (C), 70,5 h (D), 92,5 h (E), 118 h (F), 143 h (G) und 168 h (H), als schwarze Linien und die Referenzproben nach 26 h (I), 50 h (J), 70,5 h (K), 92,5 h (L), 118 h (M), 143 h (N) und 168 h (O) als rote Linien.

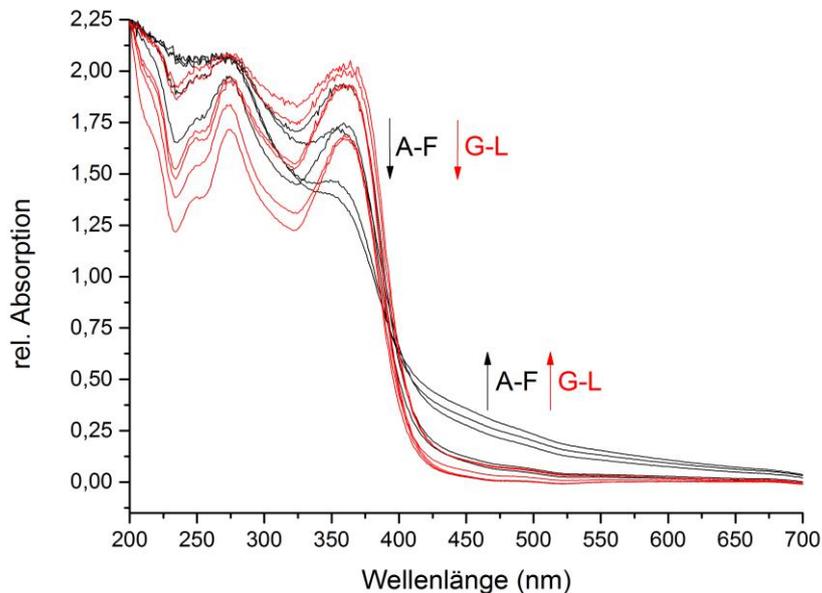


Abbildung 8.16: Differenz-Absorptionsspektren der Reaktorproben einer Lösung aus 17,5 µg/ml Tetrazyklin in 50 mM Acetat-Puffer (pH 5) nach einer Zerstäubungszeit von 0 h (A) 21,5 h (B), 27 h (C), 72 h (D), 96 h (E) und 120 h (F), als schwarze Linien und die Referenzproben nach 27 h (G), 72 h (H), 96 h (I) und 120 h (J) als rote Linien.

### 8.1.9 Prozessüberwachung einer Kultivierung von in Na-Alginat immobilisiertem *Aspergillus niger* in einem Schüttelkolben

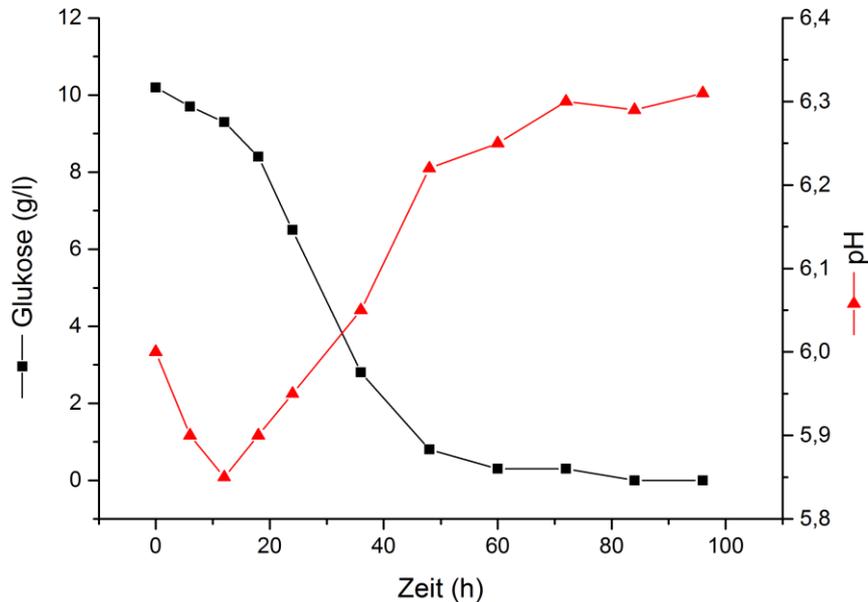


Abbildung 8.17: Prozessüberwachung der Testkultivierung in einem Schüttelkolben ( $V = 300$  ml) von in Na-Alginat immobilisiertem *A.niger* in 150 ml FM-Medium

