

Nebelkammerreaktoren zur Kultivierung biotechnologisch relevanter Systeme

Von der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Bernd Michael Tschescke
geboren am 12.04.1986 in Lippstadt

2015

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Universität Hohenheim

Tag der Promotion: 24.08.2015

„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.“

Albert Einstein

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Scheper für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das spannende und herausfordernde Thema.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Bernd Hitzmann für die Übernahme des Korreferats.

PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Unterstützung bei der Kultivierung der Pilze im Nebelkammerreaktor und die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Frank Stahl danke ich für die herzliche Betreuung in seinem Arbeitskreis.

PD Lothar Just, Prof. Timo Schmidt und Jürgen von der Ruhr danke ich für die Kooperation in dem Projekt und einige sehr interessante Projekttreffen.

Thorsten Stempel und Friedbert Gellermann aus der Feinmechanik-Werkstatt danke ich für die vielen hilfreichen Tipps, ihr handwerkliches Geschick und die vielen Reaktorteile, die sie für mich gefertigt haben.

Der Elektronik-Werkstatt unter Leitung von Thorleif Hentrop danke ich für die schnelle und unkomplizierte elektrotechnische Beratung und Unterstützung.

Dr. Lucienne Giesler und Meike Takenberg aus dem Institut für Lebensmittelchemie danke ich für die Unterstützung bei den Pilz-Kultivierungen und deren Auswertung.

Martina Weiß, Martin Pähler und Patrick Lindner danke ich für ihre Unterstützung und ihren Rat bei vielen Experimenten.

Dr. Christian Endres und Christian Ude danke ich für die Geduld und Sorgfalt mit der ihr meine Arbeit Korrektur gelesen habt.

Nicholas Sherck und Vincent Maréchal danke ich für die große Hilfe bei der Entwicklung des Nebeldichtesensors bzw. die Unterstützung bei der Kultivierung der Hefezellen.

Sarah Irmischer danke ich für die große Unterstützung bei vielen Experimenten als HiWi und das große Durchhaltevermögen bei nicht immer einfachen Aufgabenstellungen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie möchte ich mich für ihre Unterstützung und die vielen Aktivitäten außerhalb der Arbeit bedanken. Ein besonderer Dank geht dabei an meine Technikums-Crew und an meine tollen Kollegen und Freunde Matthias, Steffen, Michi, Satish, Janis, Fred, Christian, Mihri, Franzi, Maren und Bin. Mit euch durfte ich viele

schöne Momente und Reisen erleben, sodass mir meine Zeit am Institut immer in guter Erinnerung bleiben wird.

Meinen Freunden aus Lippstadt danke ich für die anhaltende Freundschaft und die Ablenkung aus der ich viel Kraft schöpfen konnte.

Nicht genug Danken kann ich meinen Eltern Gisela und Manfred sowie meinen Geschwistern Vera und Martin für den bedingungslosen Rückhalt und die Unterstützung in allen Lebenslagen während meines gesamten Studiums und der Promotion.

Ein außerordentlicher Dank geht auch an meine Alexandra, die mir zu jeder Zeit zur Seite stand. Deine Liebe, Geduld und Unterstützung haben unbeschreiblich viel zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen und mir persönlich viel Halt und Zuversicht gegeben. Danke!

Kurzfassung

Bioreaktoren können in Submers-, Feststoff- und Aerosolbioreaktoren eingeteilt werden. In Submers-Bioreaktoren sind die Zellen von einer flüssigen, wässrigen Medium-Phase umgeben. Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser ist jedoch gering, sodass eine optimale Sauerstoffversorgung der Zellen nur durch einen intensiven Gaseintrag in das Medium und eine effektive Durchmischung gewährleistet werden kann. Dieses verursacht hohe Scherkräfte, sodass eine optimale Sauerstoffversorgung immer mit einem hohen Scherstress einhergeht. Im Gegensatz zu Submers-Bioreaktoren wachsen die Zellen in Feststoffbioreaktoren auf einem festen Substrat, welches das benötigte Wasser gespeichert hat. Hier kann eine Umgebung mit einer hohen Sauerstoffversorgung und einem geringen Scherstress erreicht werden. Feststoffbioreaktoren sind jedoch aufgrund der begrenzten Wasseraufnahmekapazität des Substrates nur für Fadenpilze und einige Mikroorganismen mit einer hohen Toleranz gegenüber niedrigen Wassergehalten einsetzbar. Aerosolbioreaktoren können eine hohe Sauerstoffversorgung bei geringem Scherstress mit einer variabel einstellbaren Wasserversorgung bereitstellen. Sie werden derzeit jedoch nur zur Kultivierung von Pflanzenzellen eingesetzt. Die besondere Kultivierungsumgebung mit einem hohen Sauerstoffgehalt, geringem Scherstress und einer variablen Wasserversorgung, macht den Aerosolbioreaktor jedoch auch für andere Zellsysteme wie scherstresssensitive Säugetierzellen, Fadenpilze oder einzellige Mikroorganismen interessant.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein innovatives Nebelkammerreaktorsystem mit einer Ultraschallzerstäubung basierend auf dem Aerosolreaktorkonzept entwickelt und zur Kultivierung von Säugetierzellen, Fadenpilze und einzellige Mikroorganismen eingesetzt. Dabei wurden die besonderen Ansprüche dieser Zellsysteme wie zum Beispiel die Temperatur- und Scherstresssensitivität bei der Entwicklung berücksichtigt und das Nebelkammerreaktorsystem technisch, chemisch und biologisch charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Nebelkammerreaktorsystem in der Lage ist eine optimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung ohne eine scherstressinduzierende Begasung oder Durchmischung zu gewährleisten. Obwohl die Ultraschallzerstäubung die Stabilität einiger Mediumbestandteile (Aminosäuren und Proteine) beeinträchtigt, konnten alle Modellorganismen (*S. cerevisiae*, *F. verticillium* und *NIH 3T3*) mit einem Mediumwechsel erfolgreich in dem neuen Nebelkammerreaktor kultiviert werden.

Schlagwörter: Nebelkammerreaktor, Ultraschallzerstäubung, Scherstress, Aerosol.

Abstract

Bioreactors can be classified into submers-, solid state- and aerosol-bioreactors. In submers-bioreactors cells are suspended in liquid medium. But the solubility of oxygen in water is low. Therefore a sufficient oxygen transfer into the medium can only be supplied by a high aeration rate and a vigorous mixing during cultivation. A major drawback of this approach is that a high aeration rate and a vigorous mixing are concomitantly associated with higher shear stress. Hence a good oxygen supply combined with an environment with low shear stress is difficult to accomplish. In solid state bioreactors cells grow on a solid substrate, which contains the water that is needed for the cultivation. This cultivation strategy allows a high oxygen supply without any shear stress inducing aeration. But cell systems that can be cultivated under solid state conditions are restricted to cells which can tolerate a low water content like filamentous fungal cells. In contrast aerosol bioreactors offer an optimal oxygen supply with a low shear stress environment and a variable water content. But currently it is exclusively used for the cultivation of plant cells. However other cell systems like shear stress sensitive mammalian cells, filamentous fungi or unicellular microorganisms could also benefit from this unique cultivation environment.

Therefore an innovative mist-chamber bioreactor system with an ultrasonic vaporization based on the aerosol bioreactor concept was developed for the cultivation of mammalian cells, filamentous fungi and unicellular microorganisms. The mist-chamber bioreactor was designed with respect to the particular demands of these cell systems like temperature or shear stress sensitivity. Subsequently the bioreactor was characterized technically, chemically and biologically. The characterization revealed that the mist-chamber bioreactor was able to transport a sufficient amount of oxygen and nutrients to the cells without any shear stress inducing aeration or mixing. Some media components like amino acids or enzymes were affected in their stability by the ultrasonic vaporization. This effect could be compensated by changing the medium during the cultivation. Consequently all model organism (*S. cerevisiae*, *F. verticillium* and *NIH 3T3*) could be successfully cultivated in the new mist-chamber bioreactor.

Keywords: Mist-chamber bioreactor, ultrasonic vaporization, shear stress, aerosol

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	2
3	Theoretische Grundlagen	3
3.1	Überblick über einige etablierte Bioreaktorsysteme	4
3.1.1	Submers-Bioreaktoren.....	4
3.1.2	Feststoffbioreaktoren.....	9
3.1.3	Aerosolbioreaktoren	11
3.1.4	Limitierungen etablierter Bioreaktorsysteme.....	13
3.2	Entwicklung neuer Bioreaktoren in der Biotechnologie	14
3.2.1	Betriebsparameter von Bioreaktoren.....	14
3.2.2	Überwachung und Regelung der Betriebsparameter.....	16
3.2.3	Beschreibung einiger für den Nebelkammerreaktor relevanter Zellsysteme .	18
3.2.3.1	Einzellige Mikroorganismen.....	18
3.2.3.2	Fadenpilze.....	20
3.2.3.3	Säugetierzellen.....	21
3.3	Beschreibung des Nebelkammerreaktorkonzepts.....	23
3.3.1	Erste Entwicklung eines Nebelkammerreaktorprototyps.....	25
3.3.2	Auswahl einer geeigneten Zerstäubertechnik	26
4	Experimentelle Arbeiten	31
4.1	Aufbau und Entwicklung des Nebelkammerreaktorsystems.....	32
4.1.1	Aufbau des Reaktorkörpers	32
4.1.2	Zerstäubungsprozess und Reaktorzonen	34
4.1.3	Auswahl und Modifikation eines geeigneten Ultraschallzerstäubers	36
4.1.4	Konstruktion von Probenständern zur Zellrückhaltung im Nebel	38
4.1.5	Integration der Spritzschutzvorrichtungen im Nebelkammerreaktor.....	39
4.1.6	Aufbau eines Mess- und Regelungssystems	42
4.1.7	Entwicklung einer Temperaturregelung.....	42
4.1.7.1	Bestimmung und Evaluation der Temperaturregelungsparameter.....	45

4.1.8	Entwicklung eines Nebeldichtesensors	51
4.1.8.1	Bestimmung der optimalen Ansteuerungsstromstärke	52
4.1.8.2	Bestimmung einer optimalen Messstrecke	54
4.1.8.3	Einfluss des Umgebungslichts auf den Nebeldichtesensor	54
4.1.8.4	Einfluss von Tropfen an der Glaswand auf den Nebeldichtesensor	56
4.1.8.5	Kalibration des Nebeldichtesensors mit Formazin	57
4.1.9	Entwicklung eines Begasungssystems	58
4.1.10	Überblick über den Aufbau des Nebelkammerreaktorsystems	60
4.2	Technische Charakterisierung	61
4.2.1	Charakterisierung der Zerstäubung	62
4.2.1.1	Bestimmung der optimalen Zerstäubungsparameter	62
4.2.1.2	Maximale Zerstäuberleistung, Nebelmenge und Nebeldichte	65
4.2.2	Charakterisierung des Nebels	65
4.2.2.1	Nebelausbreitung	66
4.2.2.2	Größenverteilung der sedimentierten Nebeltropfen	68
4.2.2.3	Nebelaufbauzeit	70
4.2.2.4	Nebeldichte in Abhängigkeit der Höhe	71
4.2.2.5	Sedimentationsrate der Nebeltropfen auf einem Standard-Probenständer	72
4.2.3	Evaluation der Nährstoffversorgung anhand der Sedimentationsraten	73
4.2.3.1	Berechnung der Sedimentationsrate in der gesamten Kultivierungszone	73
4.2.3.2	Berechnung der Sedimentationsrate auf einem Standard-Probenständer	74
4.2.3.3	Evaluation der Sedimentationsraten	75
4.2.4	Bestimmung der Mischzeit im Mediumreservoir und im Nebel	77
4.2.5	Evaluation der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Versorgung	79
4.2.5.1	Sauerstoffversorgung	79
4.2.5.2	Kohlenstoffdioxidversorgung	80
4.2.6	Bestimmung der Temperaturverteilung im Nebelkammerreaktor	81
4.2.7	Zusammenfassung technische Charakterisierung	84
4.3	Chemische Charakterisierung	85
4.3.1	Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Kohlenhydrate und Antibiotika	86
4.3.2	Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Aminosäuren	87
4.3.3	Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Proteine und Enzyme	89
4.3.4	Zusammenfassung chemische Charakterisierung	94

4.4	Biologische Charakterisierung	95
4.4.1	Immobilisierung und Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	96
4.4.1.1	Immobilisierung in Alginat.....	96
4.4.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	98
4.4.2	Kultivierung von <i>F. velupites</i>	102
4.4.3	Kultivierung von <i>NIH 3T3</i>	105
4.4.4	Zusammenfassung biologische Charakterisierung.....	107
5	Zusammenfassung.....	109
6	Ausblick.....	114
	Anhang	115
A	Material.....	115
A.1	Chemikalien und Reagenzien.....	115
A.2	Geräte	117
A.3	Verwendete Zelllinien	118
A.4	Verwendete Medien, Puffer und Lösungen.....	118
B	Methoden.....	122
B.1	Aufbau und Entwicklung des Nebelkammerreaktors.....	122
B.1.1	Aufbau des Kühlsystems	122
B.1.2	Einstellung des Kühlflüssigkeitsstroms.....	124
B.1.3	Bestimmung der PID-Temperaturregelungsparameter	124
B.1.4	Entwicklung eines Nebeldichtesensors.....	125
B.1.5	Herstellung eines Formazinstandards.....	125
B.1.6	Kalibration des Nebeldichtesensors.....	126
B.1.7	Bestimmung der Nebeldichte mit dem Nebeldichtesensor	126
B.1.8	Bestimmung des Nebelaustrags mit und ohne Ablenkplatte	127
B.2	Technische Charakterisierung	127
B.2.1	Bestimmung der optimalen Zerstäubungsparameter.....	127
B.2.2	Maximale Zerstäuberleistung, Nebelmenge und Nebeldichte.....	127
B.2.3	Bestimmung der Sedimentationsrate auf einem Standard-Probenständer	128
B.2.4	Evaluation der Nebelausbreitung.....	128
B.2.5	Bestimmung der Größe der sedimentierten Nebeltropfen.....	128
B.2.6	Evaluation der Kohlenstoffdioxidversorgung	129

B.2.7	Bestimmung der Mischzeit.....	129
B.2.8	Bestimmung der Temperaturverteilung.....	130
B.3	Chemische Charakterisierung	130
B.3.1	Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Glukose und Antibiotika.....	131
B.3.2	Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Aminosäuren	132
B.3.3	Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Proteine und Enzyme.....	132
B.3.4	Aktivitätsassay Penicillin G Acylase (PGA)	133
B.3.5	Aktivitätsassay α -Chymotrypsin (CT).....	133
B.3.6	BCA-Assay.....	134
B.3.7	SDS PAGE	134
B.3.8	Aminosäureanalytik.....	136
B.4	Biologische Charakterisierung	137
B.4.1	Immobilisierung in Alginat.....	137
B.4.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	137
B.4.3	Kultivierung von <i>F. velupites</i>	138
B.4.4	Besiedelung der Zellmatrix Matriderm® mit <i>NIH 3T3</i> Zellen.....	139
B.4.5	Kultivierung der <i>NIH 3T3</i> Zellen	139
B.4.6	DAPI-Färbung.....	140
B.4.7	MTT-Vitalitätstest.....	140
C	Abkürzungsverzeichnis	141
D	Abbildungsverzeichnis	143
E	Tabellenverzeichnis.....	145
F	Literaturverzeichnis.....	146

1 Einleitung

Schon seit tausenden von Jahren nutzt der Mensch Wirkstoffe aus der Natur als Heilmittel. Dabei wurden zuerst Pflanzen als reichhaltige Quelle für Wirkstoffe identifiziert und genutzt. Die Verfügbarkeit der Wirkstoffe war jedoch aufgrund der geringen Wirkstoffkonzentrationen in den Pflanzen stets begrenzt. Dieses änderte sich in der Mitte des 19. Jahrhunderts als erste chemisch synthetisierte Pharmazeutika im großen Maßstab hergestellt werden konnten. Als Vorlage für die chemisch synthetisierten Arzneimittel dienten dabei häufig Wirkstoffe, die aus Pflanzen extrahiert wurden. Vor allem komplexe Wirkstoffmoleküle (wie z. B. Proteine), sind jedoch chemisch nur schwer oder gar nicht zu synthetisieren. Mit der Entdeckung von Penicillin wurden Mikroorganismen als zusätzliche Wirkstoffproduzenten entdeckt und genutzt, die in der Lage sind, auch komplexe Wirkstoffmoleküle herzustellen. Heute beschränkt sich dieser Industriezweig der Biotechnologie nicht nur auf die Kultivierung von Mikroorganismen. Mit zunehmendem Verständnis der Zellphysiologie und des Zellmetabolismus können mittlerweile auch komplexere Zellsysteme wie Säugetierzellen für die Produktion von Wirkstoffen oder auch zur Bildung von Gewebe für die Transplantationsmedizin verwendet werden.

Zur Kultivierung dieser verschiedenen Zellsysteme werden Bioreaktoren verwendet. Diese stellen den Kultivierungsraum sowie die optimalen Kultivierungsbedingungen für die Zellen zur Verfügung. Mit zunehmender Komplexität der Zellsysteme wuchsen jedoch auch die Ansprüche an die Bioreaktoren. Dabei wurden zunächst Reaktoren aus der chemischen Industrie für die Kultivierung von verschiedenen Zellsystemen übernommen. Diese Reaktorsysteme sind jedoch nicht für alle Zellsysteme geeignet, sodass in letzter Zeit zunehmend speziell auf die Bedürfnisse des jeweiligen Zellsystems angepasste, neue Bioreaktorsysteme in den Fokus rücken. Vor allem im Bereich der Gewebekultivierung stoßen die etablierten Bioreaktorsysteme aufgrund der hohen Sensitivität des Gewebes gegenüber Scherstress an ihre Grenzen. Dabei ist im Besonderen eine hohe Sauerstoffversorgung ohne eine scherstressinduzierende Begasung mit den bisherigen Bioreaktoren nur schwierig umzusetzen. Eine vielversprechende Möglichkeit diesen Bedarf zu decken, stellt das in dieser Arbeit weiterentwickelte Nebelkammerreaktorsystem dar. Dieses innovative Reaktorsystem ist in der Lage, durch die Kultivierung der Zellen im Nebel eine hohe Sauerstoffversorgung ohne eine scherstressinduzierende Begasung zur Verfügung zu stellen

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Entwicklung und Charakterisierung eines Nebelkammerreaktorsystems zur Kultivierung von einzelligen Mikroorganismen, Fadenpilzen und Säugetierzellen. Bei diesem Reaktorkonzept wird Nährmedium mittels Ultraschall zu einem Nebel zerstäubt. Die Zellen werden durch die Nebeltropfen mit Nährstoffen versorgt und die Sauerstoffversorgung der Zellen findet direkt über die Gasphase des Aerosols statt. Dadurch wird eine sehr gute Sauerstoffversorgung der Zellen ohne eine scherstressinduzierendes Rührwerk oder spezielle Begasung gewährleistet und eine einzigartige Kultivierungsumgebung geschaffen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in vier Teile. In dem ersten Teil wird die Entwicklung des Nebelkammerreaktorsystems beschrieben. Bei der Entwicklung sollen alle für die Kultivierung wichtigen Betriebsparameter (z. B. Temperatur, Zerstäubung, Sauerstoffversorgung) des Nebelkammerreaktors berücksichtigt und gegebenenfalls eine Überwachung und Regelung dieser Parameter ermöglicht werden. In dem zweiten Teil dieser Arbeit soll eine technische Charakterisierung des Nebelkammerreaktors erfolgen. Bei der technischen Charakterisierung des Nebelkammerreaktors soll der Zerstäubungsprozess und der entstehende Nebel untersucht sowie die Mischzeit und eine Temperaturverteilung innerhalb des Reaktors bestimmt werden. Im dritten Teil wird eine chemische Charakterisierung des Zerstäubungsprozesses im Nebelkammerreaktor durchgeführt. Dabei soll der Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf die Mediumkomponenten Glukose, Antibiotika, Aminosäuren und Proteine untersucht werden. Abschließend sollen drei verschiedene Zellsysteme (einzellige Mikroorganismen, Pilze und Säugetierzellen) im Nebelkammerreaktor kultiviert werden. Als Modellorganismen sollen hierzu *S. cerevisiae*, *F. velupites* und *NIH 3T3* eingesetzt werden.

3 Theoretische Grundlagen

Die Entwicklung neuer Bioreaktoren in der Biotechnologie hat das Ziel, einen Großteil der in der Natur vorkommenden Organismen für biotechnologische Prozesse nutzbar zu machen. Bei den ersten biotechnologischen Prozessen wurden dabei hauptsächlich anspruchslose Mikroorganismen genutzt, welche in einfachen Gärbottichen kultiviert werden konnten. Mit zunehmendem Verständnis für die Zellphysiologie und des Zellmetabolismus wurden jedoch auch anspruchsvollere Mikroorganismen, Zellen und Gewebe biotechnologisch relevant, sodass die Kultivierungsmethoden an die höheren Ansprüche der Zellsysteme angepasst werden mussten.

Die etablierten Bioreaktorsysteme sind dabei größtenteils aus historischen Gründen von Reaktorsystemen aus der chemischen Industrie abgeleitet. Diese historisch gewachsenen Reaktorsysteme können jedoch nur bedingt die zum Teil hohen Anforderungen der Zellsysteme erfüllen und stoßen daher zunehmend an ihre Grenzen. Besonders eine gute Sauerstoffversorgung ohne eine scherstressinduzierende Begasung ist derzeit schwierig zu erzielen. Diese Limitierungen der etablierten Bioreaktorsysteme sollen im Folgenden anhand eines Überblicks über einige etablierte Bioreaktorsysteme verdeutlicht werden. Aufgrund der Limitierungen der etablierten Bioreaktorsysteme werden neue Bioreaktorsysteme, wie der in dieser Arbeit entwickelte Nebelkammerreaktor, benötigt. Bei der Entwicklung eines neuen Bioreaktorsystems müssen jedoch zunächst die grundlegenden Betriebsparameter und deren Überwachung und Regelung in ein Reaktorkonzept überführt werden. Aus diesem Grund werden anschließend allgemein die wichtigsten Betriebsparameter für Bioreaktoren vorgestellt. Diese müssen an die Anforderungen des zu kultivierenden Zellsystems angepasst werden. Daher werden außerdem die Zellsysteme, die im Nebelkammerreaktor kultiviert werden sollen, näher beschrieben und deren Anforderungen an den Bioreaktor vorgestellt. Diese Informationen bilden die Basis für die Entwicklung des neuen Nebelkammerreaktorsystems. Abschließend wird ein bereits entwickelter Prototyp eines Nebelkammerreaktors vorgestellt und eine geeignete Zerstäubungstechnik ausgewählt.

3.1 Überblick über einige etablierte Bioreaktorsysteme

In diesem Kapitel soll ein kurzer Überblick über einige etablierte Bioreaktorsysteme gegeben werden. Diese Bioreaktoren können anhand ihrer Wasserverfügbarkeit in Submers-Bioreaktoren, Feststoffbioreaktoren und Aerosolbioreaktoren klassifiziert werden. In Submers-Bioreaktoren sind die Zellen in einer flüssigen Phase suspendiert, sodass die Verfügbarkeit von Wasser hier sehr hoch ist. Bei den Feststoffbioreaktoren dagegen ist das Wasser in einem festen Substrat gespeichert. Daher ist die Wasserverfügbarkeit in Feststoffbioreaktoren gering. Der Aerosolbioreaktor ist zwischen den anderen beiden Reaktorklassen einzuordnen. Hier wird das Wasser zu einem Nebel zerstäubt, sodass hier eine variable Wasserversorgung erzielt werden kann. Für die Beurteilung der hier dargestellten Bioreaktoren werden weiterhin die Kriterien Durchmischung, Sauerstoffversorgung und Scherstress verwendet. Anhand dieser Kriterien können einige Limitierungen der etablierten Bioreaktoren aufgezeigt werden.

3.1.1 Submers-Bioreaktoren

Die Submers-Bioreaktoren (SmB) sind die am häufigsten eingesetzte Bioreaktorklasse. In diesen Bioreaktoren sind die Zellen vollständig von einer flüssigen Phase umgeben. Die Zellen können je nach Zelltyp entweder in der flüssigen Phase suspendiert oder adhärent auf einem Träger vorliegen. Der allgemeine Nachteil der Submers-Bioreaktoren ist die schwierige Vereinbarkeit von einer hohen Sauerstoffversorgung mit einem geringen Scherstress auf die Zellen, welches durch die geringe Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser begründet werden kann [1, 2]. Aufgrund der geringen Löslichkeit und der damit verbundenen geringen Sauerstoffkonzentration im flüssigen Medium muss ständig neuer Sauerstoff in die Flüssigkeit eingebracht und zu den Zellen transportiert werden. Dieses ist nur durch einen hohen Energieeintrag in den Reaktor möglich, welches zu einer Scherstressbelastung auf die Zellen führt [2, 3].

In den letzten Jahrzehnten sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Submers-Bioreaktoren entwickelt worden. Zu den wichtigsten Submers-Bioreaktoren zählen Rührkessel-, Blasensäulen-, Airlift-, Festbett- und Hohlfaserreaktoren. Dabei sind einige Bioreaktoren wie der Rührkessel-Blasensäulen- oder Airliftreaktor auf eine hohe Sauerstoffversorgung ausgelegt. Dieses kann jedoch wie bereits beschrieben nur durch eine hohe Scherbelastung erreicht werden. Weitere

Submers-Bioreaktoren, wie der Festbett- und der Hohlfaserreaktor, dagegen sind auch für scherstressensitive Zellen geeignet. Dafür ist bei diesen Reaktoren die Sauerstoffversorgung der Zellen häufig geringer als in Rührkessel- oder Blasensäulenreaktoren. Dieses soll im Folgenden durch eine kurze Beschreibung der genannten Reaktoren verdeutlicht werden.

Der Rührkesselreaktor (*Stirred Tank Reactor: STR*) ist der am weitesten verbreitete Bioreaktortyp (Abb. 1 A) [4]. Die Nährstoffe und Zellen sind in dem Rührkesselreaktor in dem flüssigen Medium im Reaktorkessel gelöst bzw. suspendiert. Die Durchmischung erfolgt in dem Rührkesselreaktor mechanisch durch ein Rührwerk, das in der Mitte des Reaktors eingebracht ist. Diese Durchmischungsmethode ist sehr effektiv, sodass eine homogene Verteilung der Zellen und Nährstoffe in dem Rührkesselreaktor erzielt werden kann. Die Begasung im Rührkesselreaktor findet über einen Gasverteiler (Sparger) statt. Bei der Begasung werden möglichst kleine Gasblasen bevorzugt, da hier die Gesamtoberfläche der Gasblasen größer ist und daher ein guter Sauerstofftransfer in das Medium gewährleistet wird. Um diese kleinen Gasblasen zu erreichen, ist der Gasverteiler unterhalb des Rührwerks positioniert [3, 5]. Dadurch ist es möglich, dass die aufsteigenden Gasblasen durch den Rührer zu sehr kleinen Bläschen dispergiert werden. Überschüssiges Gas sammelt sich im flüssigkeitsfreiem Kopfraum und wird aus dem Reaktor geleitet [3, 5]. Der Rührkesselreaktor wird für suspendierte und adhärenente Zellen verschiedener Zelltypen eingesetzt. Bei adhärenente Zellen werden kleine *Microcarrier* zur Immobilisierung der Zellen eingesetzt [6].

Die wesentlichen Vorteile des Rührkesselreaktors gegenüber anderen submers-Reaktorsystemen liegen in seiner sehr guten Durchmischung und sehr guten Sauerstoffversorgung. Als wesentlicher Nachteil kann der durch das Rührwerk hervorgerufene hohe Energieeintrag pro Volumeneinheit genannt werden. Dieser führt zu einer hohen Scherbelastung, sodass sehr scherstressensitive Organismen für diesen Reaktor eher ungeeignet sind [7, 8].

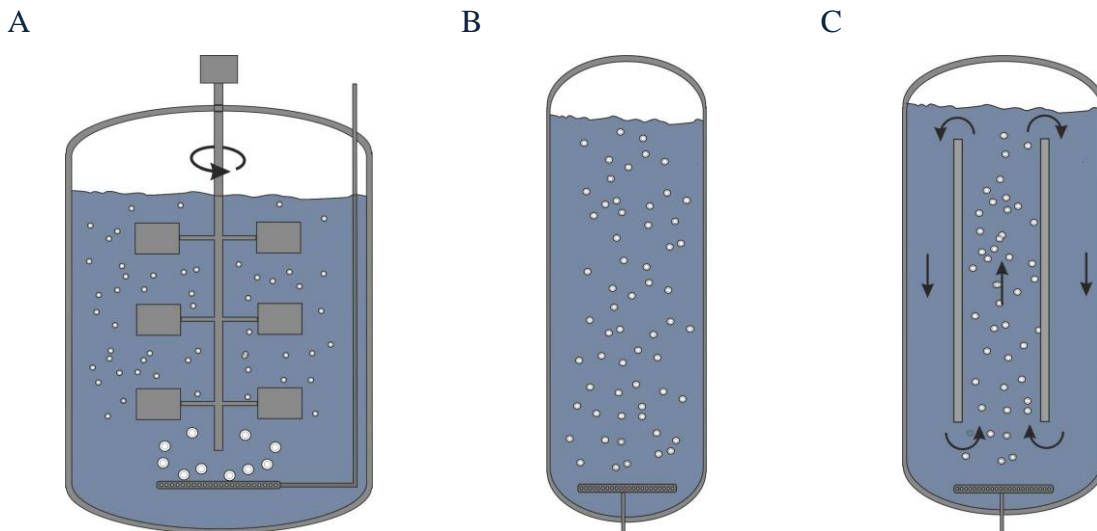


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Rührkessel- (A), Blasensäulen- (B) und eines Airliftreaktors (C).

Im Gegensatz zu dem Rührkesselreaktor mit mechanischer Durchmischung, findet bei den Blasensäulenreaktoren die Durchmischung pneumatisch statt (Abb. 1 B). Der Blasensäulenreaktor besteht aus einem Reaktorkessel, in dem ein Gas-Sparger eingebracht ist. Wird ein Begasungsstrom angelegt, entsteht eine Blasensäule, wobei die aufsteigenden Gasblasen dabei sowohl die Sauerstoffsättigung des Mediums als auch die Durchmischung des Reaktors gewährleisten. Die Durchmischung ist auf diese Weise an die Begasung gekoppelt [6].

Der wesentliche Vorteil des Blasensäulenreaktors gegenüber dem Rührkesselreaktor liegt in der einfachen Konstruktionsweise. Diese macht den Reaktor preiswert, wenig stör anfällig und wartungsarm. Ein Nachteil des Blasensäulenreaktors ist die im Vergleich zum Rührkesselreaktor weniger effektive Durchmischung. Eine ineffektive Durchmischung kann zum Beispiel zu einem ungünstigen Wärmeübertrag und Nährstoffversorgung oder zu einer Teilsedimentation bei schwierig zu suspendierenden Systemen führen [3].

Eine Modifikation des Blasensäulenreaktors ist der Airliftreaktor (Abb. 1 C). Hier ist in dem Reaktorinnenraum ein zweiter Zylinder eingebracht, der zu einem konvektiven Fluss im Reaktor führt. Dadurch kann eine bessere Durchmischung des Mediums als beim Blasensäulenreaktor erreicht werden. Daher wird der Airliftreaktor häufig verwendet, wenn die Suspensionsleistung oder die Wärmeübertragungsleistung im Blasensäulenreaktor für einen effektiven Betrieb des Reaktors nicht ausreichend sind. Die Scherstressinduktion ist trotz des Fehlens eines Rührwerks bei beiden Reaktoren aufgrund der hohen Begasungsrate vergleichbar mit dem Rührkesselreaktor [3, 9].

Festbettreaktoren und Hohlfaserreaktoren sind im Gegensatz zu den Rührkessel-, Blasensäulen oder Airliftreaktoren auch für scherstresssensitivere Zellen geeignet. Festbettreaktoren bestehen aus einem mit Trägermaterial gepacktem Gefäß, sodass ein nicht bewegliches Trägerbett (Festbett) entsteht (Abb. 2). Auf diesen Trägermaterialien können adhärent wachsende Zellen immobilisiert werden. Die Trägermaterialien gewähren dabei eine große Oberfläche zur Zellanhaftung und können durch ihre Porosität die Zellen bis zu einem gewissen Maß vor lokalen Scherkräften schützen [10]. Das Festbett wird axial oder radial mit einer Nährlösung durchströmt, sodass die immobilisierten Zellen auf dem Trägermaterial mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden können. Nachdem das Medium die Zellen passiert hat, fließt es in einen Konditionierer (Abb. 2 A). In dem Konditionierer findet eine Begasung des Nährmediums statt. Zusätzlich können Nährstoffe hinzugefügt und das Produkt angereicherte Medium abgeführt werden. Außerdem ist hier häufig die Überwachung wichtiger Prozessparameter (z. B. pH-Wert, Sauerstoff-, Nährstoffkonzentration) integriert. Nachdem das Medium den Konditionierer passiert hat, wird es wieder zurück in das Festbett geleitet [11].

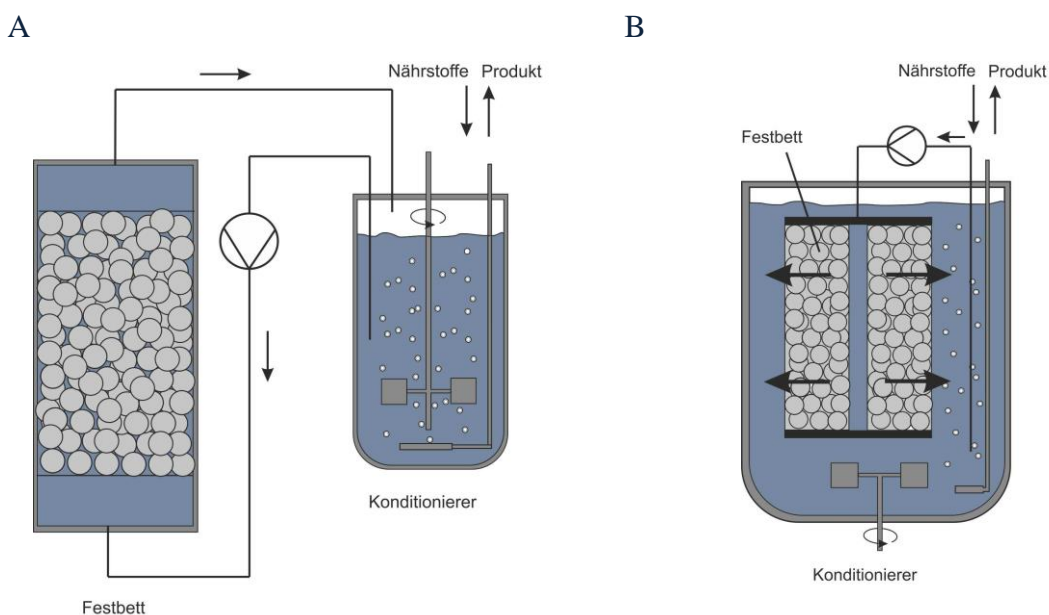


Abb. 2: Schematischer Aufbau von zwei Festbettreaktoren. Dargestellt sind ein axial durchströmter Festbettreaktor mit separatem Konditionierer (A) und ein radial durchströmter Festbettreaktor, der in dem Konditionierer integriert ist (B). Die Abbildung ist modifiziert nach Catapano 2009 [6].

Neben diesem konventionellen Aufbau existieren auch noch weitere Varianten. So kann zum Beispiel das Festbett auch in dem Konditionierer integriert sein oder das Festbett radial anstatt axial durchströmt werden (Abb. 2 B).

Der Vorteil des Festbettreaktors ist vor allem die Möglichkeit adhärenz Zellen in hohen Zelldichten von bis zu 5×10^8 Zellen/mL [12] mit wenig Scherstress zu kultivieren. Damit können 10 bis 100 Mal höhere Zelldichten erreicht werden, als bei typischen Suspensionskulturen. Daneben sind durch die Immobilisierung der Zellen auch lange Kultivierungszeiten, ein Mediumwechsel und die Produktabtrennung vergleichsweise einfach umzusetzen [6, 13].