## 8.2 Ergänzende Informationen zum experimentellen Teil

### 8.2.1 Sauerstoffübergang

Der volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient ( $k_{La}$ -Wert) wird in der Bioreaktortechnik häufig als Kennzahl für die Effizienz des Sauerstoffeintrags in flüssige Phase eines Bioreaktorsystems verwendet. Wie bereits beschrieben (Kapitel 4.6.2) ist die Sauerstoffversorgung von Mikroorganismen und Zellen in Bioreaktoren häufig ein limitierender Faktor, weshalb die Bemühungen bei der Konstruktion von Bioreaktoren darauf hinzielen einen möglichst hohen  $k_{La}$ -Wert zu erreichen. Anhand des  $k_{La}$ -Werts lassen sich unterschiedliche Begasungssysteme und Bioreaktoren miteinander vergleichen. Ein vorhandenes Reaktorsystem kann hinsichtlich seines Optimierungspotenzials in Bezug auf den Sauerstofftransport bewertet werden.

Der  $k_L a$ -Wert leitet sich von der Zweifilmtheorie des Stoffaustausches her. Es wird angenommen, dass der Transport eines Gases durch die Phasengrenzfläche Gas/Flüssigkeit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, dabei sind Gas und Flüssigkeit gut durchmischt und andere Stofftransportwiderstände werden vernachlässigt. Grundlage der Berechnung ist dabei das erste Fick'sche Gesetz. Sauerstoff wird so lange aus der Gasphase in die Flüssigphase transportiert, bis die Sauerstoffkonzentration  $c_{O_2}$  in der Flüssigkeit die Sättigungskonzentration  $c^*_{O_2}$  erreicht hat. Der Sauerstoffstrom ist proportional zum treibenden Konzentrationsgefälle für den Stofftransport und der Fläche, über die der Transport stattfindet, also der Phasengrenzfläche  $A_g$  zwischen Gas und Flüssigkeit. Als Proportionalitätsfaktor wird der Stofftransportkoeffizient  $k_L$  eingeführt. Wird der Sauerstoffstrom  $\eta_{O_2}$  auf das Flüssigkeitsvolumen  $V$  im Reaktor bezogen, ergibt sich:

$$\eta_{O_2} = k_L \frac{A_g}{V} (c^*_{O_2} - c_{O_2}) \quad (19)$$

Im speziellen Fall von Sauerstoff wird der Sauerstoffstrom  $\eta_{O_2}$  häufig als Oxygen Transfer Rate (OTR) bezeichnet. Der Quotient  $A_g/V$  ist eine spezifische, auf das Volumen bezogene, Stoffaustauschfläche. Da bei Blasen- oder Tröpfchenbildung häufig eine genaue Bestimmung der Phasengrenzfläche nicht möglich ist, wird im Folgenden  $A_g/V$  auf einen Liter bezogen und als  $a$  bezeichnet. Aus praktischen Gründen werden  $k_L$  und  $a$  häufig zu einer Variablen zusammengefasst und als volumenbezogener Sauerstofftransportkoeffizient eingeführt

$$OTR = k_L a (c^*_{O_2} - c_{O_2}) \quad (20)$$

Je höher der Wert des Sauerstofftransportkoeffizienten ist, umso größer ist der Sauerstofftransport von der Gasphase in das Medium. Durch die Kenntnis des  $k_L a$ -Werts ist es zudem möglich, die maximal erreichbaren Wachstumsraten bzw. Biomassekonzentrationen/Zellzahlen abzuschätzen, wenn die Sauerstoffversorgung der limitierende Faktor ist. Durch die Bestimmung des  $k_L a$ -Werts kann die OTR berechnet werden (siehe Kapitel 8.3.2)

## 8.2.2 Funktionsweise faseroptischer Sensoren

### 8.2.2.1 Faseroptischer Sauerstoffsensor

Die Messungen des gelösten Sauerstoffs ( $pO_2$ ) in dieser Arbeit wurden mit einem 4-Kanal-Faseroptischen Sensor der Firma PreSens (Oxy-4-mini) durchgeführt. Das Funktionsprinzip der Sensoren beruht auf dem Quenching-Effekt (Abbildung 8.18). Monochromatisches Licht wird pulsweise von einer LED über Lichtleiterkabel zu dem Sensor geleitet. Der Sensor besteht aus einer durchsichtigen Membran auf der ein Farbstoff (z.B. Ruthenium-Komplex) immobilisiert ist. Dieser wird durch das Licht angeregt und emittiert Fluoreszenzlicht, welches durch den Lichtleiter zurück zu einem Detektor geleitet wird. Der Zusammenstoß eines Sauerstoffmoleküls mit dem Farbstoff im angeregten Zustand führt zu einem strahlungslosen Energieübertrag auf den Sauerstoff. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals korreliert mit dem Sauerstoffgehalt der Lösung oder Gasphase. Als Messgröße dient die Fluoreszenzabklingzeit, die nicht von äußeren Lichtquellen, pH-Änderungen, Ionen- oder dem Salzgehalt beeinflusst wird. Die Vorteile optischer Sensoren liegen in der geringen Größe ( $D = 5 \text{ mm}$ ), sie sind nicht invasiv und es wird durch die Messung kein Sauerstoff verbraucht. Als Referenzwerte für die Kalibrierung dienen sauerstofffreies Wasser (0 %-Sauerstoffsättigung) und die getesteten Medien kurz vor dem Befüllen des Reaktors (100 %-Sauerstoffsättigung) bzw. Umgebungsluft für Messungen in der Gasphase.

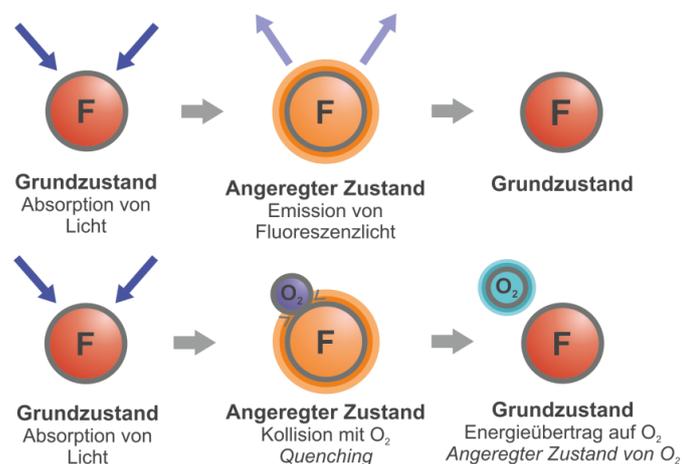


Abbildung 8.18: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines faseroptischen Sauerstoffsensors. Adaptiert von [169].

### 8.2.2.2 Faseroptischer pH-Sensor

Die Bestimmung des pH-Werts erfolgte mit einem 4-Kanal-Faseroptischen Sensor der Firma PreSens (pH-4-mini). Das Messprinzip ähnelt dem des oben beschriebenen Oxy-4-mini. Auf den Sensorspots sind zwei unterschiedliche Farbstoffe immobilisiert. Die

Fluoreszenz-Emission des einen Farbstoffs wird durch Änderungen im pH nicht beeinflusst und dient als interne Referenz (Abbildung 8.19). Die Fluoreszenzintensität des zweiten Farbstoffs ist abhängig von dem pH-Wert. Anhand der Differenz der Fluoreszenz beider Farbstoffe kann, nach vorheriger Kalibrierung, der pH-Wert in Lösung und im Aerosol bestimmt werden.

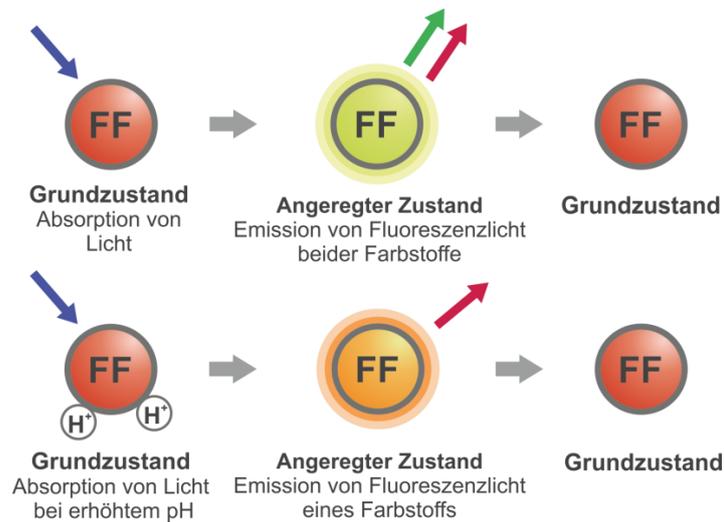


Abbildung 8.19: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines faseroptischen pH-Sensors. Adaptiert von [170].