Das Hauptproblem des Festbettreaktors ist, dass keine homogene Sauerstoff und Nährstoffverteilung im Reaktor erreicht werden kann [11]. Die Zellen, die zuerst mit Medium umspült werden, verbrauchen Nährstoffe und Sauerstoff, sodass die folgenden Zellschichten weniger Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung haben. Besonders die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gestaltet sich dabei schwierig. Außerdem kann es zu einer inhomogenen Durchströmung des Reaktors (Kanalbildung) und Verblockung der Hohlräume durch Schwebstoffe oder Biomasse kommen. Dieses kann zu einer ungleichmäßigen Durchströmung des Festbettes führen und die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff behindern [13].

Der Festbettreaktor wird häufig für die Kultivierung von gewebeähnlichen, adhärenz Zellsystemen wie zum Beispiel bei der Entwicklung einer künstlichen Leber (Bioartificial Liver: BAL) eingesetzt [11, 13, 14].

Hohlfaserreaktoren bestehen aus mehreren mit Medium durchströmten Membranen, den sogenannten Kapillaren oder Hohlfasern (Abb. 3). Die Hohlfaser trennt dabei das nährstoff- und sauerstoffreiche Medium innerhalb der Hohlfaser von den Zellen, die sie außerhalb der Hohlfaser im Extrakapillarraum befinden. Die Versorgung der Zellen findet dabei je nach Porengröße der verwendeten Hohlfasern diffusiv oder konvektiv statt [6].

Der Hohlfaserreaktor bildet demnach das natürliche Umfeld von Säugetierzellen, in welchem die Nährstoffe durch das Blut in einem Gefäßsystem transportiert werden, am besten nach. Der sich daraus ergebende sehr geringe Scherstress und die Möglichkeiten gewebeähnliche Zelldichten von 10^8 Zellen/mL zu erreichen sind die wesentlichen Vorteile des Hohlfaserreaktors. So wurden Hohlfaserreaktoren zum Beispiel schon zur Kultivierung von Knochengewebe oder zur Antikörperproduktion eingesetzt [3, 6]. Nachteile von Hohlfaserreaktoren sind der nur sehr begrenzte Sauerstoffeintrag und die Gefahr einer Membranverblockung bei längerer Betriebszeit [6]. Außerdem treten hier wie im Festbettreaktor axiale Gradienten auf. Dieses erschwert insbesondere bei größeren Reaktoren die Nährstoffversorgung, sodass ein Scale-up nur bedingt möglich ist.

Der einfachste Feststoffbioreaktor ist der Wannenreaktor (*Tray Reactor*). Dieser Reaktortyp besteht aus einer oder mehrerer Wannen, die gleichmäßig mit festem Substrat befüllt sind (Abb. 4). Die Wannen sind typischerweise oben geöffnet und haben einen perforierten Boden, um eine große Oberfläche für die Gasversorgung zu gewährleisten. Das Substrat kann aus verschiedenen festen Materialien wie Zuckerbagasse oder Kokosnusssfasern bestehen, die eine gewisse Wasseraufnahmekapazität besitzen. Die Fadenpilze wachsen dabei auf dem Substrat und versorgen sich auf diesem Weg mit Wasser und Nährstoffen. Bei diesem Reaktortyp findet die Begasung im Substratbett ausschließlich diffusiv statt, sodass die Höhe des Substratbettes begrenzt ist. Typische Höhen des Substratbettes bei Wannenreaktoren liegen zwischen 5 und 15 cm. Die Wannen sind in einem Fermentationsraum untergebracht, in dem einige Prozessparameter wie Begasung, relative Luftfeuchtigkeit und Temperatur geregelt werden können [15, 16, 20, 21].

Der Wannenreaktor ist sehr einfach aufgebaut und dadurch kostengünstig. Die zentralen Nachteile des Wannenreaktors liegen in seiner relativ schlechten Begasung und schlechten Wärmeabfuhr des Zellsystems. Außerdem liegt hier ein offenes System vor, welches das Risiko einer Kontamination erhöht [15, 16]. Verwendung findet der Wannenreaktor zum Beispiel in vielen asiatischen Ländern im Bereich der Lebensmittelindustrie (z. B. Tempeh, Ontjom, Shao-hsing-Wein) [16, 20].

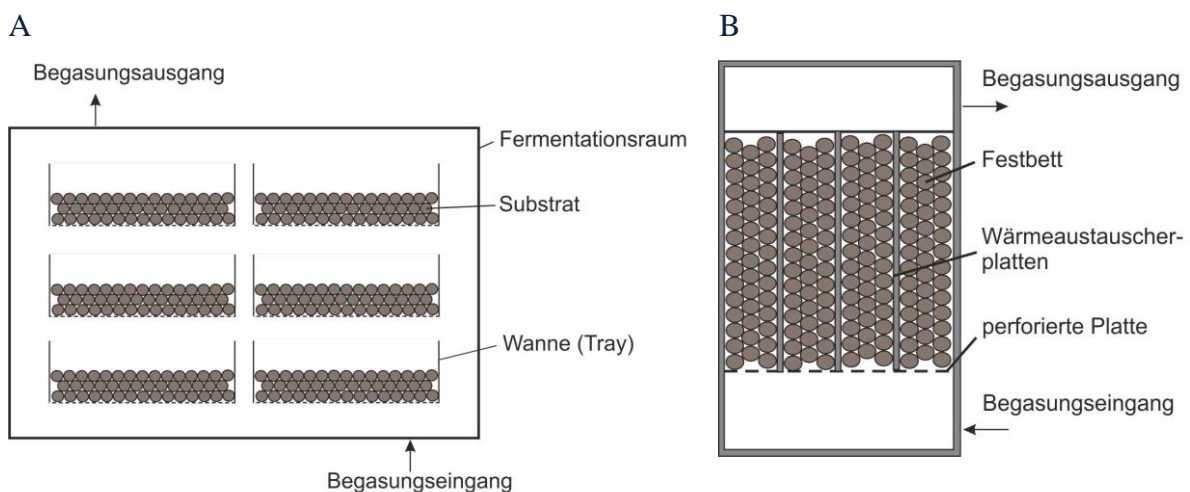


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Wannenreaktors (A) und eines Festbettreaktors als Feststoffbioreaktor (B). In beiden Reaktoren liegen die Zellen immobilisiert auf dem Substrat vor und beziehen die benötigten Nährstoffe und das Wasser aus dem Substrat.

Der Festbettreaktor als Feststoffbioreaktor ist ähnlich aufgebaut wie der submerse Festbettreaktor. Auch hier gibt es ein festes, unbewegliches Trägerbett auf dem die Zellen immobilisiert

vorliegen (Abb. 4 B). Bei diesem Reaktortyp wird das Trägerbett jedoch nicht mit Medium durchströmt, sondern nur mit befeuchteter Luft. Im Vergleich zu dem Wannenreaktor findet daher die Begasung nicht nur diffusiv sondern konvektiv statt. Dadurch können auch Substratbetten mit größerer Höhe mit Sauerstoff versorgt werden, sodass der Reaktor insgesamt größer dimensioniert werden kann als der Wannenreaktor. Um einen besseren Wärmetransport zu gewährleisten werden zusätzlich häufig noch Wärmetauscherplatten in das Festbett eingebracht, die für eine definierte und kontrollierbare Temperatur im Reaktor sorgen [16, 17, 20].

Als Vorteil des Festbettreaktors (SSB) gegenüber Wannenreaktoren kann sein vermindertes Kontaminationsrisiko genannt werden, da der Reaktor ein geschlossenes System bildet. Außerdem ist die Sauerstoffversorgung im Gegensatz zum Wannenreaktor durch den konvektiven Stofftransport verbessert [16].

3.1.3 Aerosolbioreaktoren

Aerosolbioreaktoren sind Gas-Phasen Reaktoren, bei denen das flüssige Medium in kleine Flüssigkeitstropfen zu einem Aerosol zerstäubt wird [22]. Die Versorgung mit Wasser und Nährstoffen ist daher abhängig von der Menge an zerstäubten Medium und variabel einstellbar. Die Zellen sind dabei an einer Matrix in dem Aerosol immobilisiert und werden durch die Flüssigkeitstropfen mit Wasser und Nährstoffen versorgt. Überschüssiges Medium läuft an der Matrix und den Zellen herunter und kann einem erneuten Zerstäubungszyklus zugeführt werden (Abb. 5).

Bei den Aerosolbioreaktoren wird zwischen Spray- und Nebelreaktoren unterschieden. Die Unterscheidung zwischen Spray- und Nebelreaktoren basiert auf den unterschiedlichen Tröpfchengrößen. Als Spray wird typischerweise ein Gas-Flüssigkeitsgemisch mit Flüssigkeitstropfendurchmessern $> 10 \mu\text{m}$ bezeichnet [22, 23]. Ein Nebel dagegen besitzt Tropfendurchmesser zwischen $0,01$ und $10 \mu\text{m}$ [22]. Für die Spraybioreaktoren kommen meistens Düsenzerstäuber zum Einsatz und für die Nebelbioreaktoren werden häufig Ultraschallzerstäuber verwendet (3.3.2). In der Literatur sind verschiedene Aufbauten von Spray- und Nebelreaktoren beschrieben, von denen zwei typische Beispiele in Abb. 5 dargestellt sind [22, 24].

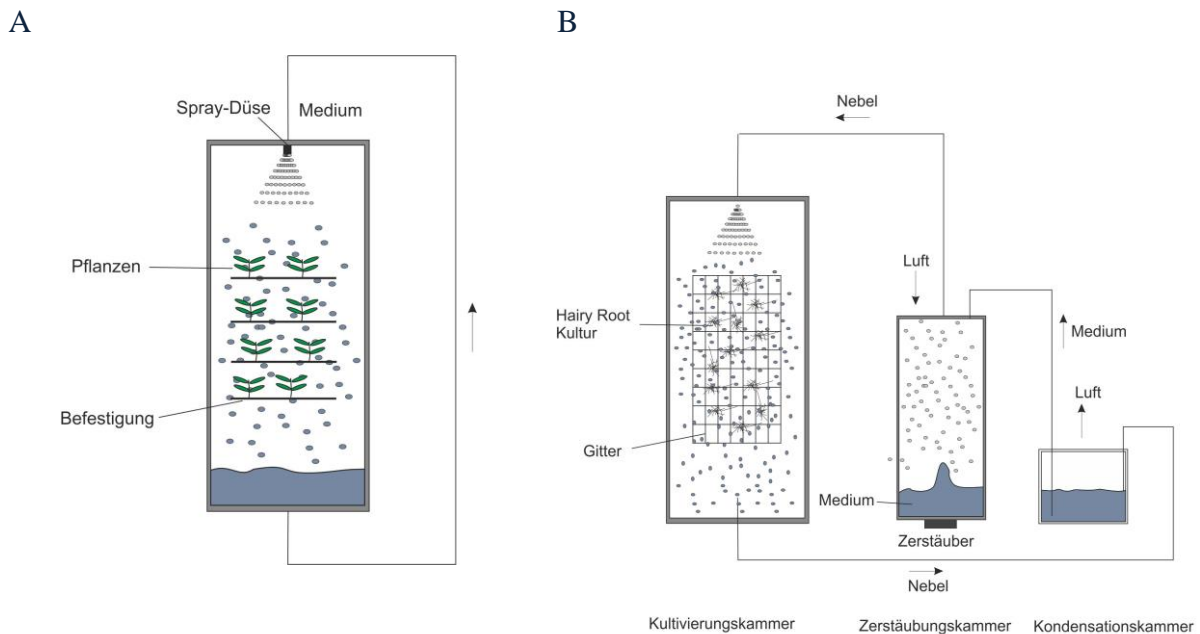


Abb. 5: Schematische Darstellungen von Sprayreaktoren (A) und Nebelreaktoren (B). Sprayreaktoren haben größere Aerosoltröpfchen, sodass dieser Reaktortyp häufig für die Kultivierung von ganzen Pflanzen eingesetzt wird. Nebelreaktoren dagegen werden aufgrund ihrer geringen Tröpfchengrößen eher für *Hairy Root* Kulturen verwendet. Hier kann der Nebel entweder extern in einer Zerstäubungskammer erzeugt und dann in die Kultivierungskammer transportiert werden (B) oder direkt in der Kultivierungskammer generiert werden (C). Die Abbildung ist modifiziert nach Weathers 2008 [22].

Bei dem Sprayreaktor (Abb. 5 A) ist ein Düsenzerstäuber oberhalb der Kultivierungskammer angebracht. Dieser zerstäubt das Medium und versorgt die in dem Reaktor befindlichen Pflanzenzellen. Der Sprayreaktor wird häufig zur Züchtung ganzer Pflanzen wie zum Beispiel Sprösslingen eingesetzt [22, 25].

Der Aufbau eines Nebelreaktors ist in Abb. 5 B dargestellt. Hier findet die Zerstäubung außerhalb der Kultivierungskammer in einer Zerstäubungskammer statt. Der Nebel wird dabei mittels Luftdruck von der Zerstäubungskammer in die Kultivierungskammer gepumpt. Die Rückgewinnung des Mediums aus dem Aerosol findet in einer Kondensationskammer statt. [22, 24, 26, 27].

Nebelreaktoren werden fast ausschließlich zur Kultivierung von Pflanzenzellkulturen (z. B. *Hairy Root* Kulturen oder Mikropropagation) eingesetzt [22]. Daneben findet sich auch eine Anwendung bei der Kultivierung von Amöbozyten aus der Pfeilschwanzkrabbe [28].

Als Vorteil der Aerosolbioreaktoren kann vor allem die hohe Sauerstoffversorgung ohne eine scherstressinduzierende Begasung genannt werden. So konnten selbst bei hohen Zelldichten keine Sauerstofflimitierungen festgestellt werden [29, 30].

3.1.4 Limitierungen etablierter Bioreaktorsysteme

Trotz der großen Anzahl der etablierten Bioreaktorsysteme, treten immer noch Limitierungen bezüglich der optimalen Kultivierungsparameter auf. Dieses spiegelt sich bei den Submers-Bioreaktorsystemen in der schwierigen Vereinbarkeit von einem guten Sauerstoffeintrag und einem geringen Scherstress wieder (Tabelle 1). Reaktortypen mit einem guten bis sehr guten Sauerstoffeintrag wie der Rührkesselreaktor, der Blasensäulenreaktor und der Airliftreaktor sind aufgrund ihrer scherstressinduzierenden Begasung für scherstressensitive Zelltypen nicht geeignet. Andere submers-betriebene Reaktortypen wie der Festbettreaktor oder der Hohlfaserreaktor dagegen können eine relativ scherstressarme Umgebung bereitstellen. Hier ist jedoch der geringe Sauerstoffeintrag und zum Teil die unzureichende Durchmischung ein häufig auftretendes Problem.

Tabelle 1: Überblick über die in dieser Arbeit besprochenen Bioreaktoren und die verwendeten Zellsysteme.

	Durchmischung	Sauerstoffeintrag	Scherstress	Komplexität (Aufbau, Kosten, Wartung)	Wasserverfügbarkeit	Primäre Zellsysteme
Submerse Bioreaktoren						
Rührkesselreaktor	gut	gut	hoch	mittel	hoch	alle
Blasensäulenreaktor	mittel	gut	hoch	gering	hoch	alle
Airliftreaktor	gut	gut	hoch	mittel	hoch	alle
Festbettreaktor	schlecht	schlecht	gering	gering	hoch	adhärent
Hohlfaserreaktor	mittel	schlecht	gering	hoch	hoch	adhärent
Feststoff-bioreaktoren						
Wannenreaktor	schlecht	mittel	gering	gering	gering	Fadenpilze
Festbettreaktor	schlecht	gut	gering	mittel	gering	Fadenpilze
Aerosol Bioreaktoren	mittel	gut	gering	mittel	variabel	Pflanzen

Bei der Reaktorklasse der Feststoffbioreaktoren dagegen kann eine sauerstoffreiche sowie scherstressarme Umgebung gewährleistet werden. Jedoch ist bei dieser Reaktorklasse die Wasserverfügbarkeit gering, sodass lediglich Zellsysteme mit einer hohen Toleranz gegenüber geringen Wassergehalten (z. B. Fadenpilze) eingesetzt werden können. Auch die Durchmischung ist bei diesen Reaktoren häufig unzureichend.

Die dritte Bioreaktorklasse der Aerosolbioreaktoren gewährleistet eine sehr gute Sauerstoffversorgung ohne scherstressinduzierende Begasung kombiniert mit einem variabel einstellbaren Wassergehalt. Dieses Aerosol-basierte Reaktorsystem wurde bislang nur für die Kultivierung von Pflanzenzellen entwickelt. Aufgrund dieser Vorteile ist dieses Reaktorsystems jedoch auch für die Kultivierung weiterer Zellsysteme interessant.

3.2 Entwicklung neuer Bioreaktoren in der Biotechnologie

Bei der Entwicklung eines neuen Bioreaktorsystems müssen zunächst die grundlegenden Betriebsparameter und deren Überwachung und Regelung in ein Reaktorkonzept überführt werden. Aus diesem Grund werden im Folgenden zunächst allgemein die wichtigsten Betriebsparameter für Bioreaktoren vorgestellt. Diese müssen jedoch an die Anforderungen des zu kultivierenden Zellsystems angepasst werden. Daher werden anschließend diese Zellsysteme näher beschrieben und deren Anforderungen an den Bioreaktor vorgestellt. Diese Informationen bilden die Basis für die Entwicklung des neuen Nebelkammerreaktorsystems.

3.2.1 Betriebsparameter von Bioreaktoren

Unter dem Begriff Betriebsparameter werden im Folgenden alle Größen verstanden, die den Bioreaktor kennzeichnen und die Wirkung des Bioreaktors auf das zu kultivierende Zellsystem festlegen, um ein reproduzierbares Arbeiten zu gewährleisten. Die Betriebsparameter eines Bioreaktors sind dabei sehr stark abhängig von dem verwendeten Zellsystem. Es sind jedoch einige grundlegende Parameter vorhanden, die bei allen biologischen Systemen einen Einfluss auf die Kultivierung und Produktivität haben können:

- Nährstoffversorgung
- Temperatur
- pH-Wert
- Sauerstoffversorgung (aerob)
- Durchmischung

Die Nährstoffe können gelöst oder in fester Form vorliegen und werden während der Kultivierung von den Zellen verbraucht. Liegen die Nährstoffe in gelöster Form vor, können sie während der Kultivierung diskontinuierlich (*Fed-Batch* Betrieb) oder kontinuierlich (kontinuierlicher Betrieb) zugefüttert werden. Werden keine Nährstoffe hinzugefügt, spricht man von einem *Batch*-Betrieb des Reaktors [3, 5].

Die richtige Temperatur ist für ein effektives Wachstum der Zellen wichtig. Nur bei einer optimalen Temperatur kann der Stoffwechsel der Zellen effizient ablaufen und die Kultivierung im Reaktor mit hohen Ausbeuten stattfinden. Dabei muss bei kleinen Reaktoren häufig die Temperatur durch eine Heizvorrichtung erhöht werden. Bei größeren Reaktoren mit entsprechend großer Biomasse kann durch den Zellmetabolismus so viel Wärme entstehen, dass der Reaktor durch eine Kühlvorrichtung abgekühlt werden muss [5]. Insgesamt sollte im Bioreaktor eine Temperaturüberwachung und Regelung stattfinden, um eine optimale Temperatur im Reaktor zu erreichen. Außerdem sollte überall im Reaktor die gleiche Temperatur vorliegen (homogene Temperaturverteilung) damit im gesamten Reaktor optimale Bedingungen für das Zellsystem gewährleistet werden.

Der pH-Wert ist ein chemischer Parameter, der den Zellmetabolismus in vielfältiger Weise beeinflusst. So spielt der pH-Wert zum Beispiel eine Rolle bei der Bildung des Membranpotenzials und beeinflusst die Proteinfaltung [31, 32]. Aus diesem Grund ist ein optimaler pH-Wert für die Zellen unerlässlich. Dabei produzieren viele Zellen Säuren oder Basen als Nebenprodukt, sodass der pH-Wert durch Puffersysteme bzw. Zugabe von Säuren oder Basen reguliert werden muss. [33, 34].

Die Sauerstoffversorgung der Zellen ist bei aeroben Prozessen für den Energiestoffwechsel der Zellen wichtig. Dabei kann die Sauerstoffversorgung entweder durch im Medium gelösten Sauerstoff (Submers-Bioreaktoren) oder direkt über die Gasphase erfolgen (Feststoffbioreaktoren). Aufgrund der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser, ist die ausreichende Versorgung

mit Sauerstoff bei Submers-Bioreaktoren jedoch ein häufiges Problem. Aus diesem Grund muss durch eine ständige Begasung Sauerstoff ins Medium transportiert werden [3, 5, 35].

Ein weiterer charakteristischer Betriebsparameter ist die Durchmischung. Die Durchmischung gibt Auskunft über räumliche Konzentrations-, Druck-, und Temperaturunterschiede im Reaktor. Die Durchmischung ist also ein Maß wie homogen die einzelnen chemischen, physikalischen und biologischen Bestandteile im Reaktor verteilt werden. Für die Durchmischung werden häufig Rührwerke oder andere Mischvorrichtungen, die einen konvektiven Stofffluss ermöglichen, in den Bioreaktor eingebaut. Eine homogene Durchmischung des Reaktors führt dazu, dass überall im Reaktor eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen vorliegt. Außerdem verhindert eine effektive Durchmischung die Bildung von Temperatur- oder pH-Gradienten und sorgt dafür, dass toxische Metabolite aus der direkten Zellumgebung transportiert bzw. verdünnt werden. Je nach Reaktor und Begasungssystem sorgt eine effektive Durchmischung auch für eine gute Versorgung mit Sauerstoff. Um die Durchmischung eines Bioreaktors zu bestimmen wird häufig die Mischzeit als charakteristischer Parameter verwendet [3, 5].

Eine effektive Durchmischung sowie eine hohe Gasversorgung können jedoch nur durch einen gewissen Energieeintrag in das Reaktorsystem gewährleistet werden. Dadurch kann es zu einer Scherbelastung auf die Zellen kommen, welches gerade bei scherstresssensitiven Zellen zu Problemen führt. Eine gute Durchmischung und Sauerstoffversorgung bei geringem Scherstress ist daher nur schwierig umzusetzen [3-5, 36].

Zusätzlich zu den genannten Betriebsparametern können je nach Zellsystem und Bioprozess auch noch weitere wichtige Betriebsparameter wie Wasserverfügbarkeit, Druck, Schaumbildung, Licht und Viskosität hinzukommen auf die hier nicht im Einzelnen eingegangen werden soll [3, 5].

3.2.2 Überwachung und Regelung der Betriebsparameter

Viele Betriebsparameter verändern sich während der Kultivierung von Zellen, sodass eine Überwachung und Regelung der verschiedenen Betriebsparameter häufig unerlässlich ist. Sowohl die Überwachung als auch die Regelung der Betriebsparameter helfen dabei die Bedingungen über die Prozessdauer möglichst optimal zu halten und dadurch ein qualitativ hochwertiges Produkt mit einer guten Ausbeute zu produzieren. Dabei werden on-line-Analysesysteme,

also vollautomatische Systeme, gegenüber off-line Systemen, bei denen eine manuelle Interaktion erforderlich ist, bevorzugt. Der Grund für die Präferenz der on-line Methoden liegt in dem geringeren Aufwand und den kürzeren Analysezeiten und der daraus folgenden schnelleren Regelung. Je nachdem, wo der Sensor eingebracht ist, wird außerdem noch zwischen in-situ und ex-situ Sensoren unterschieden. In-situ Sensoren sind im Reaktorinnenraum installiert und ex-situ Sensoren sind außerhalb des Reaktors angebracht [33, 34, 37]. Einige häufig überwachte Betriebsparameter und deren mögliche Regelungen sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Integration häufig verwendeter Sensoren in einen Rührkesselreaktor ist in Abb. 6 gezeigt.

Tabelle 2: Überblick über einige häufig überwachte Betriebsparameter und deren Mess- und Regelungsmöglichkeiten [33, 34, 37].

Prozessvariable	Messverfahren	Sensor/Methode	Analyse	Mögliche Regelung
Biomasse	Gravimetrisch	Bestimmung der Biotrockenmasse	Off-line	Kann nicht direkt geregelt werden
	Optisch	Zählkammer In-situ Mikroskopie Trübungssensoren	Off-line / On-line	
Nährstoffkonzentrationen	Biochemisch	Verschiedene biochemische Assays	Off-line	Zufütterung von Nährstoffen
	Spektroskopisch	NIR/MIR-Sonden	On-line	
Gelöster Sauerstoff	Amperometrisch	Clark-Elektrode		Erhöhung der Begasungsrate oder der Rührerdrehzahl
	Optisch	Luminiszenzsonde	On-line	
Temperatur	Resistiv	Pt100	On-line	Regelung über Heiz-/Kühlmantel
pH-Wert	Potentiometrisch	Einstabmesskette,	On-line	Zugabe von Säuren oder Basen
	Optisch	Fluoreszenzsonde		

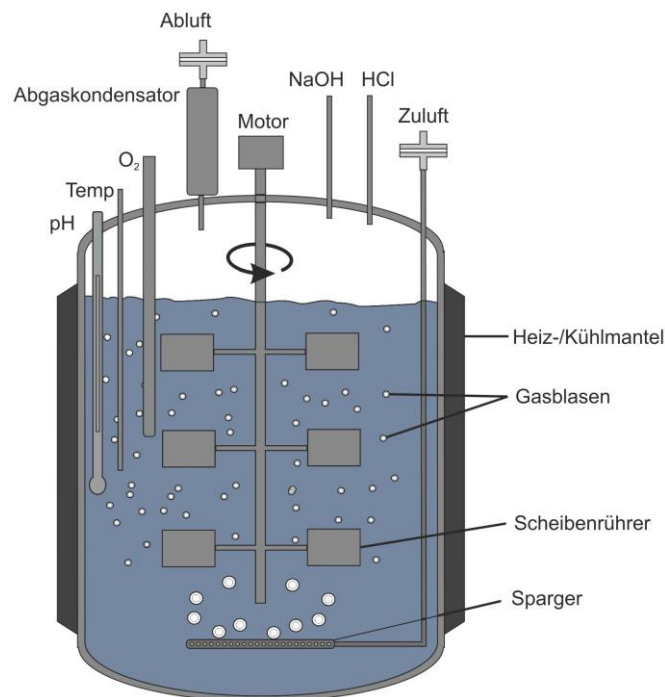


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Rührkesselreaktors mit eingebauter Sensorik für typische Prozessparameter.

3.2.3 Beschreibung einiger für den Nebelkammerreaktor relevanter Zellsysteme

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über drei für den Nebelkammerreaktor besonders relevanten Zellsysteme (Einzellige Mikroorganismen, Fadenpilze und Säugetierzellen) und deren Anforderungen an den Bioreaktor gegeben werden. Anhand dieses Überblickes sollen mögliche Anwendungsfelder des Nebelkammerreaktors identifiziert und die Anforderungen der Zellsysteme gegenüber dem Nebelkammerreaktor aufgezeigt werden.

3.2.3.1 Einzellige Mikroorganismen

Einzellige Mikroorganismen sind eine sehr große und heterogene Gruppe von Zellen. Das biotechnologische Potenzial der Mikroorganismen wird heute noch nicht vollständig ausgeschöpft. So geht man davon aus, dass viele Arten noch unentdeckt und weniger als 1 % aller Mikroorganismen mit den derzeitigen Methoden kultivierbar sind [38]. Mikroorganismen werden in der Biotechnologie häufig zur rekombinanten Expression von Enzymen eingesetzt. Daneben finden sie aber auch viele weitere Anwendungen, wie zum Beispiel bei der Produktion von Feinchemikalien, Antibiotika, Vitaminen und Aminosäuren [38].

Die derzeit biotechnologisch am häufigsten eingesetzten Mikroorganismen sind das Bakterium *E. coli* und die Hefe *S. cerevisiae*. So wurden im Jahr 2011 46 % aller in den USA zugelassenen biotechnologisch hergestellten Pharmazeutika in diesen beiden Organismen hergestellt [39, 40].

E. coli ist aufgrund schneller Wachstumsraten und hoher Ausbeuten das einfachste und schnellste Expressionssystem. Daher ist es auch die erste Wahl bei vielen biotechnologischen Prozessen. Es gibt jedoch auch einige Nachteile. So können in *E. coli* nur kleine Proteine exprimiert werden und auch Proteine mit vielen Disulfidbrücken oder posttranslationalen Modifikationen können in *E. coli* schlecht hergestellt werden. Zusätzlich akkumuliert das Produkt häufig im inneren der Zelle, sodass die Produktaufarbeitung (*Down Streaming*) aufwendig sein kann [3, 41, 42].

Hefen wie *S. cerevisiae* dagegen haben etwas langsamere Wachstumszeiten und damit einen höheren Produktionsaufwand. Dafür ist es möglich größere Proteine (>50 kDa) zu exprimieren und einige posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Acetylierungen durchzuführen [41, 43]. Diese Glykosylierungen sind jedoch nicht humanidentisch [44]. Außerdem ist bei Hefen zum Teil eine Sekretion des Produktes möglich. Neben den genannten finden auch noch weitere Mikroorganismen wie *Bacillus*, *Pichia* und viele weitere Stämme Anwendung in der Biotechnologie [41].

So gut wie alle Mikroorganismen besitzen eine stabile Zellwand und sind daher im Allgemeinen wenig scherstressempfindlich [45]. Viele Mikroorganismen können alle wichtigen Nährstoffe aus verschiedenen C- und N-Quellen gewinnen, sodass sie im Vergleich zu anderen Zellsystemen wie z. B. Säugetierzellen relativ anspruchslos gegenüber dem Kultivierungsmedium sind. Die meisten derzeit biotechnologisch relevanten Mikroorganismen treten als Einzelzellen (unizellulär) auf und können daher außerdem optimal unter submersen Kultivierungsbedingungen kultiviert werden [36]. Aus diesen Gründen liegen die Anforderungen an den Bioreaktor vor allem in der bestmöglichen Versorgung mit Nährstoffen und den besten Raum-Zeit-Ausbeuten. Diese Bedingungen sind in submersen Systemen, wie dem Rührkesselreaktor (3.1.1) am besten erfüllt. Es gibt aber auch viele Beispiele für Mikroorganismen die aus verschiedenen Gründen in anderen Reaktorsystemen kultiviert werden [3, 4, 46, 47].

Die Tatsache, dass weniger als 1 % der Mikroorganismen mit den derzeitigen Möglichkeiten kultivierbar sind, zeigt jedoch, dass die bisherigen Kultivierungsmethoden noch nicht ausrei-

chend sind. Um das volle Potenzial der Mikroorganismen ausschöpfen zu können, müssen deshalb weiterhin neue Kultivierungsmethoden entwickelt werden. So werden verbesserte Kultivierungsbedingungen dazu beitragen, die mikrobielle Physiologie besser zu verstehen und zu nutzen [47].

3.2.3.2 Fadenpilze

Die Fadenpilze sind im Unterschied zu den einzelligen Hefepilzen mehrzellig und bilden fadenförmige Zellstrukturen die sogenannten Hyphen aus. Wobei die Gesamtheit aller Hyphen Pilzmycel genannt wird [48].

Verschiedene Fadenpilze werden in vielen industriellen Prozessen wie der Produktion von Enzymen, Vitaminen, Polysacchariden, Aromen, Alkohol, Pigmente, Lipide und Glycolipide eingesetzt [49]. Dabei ist vor allem die Fähigkeit zur Sekretion von Proteinen und damit auch der Produktion von hydrolytischen Enzymen wie Cellulasen, Xylanase, Pectinasen und Proteasen hervorzuheben [16, 50]. Durch die Möglichkeit der Sekretion ist das *Down Streaming* häufig einfacher als bei Mikroorganismen. Den Markt dominieren derzeit die asexuell reproduzierenden *Aspergillus* Stämme (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* und *Trichoderma reesei*) und einige *Penicillium* Stämme [51, 52].

Traditionell werden Fadenpilze submers in flüssigem Medium kultiviert [51]. Dabei kann das Pilzmycel verschiedene Formen annehmen: Entweder es ist frei im Medium dispergiert oder es agglomeriert zu makroskopisch losen oder festen Aggregaten. Die Morphologie des Mycels ist dabei von verschiedenen Parametern wie dem Stamm, der Durchmischung, dem O₂- und pCO₂-Gehalt, dem pH-Wert und der Wachstumsrate abhängig [52]. Die wesentlichen Nachteile der submersen Kultivierung liegen in der Erhöhung der Viskosität des Mediums durch das Pilzmycel. Eine hohe Mediumviskosität bewirkt eine schlechtere Durchmischung des Mediums und in der Folge eine Verschlechterung der Sauerstoff und Nährstoffversorgung, sowie pH- und Temperaturgradienten [52].

Aufgrund dieser Nachteile gewinnt die Feststofffermentation (*Solid State Fermentation: SSF*) für die Kultivierung von Fadenpilzen in letzter Zeit an Bedeutung. Hier wächst der Pilz direkt auf einem festem Substrat, welches häufig aus Agrarabfällen, wie Zuckerbagasse, Weizenkleie oder Kokosnusssfasern besteht [16]. Das benötigte Wasser ist hier nicht frei in einem flüssigen Medium sondern im Substrat gespeichert. Typische Wassergehalte für die Kultivierung von

Pilzen liegen zwischen 55 und 80 % [17, 53, 54]. Fadenpilze sind an diese Bedingungen von allen Zellsystemen am besten angepasst. Sowohl das hyphenartige Wachstum als auch die hohe Toleranz gegenüber niedrigen Wassergehalten und hohem osmotischen Druck sind dabei die ausschlaggebende Vorteile der Fadenpilze gegenüber einzelligen Organismen [16].

3.2.3.3 Säugetierzellen

Säugetierzellen werden in der Biotechnologie vorwiegend im medizinischen und pharmazeutischen Bereich der Biotechnologie eingesetzt. Dabei können sie als Zelllinien pharmazeutische Produkte produzieren (z. B. Glykoproteine, Impfstoffe), für die Zell- und Gewebetherapie eingesetzt werden (z. B. Keratinozyten, Knochenmarkzellen, Gewebe für Transplantationen, extrakorporale Organe) oder für Zytotoxizitätstests von Pharmazeutika und anderen Substanzen verwendet werden [55-57].

Grundsätzlich stammen alle Säugetierzellen von multizellulären Organismen ab und induzieren daher ihren eigenen Zelltod (Apoptose) [58]. Dieses kann die Produktivität von biotechnologischen Prozessen stark beeinträchtigen. Daher wurden viele dieser Primärzelllinien durch Transformation in permanente Zelllinien überführt. Permanente Zelllinien, die unbegrenzt proliferieren können werden häufig zur Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt. Als Beispiele für permanente Zelllinien, die für die Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt werden, können BHK- (Baby Hamster Kidney), CHO- (Chinese Hamster Ovary) oder HEK-Zellen (Human Embryonic Kidney) genannt werden [59].

Transformierte Zelllinien können sich jedoch grundlegend von den Primärzelllinien unterscheiden und zum Beispiel einen Tumor hervorrufen, sodass sie nicht für Zell- oder Gewebetherapie eingesetzt werden können. Aus diesem Grund werden bei Gewebekulturen ausschließlich Primärzelllinien verwendet [59].

Neben der Unterscheidung zwischen Primärzelllinien und permanenten Zelllinien muss auch noch eine Unterscheidung zwischen adhärent wachsenden Zellen und in Suspension wachsenden Zellen getroffen werden. Generell wachsen die meisten Säugetierzellen auf einer Oberfläche oder in einer dreidimensionalen Matrix. Einige Zellen wie CHO- und BHK-Zellen konnten aber auch an das Wachstum in Suspension angepasst werden [55].

Eine Sonderform einer Säugetierzelllinie sind die künstlich hergestellten Hybridomazellen. Diese entstehen durch die Fusion von antikörperproduzierenden Lymphozyten mit Myelomzellen. Das daraus entstehende hybride Zellsystem vereint die Eigenschaften beider ursprünglichen Zelltypen: So können Hybridomazellen genau wie Lymphozyten für die Produktion von Antikörpern eingesetzt werden und wie Myelomzellen gut in flüssigem Medium kultiviert werden [59].