## 8.3 Methoden

### 8.3.1 Testung der Volumenaktivität von Penicillin G-Acylase (NIPAB-Assay)

Bei dem NIPAB-Assay wird das leicht gelbliche 6-Nitro-3-Phenylacetaminobenzoensäure (NIPAB) durch PGA enzymatisch in Phenyllessigsäure (PAA) und 3-Amino-6-Nitrobenzoensäure gespalten:

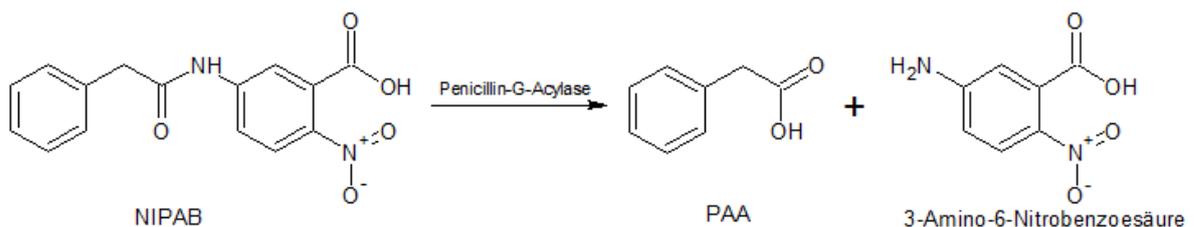


Abbildung 8.20: Reaktionsgleichung von NIPAB mit Penicillin G-Acylase

Die entstandene 3-Amino-6-Nitrobenzoesäure ist intensiv gelb gefärbt und die Absorption kann bei 405 nm in einem Photometer detektiert werden. Wird die Absorption gegen die Zeit aufgetragen, kann anhand Steigung ( $\Delta E/min$ ) mit der Formel 22 die Volumenaktivität ( $U/ml$ ) des Enzyms errechnet werden.

$$\frac{U}{ml} = \frac{\frac{\Delta E}{min} \cdot V_{Küv}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_{Probe}} \quad (22)$$

Hierbei stehen  $\varepsilon$  für den Extinktionskoeffizienten,  $d$  für die Schichtdicke der verwendeten Küvette,  $V_{Küv}$  für das Küvettenvolumen und  $V_{Probe}$  für das eingesetzte Probenvolumen. Das NIPAB (6-nitro-3-phenylacetamido-benzoesäure) wird mit einer Konzentration von 1,8 mg/ml in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 gelöst. Das zu bestimmende Enzym wird ebenfalls in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 mit einer Konzentration von 0,01 – 0,1 U/ml gelöst. Sowohl die Blindwert-Lösung als auch die Probenlösung wird in eine Küvette ( $d = 1$  cm) überführt und die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Bestimmung des Blindwerts erfolgt mit 1000  $\mu$ l Puffer + 500  $\mu$ l NIPAB-Lösung, welche in eine Küvette pipettiert werden. Für die Probelösung werden 900  $\mu$ l Puffer + 500  $\mu$ l NIPAB-Lösung in die Küvette pipettiert. Um die Reaktion zu starten werden schließlich 100  $\mu$ l Enzymlösung hinzugeben und die Absorptionsmessung gestartet. Die Absorption wird über einen Zeitraum von 3 min jede Sekunde gemessen. Für diesen Testlauf der Aktivitätsbestimmung wurde eine Enzymlösung mit einer Konzentration von 0,1 U/ml angesetzt. Hierzu wurden 2  $\mu$ l einer 983 U/ml PGA-Lösung in 20 ml Puffer gegeben.

### 8.3.2 Sulfit Methode / Berechnung der *Oxygen Transfer Rate*

Der Sauerstoffübergang ist direkt abhängig von dem Übergangskoeffizienten  $k_L$  und der Grenzfläche  $a$ . Diese beiden Größen werden zusammengefasst zu dem  $k_L a$ -Wert (Kapitel 8.2.1). Es ergibt sich folgende Stoffübergangsgleichung:

$$OTR = k_L a (c^*_{O_2} - c_{O_2}) \quad (20)$$

Zur Bestimmung des  $k_L a$ -Werts anhand der Sulfit-Methode wird einer KPP-Lösung (100 mM, pH 8) eine bestimmte Menge Sulfit und katalytische Mengen  $Co^{2+}$  bzw.  $Cu^{2+}$  zugegeben. Die Lösung wird begast und der Sauerstoff, der in die Lösung gelangt, oxidiert das Sulfit zu Sulfat:



Abbildung 8.21: Reaktionsgleichung der Cobalt-katalysierten Oxidation von Sufit zu Sulfat

Die Oxidation von Sulfit verläuft sehr viel schneller als die Diffusion von Sauerstoff in die Lösung. Solange die Lösung Sulfit enthält, bleibt der Sauerstoffgehalt daher bei null. Erst wenn alles Sulfit verbraucht ist, steigt der Sauerstoffgehalt der Lösung. Aus der Zeit von Beginn der Begasung bis zum Anstieg der Sauerstoffkonzentration, lässt sich die Sauerstoffübergangsrate und bei bekannter Menge Sulfit der  $k_{La}$ -Wert und hieraus die OTR berechnen.

### 8.3.3 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Bestimmung der D-Glucosekonzentration erfolgte als amperometrische Messung im Schnelltest mit Hilfe des Analysator 2700 Select von Yellow Springs Instruments, Ohio, USA. Das Substrat wird stöchiometrisch durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucose-Oxidase zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt. Dieses diffundiert durch die poröse Membran und wird an einer Platinelektrode zu Sauerstoff oxidiert. Der hierbei entstehende elektrische Strom steigt proportional mit zunehmender Glucosekonzentration. Zur Verifizierung der Messdaten wurden je drei voneinander unabhängigen Verdünnungen durchgeführt und separat gemessen. Die Ermittlung des Verdünnungs- und Gerätefehlers erfolgte über die Standardabweichung.

### 8.3.4 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay wird im 96-Well-Lochplatten-Format durchgeführt. Als Referenzprotein dient BSA. Eine Kalbration wird für einen Konzentrationsbereich von 0 – 2000  $\mu\text{g/ml}$ . Von jeder Probe und den Referenzproben wird eine 3-fach-Bestimmung durchgeführt. Es werden jeweils 10  $\mu\text{l}$  in ein Well überführt und 300  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz zugegeben. Die Platten werden für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend leicht geschüttelt. In einem Photometer werden die Absorptionen bei 595 nm bestimmt.

### 8.3.5 MTT-Assay

Die Bestimmung der Viabilität der getesteten Säugerzellen erfolgte anhand des MTT-Assays. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) ist ein gelbes Tetrazolium-Salz, welches von Dehydrogenasen gesunder Mitochondrien lebender Eukaryontenzellen zu einem blau-violetten Formazan-Komplex reduziert wird.

Aus einer subkonfluenten Zellkulturflasche werden die Zellen trypsiniert und mit frischem Medium auf eine Zelldichte von 8000/ml eingestellt. An Tag 0 werden vier 96-Well

Lochplatten mit jeweils 200 µl der vorbereiteten Zellsuspension befüllt. Über Nacht werden die Zellen sich anheften lassen. Am Tag 1 wird das Medium abgesaugt und jedes Well mit 200 µl einer Proben aus dem Reaktor versehen. Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) werden von jeweils einer Platte das Medium abgenommen und mit 100 µl frischem Medium und 10 µl MTT versetzt. Nach 4 h Inkubation wird 1 ml einer Solubilisierungslösung (1 g Natriumdodecylsulfat (SDS) in 10 ml 0,01 M HCl, steril filtriert, frisch angesetzt) in jede Vertiefung gegeben. Über Nacht wird bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei die Formazan-Kristalle in Lösung gehen. Die Absorption des Formazans wird bei 570 nm gegen 630 nm als Referenzsignal im Immunoreader gemessen. Das erhaltene Signal kann als Maß für die Anzahl der lebenden Zellen angesehen werden

### 8.3.6 Absorptionsspektroskopie

Ein Milliliter der zu vermessenden Lösung wird in eine Quarzglasküvette ( $V = 1,5$  ml) gefüllt und in einem UV/Vis-Absorptionsspektrometer (Cary 50, Varian Inc.) platziert. Es wird ein Absorptionsspektrum über den Wellenlängenbereich von 190 – 800 nm aufgenommen. Die Lösungen werden soweit verdünnt, dass die maximale relative Absorption einen Wert von 1,5 nicht überschreitet.

### 8.3.7 Fluoreszenzspektroskopie

Es werden 1 ml der zu vermessenden Lösung in eine Quarzglasküvette ( $V = 1,5$  ml) überführt, welche anschließend in den Fluoreszenzspektrometer (F-7000, Hitachi High-Technologies Corporation) platziert. EX 200 - 800, EM 200 – 800, Schrittweite 10 nm, Spaltbreite 10 nm, Spannung der Lichtquelle 550 V. Die Verdünnung der Proben wird so gewählt, dass die Peaks möglichst eine relative Fluoreszenzintensität von 5000 nicht überschreiten.