Die Vorteile von Säugetierzelllinien gegenüber anderen Zellsystemen liegen vor allem in der Fähigkeit große Proteine mit humanidentischen post-translationalen Modifikationen produzieren zu können. Zu diesen Modifikationen zählen proteolytische Prozessierungen, Disulfidbrückenbildung, Glykosylierungen, γ -Carboxylierungen, β -Hydroxylierungen, O-Sulfatierungen und Amidierungen. Diese Proteinmodifikationen sind wichtig für die Proteinfaltung, das Proteintargeting, die Ligandenerkennung und Bindung sowie für die biologische Aktivität, Stabilität und die Immunogenität [39, 60]. Aus diesem Grund können viele therapeutische Pharmazeutika nur in Säugetierzelllinien hergestellt werden, sodass derzeit 43 % der zugelassenen Biopharmazeutika in den USA aus Säugetierzelllinien stammen [39].

Säugetierzelllinien sind jedoch auch das anspruchsvollste Zellsystem. Sie haben keine Zellwand und sind relativ groß, sodass sie sehr anfällig gegenüber Scherstress sind. Die Wachstumsraten (Generationszeit von CHO-Zellen: 18 h) gegenüber Mikroorganismen (Generationszeit von *S. cerevisiae*: 1,5 h) sind gering, sodass längere Prozesszeiten eingeplant werden müssen. Zusätzlich sind die Ansprüche gegenüber dem Medium sehr hoch. Hierbei sind jedoch große Unterschiede zwischen den Zelllinien zu beobachten, sodass das Medium häufig an die entsprechenden Zellen angepasst werden muss. So sind Säugetierzellen zum Beispiel oft auf den Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) oder Wachstumsfaktoren angewiesen. Als Puffersystem kommt gerade bei Primärzelllinien oft das Kohlensäure-Bicarbonat-System zum Einsatz, sodass auch eine Begasung mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) zur Aufrechterhaltung des optimalen pH-Wertes von 6,8 bis 7,8 nötig sein kann [36].

Aufgrund dieser weitreichenden Ansprüche der Säugetierzellen werden auch hohe Anforderungen an die Bioreaktoren und dessen Überwachung gestellt. Im Allgemeinen können die Anforderungen an Zellkulturbioreaktoren wie folgt zusammengefasst werden [61]:

- Homogene Durchmischung mit wenig Scherstress
- Effektive Begasung mit Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid
- Effektiver Wärmetransport zur Einstellung einer homogenen Temperatur

- Möglichkeiten zur Überwachung der Prozessvariablen
- Langzeitstabilität und Sterilität
- Einfache Handhabung
- Angemessener Instandhaltungsaufwand

Für Säugetierzellen die ein Gewebe bilden sollen, dass zum Beispiel für Transplantationen eingesetzt werden kann, kommen noch weitere Anforderungen dazu [62].

- Es wird eine 3D-Matrix benötigt um die Gewebeform zu bilden.
- Die Proliferation und Differenzierung der Zellen müssen initiiert werden.
- Die hohe Scherempfindlichkeit von Geweben muss berücksichtigt werden.
- Die Nährstoffversorgung in das Gewebe muss sichergestellt werden.
- z. T. biomechanische Stimulation erforderlich

Grundsätzlich hängt die Wahl eines geeigneten Bioreaktors von dem verwendeten Zellsystem ab. Für scherstressunempfindliche, permanente Zelllinien, die für die Produktion von Biopharmazeutika eingesetzt werden sollen, werden häufig Submers-Bioreaktorsysteme, wie der Rührkessel-, Airlift- oder Blasensäulenreaktor verwendet. Diese Systeme zeichnen sich durch eine gute Durchmischung und hohe Produktausbeuten aus. Bei adhärenen Zelllinien können in diesen Reaktoren *Microcarrier* für die Immobilisierung der Zellen eingesetzt werden. Fließbett-, Festbett-, Membran- und Hohlfaserreaktoren werden für scherstressempfindlichere Zellen eingesetzt. Hier können sehr hohe gewebeähnliche Zelldichten ($>10^8$ Zellen/mL) erreicht werden, sodass diese Reaktoren auch für Gewebekulturen geeignet sind [6, 62].

3.3 Beschreibung des Nebelkammerreaktorkonzepts

Das Konzept des Nebelkammerreaktors basiert auf den Aerosolbioreaktoren, welche bereits bei der Kultivierung von Pflanzenzellen eingesetzt werden. Dabei müssen bei dem Nebelkammerreaktor jedoch die speziellen Bedürfnisse der zu kultivierenden Zellsysteme berücksichtigt werden. Das grundlegende Reaktorkonzept ist jedoch bei beiden Reaktoren gleich.

Sowohl bei den Aerosolreaktoren als auch bei dem Nebelkammerreaktor wird Nährmedium zu einem feinen Nebel zerstäubt. Das zerstäubte Medium sedimentiert anschließend auf den Zel-

len, die im Nebel auf einer Halterung immobilisiert sind, und versorgt die Zellen mit Nährstoffen. Die Gasversorgung wird dabei direkt über die Gasphase bereitgestellt. Die Durchmischung des Reaktors kann ohne ein Rührwerk durch den Zerstäubungskreislauf erfolgen. Dadurch wird eine Scherstressinduktion durch Gasblasen oder ein Rührwerk verhindert. Gleichzeitig wird durch den direkten Kontakt der Zellen mit der Gasphase eine sehr hohe Gasversorgung erreicht. Der Nebelkammerreaktor ist damit in der Lage, eine sehr gute Sauerstoffversorgung ohne eine scherstressinduzierende Begasung zu gewährleisten. Dieses macht den Nebelkammerreaktor nicht nur für Pflanzenzellen sondern auch für andere scherstresssensitive Zellsysteme wie Pilze, Säugetierzellen oder Gewebe interessant.

Daneben hat dieses Reaktorkonzept jedoch auch noch weitere Vorteile. Durch die Zerstäubung des Nährmediums kann zum Beispiel die Nährstoffversorgung und damit die Wachstumsrate der Zellproben im Reaktor eingestellt werden, sodass eine größere Reproduzierbarkeit der Kultivierungen gewährleistet wird. Außerdem kann ein großes Reaktorvolumen im Litermaßstab mit nur sehr wenig Medium im Bereich von einigen μm versorgt werden. Dieses führt zu einem geringen Mediumverbrauch, welches die Prozesskosten im Gegensatz zu submers-Reaktoren senken könnte. Zusätzlich können sekretierte Produkte unterhalb der Probenstände aufgefangen werden. Diese Produkte würden somit nicht mit dem restlichen Medium verdünnt werden, sodass im Vergleich zu submers-Reaktoren eine sehr hohe Produktkonzentration erreicht werden kann. Durch die lokale Trennung von Zellen und Nährmedium ist weiterhin ein Austausch des Mediums problemlos möglich, sodass eine kontinuierliche Kultivierung ohne zusätzliche Zellabtrennung einfach durchzuführen ist. Diese Vorteile machen das Nebelkammerreaktorsystem auch für scherstressunempfindliche Mikroorganismen interessant.

Das Reaktordesign der Aerosolbioreaktoren für Pflanzen kann jedoch aufgrund der besonderen Ansprüche nicht zur Kultivierung von einzelligen Mikroorganismen, Pilzen oder Säugetierzellen übernommen werden. Im speziellen für die Kultivierung von Säugetierzellen und Gewebe müssen einige Besonderheiten berücksichtigt werden. Dazu zählen eine sehr hohe Scher- und Temperaturempfindlichkeit sowie die Begasung mit Kohlenstoffdioxid angereicherter Luft zur Einstellung des pH-Wertes bei Kohlensäure-Bicarbonat gepufferten Medien. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein neues Nebelkammerreaktorsystem entwickelt. Dieses neue Bioreaktorsystem basiert auf einer Vorarbeit von Dreimann 2013 [63], welche im folgenden Kapitel kurz beschrieben wird.

3.3.1 Erste Entwicklung eines Nebelkammerreaktorprototyps

Ein erster Nebelkammerreaktorprototyp wurde bereits von Dreimann 2013 [63] entwickelt. Der Schwerpunkt jener Arbeit war es vor allem, verschiedene Zerstäubungsprozesse sowie die Integration des Zerstäubers in einen Nebelkammerreaktorprototyp zu evaluieren. Eine Darstellung dieses Nebelkammerreaktorprototyps ist in Abb. 7 zu sehen. Der Reaktor besteht aus einem Glaszylinder ($\varnothing = 21 \text{ cm}$, $h = 1,4 \text{ cm}$) mit einem Edelstahl-Deckel und einer Edelstahl-Bodenplatte. Damit ergibt sich ein Reaktorinnenvolumen von 4,8 L. Unterhalb der Bodenplatte ist seitlich eine Kühlkammer und ein Ultraschallzerstäuber angebracht. Die Kühlkammer ist dabei durch eine Edelstahlfolie von dem Reaktorinnenraum getrennt. Mithilfe dieses Reaktorsystems konnte eine sterile Nebelproduktion im Reaktorinnenraum erreicht werden. Ein zu einer Seite geöffnete Spritzschutz oberhalb der Zerstäubung sollte die Zellproben im Reaktorinnenraum vor sehr großen Flüssigkeitstropfen schützen. Die Temperatur des Reaktors wurde durch einen Inkubator eingestellt. Die Kühlkammer sollte die Zerstäubungswärme die an dem Ultraschallzerstäuber entsteht abführen.

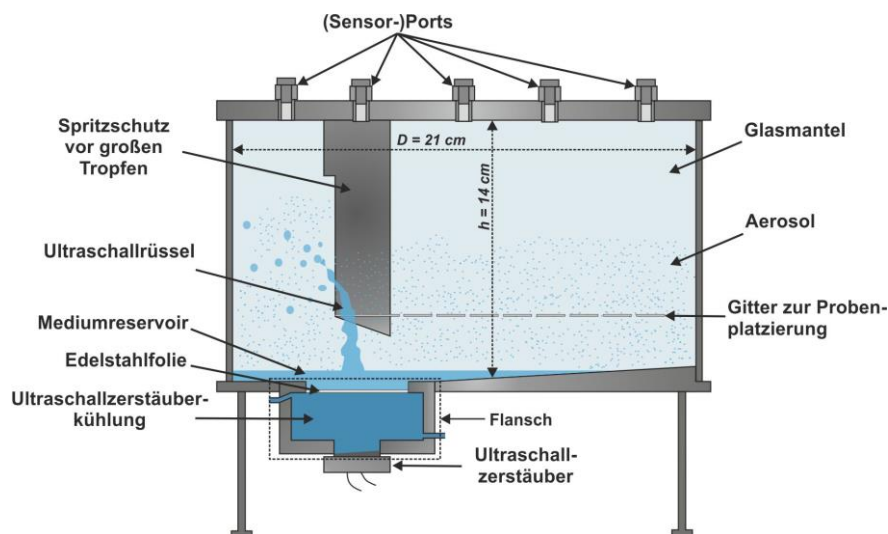


Abb. 7: Schematische Darstellung des Nebelkammerreaktorprototyps aus Dreimann (2013) [63].

Dieser Aufbau des Nebelkammerreaktorprototyps lieferte hinsichtlich der Zerstäubung vielversprechende Ergebnisse. Es konnten jedoch auch einige Probleme identifiziert werden. Dabei ist vor allem das große Reaktorvolumen zu nennen. Dieses machte den Reaktor bei der Probenahme unhandlich und führte zu sehr langen Aufwärmzeiten. Der seitlich angebrachte Zerstäuber und der halboffene Spritzschutz führten außerdem zu einer ungleichmäßigen Nebelverteilung.

lung. Aus diesem Grund wurden bei dem neuen Nebelkammerreaktorconcept ein kleineres Reaktorvolumen und eine zentrale Zerstäubung angestrebt. Außerdem sollte bei dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Nebelkammerreaktor ein Schwerpunkt auf die besonderen Ansprüche von einzelligen Mikroorganismen, Fadenpilzen und Säugetierzellen liegen. Dazu zählen eine Temperaturregelung, die Minimierung von Scherstress und eine ausführliche Charakterisierung der Zerstäubung und des Nebels. Zusätzlich wurde bei Dreimann ein negativer Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf die Stabilität einzelner Mediumbestandteile festgestellt. Aus diesem Grund sollen im folgenden Kapitel zunächst alternative Zerstäubungstechniken identifiziert und evaluiert werden.

3.3.2 Auswahl einer geeigneten Zerstäubertechnik

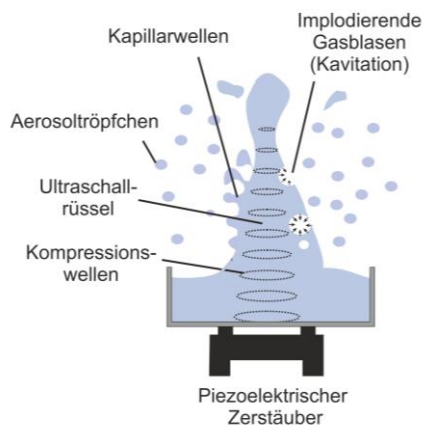
Der Zerstäubungsprozess ist der Schlüsselbetriebsparameter des Nebelkammerreaktors. Für die Zerstäubung sind verschiedene Methoden denkbar. Je nach Zerstäubungstechnik ändert sich der Aufbau des Nebelkammerreaktorsystems, sodass zunächst die verschiedenen Zerstäubungstechniken evaluiert worden sind.

Die Kriterien nach denen die Zerstäuber evaluiert worden sind, können direkt aus den Ansprüchen der Zellsysteme abgeleitet werden. Die Tröpfchengröße ist gerade bei scherstresssensitiven Zellen und Geweben wichtig. Nur bei kleinen Tröpfchengrößen von wenigen μm ist die Gravitationskraft auf die Tropfen klein genug, sodass ein stabiler Nebel mit einer geringen Sedimentationsgeschwindigkeit erreicht werden kann. Dabei ist vor allem eine geringe Sedimentationsgeschwindigkeit wichtig, um die kinetische Energie der Tropfen gering zu halten und damit Beschädigungen an den Zellen zu vermeiden. Zusätzlich ermöglicht eine geringe Sedimentationsgeschwindigkeit auch eine horizontale Bewegung der Tropfen, sodass die Eindringtiefe in Gewebe erhöht wird. Neben der Tröpfchengröße muss die Zerstäubungstechnik robust genug sein um Langzeitexperimente von mehreren Tagen bis Wochen durchführen zu können. Außerdem sollten die Anfälligkeit für Kontaminationen und der Energieeintrag in das Medium gering sein. Als letzten Punkt sollten zusätzliche, mit der Zerstäubung assoziierte Geräte soweit wie möglich vermieden werden.

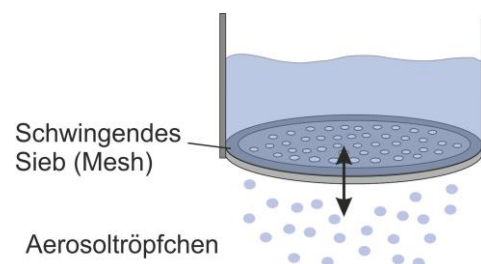
Für die Zerstäubung des Nährmediums zu einem Nebel sind vier verschiedene Methoden (Ultraschallzerstäubung, Meshzerstäubung, Düsenzerstäubung und Schwingtellerzerstäubung) denkbar.

Bei der Ultraschallzerstäubung wird ein Piezokristall durch eine Wechsellspannung zum Schwingen angeregt (Abb. 8 A). Die Schwingungen des Kristalls übertragen sich auf die darüber liegende Flüssigkeitssäule und induzieren Kompressionswellen. Treffen die Kompressionswellen auf eine Flüssigkeitsoberfläche wird die Flüssigkeit in kleine Nebeltropfen zerstäubt. Für den Zerstäubungsmechanismus existieren derzeit zwei Hypothesen. Die Kapillarwellentheorie erklärt die Zerstäubung durch instabile Wellen an der Mediumoberfläche, an dessen Kämmen sich kleine Nebeltropfen ablösen. Bei der Kavitationsblasentheorie führen Druckunterschiede der Kompressionswellen zur Bildung von kleinen Gasbläschen, die aufgrund des Umgebungsdrucks implodieren, sodass ein Nebel entsteht. Der genaue Mechanismus der Nebelentstehung und das Zusammenspiel dieser beiden Effekte ist noch nicht vollständig aufgeklärt und wird in der Literatur viel diskutiert [63-66].

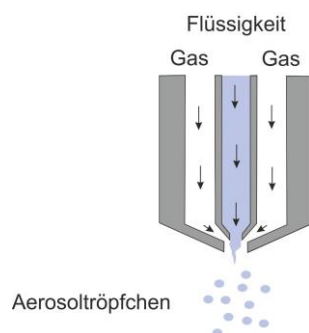
A



B



C



D

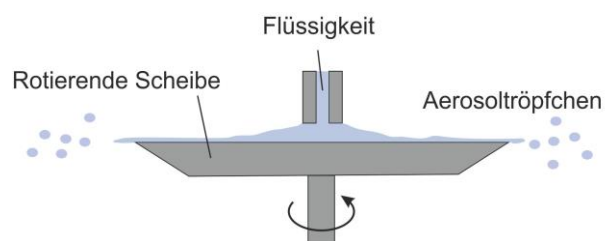


Abb. 8: Darstellung verschiedener Möglichkeiten zur Erzeugung eines Aerosols: Ultraschallzerstäubung (A), Meshzerstäubung (B), Düsenzerstäubung (C) und Schwingtellerzerstäubung (D).

Die Tröpfchengröße hängt bei der Ultraschallzerstäubung von der Frequenz des Zerstäubers ab und liegt im Bereich von einigen μm und ist damit relativ klein. Die Kompressionswellen können durch feste Materialien wie eine Edelstahlfolien dringen. Dadurch kann der Zerstäuber außerhalb des sterilen Innenraums befestigt werden, sodass die Anfälligkeit für Kontaminationen bei dieser Zerstäubungsmethode sehr gering ist. Als Verschleißteil ist bei diesem Zerstäubertyp die Piezokeramik zu nennen. Diese muss je nach Beanspruchung nach einigen Monaten ausgetauscht werden. Da dieses jedoch auch im laufenden Betrieb durchgeführt werden kann, ist bei diesem Zerstäubertyp keinerlei Einschränkung bei Langzeitexperimenten zu nennen. Die Ultraschallzerstäubung benötigt eine Kühlung, da sowohl an der Piezokeramik als auch im Medium durch die Zerstäubung Wärme entsteht [63].

Bei dem Mesh-Zerstäuber wird das Medium durch ein vibrierendes Sieb oberhalb der Kultivierungszone gedrückt und dadurch zerstäubt (Abb. 8 B). Das Medium muss dabei mithilfe einer Pumpe zu dem Meshzerstäuber transportiert werden. Die Tröpfchengröße bei diesem Zerstäuber ist mit einigen μm klein. Jedoch muss der Zerstäuber innerhalb des sterilen Reaktorinnenraums befestigt werden. Dies erhöht das Kontaminationsrisiko. Außerdem sind die sehr kleinen Löcher des Siebs anfällig gegenüber Verstopfungen durch Proteine oder Schlauchabrieb, sodass es bei längeren Kultivierungsdauern zu einer Verblockung des Siebes kommen kann. Der Energieeintrag in das Medium ist bei dieser Zerstäubungstechnik vergleichsweise gering [67, 68].

Die Düsenzerstäuber und die Schwingtellerzerstäuber haben trotz unterschiedlicher Zerstäubungstechniken ähnliche Eigenschaften. Bei dem Düsenzerstäuber wird das Medium mit hohem Druck durch eine Düse gepresst. Durch Richtungs- und Querschnittsänderungen kann der entstehende Flüssigkeitsstrahl aufgebrochen werden und es entstehen kleine Tropfen. Durch einen Drallkörper oder einen zusätzlichen Gasstrom können die entstehende Tröpfchengrößen weiter verkleinert werden (Abb. 8 C) [66].

Bei dem Schwingtellerzerstäuber trifft ein Flüssigkeitsstrahl auf einen rotierenden oder vibrierenden Teller, wodurch ein Nebel entsteht. Ähnlich wie bei Düsenzerstäubern können hier durch das Anlegen eines zusätzlichen Gasstroms die Tröpfchengrößen noch weiter verkleinert werden (Abb. 8 D) [66].

Sowohl bei Düsen als auch bei Schwingtellerzerstäubern muss der Zerstäuber oberhalb der Kultivierungszone im Reaktorinnenraum angebracht werden. Das Medium muss dementsprechend von dem Medienreservoir durch eine Pumpe kontinuierlich und steril zu dem Zerstäuber transportiert werden. Dieser Aufbau führt zu einem höheren Kontaminationsrisiko im Vergleich zu

dem Ultraschallzerstäuber. Die Tröpfchengröße ist mit 20 µm bis zu mehreren mm relativ groß und damit eher ungeeignet für sensitive Zellen. Außerdem kann die Düse oder der Schwingtellerzulauf, gerade bei proteinreichen Medium, mit der Zeit verstopfen, sodass sich dieser Zerstäubertyp nur bedingt für Langzeitexperimente eignet. Der Energieeintrag in das Medium ist bei beiden Zerstäubern gering. Eine Übersicht über die Ergebnisse der Zerstäuberevaluation gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten der Ultraschallzerstäubung und deren Eignung für den Nebelkammerreaktor

	Tröpfchen- größe	Anfälligkeit für Konta- minationen	Geeignet für Langzeitexpe- rimente	Energie- eintrag	Zusätzliche Geräte
Ultraschallzerstäuber	klein	gering	ja	hoch	Kühlung
Mesh-Zerstäuber	klein	hoch	nein	gering	Mediumpumpe
Düsenzerstäuber	groß	hoch	bedingt	gering	Mediumpumpe
Schwingtellerzerstäuber	groß	hoch	bedingt	gering	Mediumpumpe

Insgesamt konnte keine in allen Punkten optimale Zerstäubungstechnik gefunden werden. Die Düsen- und Schwingtellerzerstäuber sind vor allem aufgrund ihrer sehr großen Tröpfchengrößen für einen Nebelkammerreaktor ungeeignet. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei diesen Tröpfchengrößen eine Beschädigung der Zellproben stattfindet ist zu groß. Die Tröpfchengröße bei den Mesh- und Ultraschallzerstäubern ist dagegen optimal. Im Vergleich der Meshzerstäubungstechnik mit der Ultraschallzerstäubungstechnik liefert die Ultraschallzerstäubung insgesamt vielversprechendere Ergebnisse. Dabei sind vor allem das geringere Kontaminationsrisiko und die Möglichkeit eine Zerstäubung über einen langen Zeitraum durchzuführen, ausschlaggebende Faktoren.

Aus diesem Grund wurde sich im Rahmen dieser Arbeit auch für die Ultraschallzerstäubungstechnik entschieden. Dabei muss jedoch ein hoher Energieeintrag in das Medium und eine zusätzliche Kühlung hingenommen werden. Die Risiken des hohen Energieeintrags liegen wie

bei Dreimann 2013 [63] gezeigt in einer möglichen Veränderung der Medienbestandteile. Dieser Einfluss auf die Mediumsbestandteile muss bei der Charakterisierung des Nebelkammerreaktors berücksichtigt werden. Einer möglichen Veränderung des Mediums kann jedoch durch einen Austausch des Mediums entgegen gewirkt werden. Bei dem Aufbau des Reaktors sollte darauf geachtet werden, dass die Zellproben keinen Kontakt mit der hoch energetischen Zerstäubungszone haben. Aufgrund der Wärmeentwicklung an der Piezokeramik muss außerdem ein Kühlsystem in den Reaktor integriert werden.

4 Experimentelle Arbeiten

In dem experimentellen Teil dieser Arbeit werden zuerst der Aufbau und die Entwicklung des neuen Nebelkammerreaktorsystems beschrieben und dieser anschließend charakterisiert. Unter dem Begriff des Nebelkammerreaktorsystems wird neben dem Reaktorkörper auch ein korrespondierendes Sensor- und Regelungssystem sowie ein Begasungssystem zusammengefasst. Die Entwicklung des Nebelkammerreaktors hat das Ziel, eine effiziente und scherstressarme Nährstoffversorgung durch den Nebel zu gewährleisten und eine Möglichkeit zur Überwachung und Regelung der wichtigsten Betriebsparameter wie der Temperatur und der Nebeldichte bereitzustellen.

Die Charakterisierung des Nebelkammerreaktorsystems kann in einen technischen, einen chemischen und einen biologische Teil gegliedert werden. In der technischen Charakterisierung werden wichtige Betriebsparameter des Nebelkammerreaktors näher untersucht. Dazu zählen unter anderem die Ultraschallzerstäubung des Mediums, der entstehende Nebel, die Nährstoffversorgung sowie die Mischzeit und Temperaturverteilung. In der chemischen Charakterisierung wird der Energieeintrag in das Medium durch die Ultraschallzerstäubung analysiert. Dafür wird die Stabilität einiger Mediumkomponenten während der Zerstäubung untersucht. Abschließend werden in der biologischen Charakterisierung des Nebelkammerreaktors verschiedene Zellsysteme (Hefen, Pilze und Säugetierzellen) im Reaktor kultiviert.

Für die Charakterisierung des Nebelkammerreaktors konnte häufig nicht auf etablierte Methoden zurückgegriffen werden, da es bisher keine Literatur zu diesem Themengebiet gibt. Daher wurden viele Methoden für die Charakterisierung in dieser Arbeit entwickelt. Aus diesem Grund wird im Folgenden häufig die Methodik zu Beginn des jeweiligen Kapitels kurz erläutert. Eine ausführliche Methodenbeschreibung ist jeweils im Anhang zu finden.

4.1 Aufbau und Entwicklung des Nebelkammerreaktorsystems

4.1.1 Aufbau des Reaktorkörpers

Der während dieser Arbeit entwickelte Nebelkammerreaktor wurde in der Feinmechanik-Werkstatt des Instituts für Technische Chemie an der Leibniz Universität Hannover gefertigt und besteht im Wesentlichen aus einem Glaszylinder, einem Edelstahl Deckel und einer Edelstahl Unterkonstruktion (Abb. 9).

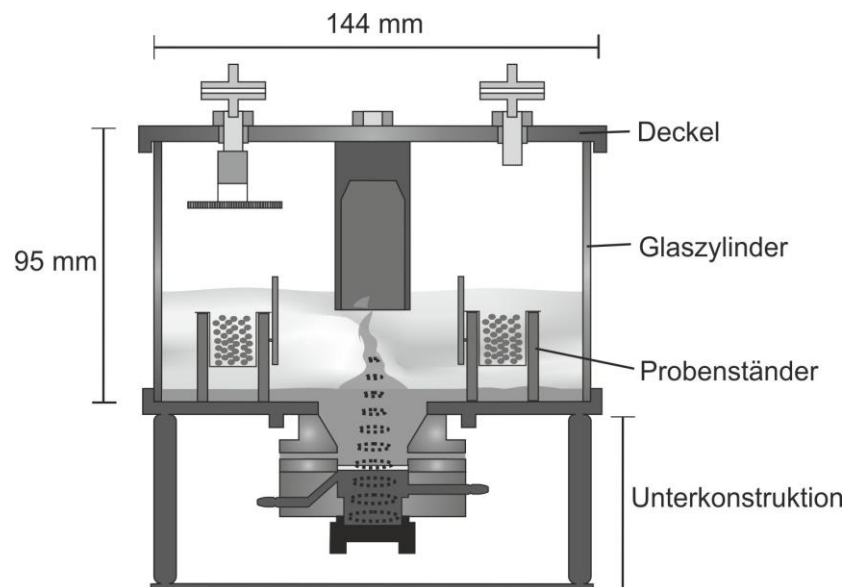


Abb. 9: Aufbau des Nebelkammerreaktors, bestehend aus einem Glaszylinder, einem Deckel und einer Unterkonstruktion. Die Zellproben befinden sich auf Probenständen im Nebel.

Der Glaszylinder stellt die seitliche Begrenzung des Reaktorinnenraums dar. Er ermöglicht eine visuelle Beobachtung der Zellproben und hat einen Durchmesser von 144 mm sowie eine Höhe von 95 mm. Mit einem Reaktorinnenvolumen von 1,55 L bietet er ausreichend Platz für die Zellproben und Sensoren und gewährleistet gleichzeitig durch die kompakte Bauweise eine einfache Handhabung bei der Probennahme unter der Sterilbank. Aufgrund des geringeren Reaktorvolumens dieses Nebelkammerreaktors im Vergleich zu dem Prototyp von Dreimann [63] mit 4,8 L (siehe 3.3.1) können eine höhere Nebeldichte innerhalb des Reaktors sowie kürzere Aufwärmzeiten erzielt werden.

Der Reaktordeckel übernimmt die Funktion, den Reaktor zu verschließen und über spezielle Ports im Deckel den Sensoren Zugang zum Reaktorinnenraum zu ermöglichen. Ein Drehverschluss mit eingebauten O-Ringen sorgt für einen luftdichten Verschluss des Deckels, sodass eine sterile Umgebung im Reaktorinnenraum erzeugt werden kann. Der Zugang zum Reaktorinnenraum wird durch sechs 18,5 mm Ports im Deckel gewährleistet (Abb. 10 A). Mithilfe von verschiedenen Schraubaufsätzen können über diese Zugänge verschiedene Sensoren steril in den Reaktorinnenraum eingebracht werden. Außerdem sind eine Begasung und eine Probenahme über diese Zugänge möglich. Für die Entnahme größerer Proben unter der Sterilbank kann der Deckel abgenommen und auf die drei seitlich angebrachten Deckelfüße gestellt werden. Dadurch wird der Kontakt der inneren, sterilen Fläche mit dem Sterilbankboden verhindert.

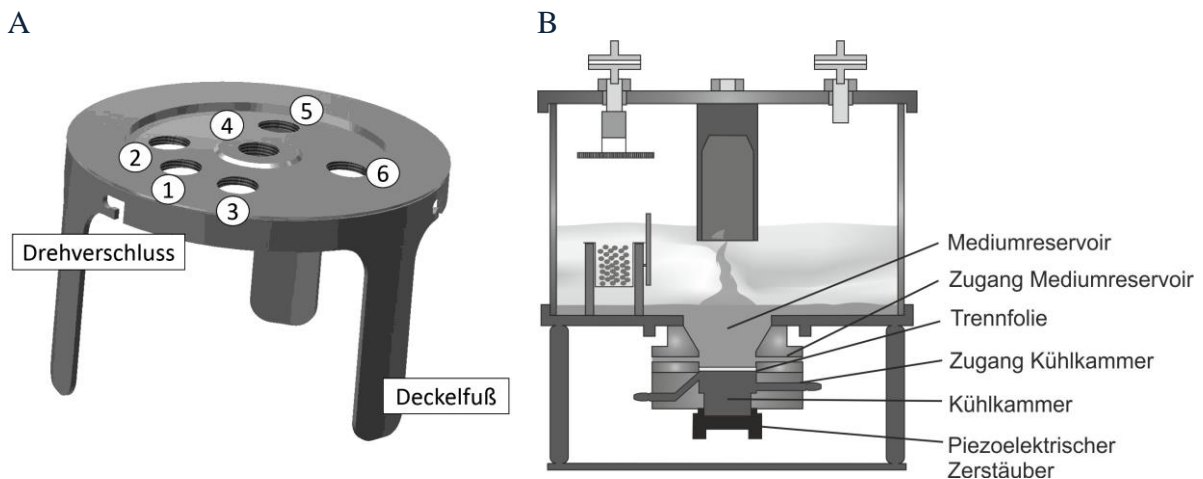


Abb. 10: Aufbau des Deckels (B) und der Unterkonstruktion (A) des Nebelkammerreaktors. Die Zugänge im Deckel können mithilfe unterschiedlicher Schraubaufsätze für verschiedene Sensoren, für die Begasung und zur Probenahme verwendet werden: 1) Nebeldichtesensor, 2) Pt-100 Temperatursonde, 3) Begasungseingang, 4) Zugang zur Probenahme, 5) Begasungsausgang, 6) Sauerstoff-/pH-Sonde

Die Unterkonstruktion besteht aus einem Medienreservoir, einer Edelstahl-Trennfolie, einer Kühlkammer und dem piezoelektrischen Zerstäuber (Abb. 10 B). Das Medienreservoir besitzt zwei seitlich angebrachte Zugänge, wodurch ein Austausch des Mediums ermöglicht wird. Die Edelstahl-Trennfolie dient als Sterilbarriere zwischen dem sterilen Reaktorinnenraum und der Kühlkammer. Die Kühlkammer ist notwendig, um die Abwärme, die durch den Zerstäubungsprozess an dem Piezokristall entsteht, abzuführen. Durch zwei seitlich angebrachte Zugänge kann außerdem die Kühlflüssigkeit kontinuierlich ausgetauscht werden. Der piezoelektrische

Zerstäuber ist für die Zerstäubung des Mediums zuständig und ist unterhalb der Kühlkammer angebracht.

4.1.2 Zerstäubungsprozess und Reaktorzonen

Die Zerstäubung des Nährmediums zu einem Nebel ist der fundamentale Prozess auf dem das Prinzip des Nebelkammerreaktors beruht. Dabei induziert ein piezoelektrischer Ultraschallzerstäuber Kompressionswellen, die sich zuerst durch die Kühlkammer und anschließend über die Edelstahltrennfolie sowie das Medium ausbreiten (Abb. 11 A). An der Mediumoberfläche bildet sich daraufhin ein Ultraschallrüssel in dem der Nebel entsteht.

Der entstehende Nebel sedimentiert auf den Zellproben, die sich auf Probenständern im Nebel befinden und versorgt die Zellen mit Nährstoffen. Überschüssiges und verbrauchtes Medium tropft durch ein Sieb unterhalb der Zellproben zurück ins Mediumreservoir und kann einem erneuten Zerstäubungsprozess zugeführt werden. Es entsteht der in Abb. 11 A abgebildete Zerstäubungskreislauf.

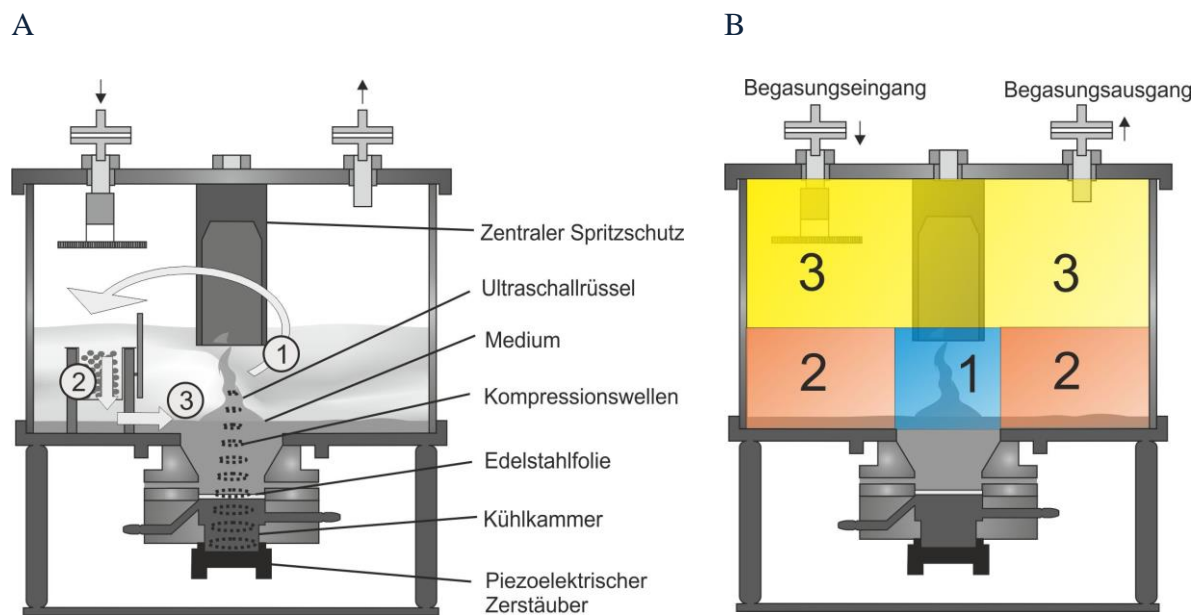


Abb. 11: Darstellung des Zerstäubungskreislaufes (A) und der Reaktorzonen (B). Der Zerstäubungskreislauf in (A) besteht aus 3 Schritten: Zunächst wird das Medium mittels eines Ultraschallzerstäubers vernebelt (1). Anschließend sedimentiert der Nebel auf den Zellprobenständen (2) und läuft schließlich zurück ins Mediumreservoir. Hierdurch wird das Medium einem erneuten Zerstäubungsprozess zugeführt. (3). Die Reaktorinnenraum in (B) kann in drei Bereiche eingeteilt werden: Eine hochenergetische Zerstäubungszone (1), eine Kultivierungszone (2) und der nebelfreie Kopfraum (3).

Die Höhe des Nebels wird im Nebelkammerreaktor durch einen zentralen Spritzschutz auf eine Höhe von ca. 4 cm begrenzt. Ein höheres Aufsteigen der Nebeltropfen wird durch die Schwerkraft verhindert. Der Spritzschutz verhindert außerdem, dass die Zellenproben von großen Nebeltropfen getroffen werden (siehe 4.1.5).

Durch diesen Aufbau kann der Reaktor in drei Zonen eingeteilt werden (Abb. 11 B). Die erste Zone ist die hochenergetische Zerstäubungszone mit einem Volumen von ca. 0,1 L. Hier befindet sich der Ultraschallrüssel und es findet der Zerstäubungsprozess statt. In dieser Zone können neben dem feinen Nebel auch größere Flüssigkeitstropfen von mehreren Millimeter Durchmesser entstehen. Außerhalb der Zerstäubungszone liegt die Kultivierungszone mit einem Volumen von ca. 0,6 L. Hier befinden sich die Halterungen mit den Zellproben. Die Tröpfchengröße des Nebels ist in der Kultivierungszone durch den Spritzschutz klein. Die dritte Reaktorzone ist der nebelfreie Kopfraum. Dieser wird für die Begasung des Reaktors verwendet und hat ein Volumen von ca. 0,85 L.

4.1.3 Auswahl und Modifikation eines geeigneten Ultraschallzerstäubers

Eines der wichtigsten Elemente des Nebelkammerreaktors ist der Zerstäuber. Wie schon in 3.3.2 beschrieben, wurde die Ultraschallzerstäubertechnik für den Nebelkammerreaktor ausgewählt. Als Ultraschallzerstäuber standen zwei Systeme mit unterschiedlichen Frequenzen zur Auswahl. Das erste System wurde von der Firma BOGA Gerätetechnik (Soest, Deutschland) bezogen und besitzt eine Frequenz von 1,6 MHz. Das zweite System kommt von der Firma TDK (Achern, Deutschland) und hat eine Frequenz von 2,5 MHz.

Als ausschlaggebendes Kriterium zur Beurteilung der beiden Zerstäuber diente der Energieeintrag in das Medium. Dieser Energieeintrag wurde indirekt über den Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf die Aktivität eines Enzyms (Penicillin G Acylase) bestimmt. Dafür wurde jeweils eine Enzymlösung für 22 h im Nebelkammerreaktor mit den beiden Zerstäubern vernebelt und die Enzymaktivitäten (U/mL) zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander verglichen. Diese Experimente fanden im Nebelkammerreaktor bei gleicher Temperatur und Nebeldichte statt. Für die Experimente wurde ein Sensor- und Regelungssystem (siehe 4.1.4) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt.

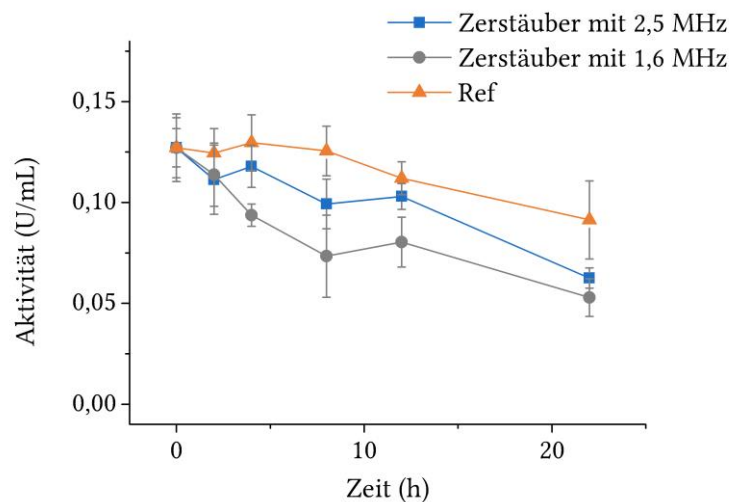


Abb. 12: Vergleich von zwei verschiedenen Ultraschallzerstäubern. Dargestellt ist der Effekt des Zerstäubungsprozesses auf die Aktivität des Enzyms Penicillin-G Acylase. Als Referenz diente eine unzerstäubte Probe.

Es ist zu erkennen, dass die Ultraschallzerstäubung zu einem Verlust der Enzymaktivität führt. Dieses ist mit dem relativ hohen Energieeintrag der Ultraschallzerstäubung in das Medium zu erklären. Dabei war der Aktivitätsverlust durch den TDK-Zerstäuber mit einer Frequenz von

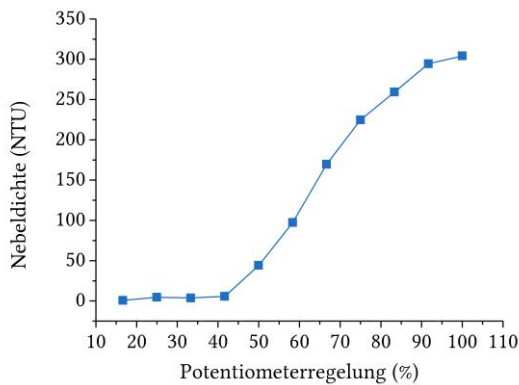
2,5 MHz geringer als bei dem BOGA-Zerstäuber mit einer Frequenz von 1,6 MHz. Die höhere Frequenz hat demnach eine etwas schonendere Zerstäubung zur Folge. Zusätzlich war die verbaute Schaltung bei dem 1,6 MHz-Zerstäuber nicht besonders robust, da ein Kondensator der Zerstäubersteuerung während der Evaluation häufig ausgetauscht werden musste. Insgesamt war daher der 2,5 MHz Zerstäuber für den Nebelkammerreaktor besser geeignet als der 1,6 MHz-Zerstäuber. Deshalb wurde sich in dieser Arbeit für diesen Zerstäuber entschieden. Eine genauere Untersuchung des Einflusses der Ultraschallzerstäubung auf verschiedene Mediumkomponenten ist in der chemischen Charakterisierung (siehe Kapitel 4.3) zu finden.

Um eine umfangreiche Steuerung des Zerstäubers zu gewährleisten, wurde der TDK-Zerstäuber mit einer Frequenz von 2,5 MHz weiter modifiziert. So wurde ein Potentiometer zur Regelung der Nebeldichte an die Steuerungsplatine angeschlossen sowie eine Pulsung für den Zerstäuber mittels eines Relais in der Stromversorgung verwirklicht. Das Ergebnis dieser Umbauten ist in Abb. 13 dargestellt.

Wie in Abb. 13 A zu erkennen, kann die Nebeldichte mithilfe eines Potentiometers eingestellt werden. Die Nebeldichte wurde mithilfe eines Nebelsensors gemessen, dessen Entwicklung in Kapitel 4.1.8 beschrieben wird. Dessen Sensorsignal wurde mithilfe einer Kalibrationskurve in die Trübungseinheit NTU (Nephelometric Turbidity Unit) umgerechnet. Es ist zu sehen, dass unterhalb von 40 % der maximalen Potentiometereinstellung kein Anstieg der Nebeldichte auftritt. Hier sind die Kompressionswellen nicht stark genug, um eine ausreichende Zerstäubung hervorzurufen. Danach ist ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen der Potentiometereinstellung und der Nebeldichte zu erkennen. Durch die Integration des Potentiometers kann demnach die Nebeldichte je nach Anforderungen der Zellproben angepasst werden und optimale Kultivierungsbedingungen eingestellt werden.

In Abb. 13 B ist der Verlauf der Nebeldichte bei gepulster Zerstäubersteuerung zu sehen. Das Relais für die Pulsung wurde hier durch das Mess- und Regelsystem (siehe 4.1.4) gesteuert. Dadurch kann der Zerstäuber automatisch ein- und ausgeschaltet werden, sodass eine Pulsung des Zerstäubers erreicht wird. Dieses bietet die Möglichkeit, Organismen unter verschiedensten Nebelbedingungen zu kultivieren. Eine Kultivierung mit gepulster Zerstäubung wurde in 4.4.2 durchgeführt.

A



B

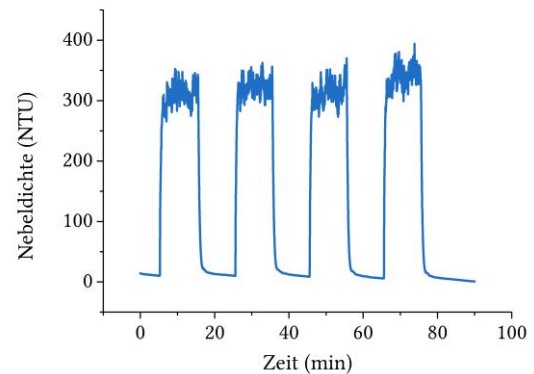
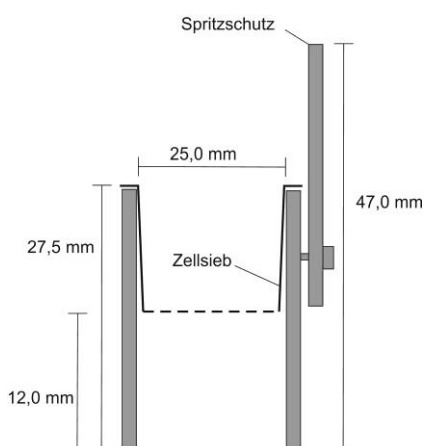


Abb. 13: Darstellung des Effektes der Potentiometerregelung (A) und der Pulsung (B) auf die Nebeldichte.

4.1.4 Konstruktion von Probenständern zur Zellrückhaltung im Nebel

Im Nebelkammerreaktor müssen die Zellproben im Nebel zurückgehalten werden. Dafür wurden Standard-Probenständer konstruiert (Abb. 14). Die Probenständer bestehen aus einem Edelstahlgerüst, welches ein herausnehmbares Zellsieb (Nylon, Porengröße: 100 μm , Corning, Durham, USA) und einem Spritzschutz trägt. Die Zellproben können auf dem Zellsieb platziert und durch den Nebel mit Nährstoffen versorgt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Höhe und Querschnittsfläche des Probenständers einen Einfluss auf die Nebelmenge hat, die auf dem Probenständer sedimentiert. Aus diesem Grund sind in Abb. 14 A die Maße des Probenständers angegeben.

A



B

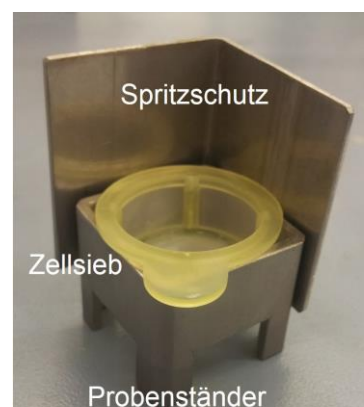


Abb. 14: Schematische Darstellung (A) und Foto (B) des Standard-Probenständers zur Zellrückhaltung.

4.1.5 Integration der Spritzschutzvorrichtungen im Nebelkammerreaktor

Der Nebelkammerreaktor benötigt durch die Kultivierung der Zellen im Nebel keine scherstressinduzierende Begasung, um eine gute Sauerstoffversorgung zu erreichen. Daher können die Zellen unter scherstressarmen Bedingungen bei guter Sauerstoffversorgung zu kultiviert werden. Die Nebeltropfen besitzen jedoch auch eine gewisse kinetische Energie, sodass beim Auftreffen auf eine Zelle ein gewisser Scherstress ausgelöst werden kann. Die kinetische Energie und damit auch der Scherstress auf die Zellen hängen dabei sowohl von der Tröpfchengröße bzw. dessen Masse als auch von der Geschwindigkeit der Nebeltropfen ab. Daher sollten die Zellproben vor besonders großen und schnellen Flüssigkeitstropfen geschützt werden. Zusätzlich zum Scherstress können große Flüssigkeitstropfen auch zu einer ungleichmäßigen Versorgung der Zellproben mit Nährstoffen führen, da größere Flüssigkeitstropfen auch ein größeres Flüssigkeitsvolumen mit sich führen.

Ohne einen zentralen Spritzschutz ist jedoch zu erkennen, dass Tropfen von mehreren Millimetern Durchmesser nach oben aus dem Ultraschallrüssel katapultiert werden und in parabelförmigen Flugbahnen das gesamte Reaktorvolumen erreichen können (Abb. 15 A-C). Diese Tropfen besitzen aufgrund ihrer Größe und ihrer Geschwindigkeit eine hohe kinetische Energie und können damit die Zellen im Reaktor beschädigen.

Um die Zellproben in der Kultivierungszone vor diesen großen Flüssigkeitstropfen zu schützen, wurde im Nebelkammerreaktor ein zentraler hohlzylinderförmiger Spritzschutz oberhalb des Ultraschallrüssels angebracht (Abb. 15 D-F). Die großen Flüssigkeitstropfen treffen innen auf den Spritzschutz und laufen an diesem herab, sodass die Zellen effektiv vor diesen großen Flüssigkeitstropfen geschützt werden. Es entsteht eine Zerstäubungszone in der Nebel und große Flüssigkeitstropfen auftreten und eine Kultivierungszone in der sich nur Nebel befindet.

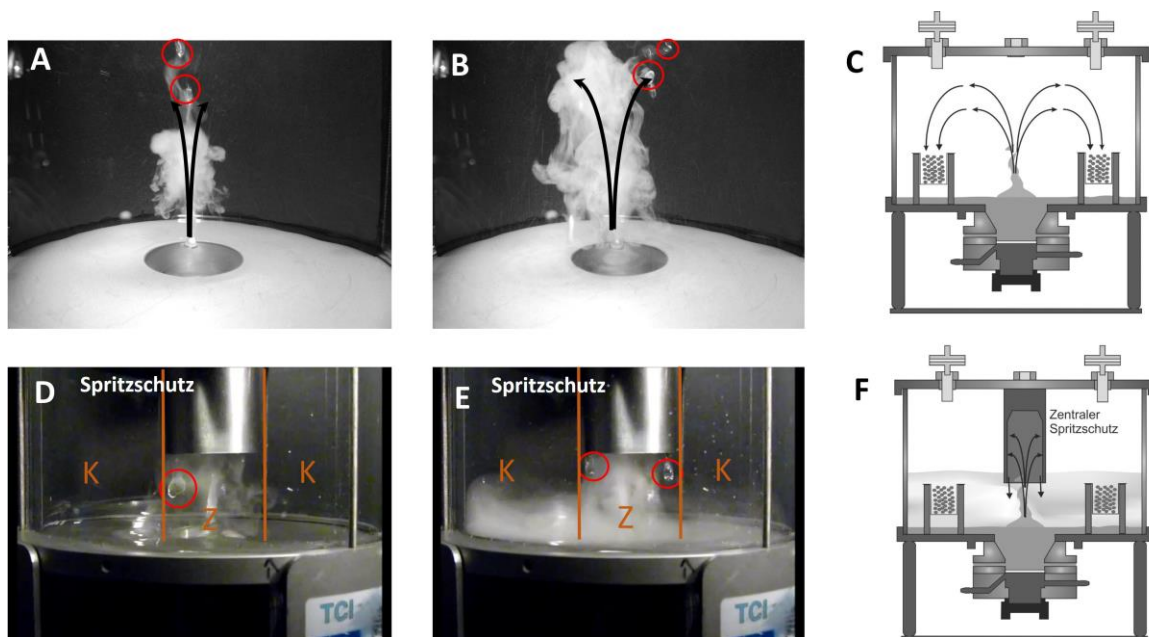


Abb. 15: Fotografische und schematische Darstellung der Ultraschallzerstäubung ohne (A-C) und mit (D-F) zentralem Spritzschutz. Sehr große Flüssigkeitstropfen von mehreren Millimetern Durchmesser sind rot markiert. Diese großen Flüssigkeitstropfen treten mit zentralem Spritzschutz nur in der Zerstäubungszone (Z) und nicht in der Kultivierungszone (K) auf.

Zusätzlich zu diesem zentralen Spritzschutz wurden auch noch ein weiterer Spritzschutz an den Probenständern angebracht (Abb. 16). Dieser Spritzschutz an den Probenhaltern ist besonders bei empfindlichen Zellproben wichtig, da er die Tröpfchengröße weiter verkleinert und für eine noch gleichmäßigere Versorgung mit Nährstoffen führt. Dieses wird mit einem Blick auf die sedimentierten Flüssigkeitstropfen auf die Standard-Probenständer mit und ohne Spritzschutz an den Probenständern deutlich (Abb. 17). Es ist zu erkennen, dass ohne den Spritzschutz einige im Verhältnis sehr große Tropfen mit Durchmessern zwischen 100 und 200 μm auf den Probeständern sedimentieren (Abb. 17 A). Die übrigen Tropfen sind dagegen mit Durchmessern $< 30 \mu\text{m}$ deutlich kleiner. Mit einem zusätzlichen Spritzschutz an den Probenständern ist auf keinem der mikroskopischen Aufnahmen ein großer Tropfen zu erkennen (Abb. 17 B), sodass der Spritzschutz in der Lage ist, das Auftreffen der großen Tropfen auf die Probeständer zu verhindern.

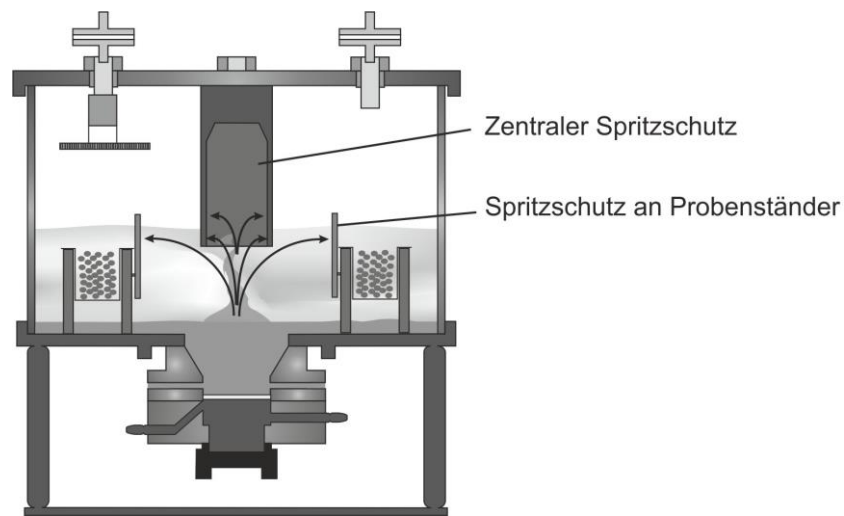


Abb. 16: Darstellung des Nebelkammerreaktors mit zentralem Spritzschutz und Spritzschutz an den Probenständen. Die Pfeile deuten die Flugbahnen der bei der Zerstäubung entstehenden größeren Flüssigkeitstropfen an.

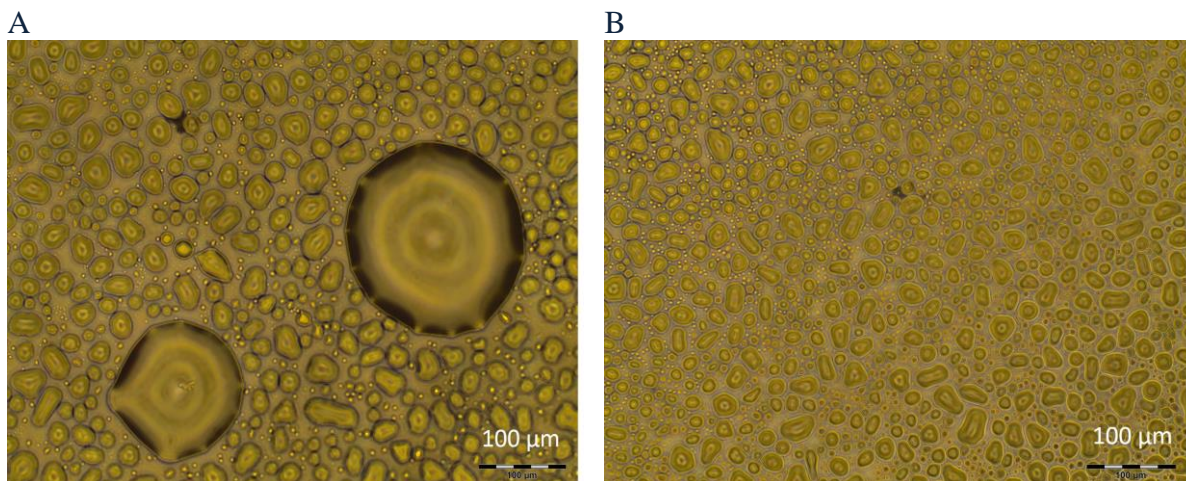


Abb. 17: Mikroskopische Aufnahme von sedimentierten Nebeltropfen auf den Standard-Probenständen ohne (A) und mit (B) zusätzlichem Spritzschutz an den Probenständen.

Insgesamt ist es mit beiden Spritzschutzvorrichtungen möglich in der Kultivierungszone einen Nebel mit kleinen Tröpfchengrößen zu erzeugen und damit eine scherstressarme Kultivierungs-umgebung sowie eine gleichmäßige Nährstoffversorgung den Zellproben zur Verfügung zu stellen.

4.1.6 Aufbau eines Mess- und Regelungssystems

Das Nebelkammerreaktorsystem besteht neben dem Reaktorkörper und dem Zerstäuber auch aus verschiedenen Sensoren, die wichtige Betriebsparameter (z. B. Temperatur, pH-Wert) messen können. Um eine einheitliche Plattform für den Anschluss dieser Sensoren und deren Datenerfassung zu ermöglichen, wurde ein Mess- und Regelungssystem der Firma Delphin mit dem Namen *LogMessage LM200* (Delphin, Bergisch Gladbach) verwendet. Dieses Mess- und Regelungssystem wird im Folgenden mit MRS abgekürzt. Es ist neben der Erfassung und Überwachung der Daten auch in der Lage mit einer entsprechenden Programmierung bei einer Abweichung vom Sollwert eine Regelung der Stellgröße wie zum Beispiel der Temperatur zu übernehmen. Die Betriebsparameter werden dabei über die mitgelieferte Software *ProfiSignal* visualisiert und geregelt.

Im Einzelnen besteht das MRS aus einem Computermodul, das für die Berechnungen zuständig ist, und zwei Messmodulen, an welche die Sensoren angeschlossen werden können. Als Messmodule wurden für unser System ein Analoges Modul (10 Eingänge, 1 Ausgang) und ein digitales Modul (12 Eingänge, 16 Ausgänge) verbaut.



Abb. 18: Foto des verwendeten Mess- und Regelungssystems (MRS). Die Anschlüsse K1 bis K14 können für verschiedene Sensoren verwendet werden.

4.1.7 Entwicklung einer Temperaturregelung

Die Temperatur ist ein wichtiger Betriebsparameter im Nebelkammerreaktor und wird hauptsächlich durch einen Inkubator, in den der Reaktor gestellt wird, bestimmt. Bei der ultraschall-induzierten Zerstäubung tritt jedoch auch thermische Energie auf, welche die Temperatur in dem Reaktor zusätzlich beeinflusst. Diese thermische Energie entsteht sowohl durch das Auf-

heizen des Piezokristalls als auch durch die Kavitationseffekte in dem Ultraschallrüssel während der Zerstäubung. Die Menge der entstehenden Wärme darf dabei die Temperatur in der Kultivierungszone nicht erhöhen und muss daher gegebenenfalls über die Kühlkammer abgeführt werden. Aus diesem Grund wurde zunächst der Einfluss der Zerstäubung auf die Temperatur in der Kultivierungszone untersucht.

In Abb. 19 ist die Temperatur des Nebels während der Zerstäubung ohne ein Kühlsystem bei einer Umgebungstemperatur von 27 °C abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die Temperatur ohne eine aktive Kühlung im Nebelkammerreaktor auf 55 °C ansteigt. Auch mit einem passiven Kühlsystem, bei dem die Kühlflüssigkeit mit Umgebungstemperatur durch die Kühlkammer gepumpt wird, steigt die Temperatur auf über 40 °C. Diese Temperaturen sind zu hoch für eine optimale Kultivierung von Mikroorganismen, Pilzen und tierischen Zellsystemen.

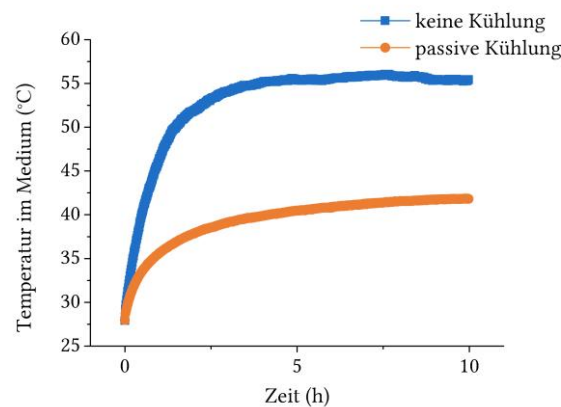


Abb. 19: Darstellung des Temperturverlaufes während der Ultraschallzerstäubung in der Kultivierungszone ohne bzw. mit einer passiven Kühlung.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde sich für ein aktives Kühlsystem entschieden. Hier wird ein regelbares Thermostat an die Kühlkammer angeschlossen. Das Thermostat pumpt Kühlflüssigkeit durch die Kühlkammer und führt damit die Zerstäubungswärme des Piezokristalls ab (Abb. 20). Als Thermostat wurde ein DC 30 (Thermo Haake, Karlsruhe, DE) verwendet. Dieses kann über eine serielle Schnittstelle an einen Computer angeschlossen und geregelt werden. Für die Regelung wird eine Temperaturerfassung in der Kultivierungszone benötigt, welches von einer Pt100-Temperatursonde übernommen wird. Eine zweite Temperatursonde in der Kühlkammer erfasst die Temperatur direkt über dem Piezozerstäuber. Beide Temperatursonden werden an das Mess- und Regelungssystem angeschlossen.

Der Wärmeaustausch aus der Zerstäubungskammer hängt dabei neben der Temperatur des Thermostaten auch von dem Volumenstrom der Kühlflüssigkeit ab. Daher ist zusätzlich ein digitaler

Durchflussmesser und ein Ventil in den Kühlkreislauf eingebaut worden. Die Ermittlung der PID-Regelungsparameter wird im folgenden Kapitel beschrieben.

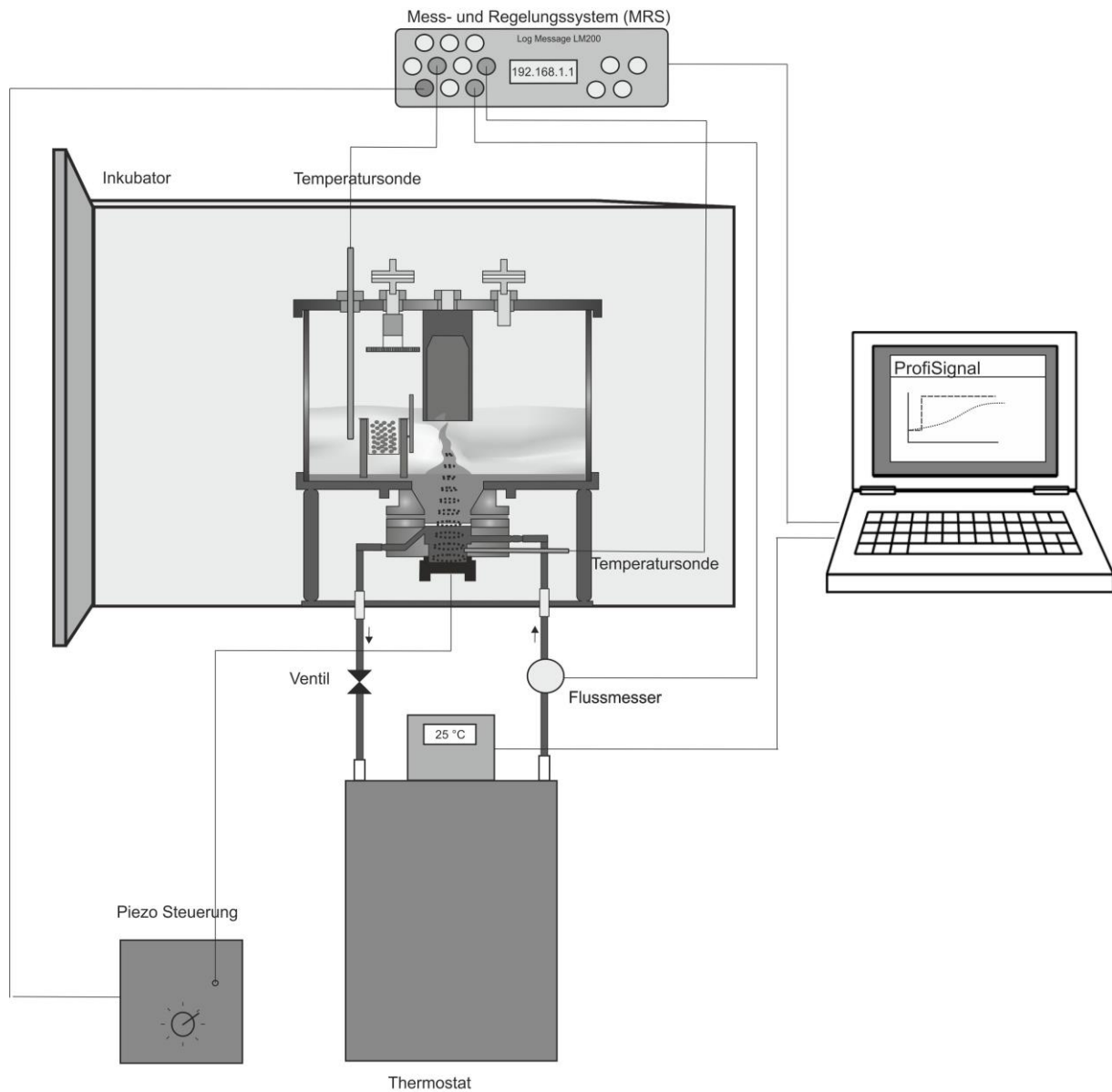


Abb. 20: Darstellung des Temperaturregelungsaufbaus. Grundsätzlich wird die Temperatur im Nebelkammerreaktor durch einen Inkubator eingestellt. Aufgrund der Wärmeentwicklung bei dem Zerstäubungsprozess ist jedoch auch eine Kühlvorrichtung notwendig, welche durch ein Thermostat realisiert wird. Das Thermostat ist dabei mit der Kühlkammer verbunden und führt die entstehende Zerstäubungswärme am Piezokristall ab. Die Erfassung der Temperatur im Reaktor erfolgt mit einer Temperatursonde in der Kultivierungszone und einer Temperatursonde in der Kühlkammer. Ein digitaler Durchflussmesser kann außerdem den Kühlflüssigkeitsstrom überwachen. Sowohl das Thermostat als auch die Temperatursonden und der Durchflussmesser können an das MRS bzw. den PC angeschlossen werden. Die Regelung der Thermostatterperatur wird von der Software ProfiSignal übernommen.

4.1.7.1 Bestimmung und Evaluation der Temperaturregelungsparameter

Wie schon in dem vorherigen Kapitel dargelegt, ist eine Regelung der Temperatur in der Kultivierungszone aufgrund der Wärmeentwicklung beim Zerstäubungsprozess erforderlich. Besonders bei längeren Kultivierungen ist eine manuelle Regelung nicht mehr durchführbar. Daher wurde eine automatische Temperaturregelung für den Nebelkammerreaktor aufgebaut. Als Regelgröße wird die Temperatur in der Kultivierungszone verwendet. Die Stellgröße, welche die Temperatur in der Kultivierungszone beeinflussen kann, ist die Temperatur des Thermostaten. Die Regelung findet bei einem Volumenstrom der Kühlflüssigkeit von 150 mL/min mit dem im Anhang (B.1.1) beschriebenen Schlauchsystem statt.

Bei dem hier aufgebauten Regelungssystem handelt es sich um einen Regelstrecke mit Ausgleich, da nach einer Änderung der Stellgröße die Regelgröße einem Endwert zustrebt. Außerdem sind mehrere Energiespeicher wie zum Beispiel das Schlauchsystem, der Reaktorkörper und die Kühlflüssigkeit vorhanden, sodass es sich um eine Regelung höherer Ordnung handelt. Für solche Regelsysteme ist eine Proportional-, Integral- und Differentialregelung (PID-Regler im Vergleich zu P, I, PI, und PD-Reglern am besten geeignet [69-71].

Ein PID-Regler errechnet aus der Regeldifferenz $e(t)$ (Differenz zwischen Ist-Wert und Soll-Wert) und den Regelparametern den Wert der Stellgröße. Der PID-Regler besteht aus einem proportionalem (P), einem integralen (I) und einem differentialen (D) Anteil, welche entsprechend die drei Regelparameter K_p , T_I und T_D enthalten. Mithilfe dieser Parameter und der Regeldifferenz kann unter Zuhilfenahme von Formel (1) die dimensionslose Stellgröße $x(t)$ berechnet werden:

$$x(t) = \underbrace{K_p * (e(t))}_{\text{P-Anteil}} + \underbrace{\frac{1}{T_I} * \int e(t)dt}_{\text{I-Anteil}} + \underbrace{T_D * \frac{d e(t)}{dt}}_{\text{D-Anteil}} \quad (1)$$

Die Stellgröße wurde dabei auf die Werte zwischen 0 und 1 begrenzt, um ein zu großes Überschwingen des Reglers zu verhindern. Diese dimensionslose Stellgröße kann jedoch nicht direkt als Zieltemperatur für das Thermostat verwendet werden. Daher wurde die Stellgröße $x(t)$ mithilfe des Sollwertes s und der Temperaturgrenzwerte T_{\min} und T_{\max} in eine transformierte Stellgröße $x^*(t)$ umgerechnet (Formel (2)). Diese transformierte Stellgröße entspricht einer Temperatur in dem Temperaturbereich zwischen T_{\min} und T_{\max} und kann daher als Zieltemperatur für das Thermostat benutzt werden.

$$x^*(t) = (T_{max} - T_{min}) * x(t) + T_{min} \quad (2)$$

Die Werte für T_{max} und T_{min} sind von dem Sollwert s abhängig und wurden mit den Formeln (3) und (4) berechnet.

$$T_{max} = s + 8 \quad (3)$$

$$T_{min} = s - 22 \quad (4)$$

Die Bestimmung der drei Regelparameter K_p , T_I und T_D in Formel (1) erfolgte mittels des Wendetangentenverfahren nach Chien, Hrones und Reswik [72] und des T-Summenverfahrens. In beiden Verfahren wird eine Sprungfunktion aufgenommen. Dabei wird die Stellgröße $x(t)$ sprunghaft um den Wert Δx verändert und die Antwort der Regelgröße $y(t)$ aufgezeichnet (Abb. 21). Der Quotienten Δx zu Δy wird Streckenverstärkung K_S genannt.