### 8.3.8 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch denaturierende Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli. Durch Vernetzung von Acrylamid mit N,N-Methylenbisacrylamid entsteht ein Polyacrylamidgel. TEMED ist ein organisches Amin, das die Radikalbildung initiiert. APS liefert die Startradikale, die für die Polymerisationsreaktion nötig sind.

Es werden 12 %ige oder 15 %ige Trenngele und 6 %ige Sammelgele verwendet. Zuerst wird das Trenngel gegossen und zum Polymerisieren mit Isopropanol überschichtet, welches anschließend wieder entfernt wird. Vor dem Auftragen werden die Proben, versetzt mit Probenauftragspuffer (2x Laemmli), für 5 min bei 95 °C denaturiert. Beim Sammelgel wird eine Spannung von 80 V, beim Trenngel eine von 160 V angelegt und das Gel laufen gelassen bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht.

Zum Färben mit Coomassie werden die Gele über Nacht in der Coomassie Lösung inkubiert, welche an die basischen Seitenketten der Proteine angelagert wird und diese damit unspezifisch färbt. Anschließend wird der ins Gel eingelagerte Farbstoff durch Waschen mit Wasser entfärbt. Dieser Vorgang wird wiederholt bis sich das gewünschte Banden-Hintergrund-Verhältnis eingestellt hat.

### 8.3.9 Hemmhof-Test

Es wird eine frisch autoklavierte warme LB-Medium-Agar-Lösung (Hefeextrakt 5 g/l, Trypton 10 g/l, Natriumchlorid 5 g/l und 15 g/l Agar) in Petrischalen überführt. Nach dem abkühlen und aushärten des Agars werden aus einer Vorkultur von *E.coli-K12*-Bakterien jeweils 100 µl auf eine Agarplatte pipettiert und mit einem Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Auf der Platte werden runde Filterpapierausschnitte mit einem Durchmesser von 5 mm platziert und auf jeden Filterpapierausschnitt 10 µl der Testsubstanzen gegeben. Die Agarplatten werden verschlossen bei 37 °C inkubiert. Der Durchmesser der Hemmhöfe wird an Tag 1 und Tag 2 ausgemessen. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit erfolgte für jede Probe eine Doppelbestimmung.

### 8.3.10 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellgesamtkonzentration pro Milliliter wurde eine Thoma-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,02 mm verwendet. Mit einer 20x Vergrößerung wurden pro zu untersuchende Probe zwei Bilder (1280 x 960 Pixel) derselben Verdünnung aufgenommen und ausgezählt. Die Proben wurden mit 0,9% (w/v) NaCl-Lösung derart verdünnt, dass sich in einem Großquadrat ca. 50 – 100 Zellen befanden.

### 8.3.11 Kultivierung von *E.coli K12*

Zum Animpfen der Vorkultur wurden ca. 150 ml LB-Medium in einem 500 ml-Schüttelkolben mit je 200 µl einer Kryokultur der *E.coli K12* versetzt. Der Kolben wurde anschließend über Nacht in einem Schüttelschrank bei 37 °C und 150 RPM inkubiert.

### 8.3.12 Immobilisierung und Kultivierung von *A.niger*

Eine frisch autoklavierte 3 %ige Na-Alginat-Lösung wird nach dem Abkühlen auf ca. 30 °C mit bei -80 °C gelagerten *Aspergillus niger*-Sporen versetzt, so dass sich eine Endkonzentration von 10<sup>9</sup> Sporen/ml ergibt. Die Lösung wird ausreichen gerührt. Anschließend wird die Lösung in die angefertigte Konstruktion zur Produktion von Alginatkugeln überführt (siehe Versuchsbeschreibung Kapitel 4.7.4). Die Alginatlösung wird in eine 2%ige gerührte CaCl<sub>2</sub>-Lösung getropft. [171, 172] Die erhaltenen Kugeln werden für 30 min in der Lösung zum Aushärten aufbewahrt. Anschließend werden die Kugeln abfiltriert, mehrfach (mind. 3 Mal) mit frischer CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen. Die

---

erhaltenen Alginatkugeln mit dem immobilisierten *A.niger* werden in den Reaktor und/oder einen Schüttelkolben überführt und in FM-Medium bei 30 °C inkubiert.