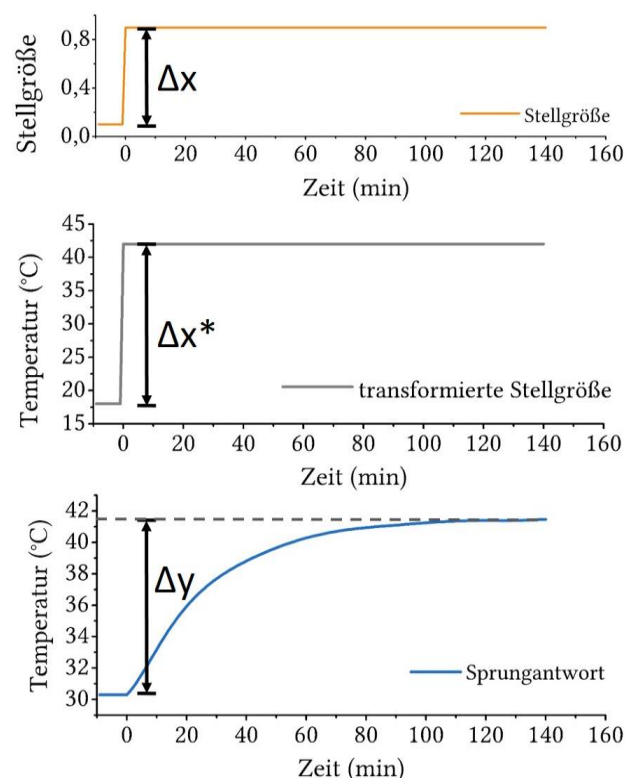


Abb. 21: Darstellung einer Sprungfunktion zur Ermittlung der PID-Regelungsparameter. Für die Sprungfunktion wird die Stellgröße sprunghaft verändert (oben). Der Wertebereich der Stellgröße wurde dabei auf Werte zwischen 0 und 1 begrenzt. Dieser Stellgrößenwertebereich kann dann durch eine entsprechende Transformation in einen Temperaturwertebereich (z. B. 15 -45 °C) umgerechnet werden (mitte). Aus der Antwort der Regelgröße (Temperatur in der Kultivierungszone) können die Regelparameter berechnet werden (unten).

Bei dem Wendetangentenverfahren (WT) wird eine Tangente in dem Wendepunkt der Sprungantwort angelegt. Anhand dieser Wendetangente können, wie in Abb. 22 zu sehen, die Verzugszeit T_u und die Ausgleichszeit T_g bestimmt werden. Mithilfe dieser Parameter und den Formeln in Tabelle 4 können anschließend die Regelparameter K_p , T_I und T_D bestimmt werden. Dabei wird zwischen den Parametersets Führung und Störung unterschieden. Die Regelparameter für die Führung sind für die Führung der Regelgröße optimiert und die Regelparameter für die Störung sind für die Reaktion auf Störungen optimiert. Bei der Temperaturregelung des Nebelkammerreaktors sind sowohl die Führung der Regelgröße wichtig als auch die Reaktion auf Störungen, sodass beide Parametersets evaluiert wurden.

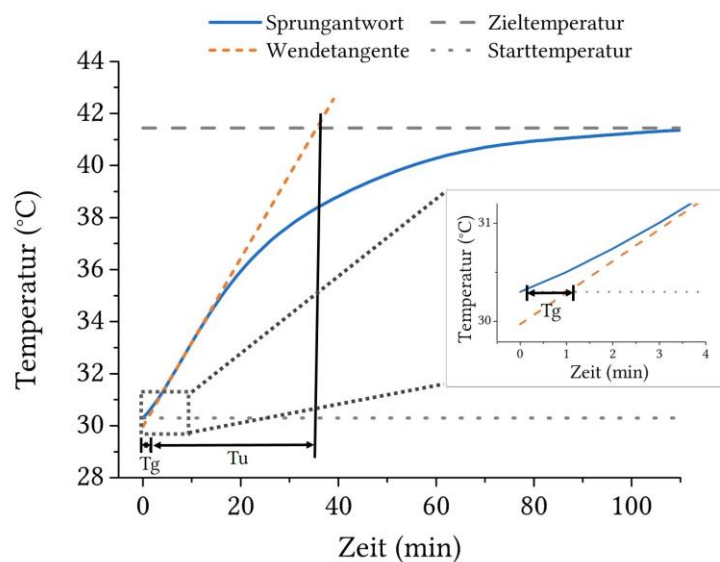


Abb. 22: Bestimmung der PID-Regelparameter mit dem Wendetangentenverfahren. Anhand der Wendetangente können die Verzugszeit T_u und die Ausgleichszeit T_g bestimmt werden.

Tabelle 4: Berechnung der PID-Regelparameter mit dem Wendetangentenverfahren anhand der Verzugszeit T_u und die Ausgleichszeit T_g . Hier können zwischen einem Parameterset, der für die Führung nach einer Sollwertänderung und einem Parameterset, der einen möglichst guten Ausgleich von Störungen liefert, unterschieden werden.

Führung	Störung
$K_p = 0,95 \cdot T_g / (T_u \cdot K_s)$	$K_p = 0,6 \cdot T_g / (T_u \cdot K_s)$
$T_I = 2,4 \cdot T_u$	$T_I = T_g$
$T_D = 0,42 \cdot T_u$	$T_D = 0,5 \cdot T_u$

Bei dem T-Summenverfahren (TS) wird dagegen anstatt der Wendetangente eine Summenzeitkonstante T_Σ bestimmt (Abb. 23). Die Summenzeitkonstante ist der Zeitpunkt an dem die Flächen A1 und A2 in Abb. 23 gleich groß sind. Die Regelparameter K_p , T_I und T_D können anschließend mithilfe der Formeln in Tabelle 5 berechnet werden. Dabei wird zwischen einem für eine normale Regelung optimierten Parameterset und einem Parameterset für eine schnelle Regelung unterschieden. Zusätzlich wurde für das T-Summenverfahren auch noch eine invertierte Sprungfunktion aufgenommen. Invertiert bedeutet, dass eine Sprungfunktion von einer höheren Temperatur zu einer niedrigeren Temperatur aufgenommen worden ist. Dadurch wird nicht die Heizleistung sondern die Kühlleistung des Thermostaten für die Berechnung der Regelparameter berücksichtigt. Die Ergebnisse der PID-Regelparameterbestimmung sind in Tabelle 6 dargestellt.

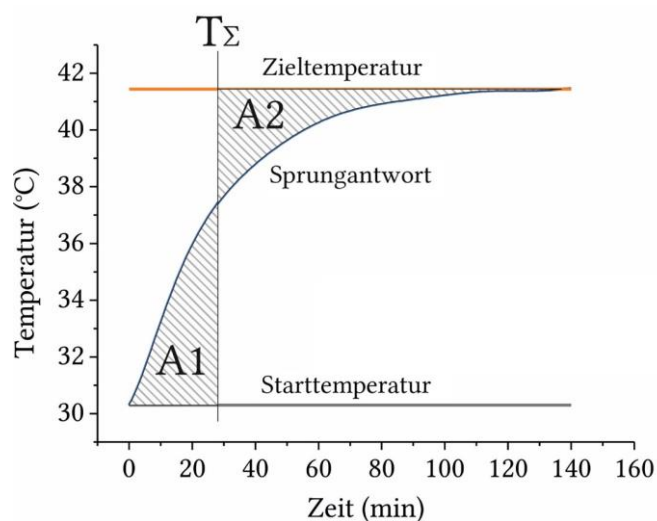


Abb. 23: Bestimmung der PID-Regelparameter mit dem T-Summenverfahren. Die Summenzeitkonstante T_Σ ist in diesem Beispiel definiert als die Zeit an der die Flächen A1 und A2 gleich groß sind. Mithilfe der Summenzeitkonstante können die PID-Regelparameter berechnet werden.

Tabelle 5: Formeln zur Bestimmung der PID-Regelungsparameter nach dem T-Summenverfahren. Hier gibt es einen Parameterset für eine normale Regelung und einen Parameterset für eine schnelle Regelung.

Normale Regelung	Schnelle Regelung
$K_P = 1/K_S$	$K_P = 2/K_S$
$T_I = 0,66 * T_\Sigma$	$T_I = 0,8 * T_\Sigma$
$T_D = 0,167 * T_\Sigma$	$T_D = 0,194 * T_\Sigma$

Tabelle 6: Ergebnisse der PID-Parameterermittlungen mit dem Wendetangentenverfahren (WT) und dem T-Summenverfahren (TS). Bei dem invertierten T-Summenverfahren (TS invertiert) wurde anstatt einer Sprungfunktion in der die Temperatur erhöht wird, die Sprungfunktion mit einer Temperaturerniedrigung aufgenommen.

	WT Führung	WT Störung	TS normal	TS schnell	TS normal in-vertiert	TS schnell invertiert
K_p	1,45	2,29	0,07	0,14	0,07	0,15
T_I (s)	2070,86	147,90	1082,02	1311,54	1556,71	1886,93
T_D (s)	30,81	25,88	273,79	318,05	393,90	457,58

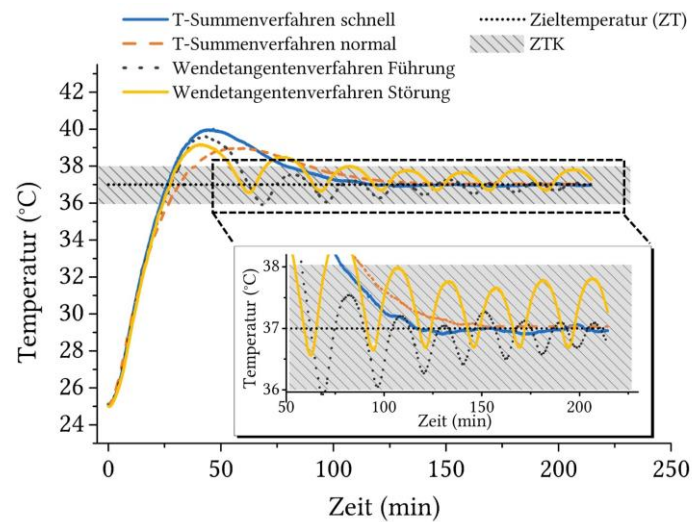
Nach der Bestimmung der Parametersets, wurden die Parametersets für die Regelung der Temperatur im Nebelkammerreaktor evaluiert. Besonders das Aufwärmen des Reaktors von Raumtemperatur auf eine Kultivierungstemperatur von 37 °C ist dabei ein Regelungsproblem, welches häufig auftritt (zu Beginn der Kultivierung und nach jeder Probennahme unter der Sterilbank). Daher wurde dieses Regelungsproblem für die Evaluation der Parametersets verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt.

Als Gütekriterien zur Bewertung der Parameter wurden die Überschwingweite, die Zeit bis zum endgültigen Erreichen des Zieltemperaturkorridors ($ZTK = 37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$) sowie die Stabilität der Regelung verwendet. Die Zeit bis zum endgültigen Erreichen des Zielkorridors wird im Folgenden als Aufwärmzeit bezeichnet. Ein Überblick über die Parameterevaluation gibt Tabelle 7.

Es ist zu erkennen, dass die unterschiedlichen Parametersets ein unterschiedliches Regelverhalten aufweisen. Die Parametersets, die mit dem Wendetangentenverfahren (WT) ermittelt worden sind, erreichen innerhalb von 215 min keine konstante Temperatur, sondern oszillieren um die Zieltemperatur. Dieses weist auf eine instabile Regelung hin. Daher sind diese Parameter als PID-Regelparameter ungeeignet. Die mit dem T-Summenverfahren ermittelten Parameter erreichen alle innerhalb von 215 min eine konstante Zieltemperatur von 37 °C. Unterschiede ergeben sich jedoch in der Überschwingweite und in der Aufwärmzeit. Die Überschwingweite ist bei dem Parameterset *TS normal invertiert* mit 1,4 °C am geringsten. Dafür ist hier eine relativ hohe Aufwärmzeit von 104 min zu finden. Diese Tendenz einer längeren Aufwärmzeit bei geringeren Überschwingweiten ist bei allen Parametersets zu beobachten. Zum Vergleich hat das Parameterset *TS schnell* die höchste Überschwingweite von 3 °C. Dafür liegt die Aufwärmzeit hier bei nur 79 min. Insgesamt ist eine hohe Überschwingweite zu vermeiden, da eine

zu hohe Temperatur das Zellwachstum signifikant beeinträchtigen kann. Daher wurde im Folgenden das Parameterset mit der geringsten Überschwingweite (*TS normal invertiert*) für die PID-Regelung des Nebelkammerreaktors verwendet.

A



B

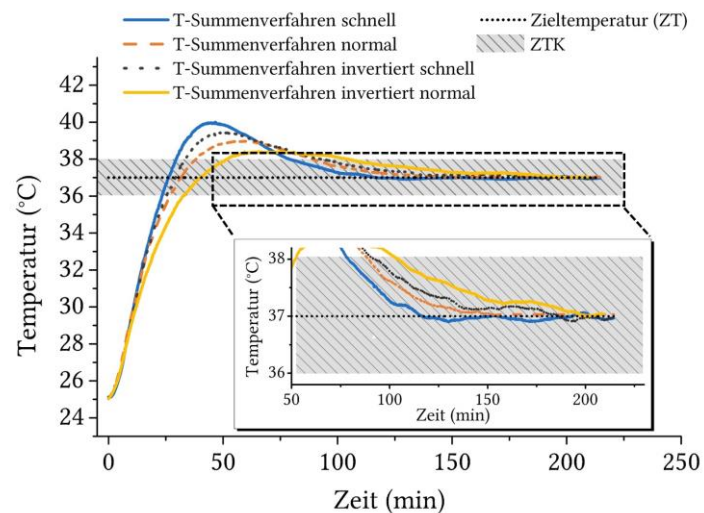


Abb. 24: Evaluation der ermittelten PID-Regelparameter. Zur Evaluation der Regelparameter wurde das Aufwärmverhalten von Raumtemperatur auf 37 °C mit den entsprechenden Parametersets untersucht. In (A) werden die Regelungsverläufe der Parametersätze des T-Summenverfahrens und des Wendetangentenverfahrens verglichen. In (B) werden die Regelungsverläufe der Parametersätze des T-Summenverfahrens verglichen. Bei dem invertierten Parametersätzen wurde eine invertierte Sprungfunktion aufgenommen (sprunghafte Temperaturniedrigung anstatt sprunghafte Temperaturerhöhung). Grau unterlegt ist der Zieltemperaturkorridor (ZTK = Zieltemperatur \pm 1 °C).

Tabelle 7: Ergebnis der Evaluation der ermittelten Parametersets aus den Wendetangentenverfahren (WT) und dem T-Summenverfahren (TS). Als Gütekriterien zur Evaluation der Parametergüte werden die Möglichkeit nach 215 min eine konstante Zieltemperatur zu erreichen, die Zeit bis zum endgültigen Erreichen des Zieltemperaturkorridors (Aufwärmzeit) und die maximale Überschwingweite verwendet.

	WT Führung	WT Störung	TS normal	TS schnell	TS normal invertiert	TS schnell invertiert
Konstante Zieltemperatur nach 215 min erreicht	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Überschwingweite (°C)	2,6	2,2	2,0	3	1,4	2,4
Aufwärmzeit (min)	80	86	89	79	104	92

4.1.8 Entwicklung eines Nebeldichtesensors

Die Zerstäubung und der daraus resultierende Nebel sind die wichtigsten Betriebsparameter im Nebelkammerreaktor. Um diese Parameter beschreiben und charakterisieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Nebeldichtesensor entwickelt.

Das Messprinzip des Nebeldichtesensors basiert auf dem Transmissionslichtprinzip und ist in Abb. 25 dargestellt. Bei diesem Sensorprinzip wird die Abschwächung des Transmissionslichtes durch den Nebel gemessen. Als Lichtquelle wird eine LED mit einer maximalen Intensität im roten, sichtbaren Wellenlängenbereich ($\lambda=660$ nm) verwendet. Die LED befindet sich dabei außerhalb des Reaktors und das austretende Licht wird durch eine Linse gebündelt. Das gebündelte Licht passiert zunächst die Luft zwischen LED und Glasscheibe, dann die Glasscheibe und schließlich den Nebel. Je nach Nebeldichte und Messstrecke wird das Licht entsprechend abgeschwächt und trifft, nachdem es einen Filter passiert hat, auf eine weitere Linse (Kollektorlinse), welche das Licht auf die Detektionsfläche der Fotodiode lenkt. Der Filter mit einer Durchlässigkeit in dem Wellenlängenbereich 650 ± 40 nm minimiert störende Einflüsse des Umgebungslichts. Sowohl die LED als auch die Fotodiode werden durch das Mess- und Regelungssystem (MRS) angesteuert. Die Fotodiode mit Filter können axial und radial zum Reaktor bewegt werden. Dadurch kann die Nebeldichte bei verschiedenen Höhen vermessen und die Messstrecke verändert und optimiert werden.

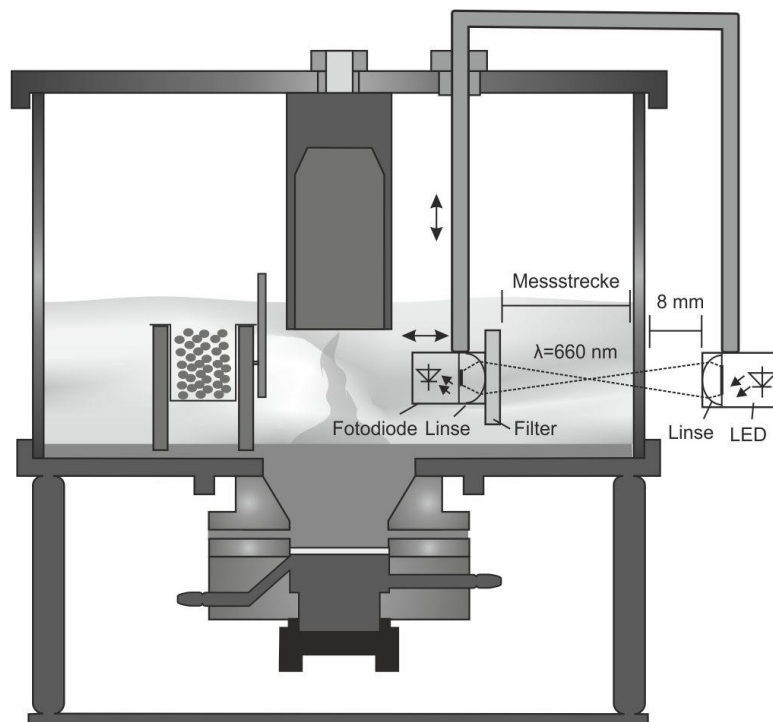


Abb. 25: Schematischer Aufbau des Nebeldichtesensors. Die Höhe des Sensors sowie die Messstrecke sind einstellbar.

Um einen optimalen Aufbau sowie eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Messsignals zu gewährleisten, wurden zunächst grundlegende Sensorparameter wie die Messstrecke und die LED Ansteuerungsstromstärke optimiert. Zusätzlich wurde der Einfluss des Umgebungslichts sowie der Einfluss von Flüssigkeitstropfen auf der Glaswand des Reaktors auf den Sensor als Störgrößen evaluiert. Anschließend wurde der Sensor mithilfe des Trübungsstandards Formazin kalibriert, sodass anstatt der Spannung die Trübungseinheit NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*) als Messgröße verwendet werden kann. Diese Entwicklungen werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.1.8.1 Bestimmung der optimalen Ansteuerungsstromstärke

Die Ansteuerungsstromstärke der LED verändert die Lichtintensität der LED und hat damit einen direkten Einfluss auf das Sensorsignal der Fotodiode. Dabei sollte ohne Nebel im Reaktor die Ansteuerungsstromstärke so gewählt werden, dass das maximale Sensorsignal der Fotodiode (10.000 mV) erreicht wird. Dadurch kann der Messbereich der Fotodiode bestmöglich aus-

genutzt und die größtmögliche Sensitivität des Sensors erreicht werden. Dieses wird ohne Tropfen auf der Glaswand des Reaktors bei einer Ansteuerungsstromstärke von 0,15 mA erreicht (Abb. 26).

Bei der Zerstäubung eines Nährmediums entstehen jedoch mit der Zeit Tropfen auf der Innenseite des Glaszylinders. Diese Tropfen können aufgrund von verschiedenen physikalischen Effekten an der Phasengrenzfläche der Tropfen (Reflexion und Brechung) zu einer zusätzlichen Abschwächung des Lichtes der LED führen. Diese Abschwächung durch die Flüssigkeitstropfen führt dazu, dass ohne Nebel bei 0,15 mA nicht mehr das maximale Sensorsignal erreicht wird (Abb. 26). Dieses muss durch eine Erhöhung der Ansteuerungsstromstärke der LED ausgeglichen werden. Experimentell konnte gezeigt werden, dass mit einer Ansteuerungsstromstärke von 0,24 mA die Abschwächung durch die Tropfen ausgeglichen werden kann und das maximale Sensorsignal von 10.000 mV erreicht wird (Abb. 26).

Insgesamt werden also abhängig vom Experiment entweder 0,15 mA oder 0,24 mA als Ansteuerungsstromstärke benutzt. Bei dem regulären Betrieb mit Nebel treten Tropfen auf der Glasscheibe auf, sodass eine Ansteuerungsstromstärke von 0,24 mA zum Einsatz kommt. Bei der Kalibration mit Formazin (4.1.8.5) dagegen treten keine Tropfen auf der Glasscheibe auf, weil eine Dispersion von Formazin in Wasser verwendet wird. Hier wird eine Stromstärke von 0,15 mA benutzt.

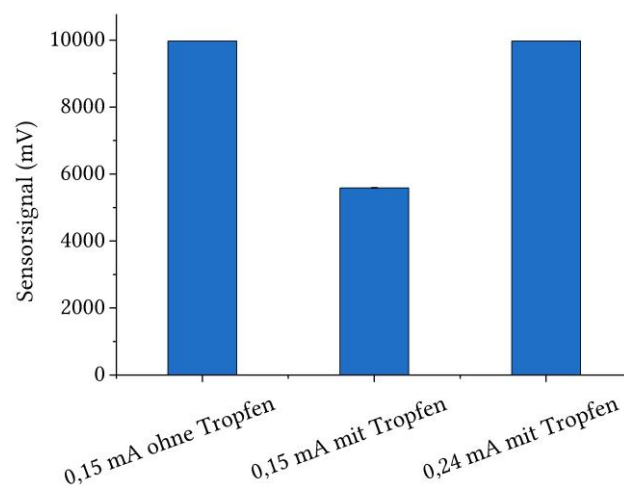


Abb. 26: Einfluss von Tropfen auf der Innenseite der Glasscheibe der Reaktorwand auf das Sensorsignal des Nebel-dichtesensors in Abhängigkeit der LED-Ansteuerungsstromstärke. Um das gleiche Sensorsignal mit Tropfen im Vergleich zu dem Sensorsignal ohne Tropfen zu erhalten, muss eine höhere LED-Ansteuerungsstromstärke von 0,24 mA verwendet werden.

4.1.8.2 Bestimmung einer optimalen Messstrecke

Die Messstrecke hat ebenfalls einen direkten Einfluss auf das Sensorsignal. Je größer die Messstrecke ist, desto mehr Nebel befindet sich zwischen der LED und der Fotodiode und desto größer ist die Abschwächung des LED Lichtes. Bei gleicher Nebeldichte und größerer Messstrecke wird daher ein kleineres Sensorsignal gemessen.

Kleinere Messstrecken haben dabei den Vorteil, dass das Sensorsignal proportional zu der Nebeldichte ist (linearer Zusammenhang). Bei größeren Messstrecken dagegen werden einige Nebeltropfen von anderen verdeckt, sodass z. B. eine Verdopplung der Nebeldichte nicht in einer Verdopplung des Sensorsignals resultiert (exponentieller Zusammenhang). Dadurch verringert sich die Sensitivität des Sensors bei hohen Nebeldichten. Bei dem hier entwickelten Nebeldichtesensor kann jedoch der Nebel bei kleinen Messstrecken nicht gut in den Messbereich eindringen, da der Messbereich und die Nebelerzeugung auf entgegengesetzten Seiten der Fotodiode und des Filter liegen. Dadurch kann es zu einer Abschirmung des Messbereiches durch die Fotodiode und den Filter kommen. Daher sollten keine kleinen Messstrecken verwendet werden. Insgesamt hat sich eine Messstrecke von 20 mm als optimal erwiesen. Hier konnte sowohl eine ausreichende Sensitivität des Sensors gewährleistet, als auch eine Abschirmung durch den Sensor weitestgehend ausgeschlossen werden.

4.1.8.3 Einfluss des Umgebungslichts auf den Nebeldichtesensor

Neben dem von der LED emittierten Licht, detektiert die Fotodiode auch das Umgebungslicht. Um den Anteil des Umgebungslichts am Sensorsignal zu reduzieren, wurde ein Bandpassfilter (Zentralwellenlänge 650 ± 40 nm, FB650-40, Thorlabs, München, Deutschland) vor der Fotodiode angebracht. Die Effekte des Umgebungslichts und des Filters auf das Sensorsignal sind in Abb. 27 dargestellt. Dafür wurde das Sensorsignal bei verschiedenen Ansteuerungsstromstärken der LED mit und ohne Umgebungslicht gemessen und daraus der Anteil des Umgebungslichtes am Sensorsignal bestimmt.

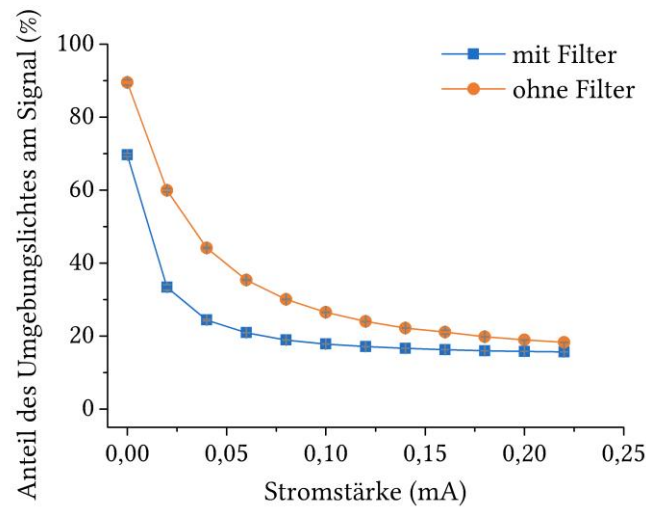


Abb. 27: Anteil des Umgebungslichtes am Sensorsignal in Abhängigkeit der Ansteuerungsstromstärke der LED.

Es ist zu erkennen, dass gerade bei niedrigen Ansteuerungsstromstärken der LED ein großer Effekt des Umgebungslichts auf das Sensorsignal vorhanden ist. Mit dem Filter ist der Anteil des Umgebungslichts am Gesamtsignal jedoch deutlich niedriger als ohne. Bei höheren Ansteuerungsstromstärken nähern sich beide Werte einander an, sodass bei dem dargestellten Experiment bei 0,22 mA mit und ohne Filter ungefähr 20 % des Gesamtsignals auf das Umgebungslicht entfallen. Dieser Anteil kann jedoch in Abhängigkeit der Umgebungslichtsituation variieren.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Umgebungslicht bei allen Ansteuerungsstromstärken einen signifikanten Einfluss auf das Sensorsignal hat. Dieser Einfluss ist bei niedrigen Ansteuerungsstromstärken der LED besonders deutlich und kann durch einen Filter abgemildert, jedoch nicht beseitigt werden. Der Sensor sollte daher nicht mit niedrigen Ansteuerungsstromstärken $< 0,15$ mA betrieben werden.

Zusätzlich muss eine Normierung des Sensors auf das Umgebungslicht vor jedem Messprozess durchgeführt werden. Dabei wird das Sensorsignal ohne Nebel bei ausgeschalteter LED gemessen und von dem Sensorsignal abgezogen. Dadurch wird die Vergleichbarkeit von Messungen bei unterschiedlichen Umgebungslichtbedingungen gewährleistet. Bei längeren Messungen bei denen eine Veränderung des Umgebungslichtes zu erwarten ist, sollte in regelmäßigen Zeitabständen die Normierung wiederholt werden.

4.1.8.4 Einfluss von Tropfen an der Glaswand auf den Nebeldichtesensor

Zusätzlich zu dem Umgebungslicht wurde auch der Einfluss von Tropfen an der Glaswand des Reaktors auf das Sensorsignal als Störfaktor evaluiert. Wie schon erwähnt, muss aufgrund der Tropfen auf der Glasscheibe die Ansteuerungsstromstärke angepasst werden, um mit und ohne Tropfen die gleiche Lichtintensität an der Fotodiode zu realisieren. Die Tropfen an der Glasscheibe unterliegen jedoch auch einer Veränderung während der Zerstäubung: Mit zunehmender Zerstäubungsdauer nehmen sie an Größe zu bis sie schließlich an der Glasscheibe herablaufen. Diese Veränderung kann einen Einfluss auf das Sensorsignal haben und wurde daher untersucht.

Dafür wurde Wasser im Reaktor über einen Zeitraum von 14 h zerstäubt und das Sensorsignal kontinuierlich aufgezeichnet. Während dieser Zeit bildeten sich ständig Wassertropfen innen an der Glasscheibe und flossen daran ab. Der Einfluss der sich verändernden Wassertropfen an der Glasscheibe auf den Strahlengang des Nebeldichtesensors konnte anhand des Sensorsignals untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 dargestellt. Sie zeigen, dass der Sensor über den gesamten Zeitraum ein gleichmäßiges Signal liefert. Der Einfluss der sich verändernden Nebeltropfen auf das Sensorsignal ist in der Summe daher gleich, sodass ein gleichmäßiges Sensorsignal während der Zerstäubung erreicht werden kann.

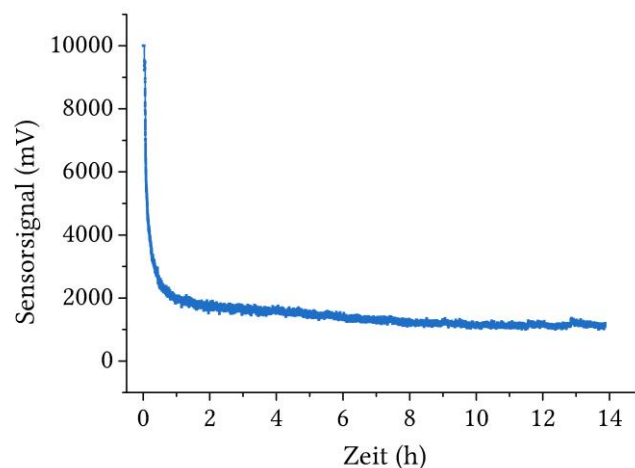


Abb. 28: Einfluss von Tropfen auf das Signal des Nebeldichtesensors bei einer Zerstäubung über 14 h.

4.1.8.5 Kalibration des Nebeldichtesensors mit Formazin

Die Kalibration des Nebeldichtesensors erfolgte mittels einer unzerstäubten Formazindispersion im Nebelkammerreaktor mit den zuvor bestimmten Sensorparametern (Ansteuerungsstromstärke: 0,15 mA, Messstrecke: 22 mm). Dafür wurde die Formazindispersion mit bekannter Trübung in den Reaktor gegeben und das Sensorsignal des Nebeldichtesensors aufgezeichnet. Formazin ist ein anerkannter Standard für Trübungsmessungen und die dazugehörige Einheit ist NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*). Durch die Kalibration wird das Sensorsignal auf einen externen Standard (Formazin) bezogen, sodass die Vergleichbarkeit zwischen den Experimenten erhöht wird. Es können zum Beispiel Veränderungen des Sensors aufgrund von Alterungserscheinungen der LED oder der Fotodiode durch eine erneute Kalibration identifiziert und ausgeglichen werden.

Für die Kalibration des Nebeldichtesensors wurde das Sensorsignal bei verschiedene Formazin-Verdünnungsstufen mit einer bekannten Trübung in NTU aufgezeichnet. Diese Kalibration ist in Abb. 29 A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ein exponentieller Zusammenhang zwischen dem Sensorsignal in mV und der Trübungseinheit in NTU besteht. Durch eine Ausgleichsfunktion wurde der folgende mathematische Zusammenhang beider Größen gefunden:

$$U_S = 490,26 + 9271,83 * e^{(-0,00483 * T_{NTU})} \quad (5)$$

mit

U_S : Sensorsignal in mV

T_{NTU} : Trübung in NTU

Der Fehler der Kalibration ist mit einem RMSEC (*Root Mean Square Error of Calibration*) von 1,3 % des maximalen Sensorsignals (132 mV) niedrig. Auch die regulären Residuen sind gleichmäßig über den Messbereich verteilt, sodass es zu keinem systematischen Fehler in bestimmten Abschnitten des Messbereiches kommt (Abb. 29 B). Die Kalibration wird daher als geeignet für die Bestimmung der Nebeldichte in NTU angesehen werden und wurde für die folgenden Experimente verwendet. Hierbei ist zu beachten, dass aufgrund der exponentiellen Kalibration die Sensitivität über den Messbereich verschieden ist (Abb. 29 C). Aus diesem Grund ist das Messrauschen bei höheren Nebeldichten größer als bei niedrigeren Nebeldichten. Mit einer relativen Standardabweichung von ca. 2 % und einer relativen maximalen Abweichung vom Mittelwert von ca. 6,5 % (25 NTU) ist das Messrauschen jedoch auch bei einer hohen Nebeldichte von 400 NTU gering. Die Präzision des Sensors ist also ausreichend, um

die Nebeldichte zu bestimmen. Eine Darstellung des Zerstäubungsprozesses mit steigender Nebeldichte und dem entsprechenden Sensorsignal in mV und der Trübung in NTU ist in Abb. 29 D zu sehen. Im Folgenden wird basierend auf dieser Kalibration die Nebeldichte in der Trübungseinheit NTU angegeben.

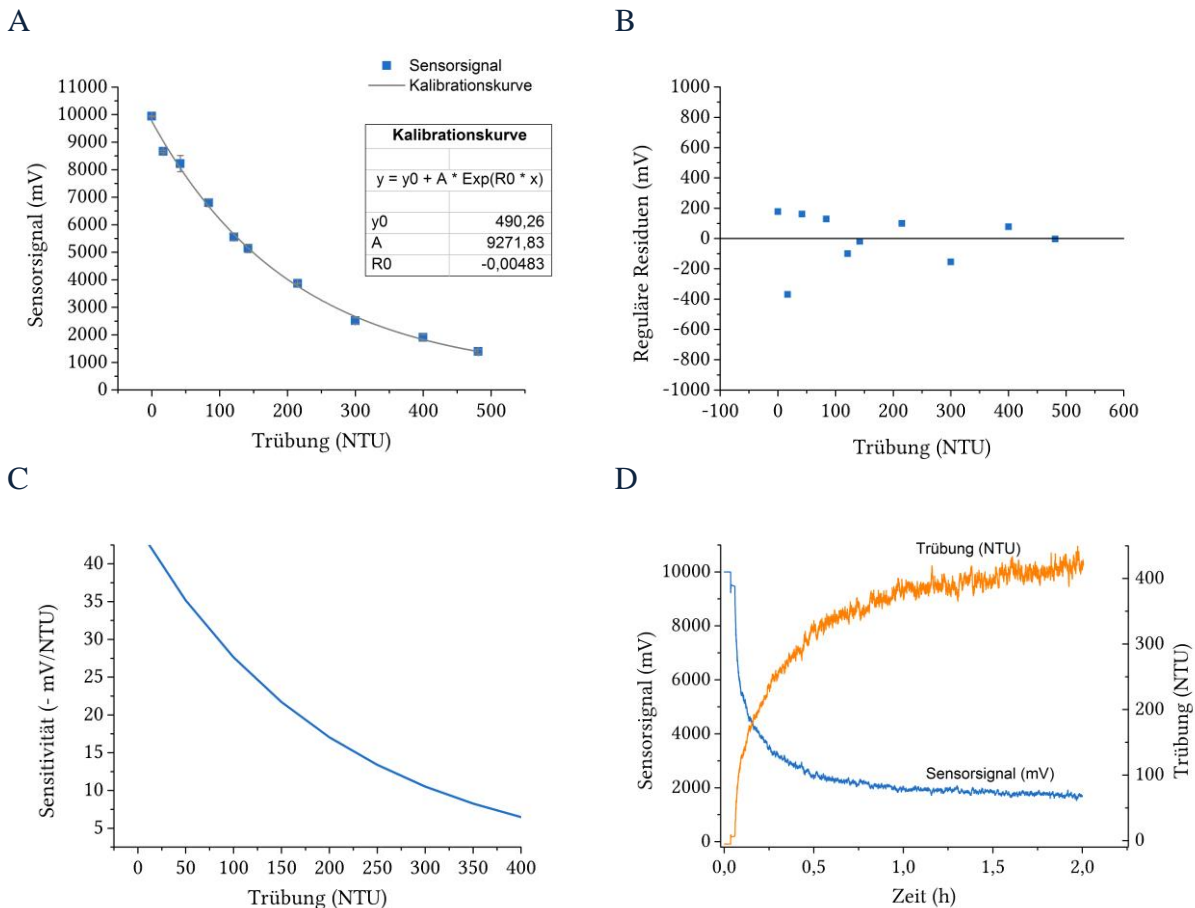


Abb. 29: Darstellung der Kalibration des Nebelsensors mit Formazin. In (A) und (B) sind die Kalibrationskurven und die dazugehörigen regulären Residuen abgebildet. Die Sensitivität in Abhängigkeit der Nebeldichte ist in (C) und der Zusammenhang zwischen dem Sensorsignal in mV und der Trübung in NTU ist in (D) zu sehen.

4.1.9 Entwicklung eines Begasungssystems

Bei aeroben Prozessen wird aufgrund des Energiestoffwechsels der Zellen während der Kultivierung Sauerstoff verbraucht. Der Nebelkammerreaktor ist jedoch luftdicht verschlossen, um das Eindringen von Kontaminanten wie Bakterien zu verhindern. Daher muss entweder im Reaktorraum genügend Sauerstoff für den Stoffwechsel der Zellen vorhanden sein oder durch eine geeignete Begasung ein Luftaustausch im Reaktor stattfinden. Zusätzlich benötigen einige Zell-

systeme wie zum Beispiel Säugetierzellen eine mit Kohlenstoffdioxid angereicherte Atmosphäre (CO_2 -Gehalt $> 5\%$), um optimal wachsen zu können. Das Begasungskonzept des Nebelkammerreaktors sollte daher sowohl eine ausreichende Sauerstoffversorgung als auch eine Möglichkeit zum Einstellen einer Kohlenstoffdioxid-angereicherten Atmosphäre umfassen.

Bei dem in dieser Arbeit entwickelten Begasungssystem wird der Reaktor in einen Inkubator mit definiertem Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalt gestellt. Zur Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid wird die Inkubatorluft mittels einer Pumpe in den Reaktor geleitet. Dadurch kann ein hoher Luftaustausch gewährleistet und je nach Bedürfnissen des Zellsystems verschiedene Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidkonzentrationen im Nebelkammerreaktor eingestellt werden. Der Aufbau dieses Begasungssystems ist in Abb. 30 dargestellt. Der Volumenstrom der Begasung wurde durch ein Gasflussmesser gemessen und mithilfe eines Ventils eingestellt. Dabei verhinderte eine Ablenkplatte das direkte Auftreffen des Luftstroms auf den Nebel, wodurch eine Verwirbelung und, wie in Abb. 31 gezeigt, auch der Austrag des Nebels aus dem Reaktor verhindert wurde. Zwei Sterilfilter am Begasungseingang und am Begasungsausgang gewährleisteten während der Begasung die Sterilität im Reaktor.

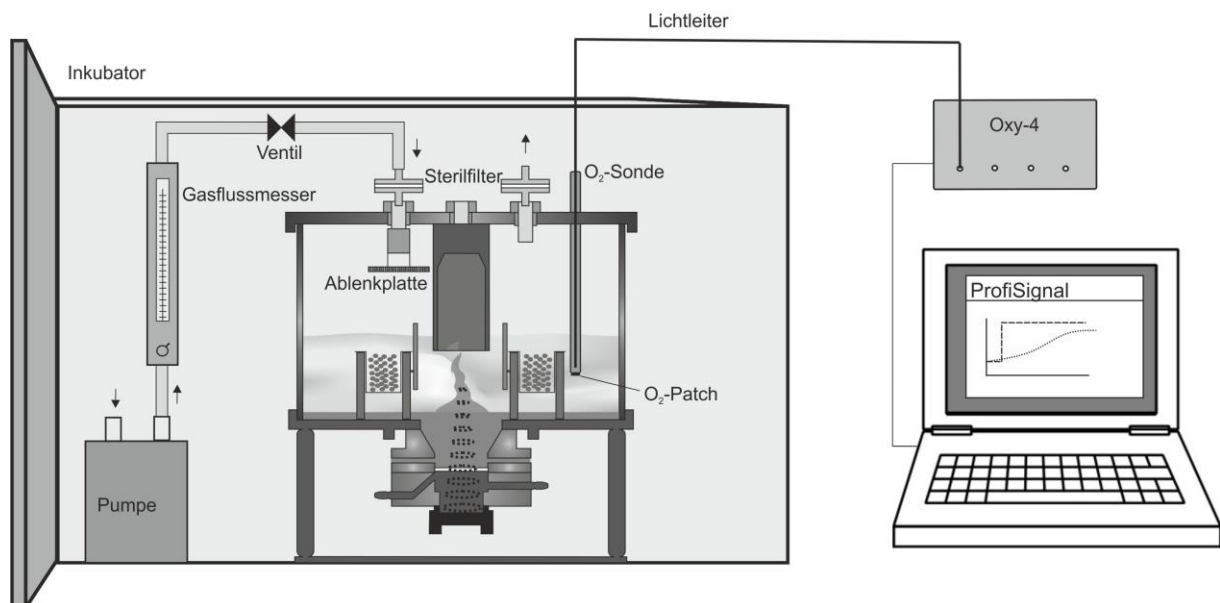


Abb. 30: Schematische Darstellung des Begasungssystems und der Sauerstoffmesstechnik.

Der Sauerstoffgehalt im Reaktor wurde mit dem Oxy4-System der Firma PreSens (PreSens, Regensburg, DE) bestimmt. Bei diesem Sensor wird ein Sensorspot mit einem sauerstoffsensitiven Fluoreszenzfarbstoff (O₂-Patch) in den Reaktorinnenraum eingebracht und mit Licht über einen Lichtleiter angeregt. Trifft ein Sauerstoffmolekül auf ein angeregtes Farbstoffmolekül des

Sensorspots kommt es zu einer Fluoreszenzlöschung (Dynamic Quenching). Diese Fluoreszenzlöschung ist abhängig von der Sauerstoffkonzentration und wird mittels eines Detektors in der Sensorsteuerung bestimmt.

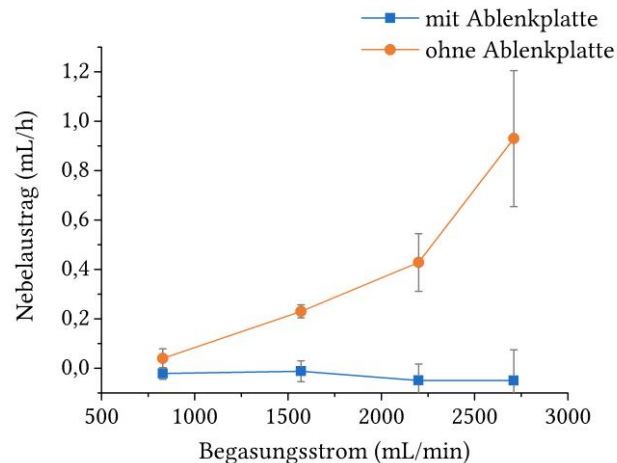


Abb. 31: Evaluation einer Begasung mit und ohne Ablenkplatte. Dargestellt ist der Nebelaustrag in Abhängigkeit des Begasungsstroms. Bei der Begasung sollte ein Nebelaustrag soweit wie möglich vermieden werden.

4.1.10 Überblick über den Aufbau des Nebelkammerreaktorsystems

In diesem Kapitel wurde ein Nebelkammerreaktorsystem bestehend aus dem Nebelkammerreaktorkörper mit Zellprobenständern, einem Mess- und Regelungssystem (MRS), einer Temperaturregelung sowie einem Sensor- und Begasungssystem entwickelt. Ein Überblick über den Aufbau des Nebelkammerreaktorsystems mit dem Reaktorkörper und allen Sensoren und peripheren Geräte ist in Abb. 32 dargestellt. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Geräten und Sensoren kann der pH-Wert mithilfe des fluoreszenzbasierten Sensors pH-mini (PreSens, Regensburg, DE) anstatt des in 4.1.9 beschriebenen Oxy-4 derselben Firma bestimmt werden.

In den folgenden Kapiteln wird der entwickelte Nebelkammerreaktor technisch, chemisch und biologisch charakterisiert.

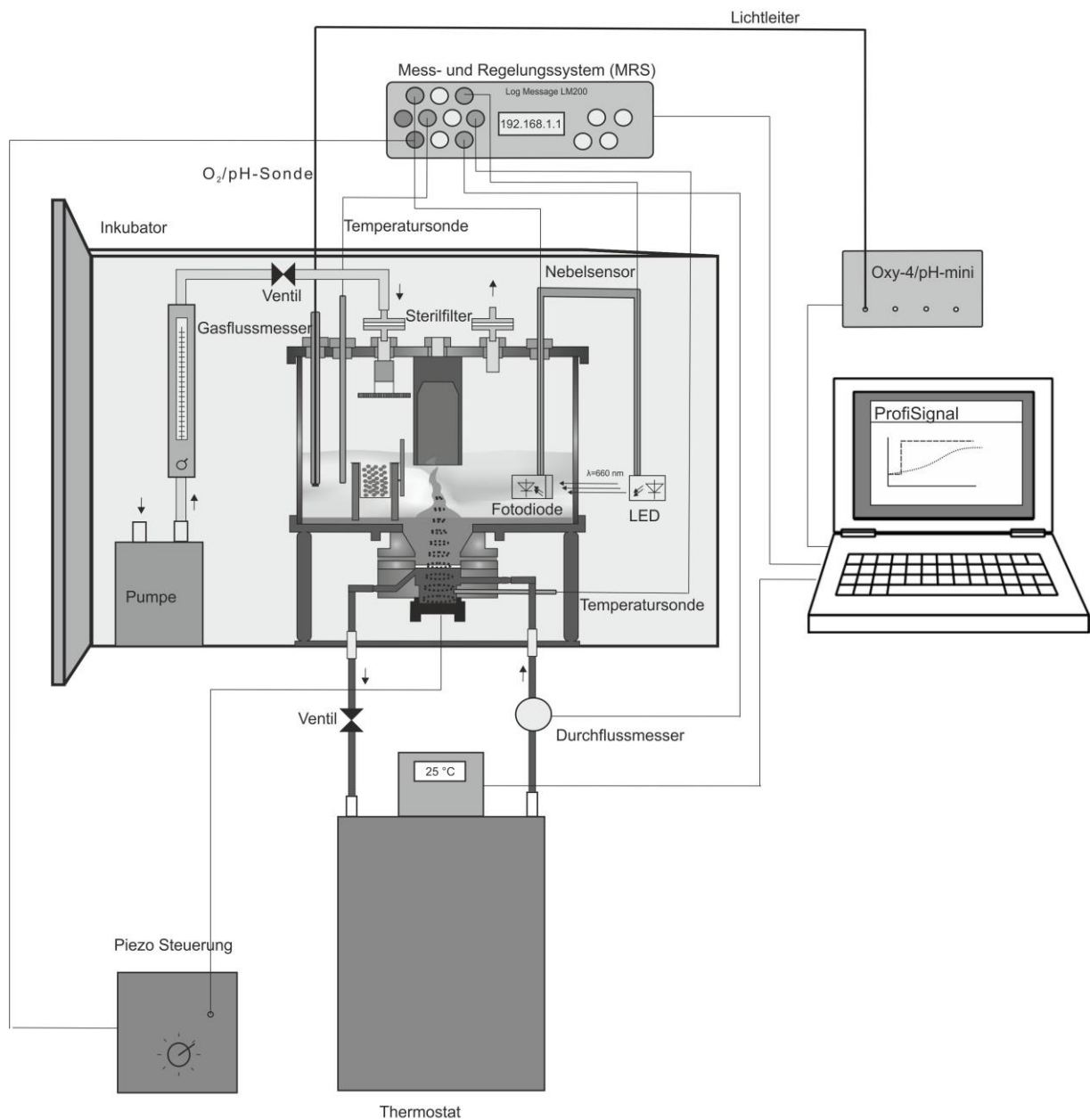


Abb. 32: Überblick über das Nebelkammerreaktorsystem. Das Nebelkammerreaktorsystem besteht aus dem Nebelkammerreaktorkörper mit Zellprobenständern, einem Mess- und Regelungssystem (MRS) mit verschiedenen Sensoren (Temperatur, Nebeldichte, Sauerstoff, pH-Wert), einem Kühlsystem, sowie einem Begasungssystem.

4.2 Technische Charakterisierung

In diesem Kapitel wird das zuvor entwickelte Nebelkammerreaktorsystem technisch charakterisiert. Dafür werden zunächst wichtige Zerstäubungsparameter bestimmt, die einen Einfluss

auf die Menge an Flüssigkeit haben, die mit dem Zerstäuber vernebelt werden kann (Zerstäuberleistung). Dadurch ist es möglich eine reproduzierbare Zerstäubung zu erreichen und die maximale Zerstäuberleistung im Nebelkammerreaktor zu bestimmen. Anschließend wird der entstehende Nebel charakterisiert und die Nährstoffversorgung evaluiert. Zu der Charakterisierung des Nebels gehört eine Analyse der Nebelausbreitung, der Nebeltröpfchengröße sowie die Bestimmung der Nebelaufbauzeit, der Nebeldichteverteilung in Abhängigkeit der Höhe und der Sedimentationsrate auf einen Probenständer. Diese Untersuchungen geben einen Einblick in die Kultivierungsbedingungen im Nebel. Zusätzlich wird die Versorgung des Nebelkammerreaktors mit Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid evaluiert und die Mischzeit von gelösten Mediumbestandteilen im Mediumreservoir und im Nebel bestimmt. Abschließend wird untersucht ob eine homogene Temperaturverteilung innerhalb des Reaktorsystems erreicht werden kann.

4.2.1 Charakterisierung der Zerstäubung

4.2.1.1 Bestimmung der optimalen Zerstäubungsparameter

Eine optimale Zerstäubung des Nährmediums ist die Voraussetzung für eine effiziente Versorgung der Zellen im Nebelkammerreaktor mit Nährstoffen. Als wichtige Parameter, die einen Einfluss auf den Zerstäubungsprozess haben, wurden in dieser Arbeit das Füllvolumen, die Temperatur in der Kühlkammer, Gasblasen in der Kühlkammer und der Volumenstrom der Kühlflüssigkeit identifiziert. Im Folgenden wird der Einfluss dieser Zerstäubungsparameter auf die Nebeldichte untersucht und daraus Zerstäubungsparameter bestimmt, mit denen die höchstmögliche Nebeldichte und damit die bestmögliche Zerstäuberleistung ($\mu\text{L}/\text{min}$) erreicht werden kann.

Die Abhängigkeit der Nebeldichte vom Füllvolumen des Reaktors ist in Abb. 33 A für Wasser als Medium dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei zunehmendem Füllvolumen die Zerstäuberleistung und damit auch die Nebeldichte abnehmen. Im Vergleich zu einem mit 50 mL Medium gefüllten Reaktor, kann bei einem Füllvolumen von 250 mL eine um 100 NTU geringere Nebeldichte gemessen werden. Die Abnahme der Nebeldichte bei höheren Füllvolumina lässt sich durch den größeren Abstand der Mediumoberfläche vom Zerstäuber begründen. Mit zunehmendem Abstand zwischen Mediumoberfläche und Zerstäuber verlieren die Kompressionswellen des Zerstäubers Energie, sodass die Nebeldichte abnimmt.

Die höchste Nebeldichte wird demnach bei einem Füllvolumen von 50 mL erreicht. Dieses Füllvolumen ist jedoch für die Durchführung einer Kultivierung ungeeignet, da während der Kultivierung der Flüssigkeitsverlust im Mediumreservoir mitberücksichtigt werden muss. Dieser Flüssigkeitsverlust im Medienreservoir entsteht durch die Bildung von Flüssigkeitstropfen an der Reaktorwand. Dieses hat zur Folge, dass die Flüssigkeitsmenge im Mediumreservoir mit der Zeit abnimmt, sodass nicht genug Flüssigkeit für die Zerstäubung zur Verfügung steht. Bei Langzeitkultivierungen haben sich daher Füllvolumina < 100 mL als ungeeignet erwiesen. Somit wurden 100 mL Füllvolumen für die folgenden Experimente als Standardbedingung definiert.

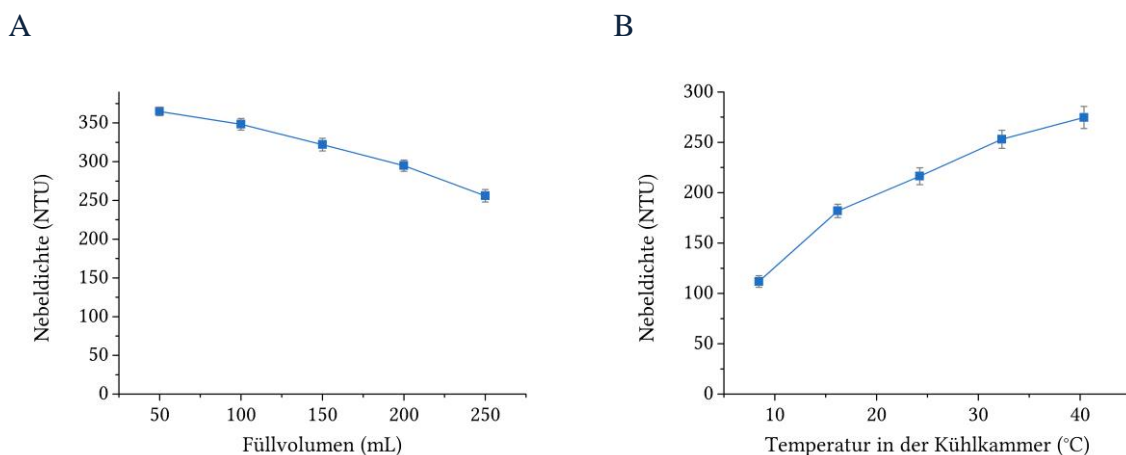


Abb. 33: Evaluation der Zerstäubungsparameter Füllvolumen und Temperatur. Dargestellt ist die Nebeldichte in Abhängigkeit des Füllvolumens (A) und der Temperatur in der Kühlflüssigkeit (B).

Als weiteren Zerstäubungsparameter, der die Nebeldichte beeinflusst, wurde die Temperatur in der Kühlkammer identifiziert. Diese kann die Schwingungseigenschaften der Piezokeramik verändern und somit die Zerstäubung bzw. die Nebeldichte beeinflussen. Die Abhängigkeit der Nebeldichte von der Kühlkammertemperatur ist in Abb. 33 B dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Nebeldichte bei einem Temperaturanstieg von 8 °C auf 40 °C in der Kühlkammer um ~ 160 NTU zunimmt. Die Temperatur in der Kühlkammer hat also einen erheblichen Einfluss auf die Nebeldichte und sollte daher während der Zerstäubung möglichst konstant gehalten werden. Eine konstante Temperatur in der Kühlkammer wird in Abhängigkeit der Ansprüche des Zielorganismus durch das geregelte Kühlsystem des Reaktors gewährleistet. Um zum Beispiel eine Kultivierung bei 37 °C in der Kultivierungszone durchführen zu können, ist bei einem Volumenstrom der Kühlflüssigkeit von 150 mL/min eine Temperatur von ~ 34 °C in der Kühlkammer erforderlich.

Zusätzlich zum Füllvolumen und der Kühlkammertemperatur können auch Gasblasen in der Kühlkammer die Nebeldichte beeinflussen. Diese entstehen vermutlich aufgrund von einem ultraschallinduzierten Ausgasen der Kühlflüssigkeit unterhalb der Trennfolie und behindern die Weiterleitung der Kompressionswellen und damit auch die Zerstäubung. Normalerweise werden die entstehenden Gasblasen zusammen mit der Kühlflüssigkeit durch den Ausgang der Kühlkammer ausgetragen. Es ist jedoch möglich, dass einige Gasblasen in der Kühlkammer verbleiben und die Zerstäubung beeinträchtigen. Das Auftreten der Gasblasen kann durch eine Reinigung der Trennfolie vor der Zerstäubung vermieden werden.

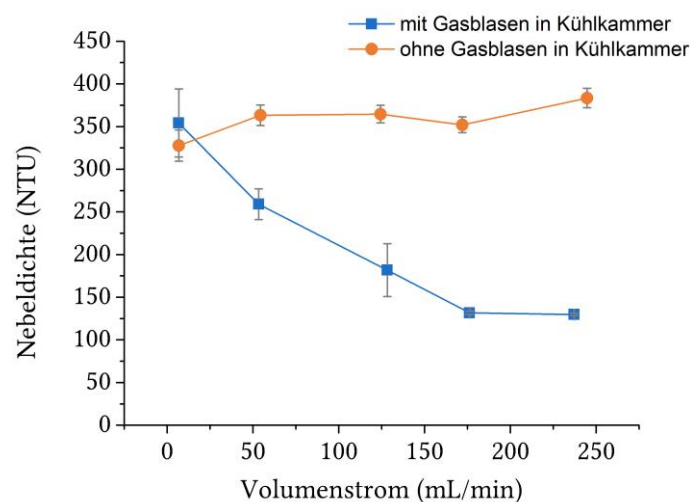


Abb. 34: Nebeldichte in Abhängigkeit des Volumenstroms der Kühlflüssigkeit mit und ohne Gasblasen in der Kühlkammer.

Außerdem wurde der Einfluss des Volumenstroms der Kühlflüssigkeit auf die Nebeldichte untersucht. Wie in Abb. 34 zu sehen, konnte ohne Gasblasen in der Kühlkammer kein wesentlicher Einfluss des Volumenstroms auf die Zerstäubung festgestellt werden. Bei niedrigen Volumenströmen (< 150 mL/min) ist jedoch die Kühlleistung des Kühlsystems unzureichend. Es wurde daher ein Volumenstrom von 150 mL/min als Standard-Betriebsbedingung festgesetzt. Bei der Anwesenheit von Gasblasen in der Kühlkammer war jedoch bei höheren Volumenströmen der Kühlflüssigkeit eine deutlich niedrigere Nebeldichte zu erkennen. Auf diese Weise können Gasblasen in der Kühlkammer detektiert werden. Ist also eine Erhöhung der Nebeldichte bei Verminderung des Volumenstroms der Kühlflüssigkeit zu erkennen, so sollte die Trennfolie gereinigt werden, um die Ablagerung unerwünschter Gasblasen zu vermeiden. Auf diese Weise kann eine effiziente Zerstäuberleistung gewährleistet werden.

4.2.1.2 Maximale Zerstäuberleistung, Nebelmenge und Nebeldichte

Unter Verwendung der in 4.2.1.1 ermittelten Standard-Zerstäubungsparameter, kann die maximale Nebelmenge (μL), Zerstäuberleistung ($\mu\text{L}/\text{min}$) und Nebeldichte (NTU) im Reaktor bestimmt werden. Die Nebelmenge ist das Flüssigkeitsvolumen das zu einem bestimmten Zeitpunkt als Nebel vorliegt. Die Zerstäuberleistung beschreibt die Flüssigkeitsmenge, die in einer bestimmten Zeit zerstäubt wird.

Die Bestimmung der maximalen Zerstäuberleistung erfolgte durch die Messung der Gewichtsänderung des Reaktors, während mit einem hohen Begasungsstrom der produzierte Nebel aus dem Reaktor geblasen wird. Die Nebelmenge im Reaktor wurde auf die gleiche Weise bestimmt, wobei hier der Zerstäuber ausgeschaltet war, sodass nur der bereits im Reaktor enthaltene Nebel ausgetragen wurde.

Als Ergebnis wurde eine maximale Zerstäuberleistung von $527 \pm 50 \mu\text{L}/\text{min}$ und eine maximale Nebelmenge von $44 \pm 32 \mu\text{L}$ im Nebelkammerreaktor ermittelt. Diese Zerstäuberleistung und Nebelmenge resultiert in einer maximalen Nebeldichte von 400 NTU. Diese Ergebnisse zeigen, dass die gesamte Kultivierungs- und Zerstäubungszone mit einem Volumen von 0,7 L mit nur sehr wenig Medium ($44 \mu\text{L}$) benebelt werden kann. Dieses führt zu einem geringen Mediumverbrauch und damit auch zu einer ressourcenschonenden Betriebsweise. Mit einer Verkleinerung des Mediumreservoirs könnte der Mediumverbrauch zukünftig auch noch weiter verringert werden.

4.2.2 Charakterisierung des Nebels

Im Nebelkammerreaktor werden die Nährstoffe über kleine Nebeltropfen zu den Zellen transportiert. Der Nebel ist damit für Nährstoffversorgung im Nebelkammerreaktor essentiell und wird im Folgenden charakterisiert. Die Nährstoffversorgung der Zellen über einen Nebel hat jedoch auch einen Nachteil. So könnte je nach Geschwindigkeit und Größe der Nebeltropfen Scherstress auf die Zellen ausgeübt werden. Daher wird der Nebel zunächst mittels einer Analyse der Nebelausbreitung und der Bestimmung einer Größenverteilung hinsichtlich der Nebeltröpfchen-Geschwindigkeiten und -Größen untersucht. Anhand dieser Daten kann der Scherstress auf die Zellen im Nebelkammerreaktor abgeschätzt werden.

Zur Untersuchung der Nährstoffversorgung über den Nebel, wurde die Nebelaufbauzeit, die Nebeldichte in Abhängigkeit der Höhe über dem Reaktorboden und die Sedimentationsrate auf

einem Standard-Probenständer bei verschiedenen Nebeldichten untersucht. Die Nebelaufbauzeit und die Nebeldichte geben dabei Auskunft über die zeitliche und räumliche Verteilung der Nährstoffe im Nebel. Die Sedimentationsrate dagegen zeigt, wieviel Flüssigkeit und damit auch Nährstoffe auf den Zellen sedimentieren kann. Eine genaue Berechnung und Evaluation der Nährstoffversorgung im Nebelkammerreaktor erfolgt in dem Kapitel 4.2.3.

4.2.2.1 Nebelausbreitung

Die Ausbreitung des Nebels in der Reaktorkammer wurde anhand von Serienbildaufnahmen während der Zerstäubung analysiert. Die Ergebnisse der Nebelausbreitung im Nebelkammerreaktor können anhand von Abb. 35 verdeutlicht werden. Der Nebel entsteht $\sim 0,25$ s nach dem Anschalten der Zerstäubung zunächst an der Spitze des Ultraschallrüssels (Abb. 35 A). Anschließend sinkt er nach unten und breitet sich am Boden des Reaktors von innen nach außen aus, bis er nach $\sim 1,5$ s an den Rand des Glaszylinders gelangt (Abb. 35 B - D). Die Höhe der Nebelsäule beträgt während der Ausbreitung < 2 cm. Danach steigt der Nebel nach oben und erreicht nach ~ 13 s seine maximale Höhe von 4 cm (Abb. 35 E-F).

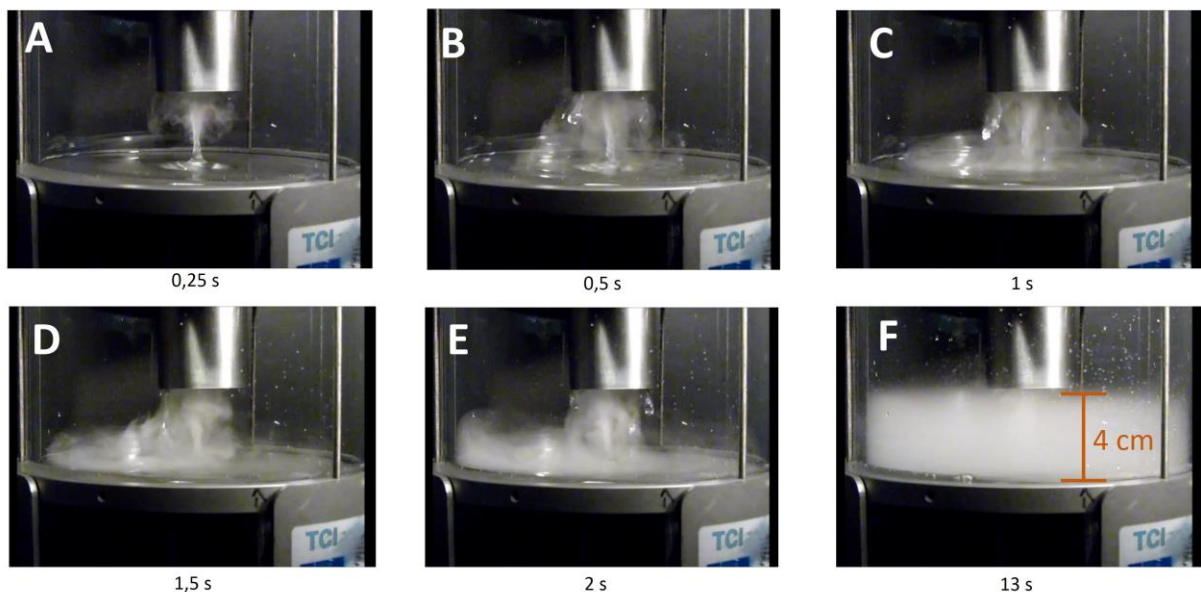


Abb. 35: Serienbildaufnahme der Nebelproduktion im Nebelkammerreaktor. Der Nebel entsteht an der Spitze des Ultraschallrüssels (A), sinkt anschließend ab (B) und verteilt sich über den Reaktorboden (C, D). Anschließend steigt der Nebel in der Mitte und am Rand nach oben bis er eine Höhe von ~ 4 cm erreicht hat (E, F).

Die Ausbreitung des Nebels im Nebelkammerreaktor kann damit in drei Phasen eingeteilt werden (Abb. 36 A). In der ersten Phase erfolgt eine Nebelausbreitung am Boden des Reaktors in

radialer Richtung. In der zweiten Phase steigt der Nebel nach oben, bis er die Höhe von ~ 4 cm erreicht hat. Die dritte Phase kennzeichnet ein langsames Absinken der Nebeltropfen aufgrund der Schwerkraft nach unten ins Mediumreservoir.

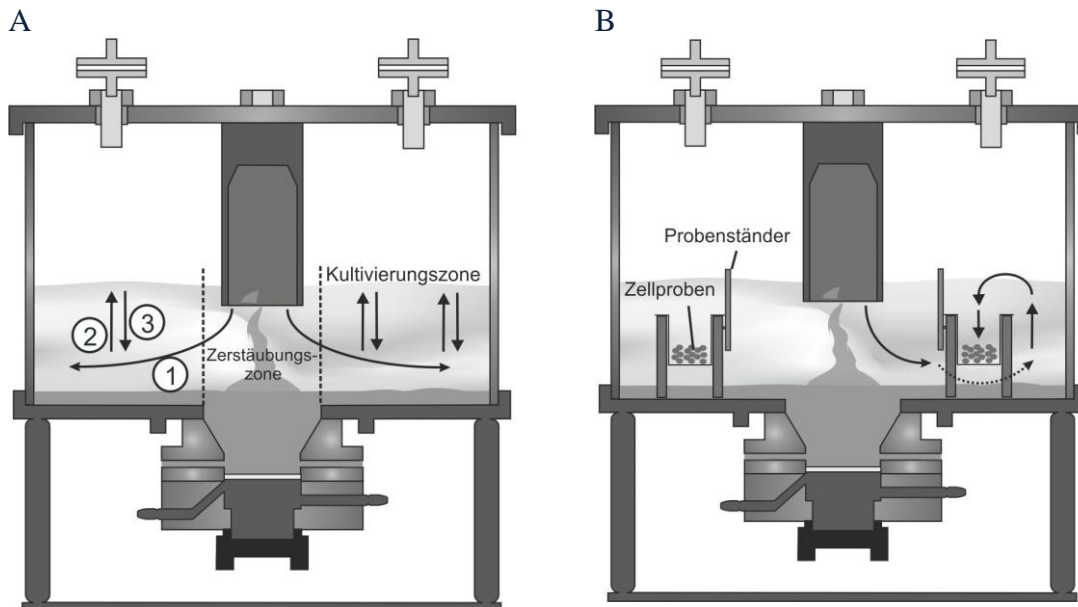


Abb. 36: Schematische Darstellung der Nebelausbreitung (A) und der Sedimentation auf einen Standard-Probenständer (B). Die drei Phasen der Nebelausbreitung sind in (A) mit den Zahlen 1-3 gekennzeichnet. In der ersten Phase findet eine Nebelausbreitung in radialer Richtung des Reaktorzylinders statt (1). In der zweiten Phase steigt der Nebel nach oben bis er die maximale Höhe von 4 cm erreicht hat (2). In der dritten Phase sinkt er schließlich nach unten und kann die Zellproben auf den Probenständern mit Nährstoffen versorgen (3). Die Probenständer sind dabei so konstruiert, dass nur die langsam absinkenden Nebeltropfen auf den Zellproben sedimentieren können (B)

Anhand der Aufnahmen aus Abb. 35 können auch die Geschwindigkeiten der Nebeltropfen im Nebelkammerreaktor abgeschätzt werden. Am Boden des Reaktors ist dabei die höchste Geschwindigkeit der Nebeltropfen zu beobachten. Der Nebel benötigt zum Durchqueren der Kultivierungszone mit einem Durchmesser von 5,4 cm eine Zeit von ~ 1,5 s. Damit ergibt sich eine Geschwindigkeit des Nebels von 3,6 cm/s. Der Aufstieg des Nebels bis zu einer Höhe von 4 cm dauert ~ 13 s, sodass die Nebelaufstiegs geschwindigkeit mit 0,3 cm/s deutlich niedriger ist. Nach dem Ausschalten der Zerstäubung benötigt der Nebel ~ 20 s zum Absinken und besitzt daher eine Absinkgeschwindigkeit von 0,2 cm/s. Die einzelnen Nebeltropfen haben jedoch insgesamt ein sehr chaotisches Bewegungsverhalten, sodass diese Werte nur eine Näherungen der tatsächlichen Tropfengeschwindigkeiten im Nebel darstellen. Insgesamt ist jedoch am Boden des Reaktors bis zu einer Höhe von ~ 2 cm eine deutlich höhere Nebeltropfengeschwindigkeit zu erwarten als in einer Höhe > 2 cm.

Um die Zellproben vor den schnellen Nebeltropfen am Boden des Reaktors zu schützen, wurde ein an den Seiten geschlossener und nach oben geöffneter Probenständer für den Nebelkammerreaktor entwickelt. Der Nebel kann damit nur von oben auf die Zellproben sedimentieren, sodass keine Beschädigung der Zellen durch besonders schnelle Nebeltropfen stattfinden kann (Abb. 36 B). Die Geschwindigkeit mit der die Nebeltropfen auf die Zellproben sinken ist mit 0,2 cm/s relativ gering, sodass kein besonders großer Scherstress auf die Zellproben ausgeübt wird.

4.2.2.2 Größenverteilung der sedimentierten Nebeltropfen

Neben der in 4.2.2.1 beschriebenen Geschwindigkeit der Nebeltropfen, ist auch die Masse und damit die Größe der Nebeltropfen für die kinetische Energie der Tropfen und somit den möglichen Scherstress auf die Zellen maßgeblich. Deshalb wurde eine Größenverteilung der Nebeltropfen auf einen Standard-Probenständer aufgenommen.

Zur Bestimmung der Größenverteilung der sedimentierten Nebeltropfen auf einen Standard-Probenständer wurde ein Deckgläschen auf einem Probenständer platziert und die auf der Glasoberfläche sedimentierten Nebeltropfen mikroskopisch analysiert. Unter Verwendung einer am Institut für Technische Chemie Hannover entwickelten Bildbearbeitungs-Software *Particle Analyzer* (Entwickelt von Lindner und Prediger [73, 74]) erfolgte eine Auswertung der Größenverteilung der Nebeltropfen.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 37 und Abb. 38 dargestellt. In Abb. 37 A und B sind die Aufnahmen der sedimentierten Nebeltropfen und die durch das Programm erkannten Nebeltropfen zu erkennen. Dabei wurden alle angefärbten Nebeltropfen in Abb. 37 B vom Objekterkennungsalgorithmus erkannt.