### 8.3.13 Ninhydrin-Assay

Es wird eine Kalibrationsreihe der zu testenden Aminosäure im geeigneten Konzentrationsbereich erstellt. Jeweils 1 ml der Kalibrationslösungen und der Proben werden in ein Eppendorfgefäß ( $V = 1,5$  ml) überführt und mit 200  $\mu$ l Ninhydrinlösung (8 % w/v Ninhydrin in Aceton) vermischt. Die Eppendorfgefäße werden verschlossen und bei 95 °C für 15 min geschüttelt. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, werden 100  $\mu$ l jeder Probe in ein Well einer 96-Well-Lochplatte überführt und mit einer Ethanollösung (50 %ig v/v Ethanol/Wasser) versetzt. Anschließend werden die Absorptionen bei 570 nm gemessen und anhand der Kalibrationsgerade die Konzentrationen der Proben berechnet.

## 8.4 Materialien

### 8.4.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 8.1: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
Ampicillin, C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	Biochrom, <i>Berlin</i>
<i>Bovine serum albumin</i>	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Ammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Cobaltnitrat, Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Eisenchlorid, FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Eisensulfat, FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Ethanol, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
L-Glutamin, C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Biochrom, <i>Berlin</i>
D-(+)-Glucose, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i> Roth, <i>Karlsruhe</i>
Kaliumdihydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AppliChem, <i>Darmstadt</i>
di-Kaliumhydrogenphosphat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem, <i>Darmstadt</i>
Kaliumhydroxid, KOH	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Kaliumnitrat, KNO <sub>3</sub>	VWR, <i>Darmstadt</i>
Kupfersulfat, CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Magnesiumsulfat, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Natriumalginat	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Natriumchlorid, NaCl	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, <i>Karlsruhe</i>
di-Natriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Riedel de Haen, <i>Seelze</i>
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Natriumhydroxid, NaOH	Merck, <i>Darmstadt</i>
Natriumsulfit, Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
<i>Newborn calf serum</i>	PAA Laboratories, Österreich Institut für Organische Chemie, Hannover
<i>NIPAB</i> , C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Biochrom, <i>Berlin</i>
<i>Penicillin G</i> C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel
<i>Penicillin G-Acylase</i>	Biochrom, <i>Berlin</i>
<i>L-Phenylalanin</i> C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Sojapepton	Biochrom, <i>Berlin</i>
Streptomycin, C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	Biochrom, <i>Berlin</i>
Tetracyclin C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Biochrom, <i>Berlin</i>

## 8.4.2 Rezepte der verwendeten Kulturmedien

### 8.4.2.1 DMEM

Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (Sigma, Steinheim), (DMEM-Pulver;  $\text{NaHCO}_3$  (3,7 g/l); mit HCl auf  $\text{pH} = 7,2$ ). Das Medium wird vor Gebrauch mit 10 % (v/v) NKS und 1 % P/S versetzt

### 8.4.2.2 LB-Medium

Es werden 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton und 1 g Natriumchlorid in 1 l deionisiertem Wasser gelöst und mit HCl ein  $\text{pH}$ -Wert von 7 eingestellt.

### 8.4.2.3 FM-Medium

Es werden 10 g Sojapepton, 5-20 g D-Glucose, 1g Natriumdihydrogenphosphat, 1 g Kaliumdihydrogenphosphat, 5 g Ammoniumsulfat und 2 g Magnesiumsulfat in 1 l deionisiertem Wasser gelöst und ein  $\text{pH}$ -Wert von 6 eingestellt.

## 8.4.3 Verwendete Puffer und Lösungen

### 8.4.3.1 Glucose- und Laktatbestimmung

YSI-Kalibrationslösung

0,539 g Li-Lactat, 1 g D-Glucose und 3,5 mg Gentamycinsulfat, in 250 mL deionisiertem Wasser lösen. 24 h vor Gebrauch ansetzen.

YSI-Puffer

0,147 g  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7 mg Gentamycinsulfat, 0,973 g Natriumbenzoat, 1,84 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7,293 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,289 g NaCl und 27 mg KCl in 1 L deionisiertem Wasser lösen.

### 8.4.3.2 $k_{La}$ -Wert-Messung

NaSO<sub>3</sub>-Lösung

2,09 g KPP und 5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> werden in 1 L deionisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit

50 %iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 8 eingestellt.