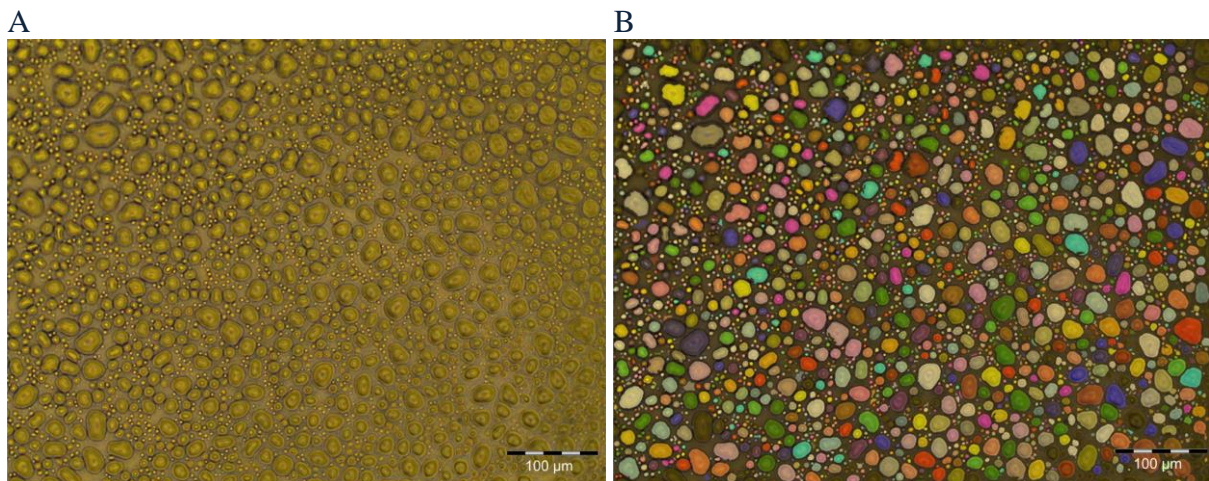


Abb. 37: Mikroskopische Aufnahme von Nebeltropfen die auf den Probenständen sedimentiert sind. (A) zeigt das Originalbild. In (B) sind die durch den Objekterkennungsalgorithmus der Software *Particle Analyzer* (Institut für Technische Chemie, Hannover) erkannten Nebeltropfen bunt angefärbt.

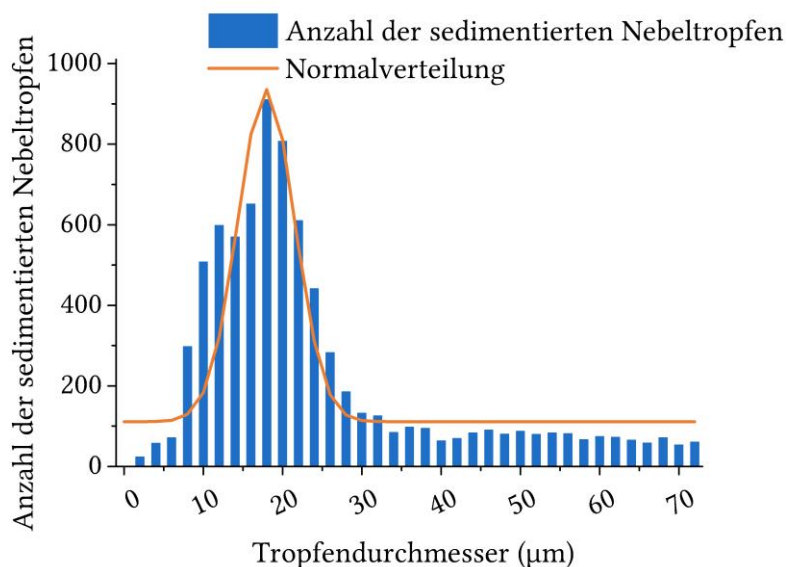


Abb. 38: Größenverteilung der sedimentierten Nebeltropfen auf einem Probenstander.

Das Ergebnis der Größenverteilung ist in Abb. 38 dargestellt. Insgesamt sind annähernd normalverteilte Tröpfchengrößen zu erkennen, deren Mittelwert bei einem Durchmesser von 18 µm liegt. Damit kann durch den beschriebenen Aufbau eine sehr kleine Nebeltröpfchengröße auf dem Probenstander realisiert werden, sodass von einer geringen Scherstressbelastung auf die Zellen ausgegangen werden kann. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass diese Größenverteilung der Nebeltropfen auf dem Glasträger nicht unbedingt den Nebeltröpfchengrößen im Nebel

entspricht. Vor allem die Verschmelzung von mehreren kleinen Wassertropfen auf der Glasoberfläche zu einem großen Tropfen könnte die Größenverteilung in Richtung größerer Durchmesser verschieben. Außerdem entspricht die Form der Wassertropfen auf einer Glasoberfläche nicht einer idealen Kugel, sondern ist abgeflacht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Nebeltröpfchengröße im Nebel sogar noch kleiner ist, als die hier bestimmte sedimentierte Nebeltröpfchengröße. Insgesamt konnte mit diesem Experiment jedoch gezeigt werden, dass eine sehr kleine Nebeltröpfchengröße auf den Probenständen realisiert werden kann, sodass die Wahrscheinlichkeit einer relativ hohen Scherbelastung durch besonders große Tropfen eher gering ist.

4.2.2.3 Nebelaufbauzeit

Die Zeit, die der Nebel benötigt, um die komplette Kultivierungszone mit Nebel auszufüllen, konnte bereits durch die Serienbildaufnahmen in 4.2.2.1 mit ~ 13 s ermittelt werden. Diese Nebelaufbauzeit ist jedoch ungenau, da hier nur mittels Serienbildaufnahmen die Zeit bestimmt wurde bis der Nebel die maximale Höhe erreicht hat. Ob danach die Nebeldichte noch weiter ansteigt, wird dabei nicht berücksichtigt. Daher wurde mithilfe des Nebeldichtesensors die Zeit bestimmt, die der Nebel benötigte, um 90 % der Nebeldichte im Reaktor aufzubauen. Diese Zeit wird als t_{90} bezeichnet.

Der Verlauf der Nebeldichte nach dem Anschalten der Zerstäubung ist in Abb. 39 für eine Höhe von 3,5 cm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Nebelaufbauzeit t_{90} mit Berücksichtigung der Nebeldichte deutlich über der Zeit von 13 s liegt. Insgesamt konnte mit dem Nebeldichtesensor eine Nebelaufbauzeit t_{90} von $43,8 \pm 4,4$ s bestimmt werden. Der Nebelkammerreaktor ist damit nach weniger als 1 min komplett mit Nebel befüllt, sodass die Zellen nach dieser Zeit optimal mit Nährstoffen versorgt werden können.

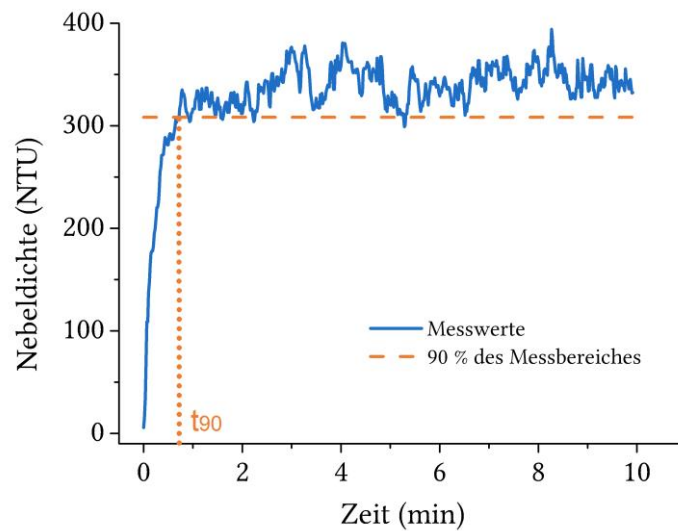


Abb. 39: Bestimmung der Nebelaufbauzeit t_{90} mithilfe des Nebeldichtesensors. Die Nebelaufbauzeit t_{90} ist die Zeit innerhalb der 90 % der maximalen Nebeldichte erreicht sind.

4.2.2.4 Nebeldichte in Abhängigkeit der Höhe

Die Nebeldichte bestimmt, wie viel Nährstoffe in einem Volumenelement des Nebels den Zellen zur Verfügung stehen. Die Nebeldichte gibt damit die räumliche Verteilung der Nährstoffe im Reaktor an. Um die Nährstoffversorgung der Zellen evaluieren zu können, ist daher die Nebeldichteverteilung im Reaktor entscheidend. Daher wurde mithilfe des Nebeldichtesensors die Nebeldichte in Abhängigkeit der Höhe bestimmt (Abb. 40).

Es ist zu erkennen, dass der Nebel bis zu einer Höhe von 3,5 cm mit Werten zwischen 350 und 400 NTU relativ homogen vorliegt. Die Nährstoffe sind demnach wahrscheinlich gleichmäßig über diese Reaktorhöhe verteilt. Zwischen 3,5 und 4,5 cm ist eine starke Abnahme der Nebeldichte zu erkennen. Hier befindet sich die Phasengrenze zwischen der Aerosolphase und der nebelfreien Phase. Die Höhe des Nebels ist dabei mit dem Nebeldichtesensor nicht exakt zu bestimmen, da der Sensor die Nebeldichte immer über einen Bereich von mehreren Millimetern Höhe bestimmt. Misst man die Nebelhöhe jedoch mit einem Messschieber nach, kann eine maximale Höhe des Nebels von ~ 4 cm bestimmt werden. Daher kann insgesamt eine Höhe des Nebels von 4 cm angegeben werden. Bis zu dieser Höhe ist nur eine leichte Abnahme der Nebeldichte zu erkennen, sodass von einer relativ homogenen Nebeldichte innerhalb des Nebels ausgegangen werden kann. Über einer Höhe von 4,5 cm ist kein Nebel mehr zu detektieren.

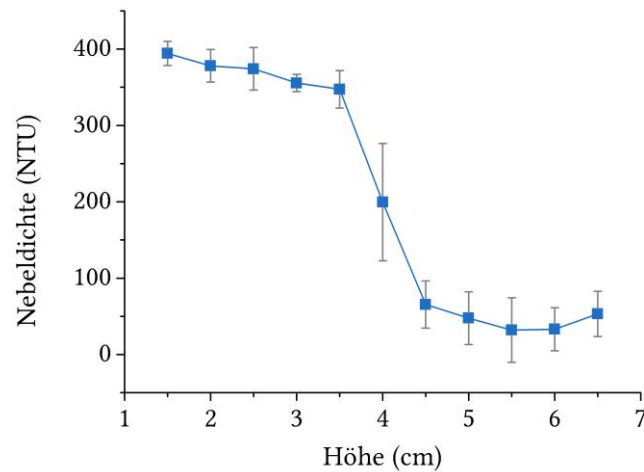


Abb. 40: Nebeldichte im Nebelkammerreaktor in Abhängigkeit der Höhe.

4.2.2.5 Sedimentationsrate der Nebeltropfen auf einem Standard-Probenständer

Die Sedimentationsrate des Nebels auf einen Standard-Probenständer legt bei gegebener Nährstoffkonzentration die Menge an Nährstoffen fest, die für die Versorgung der Zellen zur Verfügung stehen. Daher wurde bei verschiedenen Nebeldichten die Sedimentationsrate auf einen Standard-Probenständer bestimmt (Abb. 41). Es ist insgesamt ein linearer Anstieg der Sedimentationsrate ($\mu\text{L}/\text{min}$) in Abhängigkeit von der Nebeldichte (NTU) zu erkennen. Die Sedimentationsraten auf einen Standard-Probenständer liegen dabei in dem Bereich von $3 \mu\text{L}/\text{min}$ bei 210 NTU bis $10 \mu\text{L}/\text{min}$ bei 400 NTU.

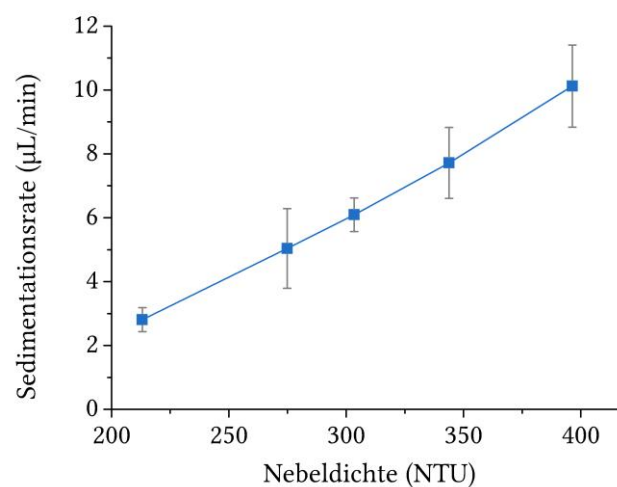


Abb. 41: Gemessene Sedimentationsrate auf einem Standard-Probenständer in Abhängigkeit der Nebeldichte.

4.2.3 Evaluation der Nährstoffversorgung anhand der Sedimentationsraten

Die Nährstoffversorgung der Zellen im Nebelkammerreaktor hängt neben der Konzentration der Nährstoffe im flüssigen Medium wesentlich von dem Transport der Nährstoffe über den Nebel zu den Zellen ab. Dieser Stofftransport zu den Zellen kann durch die Sedimentationsrate auf die Zellen ausgedrückt werden. Dabei hängt die Menge an sedimentierenden Nebel wesentlich von dem Volumen der Nebelsäule oberhalb der Zellproben ab, da nur dieser Nebelanteil auf den Zellen sedimentieren kann. Dadurch ergibt sich eine Abhängigkeit der Sedimentationsrate und auch der Nährstoffversorgung von den Ausmaßen der verwendeten Probenstände. Für die Evaluation der Nährstoffversorgung im Nebelkammerreaktor ist jedoch auch die maximale Sedimentationsrate in der gesamten Kultivierungszone unabhängig von den verwendeten Probenständen interessant. Diese ist unabhängig von der Dimensionierung der Probenstände und definiert den maximalen Flüssigkeitstransport und damit auch die maximale Nährstoffversorgung im gesamten Nebelkammerreaktor. Daher wird im Folgenden sowohl die Sedimentationsrate in der gesamten Kultivierungszone als auch die Sedimentationsrate auf einen Standard-Probenstand bestimmt. Anschließend wird die Nährstoffversorgung im Nebelkammerreaktor anhand der Sedimentationsraten und der Verbrauchsdaten von zwei verschiedenen Zellsystemen evaluiert.

4.2.3.1 Berechnung der Sedimentationsrate in der gesamten Kultivierungszone

Die maximale Sedimentationsrate in der gesamten Kultivierungszone kann durch die in 4.2.1.2 bestimmte maximale Zerstäuberleistung ausgedrückt werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass ein Teil des zerstäubten Mediums direkt in der Zerstäubungszone sedimentiert und somit den Zellen in der Kultivierungszone nicht zur Verfügung steht (4.1.2). Geht man von einer homogenen Nebelverteilung und stationären Bedingungen aus, kann daher die Sedimentationsrate in der Kultivierungszone S_{RK} durch die Zerstäubungsrate Z_R und dem Verhältnis der Querschnittsfläche der Kultivierungszone A zu der gesamten Querschnittsfläche des Reaktors A_{total} ausgedrückt werden:

$$S_{RK} = \frac{A}{A_{total}} * Z_R \quad (6)$$

Bei einer Querschnittsfläche der Kultivierungszone von $A = 153 \text{ cm}^2$, einer Querschnittsfläche des gesamten Reaktors von $A_{total} = 163 \text{ cm}^2$ und einer maximalen Zerstäuberleistung von

527 $\mu\text{L}/\text{min}$ ergibt sich somit eine Sedimentationsrate von 495 $\mu\text{L}/\text{min}$ in der Kultivierungszone.

In Abhängigkeit von der Nährstoffkonzentration c_{sm} im Medium kann diese volumetrische Sedimentationsrate in eine molare Sedimentationsrate S_{RKm} umgerechnet werden.

$$S_{RKm} = \frac{A}{A_{total}} * Z_R * c_{sm} \quad (7)$$

4.2.3.2 Berechnung der Sedimentationsrate auf einem Standard-Probenständer

Die Sedimentationsrate auf einem Probenständer ist von dem Volumen der Nebelsäule oberhalb des Probenständers abhängig, da nur dieser Anteil des Nebels in der Lage ist, auf den Zellproben zu sedimentieren. Um die Sedimentationsrate auf einem Zellprobenständer zu bestimmen, kann daher in Formel (7) anstatt A/A_{total} näherungsweise das Verhältnis des Nebelvolumens über dem Probenständer V zum gesamten Nebelvolumen V_{total} eingesetzt werden.

$$S_{RZm} = \frac{V}{V_{total}} * Z_R \quad (8)$$

Bei einem Volumen der Nebelsäule oberhalb des Probenständers von 13,7 mL, einem Volumen des gesamten Nebels von $V_{total} = 707$ mL und einer maximalen Zerstäuberleistung von 527 $\mu\text{L}/\text{min}$, ergibt sich damit eine Sedimentationsrate von 10,2 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf einem Probenständer. Vergleich man diese berechnete Sedimentationsrate von 10,2 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit der in 4.2.2.5 beschriebenen experimentell bestimmten Sedimentationsrate bei maximaler Nebeldichte von 400 NTU von 10,1 $\mu\text{L}/\text{min}$, so ist eine gute Übereinstimmung beider Werte zu erkennen.

Die volumetrische Sedimentationsrate kann in eine molare Sedimentationsrate S_{RKm} durch Multiplikation mit der Nährstoffkonzentration umgerechnet werden.

$$S_{RZm} = \frac{V}{V_{total}} * Z_R * c_{sm} \quad (9)$$

4.2.3.3 Evaluation der Sedimentationsraten

Die Evaluation der Sedimentationsraten in der gesamten Kultivierungszone und der Sedimentationsrate auf einem Standard-Probenständer soll über einen Vergleich mit der Nährstoffverbrauchsrate von drei verschiedenen Zellsystemen durchgeführt werden. Die Verbrauchsrate Q ist dabei definiert als die Biomasse X multipliziert mit der spezifischen Aufnahmerate q_s .

$$Q_s = X * q_s \quad (10)$$

Unter der Annahme, dass alle auf den Zellen sedimentierten Nährstoffe direkt von den Zellen aufgenommen werden, können die molare Sedimentationsraten in (7) und (9) mit der Verbrauchsrate (10) gleich gesetzt werden. Durch Umstellung dieser Gleichung kann die maximale Biomasse berechnet werden, welche ohne Transportlimitierungen der Nährstoffe versorgt werden kann. Die maximale Biomasse, die durch den Nebel mit Nährstoffen versorgt wird, kann daher mit der Gleichung (11) für die gesamte Kultivierungszone (X_K) und der Gleichung (12) für einen Probenständer (X_P) ausgedrückt werden.

$$X_K = \frac{\frac{A}{A_{total}} * Z_R * c_{sm}}{q_s} \quad (11)$$

$$X_P = \frac{\frac{V}{V_{total}} * Z_R * c_{sm}}{q_s} \quad (12)$$

Die maximalen Biomassen, die ohne Nährstofflimitierungen im Nebelkammerreaktor kultiviert werden können, sind beispielhaft für drei unterschiedliche Zellsysteme in Tabelle 8 berechnet worden. Diese Berechnungen basieren auf der zuvor bestimmten maximalen Zerstäuberleistung von $Z_R = 527 \mu\text{L}/\text{min}$ (4.2.1.2). Für die Nährstoffkonzentration c_{sm} wurden für *A. niger* und *S. cerevisiae* typische Glukosekonzentration des Mediums von 20 g/L [75] und für primäre Hepatozyten 2 g/L [76] eingesetzt.

Tabelle 8: Berechnung der maximalen Biomassen, die ohne Transportlimitierungen im Nebelkammerreaktor kultiviert werden können. Als Biomasse wurde die Biotrockenmasse (BTM) für *A. niger* und *S. cerevisiae* und die Zellzahl für primäre Hepatozyten angegeben.

	<i>A. niger</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Primäre Hepatozyten
Spezifische Glukoseaufnahme rate q_s	1,44 mmol/h/g [77]	3,45 mmol/h/g [78]	40 nmol/h/10 ⁶ Zellen [76]
Gesamte Biomasse in Kultivierungszone (X_K)*	2,3 g	1 g	8,2 x 10 ¹⁰ Zellen
Biomasse auf einem Standard Probenständer (X_P)**	0,05 g	0,02 g	0,17 x 10 ¹⁰ Zellen

* mit $A=153\text{ cm}^2$ und $A_{\text{total}}=163\text{ cm}^2$

** mit $V=13,7\text{ mL}$ und $V_{\text{total}}=707\text{ mL}$

Anhand der Werte in der Tabelle 8 ist zu erkennen, dass in der gesamten Kultivierungszone Biomassen von einigen Gramm (2,3 g *A. niger* und 1 g *S. cerevisiae*) bzw. Zellzahlen von $8,2 \times 10^9$ Zellen (primäre Hepatozyten) ohne Transportlimitierungen mit den gegebenen Glukosekonzentrationen versorgt werden können. Für einen einzelnen Standard-Probenständer reduziert sich diese Biomasse ungefähr um den Faktor 50 auf 0,05 bis 0,02 g bzw. $0,17 \times 10^9$ Zellen. Je nach Anzahl und Dimensionierung der Probenständer liegt die Biomasse einer Kultivierung, die in dem Nebelkammerreaktor ohne Transportlimitierungen versorgt werden kann, zwischen diesen beiden Werten.

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse sind jedoch zwei Aspekte zu beachten: Zum einen können auch deutlich höhere Biomassen im Nebelkammerreaktor erzielt werden. Dabei treten jedoch Transportlimitierungen der Nährstoffe durch die Zerstäubung auf, sodass nicht die maximale Zellwachstumsrate erzielt werden kann. Und zum anderen sinkt während der Kultivierung die Glukosekonzentration, sodass ohne ein Mediaumaustausch oder Zufütterung zwangsläufig ab einem bestimmten Zeitpunkt Transportlimitierungen auftreten. Um insgesamt höhere Biomassen ohne Transportlimitierungen zu erzielen oder den Zeitpunkt der Limitierung hinauszuzögern, kann die Zerstäuberleistung weiter optimiert oder die Nährstoffkonzentration im Medium erhöht werden. Für eine erste Evaluation des Nebelkammerreaktors ist jedoch die Nährstoffversorgung über den Nebel ausreichen. Dieses wird durch die Kultivierung des Modellorganismus *S. cerevisiae* in 4.4.1.2 mit Berechnung der Nährstoffversorgung durch den Nebel gezeigt.

4.2.4 Bestimmung der Mischzeit im Mediumreservoir und im Nebel

Die Mischzeit als Maß für die Durchmischung liefert Informationen über die Verteilung der Nährstoffe im Reaktor. So verhindert eine gute Durchmischung zum Beispiel die Bildung von Nährstoff- oder pH-Gradienten im Bioreaktor. Besonders bei Kultivierungen in denen sich große Konzentrationsänderungen im Reaktor verteilen müssen, wie sie zum Beispiel bei der Zufütterung von Nährstoffen oder bei einer pH-Wert Regelung durch Säuren oder Basen entstehen, ist eine gute Durchmischung wichtig.

In dem Nebelkammerreaktor ist die Durchmischung komplex, da sich mehrere Durchmischungsvorgänge überlagern. Zum einen muss eine gute Durchmischung der flüssigen Phase im Nebelkammerreaktor stattfinden, damit die gelösten Komponenten effektiv dem Zerstäubungsprozess zugeführt werden. Um eine homogene Durchmischung in der Nebel-Phase zu gewährleisten, müssen zusätzlich die Nährstoffe aus dem Mediumreservoir effektiv zerstäubt werden. Nur wenn eine effektive Durchmischung sowohl in der Flüssig- als auch in der Nebel-Phase vorliegt, kann eine homogene Verteilung der gelösten Komponenten im gesamten Reaktor erzielt werden.

Aus diesem Grund wurde die Mischzeit des Nebelkammerreaktors sowohl für die flüssige Phase als auch für die Nebel-Phase mithilfe eines Indikators, der in der Mitte der Mediumreservoirs dazugegeben wurde, bestimmt. Das System kann dabei als vollständig durchmischt bezeichnet werden, wenn überall im Reaktor die gleiche Konzentration des Indikators vorliegt. Die Mischzeit wird hier definiert als die Zeit bis zu der eine 90 %ige Durchmischung vorliegt. Eine Möglichkeit die Mischzeit zu bestimmen, ist die sogenannte pH-Methode [79]. Dabei wird ein bestimmter pH-Wert eingestellt und eine definierte Menge an Säure oder Base als Indikator hinzugegeben. Das Antwortsignal wird dann an einer oder mehreren Stellen im Reaktor mit pH-Sonden aufgezeichnet. Diese Methode wurde für die Bestimmung der Mischzeit im Nebelkammerreaktor verwendet.

Für die pH-Messung kam dabei das pH4-mini System der Firma PreSens (PreSens, Regensburg, DE) zum Einsatz. Dieses basiert auf Fluoreszenzsonden und hat den Vorteil, dass an mehreren Stellen im Reaktor gleichzeitig gemessen werden kann. Außerdem ist dieses System laut Hersteller sowohl für die flüssige als auch für die Gasphase geeignet. Es wurde daher davon ausgegangen, dass das Sensorsystem auch für die Nebelphase geeignet ist. Um den pH-Wert

mittels einer Fluoreszenzsonde zu messen wird ein Fluoreszenzpatch verwendet. Dieser beinhaltet einen pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff dessen Farbumschlag mit einem Lichtleitersensorsystem detektiert werden kann.

In Abb. 42 ist eine Beispielbestimmung der Mischzeit dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bereits nach wenigen Minuten die flüssige Phase vollständig durchmischt ist. Die Nebel-Phase weist dagegen eine deutlich längere Mischzeit auf. Insgesamt konnte eine mittlere Mischzeit für die flüssige Phase von 5,6 min ($\sigma = 0,38$ min) und eine mittlere Mischzeit von 54,8 min ($\sigma = 5,3$ min) für den Nebel-Phase bestimmt werden.

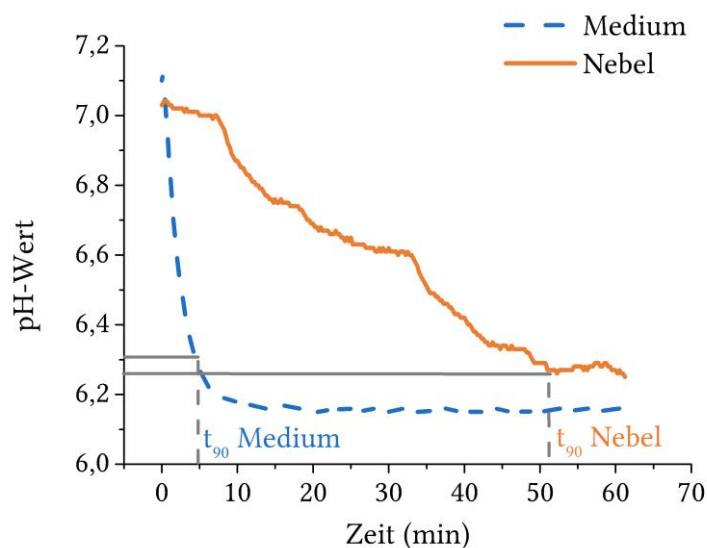


Abb. 42: Bestimmung der Mischzeit im Medium (blau) und im Nebel (orange). Als Mischzeit wird die Zeit definiert, die benötigt wird um eine 90 % ige Durchmischung (t_{90}) zu erreichen.

Eine Veränderung der Mediumzusammensetzung verteilt sich im Nebelkammerreaktor also relativ langsam im Vergleich zu einem Rührkesselreaktoren mit Mischzeiten von wenigen Sekunden [80]. Dieses ist auf die Abwesenheit einer Rührvorrichtung zurückzuführen. Besonders die um den Faktor 10 höhere Mischzeit des Nebels im Vergleich zur flüssigen Phasen ist hervorzuheben. Der Grund für die hohe Mischzeit im Nebel ist, dass zunächst das Medium am Sensorpatch mit der bisherigen Zusammensetzung verdrängt werden muss, bevor die veränderte Konzentration im Nebel gemessen werden kann. Die mit dem Sensorpatch bestimmte Mischzeit im Nebel ist damit vor allem von der Austauschrate und damit dem Transport des Mediums zum Sensorpatch abhängig. Dieser Effekt der Mischzeitverzögerung tritt somit vermutlich auch beim Medium in der Zellumgebung auf. Die Austauschrate hängt dabei sowohl

von der Menge an sedimentierenden Nebel, als auch vom Volumen der Flüssigkeit am Sensorpatch bzw. den Zellen ab. Insgesamt verzögert sich durch diese Abhängigkeit die Mischzeit im Nebel deutlich und erklärt den annähernd linearen Kurvenverlauf des pH-Wertes im Nebel in Abb. 42.

Es ist daher anzunehmen, dass Nährstoff- oder pH-Gradienten zwischen dem Mediumreservoir und den Zellproben im Nebel auftreten. Dieses muss im Besonderen bei Kultivierungen mit plötzlichen Konzentrationsänderungen einer gelösten Komponente, wie zum Beispiel bei einer pH-Regelung oder einer Zufütterung von Nährstoffen, berücksichtigt werden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Kultivierungen treten jedoch bis auf dem Austausch des Mediums bei längeren Kultivierungen keine sprunghaften Konzentrationsänderungen einzelner gelösten Komponenten auf. Bei einem Mediaustausch im Abstand von mehreren Stunden oder Tagen ist jedoch genug Zeit für die Durchmischung des Mediums im Mediumreservoir und im Nebel vorhanden. Daher sollten die relativ hohen Mischzeiten im Nebel keinen signifikanten Einfluss auf die Kultivierungen haben.

Zur Verringerung der Mischzeit im Nebel kann die Zerstäubungsleistung verbessert werden. Eine höhere Zerstäubungsleistung hat eine höhere Austauschrate der Flüssigkeit um die Zellen bzw. den Sensorpatch zur Folge und verringert somit die Mischzeit im Nebel und kann die Bildung von Nährstoff- oder pH-Gradienten verhindern.

4.2.5 Evaluation der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Versorgung

Die Gasversorgung ist ein wichtiger Betriebsparameter in jedem Bioreaktor. Dabei ist vor allem eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff für aerobe Prozesse ein entscheidendes Kriterium. Andere Gase spielen hier eine eher untergeordnete Rolle. Eine Ausnahme bildet Kohlenstoffdioxid, welches bei Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystemen häufig zur Einstellung des pH-Wertes benötigt wird und vor allem bei Säugetierzellkultivierungen zum Einsatz kommt. Sowohl die Sauerstoffversorgung als auch die Kohlenstoffdioxidversorgung sollen im Folgenden für den Nebelkammerreaktor evaluiert werden.

4.2.5.1 Sauerstoffversorgung

Für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen im Nebelkammerreaktor wird zunächst evaluiert, ob die Menge des bereits im Reaktor vorhandenen Sauerstoffes für eine Kultivierung

ausreichend ist. Die Menge an Sauerstoff n , die sich in dem nicht mit Flüssigkeit gefüllten Reaktorinnenraum ($V=1,45$ L) befindet, kann für einen bestimmten Druck p und eine bestimmte Temperatur T unter Zuhilfenahme der Gaskonstanten R mit dem idealen Gasgesetz (13) berechnet werden:

$$p * V = n * R * T \quad (13)$$

Geht man von einem Normaldruck von 1013 hPa und einem Sauerstoffgehalt von 21 % im Reaktor aus, so ergibt sich für die Temperatur von 37 °C eine Sauerstoffmenge von 12,62 mmol in 1,45 L Luft. Stellt man dieser Menge an vorhandenem Sauerstoff die Sauerstoffverbrauchsrate Q und die vorhandene Biomasse des zu kultivierenden Organismus gegenüber, so kann die Zeit berechnet werden, in der der im Reaktor vorhandene Sauerstoff verbraucht wird. Zum Beispiel ergibt sich für 1 g Hefe mit $Q = 8$ mmol/g/h [78] eine Zeit von 1,6 h. Für 1×10^9 Hepatozyten mit $Q=29$ fmol/min/Zelle [81] ergibt sich dagegen eine Zeit von 7,25 h bis der Sauerstoff verbraucht ist.

Für Kultivierungen mit niedrigen Biomassen ist daher der Sauerstoffgehalt im Reaktor für einen gewissen Zeitraum ausreichend. Durch eine regelmäßige Probennahme, bei der der Deckel angehoben und dadurch das Gas im Reaktor ausgetauscht wird, können jedoch auch bedeutend längere Kultivierungen ohne eine zusätzliche Begasung durchgeführt werden.

Für Kultivierung mit höheren Biomassen kann wie in 4.1.9 beschrieben eine aktive Begasung des Reaktorinnenraums durchgeführt werden. Zur Begasung des Reaktors konnten Gasflussraten von bis zu 2700 mL/min verwendet werden, ohne dass Nebel aus dem Reaktorinnenraum ausgetragen wurde. Durch diese Gasflussrate wird das vollständige Gasvolumen des Reaktors annähernd zweimal pro Minute ausgetauscht. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass mit einer aktiven Begasung jederzeit ausreichend Sauerstoff im Reaktor vorhanden ist.

4.2.5.2 Kohlenstoffdioxidversorgung

Bei Säugetierzellkultivierungen wird der pH-Wert häufig durch eine Begasung mit Kohlenstoffdioxid-angereicherter Luft (>5 %) in einem Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem eingestellt. Diese erhöhte Kohlenstoffdioxidkonzentration wird im Nebelkammerreaktor über einen Inkubator mit Kohlenstoffdioxid-Regelung bereitgestellt und über eine Pumpe in den Reaktor geleitet.

Die Möglichkeit den pH-Wert eines Kohlensäure-Bicarbonat gepufferten Mediums mit dem in 4.1.9 beschriebenen Begasungssystem einzustellen, ist in Abb. 43 dargestellt. Mit dem Begasungssystem ist eine deutliche Veränderung des pH-Wertes von pH 8 auf den angestrebten pH-Wert von 7,25 innerhalb von 5 min zu erkennen. Das Begasungssystem ist demnach in der Lage den pH-Wert des Kohlensäure-Bicarbonat gepufferten Mediums in kurzer Zeit einzustellen und ist damit für die Kultivierung von Säugetierzellen geeignet.

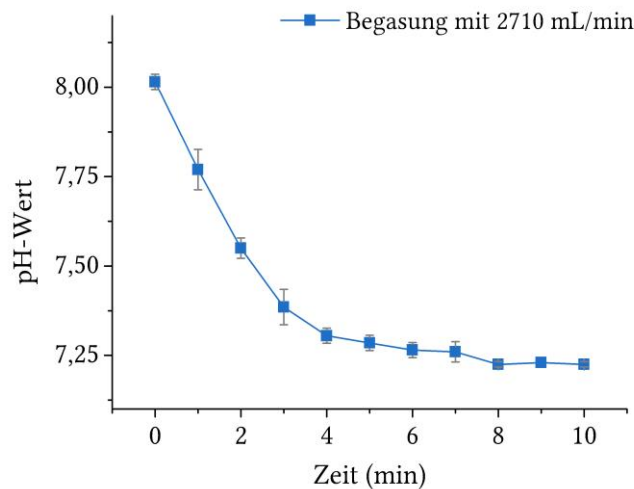


Abb. 43: Effekt einer aktiven Begasung mit CO₂-angereicherter Inkubatorluft auf die Einstellung des pH-Wertes bei einem Kohlensäure-Bicarbonat gepufferten Medium.

4.2.6 Bestimmung der Temperaturverteilung im Nebelkammerreaktor

Eine homogene Temperaturverteilung in der Kultivierungszone des Nebelkammerreaktors ist für die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Kultivierungen im Nebelkammerreaktor wichtig. Aus diesem Grund wurde ein Temperaturarray mit 12 Temperatursensoren in zwei Ebenen zur Bestimmung einer Temperaturverteilung in dieser Arbeit entwickelt (Abb. 44). Der Temperaturarray kann an das Mess- und Regelungssystem (MRS) angeschlossen werden. Zur visuellen Darstellung können die Bereiche zwischen den Sensoren mittels einer Normalverteilung extrapoliert werden.

Als erstes wurde eine Temperaturverteilung ohne einen Inkubator mit einer Zieltemperatur von 37 °C aufgenommen. In diesem Fall wurde nur das „Kühlsystem“ zur Temperierung des Reaktors verwendet. Wobei hier das „Kühlsystem“ nicht die Funktion der Kühlung sondern der Er-

wärmung des Reaktors von Raumtemperatur auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ übernimmt. Die Temperatur der „Kühlflüssigkeit“ in der Kühlkammer und damit auch die Temperatur im gesamten Reaktor wurde durch eine PID-Regelung des Thermostaten eingestellt. Als Regelgröße wurde einer der zwölf Temperatursonden im Reaktor verwendet. Zusätzlich zu den Temperatursonden des Temperaturarrays wurden auch die Temperaturen in der Kühlkammer und im Medium mit separaten Temperatursonden gemessen. Das Ziel dieses Experimentes war es zu evaluieren, ob eine Kultivierung auch ohne den zusätzlichen Wärmeeintrag des Inkubators durchführbar ist.