### 8.4.4 Verwendete Materialien und Geräte

Tabelle 8.2: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller
Analysenwaage „AC 211 S“	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Analysenwaage „Analytik AC 210S“	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Analysenwaage „AT621 DeltaRange“	Mettler Instrumente AG, <i>Greifensee</i>
Analysenwaage „CP8201“	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Wasseraufbereitungsanlage "Arium® 661 Ultrapure water system"	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Autoklav "Systec V-150"	Systec GmbH, <i>Wettenberg</i>
Einkanal-Pipette „Reference®“ (div. Größen)	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Einkanal-Pipette „Research®“ (div. Größen)	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Einkanal-Pipette „Transferpette® S“ (div. Größen)	Brand GmbH & Co. KG, <i>Wertheim</i>
Glasflaschen SCHOTT Duran® (div. Größen)	Schott AG, <i>Mainz</i>
Glucosemessgerät „YSI 2300“	YSI Incorporated, Brannum Lane, <i>Yellow Springs</i> , Ohio, USA
Inkubationsschüttler „KS 4000 ic control“	IKA® –Werke GmbH & Co. KG, <i>Staufen</i>
Leitfähigkeitsmessgerät Professional pH Meter PP-50 PP-050	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Membranpumpe LABOPORT® N 86 KT. 18 Parafilm® M	KNF Neuberger GmbH, <i>Freiburg</i> American National Can Group, <i>Chicago</i> , USA
Phasenkontrastmikroskop „BX41“	Olympus, <i>Hamburg</i>
pH-Meter	Deutsche Metrohm GmbH, <i>Filderstadt</i>
pH-Meter <i>pH-1-mini</i>	Precision Sensing GmbH, <i>Regensburg</i>
Photometer „Cary 50“	Varian, <i>Darmstadt</i>
Photometerküvetten (1.000 µL, 1 cm Dicke, Kunststoff)	Sarstedt AG & Co., <i>Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>

Reaktionsgefäße, 1 mL/2 mL/15 mL/50 mL	Sarstedt AG & Co., <i>Nümbrecht</i>
Reflective Optical Sensor, CNY70	Vishay, <i>Malvern, USA</i>
Sauerstoffmessgerät <i>OXY 4-mini</i>	Precision Sensing GmbH, <i>Regensburg</i>
Schüttelkolben mit vier/ohne Schikanen, PC, 125 mL/250 mL/500 mL/1.000 mL	Corning Inc. <i>Corning</i>
Schüttelschrank, Certomat® BS-1	B. Braun Biotech International GmbH, <i>Melsungen</i>
Serologische Pipetten, Stripette®, 1 – 50 mL	Corning Inc., <i>Corning</i>
Sterilbank "MSC-Advantage 1.2"	Thermo Fisher Scientific Inc., <i>Waltham, MA, USA</i>
Sterilbank „Herasafe®“	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. <i>KG, Bonn</i>
Sterilfilter 0,2 µm PTFE "Minisart®"	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Sterilfilter 0,2 µm "Minisart®"	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Thermoschüttler	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Universal-Impulsgenerator UPG 100	ELV Elektronik AG, <i>Leer</i>
Ultraschallreiniger „Sonorex Super RK 510 H“	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, <i>Berlin</i>
US-Zerstäuber, <i>AW-Typ I</i>	<b>BOGA Gerätetechnik</b> GmbH, <i>Soest</i>
US-Zerstäuber, <i>AW-Typ II</i>	<b>BOGA Gerätetechnik</b> GmbH, <i>Soest</i>
US-Zerstäuber, <i>LHZ1</i>	Lechler GmbH, <i>Metzingen</i>
US-Zerstäuber, CH12V	Unbekannt
US-Zerstäuber, CH24V	Unbekannt
Zentrifuge „Pico Heraeus“	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. <i>KG, Bonn</i>



---

**WEITERBILDUNG**

Nov. 2009 – Mär. 2010      Lehrveranstaltung      “Verfahrenstechnische      und  
betriebswirtschaftliche      Grundlagen      biotechnologischer  
Prozesse“

21.- 23. Sep.2010      28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen

13.- 14. Apr. 2010      Fortbildungslehrgang “Gentechnische Sicherheit”

**KONFERENZEN**

6. - 8. Okt. 2009      Biotechnica 2009

5. - 9. Okt. 2010      Biotechnica 2010

21.- 23. Sep. 2010      28. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen

**SPRACHEN**

Deutsch: Muttersprache

Englisch: Verhandlungssicher in Wort und Schrift

Französisch: Grundkenntnisse

Portugiesisch: Grundkenntnisse

## 8.6 Publikationsliste

- J. Dreimann, T. Schmidt, L. Just, F. Stahl, T. Scheper (2010); Evaluierung eines Bioreaktor-Systems mit Ultraschallzerstäubung (Posterbeitrag, ProcessNet-Jahrestagung und 28. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Aachen)
- B. Tscheschke, J. Dreimann, J. von der Ruhr, T. Schmidt, L. Just, F. Stahl, T. Scheper (2012); Charakterisierung von Nebelkammerreaktoren mit Ultraschallzerstäubung (Posterbeitrag, ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Aachen)