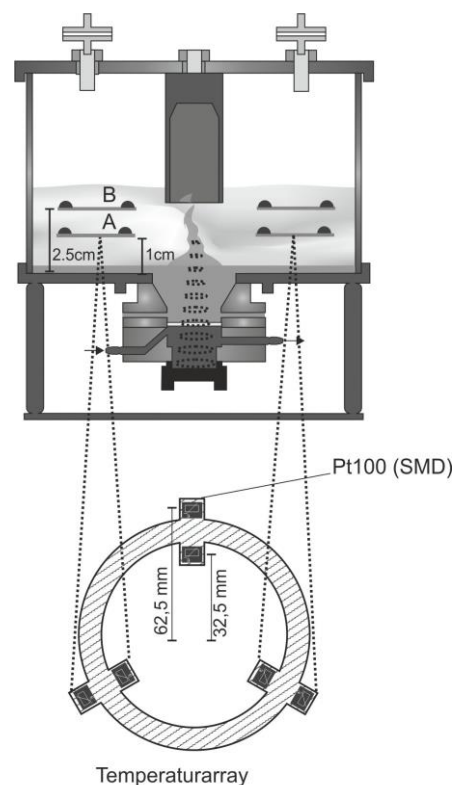


Abb. 44: Schematischer Aufbau des Temperaturarrays zur Messung einer Temperaturverteilung.

Die Ergebnisse der Temperaturverteilung der beiden Ebenen des Temperaturarrays ohne einen Inkubator sind in Abb. 45 A.1 und A.2 dargestellt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Temperaturverteilung im Nebelkammerreaktor schematisch visualisieren (Abb. 45 A.3). Es ist zu erkennen, dass auch ohne Inkubator eine Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in der Kultivierungszone erreicht werden konnte. Der Temperaturbereich, in dem eine Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorliegt, beschränkte sich jedoch auf einen kleinen runden Bereich in der Kultivierungszone, in der auch die Regelgröße erfasst wurde. Entfernte man sich von dieser Zone nach außen war ein starkes

Temperaturgefälle zu beobachten. So wurden an dem äußeren Temperatursonden nur noch 35 °C gemessen. Auch bei einem Vergleich der zwei Ebenen des Temperaturarrays war ein Temperaturgradient zu erkennen. Auf der unteren Ebene mit einer Höhe von 1 cm wurden auf dem inneren Temperatursondenring zum Beispiel Temperaturen von bis zu 39 °C gemessen.

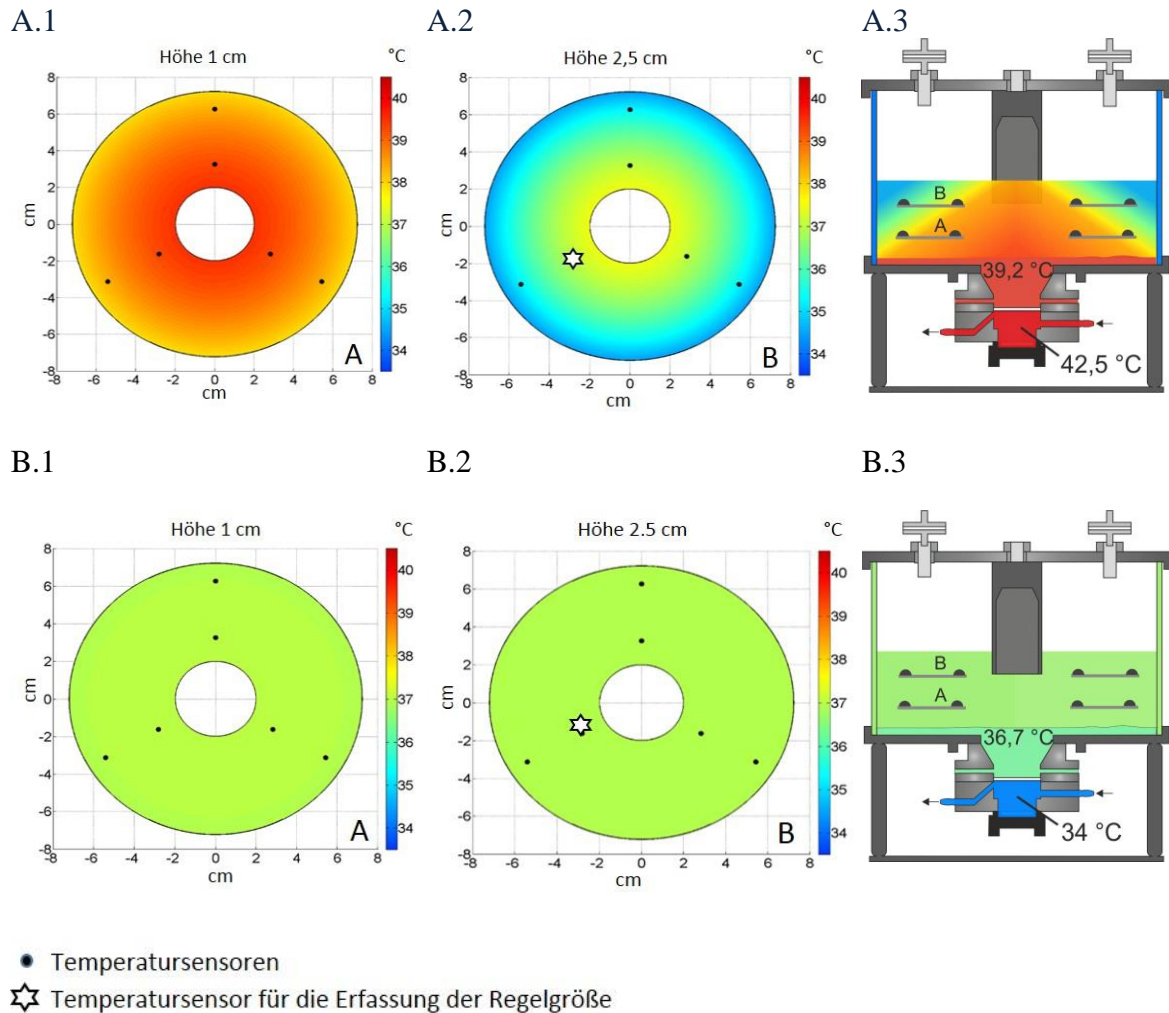


Abb. 45: Temperaturverteilung der Kultivierungszone ohne (A.1 bis A.3) und mit Inkubator (B.1 bis B.3).

Insgesamt liegen also ohne einen Inkubator ein axialer sowie ein radialer Temperaturgradient vor, die sich überlagern. Dadurch ergibt sich ein Temperaturprofil, wie es in Abb. 45 A.3 dargestellt ist. Der axiale Temperaturgradient entsteht dabei durch die hohen Temperaturen in der Kühlkammer und im Medium (42,5 °C bzw. 39,2 °C). Diese hohen Temperaturen sind ohne einen Inkubator nötig, da über die Kühlkammer und das Medium der Reaktor erwärmt wird. Die hohe Temperatur des Mediums führt jedoch auch dazu, dass sich die Nebelphase oberhalb des Mediums erwärmt und sich somit den axialen Temperaturgradienten ausbildet. Der radiale

Temperaturgradient entsteht dagegen durch die kühle Umgebungstemperatur. Diese kühlt die Außenwand des Reaktors und damit auch den angrenzenden Nebel ab. Es ergeben sich insgesamt Temperaturunterschiede in der Kultivierungszone von bis zu 4 °C, sodass eine Kultivierung ohne Inkubator nicht sinnvoll ist.

Mit einem Inkubator dagegen ist in der gesamten Kultivierungszone eine homogene Temperaturverteilung von 37 °C zu beobachten (Abb. 45 B.1 bis B.3). Hier haben sowohl die Umgebungstemperatur (37 °C) als auch die Temperatur des Mediums (36,7 °C) annähernd die Zieltemperatur von 37 °C, sodass kein Temperaturgefälle über den Reaktorquerschnitt auftritt. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit in der Kühlkammer ist mit 34 °C deutlich kälter als die Zieltemperatur. Diese niedrige Temperatur ist notwendig, um die Zerstäubungswärme effektiv abzuführen. Insgesamt ist es also mit der Kombination aus einem Inkubator und einem geregelten Kühlsystem möglich eine homogene Temperaturverteilung im Reaktor zu erreichen und damit optimale Wachstumsbedingungen den Zellen zur Verfügung zu stellen.

4.2.7 Zusammenfassung technische Charakterisierung

In der technischen Charakterisierung wurde zunächst die Zerstäubung optimiert. Dadurch konnte eine Zerstäuberleistung von 527 µL Flüssigkeit pro Minute im Reaktor erreicht werden. Diese Zerstäuberleistung führte zu einer Flüssigkeitsmenge von 44 µL im Nebel und einer Nebeldichte von 400 NTU.

Die anschließende Charakterisierung des Nebels zeigte, dass durch eine geringe Nebeltropfengeschwindigkeit (0,2 cm/s) und –größe (18 µm) eine Kultivierungsumgebung mit wenig Scherstress erreicht werden kann. Die Analyse der Nebelaufbauzeit und der Nebeldichte verdeutlichte, dass in dem Nebelkammerreaktor ein homogener Nebel in weniger als 1 min aufgebaut werden kann.

Anhand der Sedimentationsraten wurde anschließend die Nährstoffversorgung der Zellen im Nebel evaluiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Biotrockenmassen bis in den Gramm Maßstab sowie Zellzahlen von annähernd 1×10^{10} Zellen im Nebelkammerreaktor ohne Transportlimitierungen versorgt werden können.

Die Mischzeiten im Mediumreservoir und im Nebel lieferten zusätzliche Informationen über die Verteilung von gelösten Komponenten wie zum Beispiel Nährstoffen im Reaktor. Als Ergebnis wurden relativ hohe Mischzeiten von 5,6 min im Mediumreservoir und 54,8 min im

Nebel ermittelt. Hierbei ist vor allem die relativ hohe Mischzeit im Nebel bemerkenswert. Diese könnte dazu führen, dass Nährstoff- oder pH-Gradienten zwischen der flüssigen Phase und dem Nebel auftreten. Dieses sollte bei Kultivierungen mit schnellen Konzentrationsänderungen, wie sie zum Beispiel bei einer pH-Regelung entstehen, beachtet werden.

Die Evaluation der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidversorgung zeigte, dass durch das in dieser Arbeit entwickelte Begasungssystem eine ausreichende Gasversorgung bereitgestellt werden kann.

Eine homogene Temperaturverteilung im Reaktor ist für einen effektiven Betrieb des Nebelkammerreaktors wichtig. Daher wurde eine Temperaturverteilung im Nebelkammerreaktor mittels eines Temperaturarrays aufgenommen. Hier konnte gezeigt werden, dass mithilfe eines Inkubators und der PID-Temperaturregelung eine homogene Temperaturverteilung in der gesamten Kultivierungszone erreicht werden kann.

4.3 Chemische Charakterisierung

In diesem Kapitel wird der Einfluss der Ultraschallzerstäubung (Frequenz: 2,5 MHz) auf die Mediumkomponenten Glukose, Antibiotika, Aminosäuren und Enzyme untersucht. Ziel dieses Kapitels ist es zu prüfen, ob und in welchem Maß es zu einer Beeinträchtigung der untersuchten Bestandteile des Mediums durch die Ultraschallzerstäubung kommt.

Für alle Experimente in der chemischen Charakterisierung wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet (siehe Abb. 46). Dabei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Temperaturüberwachung und Regelung des Nebelkammerreaktors und der Referenz gelegt. Dies ist notwendig, da Abwärme durch den Ultraschallzerstäubungsprozess entsteht. Diese zusätzliche Wärme kann gerade bei temperatursensitiven Bestandteilen einen zusätzlichen Effekt zu der eigentlichen Zerstäubung auf die Stabilität der Komponenten haben kann. Um konstante Bedingungen zu erhalten wurde daher während aller Experimente die Temperatur des Nebelkammerreaktors auf die Temperatur der jeweiligen Referenz geregelt. Die Referenz zu dem Nebelkammerreaktor bestand bei jedem Experiment aus der gleichen Probelösung bestehend aus Glukose, Antibiotika, Aminosäuren oder Proteinen, die jedoch nicht zerstäubt wurde. Um eine konstante Temperatur der Referenz zu gewährleisten, wurde diese in ein Wasserbad mit der Temperatur 25 °C gestellt. Damit ergab sich ebenfalls eine Temperatur von 25 °C in der Probelösung. Es

wurden jeweils 100 mL Probelösung und eine maximale Zerstäuberleistung verwendet. Ablagerungen von Mediumkomponenten an den Gefäßwänden wurden durch starkes Schütteln und gründliches Abspülen der Wände mit der im Gefäß enthaltenen Probelösung ausgeschlossen. Eine detaillierte Beschreibung über die Durchführung und den Aufbau des Experiments ist im Anhang unter B.1 zu finden.

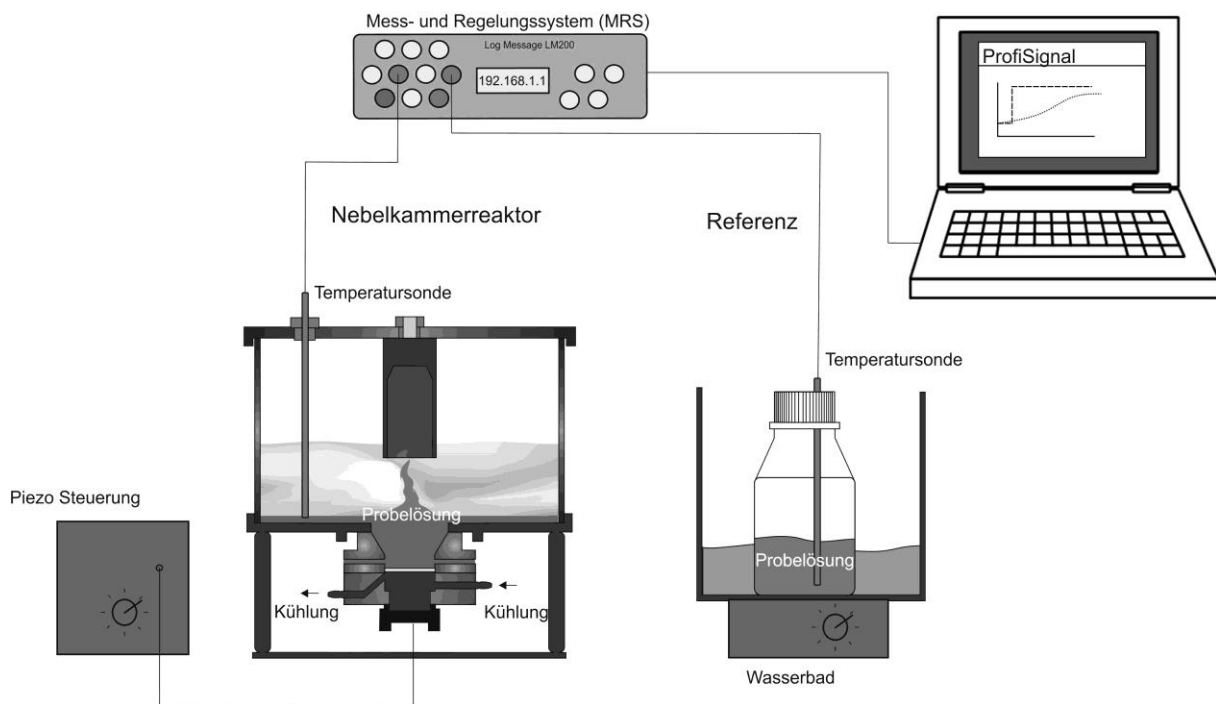


Abb. 46: Experimentdesign zur Untersuchung des Einflusses der Ultraschallzerstäubung auf das Medium.

4.3.1 Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Kohlenhydrate und Antibiotika

Der Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Kohlenhydrate (Glukose) und Antibiotika in Form von Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) wurde untersucht. Kohlenhydrate sind als Kohlenstoff-Quelle und effektiver Energielieferant einer der wichtigsten Bestandteile vieler Nährmedien. Antibiotika dagegen sind kein essentieller Bestandteil von Nährmedien. Dennoch werden Antibiotika häufig Zellkulturmedien zugesetzt, um Kontaminationen vorzubeugen. Als Messmethoden kamen ein Glukose-Analyzer und ein Hemmhofstest zum Einsatz. Der Hemmhofstest misst die Wirksamkeit des Antibiotikums auf eine *E.coli*-Kultur mittels des Hemmhofdurchmessers auf einer Agarplatte.

Die Ergebnisse der Stabilitätsmessung beider Medienkomponenten sind in Abb. 47 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass beide Komponenten innerhalb des Messzeitraums von 72 h kaum durch

die Zerstäubung beeinflusst werden. Im Hinblick auf Glukose ist kein Unterschied im Vergleich zur Referenz zu sehen. Bei dem Antibiotikum konnte nach 72 h eine leichte Verringerung des Hemmhofdurchmessers um 20 % beobachtet werden. Es ist jedoch mit 80 % immer noch eine hohe Wirksamkeit des Antibiotikums nach 72 h festzustellen.

Beide Medienkomponenten können demnach über einen Zerstäubungszeitraum von 72 h als stabil angesehen werden. Bei sehr langen Kultivierungen ohne Mediumaustausch könnte eine Nachdosierung des Antibiotikums erforderlich werden.

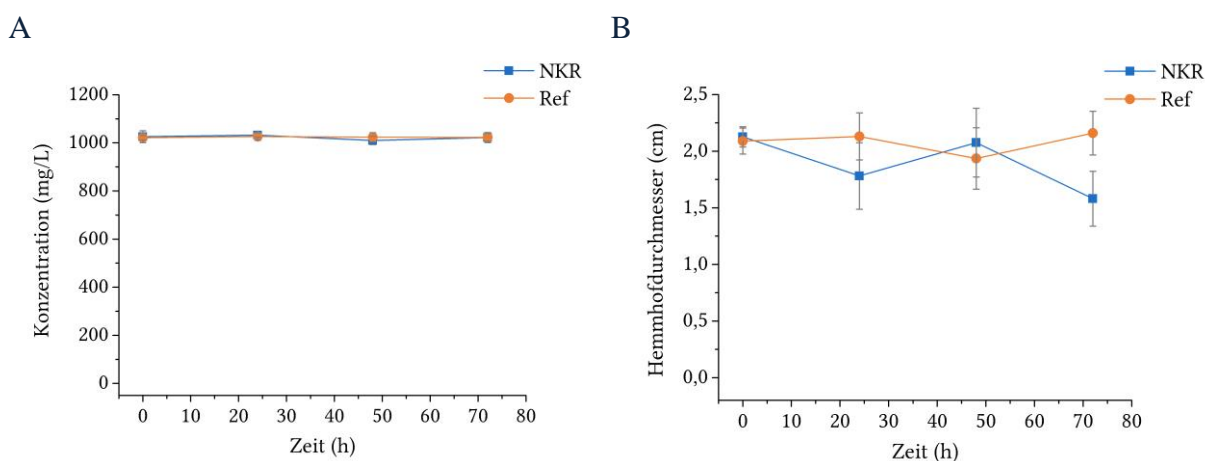


Abb. 47: Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Glukose (A) und das Antibiotikum Penicillin/Streptomycin (B).

4.3.2 Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Aminosäuren

Aminosäuren sind essentieller Bestandteil aller Nährmedien für höhere Eukaryoten. Prokaryoten und einfache Eukaryoten dagegen können Aminosäuren größtenteils selber synthetisieren. Aufgrund des besseren Wachstums ist es jedoch hier üblich Aminosäuren in Form von Proteinhydrolysaten zuzusetzen. Der Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf verschiedene Aminosäuren wurde mittels HPLC und einer Standardaminosäurelösung untersucht.

Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abb. 48 dargestellt. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Aminosäurestabilität zwischen dem Nebelkammerreaktor und der Referenz festzustellen. Dabei scheint es Unterschiede zwischen den einzelnen Aminosäuren zu geben (Abb. 48 A, B). So sinkt zum Beispiel die Konzentration der Aminosäuren ASN, GLN, GLY, LYS, MET, TRP und TYR innerhalb der ersten 48 h auf unter 20 % der Ausgangskonzentration, während alle anderen Aminosäuren nach 48 h noch Konzentrationen zwischen 40 % und 70 % aufweisen. Dabei sind keine strukturellen Ähnlichkeiten der instabileren Aminosäuren auszumachen.

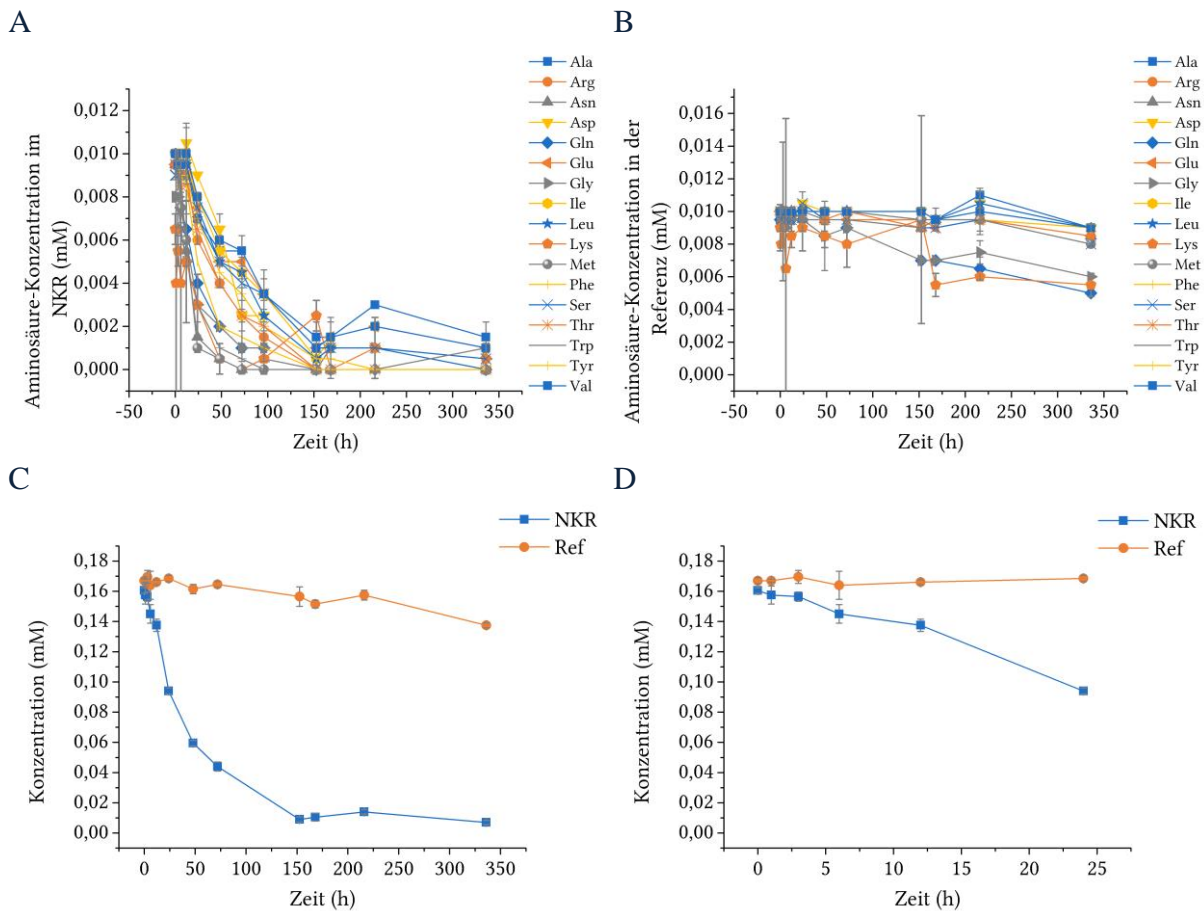


Abb. 48: Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Aminosäuren im Nebelkammerreaktor (NKR) (A) und in einer unzerstäubten Referenz (B). Außerdem ist die Gesamtaminosäurekonzentration für den gesamten Versuchszeitraum (C) und für die ersten 24 h (D) aufgetragen.

Anhand der Gesamtaminosäurekonzentration kann der Konzentrationsverlauf aller Aminosäuren über die Zeit dargestellt werden (Abb. 48 C, D). Hier ist zu erkennen, dass nach 12 h noch 85 %, nach 24 h noch 60 %, nach 48 h noch 40 % und nach 150 h keine Aminosäuren mehr im Nebelkammerreaktor vorhanden waren. Die Referenz sinkt dagegen innerhalb von 150 h lediglich auf 93 % der Anfangskonzentration.

Insgesamt ist ein deutlicher Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf alle Aminosäuren festzustellen. Mit der vorliegenden Datenlage ist es jedoch nicht möglich den genauen Grund für den Konzentrationsverlust auszumachen. Ein Mediaustausch ist daher nach 12 h sinnvoll. Hier ist noch 86 % der Gesamtaminosäurekonzentration vorhanden.

4.3.3 Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Proteine und Enzyme

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Proteine und Enzyme untersucht. Prokaryoten und einfache Eukaryoten können alle benötigten Proteine selber herstellen und benötigen daher keinen Proteinzusatz im Medium. Höhere Eukaryoten dagegen sind auf Proteine und Enzyme, wie Wachstumsfaktoren, Adhäsionsproteine, Proteaseinhibitoren und Matrixproteine angewiesen [82].

Stellvertretend für die Stoffgruppe der Proteine wurde ein kommerziell erhältliches Zellysate mit dem Enzym PGA (Penicillin G Acylase, ASA Spezialenzyme, Wolfenbüttel, DE) und eine Enzymlösung bestehend aus CT (α -Chymotrypsin, Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE) verwendet. Für diese Enzyme existieren einfache spektrophotometrische Assays, um die Aktivität und damit die Stabilität zu bestimmen.

Zunächst wurde der Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf die beiden PGA Acylase und CT mit einem Messzeitraum von 8 h evaluiert. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abb. 49 dargestellt. Sie zeigen einen deutlichen Aktivitätsverlust beider Enzyme innerhalb des Messzeitraums während der Zerstäubung. Bei den Referenzen dagegen konnte kein Aktivitätsverlust beobachtet werden.

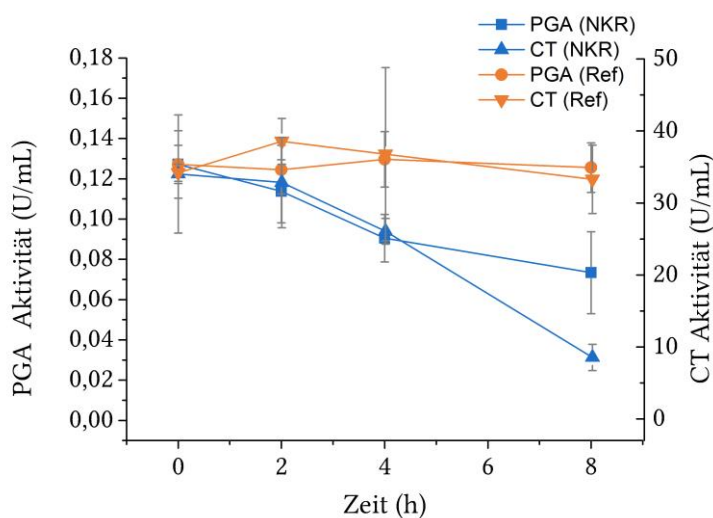


Abb. 49: Enzymaktivität während der Ultraschallzerstäubung im Nebelkammerreaktor (NKR) und unzerstäubt in der Referenz von zwei unterschiedlichen Enzymen: Penicillin G Acylase (PGA) und α -Chymotrypsin (CT).

Die Ultraschallzerstäubung hat demnach auch schon bei einem kurzen Messzeitraum von 8 h einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Enzyme. Der Aktivitätsverlust der Enzymlösung kann folgende Ursachen haben:

- Das Enzym verliert seine dreidimensionale Struktur (Denaturierung)
- Das Enzym denaturiert und lagert sich an andere Moleküle an (Aggregation)
- Das Enzym wird in Peptide und/oder Aminosäuren gespalten (Fragmentierung)

Ein weiterer Grund für den Aktivitätsverlust können Ablagerungen der Enzyme an Gefäßwänden sein. Diese Ablagerungen wurden jedoch durch sehr kräftiges Schütteln und Schwenken vor jeder Probenahme soweit wie möglich resuspendiert. Auch die Abscheidung von Proteinen in einem Schaum kann ausgeschlossen werden, da bei den letzten beiden Messpunkten kein Schaum mehr aufgetreten ist.

Um den Grund für den Aktivitätsverlust näher zu analysieren, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Dabei wurde nur das Zelllysats von PGA weiter untersucht, da CT als Endopeptidase autokatalytische Aktivität besitzt und daher eine Fragmentierung unabhängig von der Ultraschallzerstäubung auftritt. In dem folgenden Versuch wurde der Messzeitraum auf 48 h ausgedehnt und zusätzlich zu der Aktivität auch die Gesamtproteinkonzentration des Zelllysats mittels eines BCA Assays gemessen. Hierbei sollte angemerkt werden, dass in dem Zelllysats neben dem Enzym auch noch weitere Proteine bzw. Proteinfragmente vorhanden sind. Außerdem wurden die Proben mittels einer SDS-PAGE (10 %) auf Denaturierung, Aggregation und Fragmentierung untersucht.

In Abb. 50 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Die Aktivitätsmessungen (Abb. 50 A) des PGA-Zelllysats zeigten einen annähernd linearen Aktivitätsverlust im Nebelkammerreaktor, sodass nach 48 h keine Enzymaktivität mehr vorhanden war. Die unzerstäubte Referenzprobe dagegen verlor in dem gleichen Zeitraum nur 25 % ihrer Aktivität. Hinsichtlich der Gesamtproteinkonzentration (Abb. 50 B) des PGA-Zelllysats ist innerhalb der ersten 12 h, sowohl im Nebelkammerreaktor als auch in der Referenz, eine relativ starke Abnahme der Konzentration festzustellen. Wobei im Nebelkammerreaktor die Proteinkonzentration stärker abnimmt (50 %) als in der Referenz (25 %).

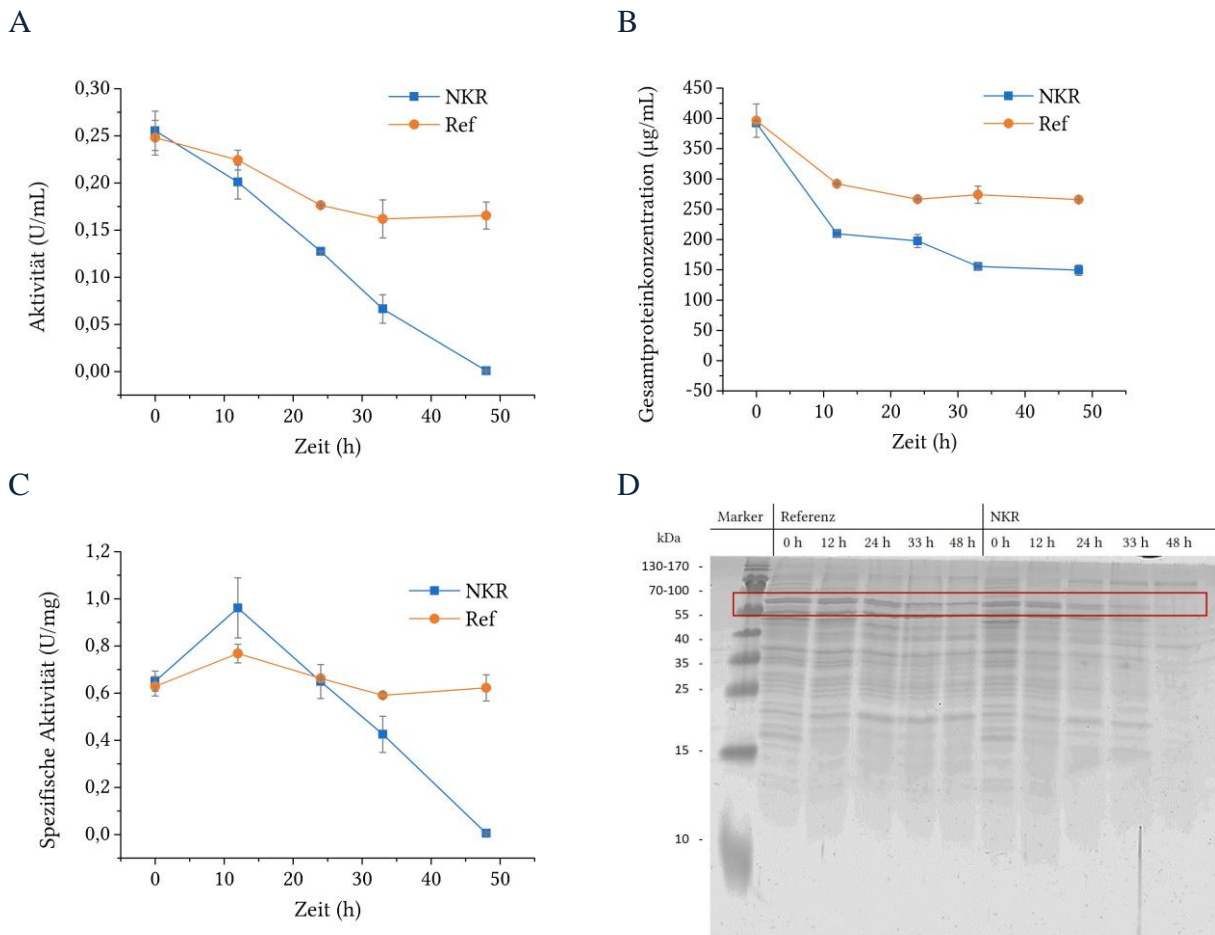


Abb. 50: Enzymaktivität des Enzyms Penicillin G Acylase (A), Gesamtproteinkonzentration (B), spezifische Aktivität (C) und SDS-PAGE (10 %) während der Zerstäubung im Nebelkammerreaktor (NKR) und in der Referenz (unzerstäubt). Die Penicillin G Acylase Bande der SDS-PAGE ist rot markiert.

Aus der Aktivität und der Proteinkonzentration kann die spezifische Aktivität des Zelllysats berechnet werden (Abb. 50 C). Über den gesamten Messzeitraum sinkt die spezifische Aktivität des Zelllysats im Nebelkammerreaktor deutlich, während sie in der Referenz näherungsweise konstant bleibt. Es ist jedoch auch zu sehen, dass die spezifische Aktivität im Nebelkammerreaktor zunächst ansteigt. Dieses ist durch die starke Abnahme der Gesamtproteinkonzentration in den ersten 12 h zu begründen. Die Gesamtproteinkonzentration sinkt im Verhältnis stärker als die Aktivität von PGA, sodass die spezifische Aktivität des Zelllysates zunächst ansteigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass in der Referenz die Aktivität annähernd proportional zur Proteinkonzentration abnimmt. Im Nebelkammerreaktor dagegen ist eine überproportionale Abnahme der Aktivität zu beobachten. Aus diesen Ergebnissen lassen sich zwei wesentliche Schlussfolgerungen ziehen. Zum einen beeinträchtigt die Ultraschallzerstäubung, neben der Enzymakti-

vität, auch die Proteinkonzentration. Dieses spricht gegen eine reine Denaturierung des Enzyms, da hier die Proteinkonzentration nicht beeinträchtigt werden würde. Und zum anderen nimmt die Proteinkonzentration im Nebelkammerreaktor im Vergleich zur Aktivität in den ersten 12 h überproportional stark ab.

Zusätzlich wurde eine 10%ige SDS-PAGE von den Proben durchgeführt (Abb. 50 D). Hier werden die Proteine und eventuelle Proteinfragmente in dem Zellysate nach ihrer Größe aufgetrennt, sodass der Abbauprozess des Zielenzyms und die Entstehung möglicher Proteinfragmente analysiert werden können. Um eine mögliche Fragmentierung zu erkennen, wurde der Fokus des Gels auf den unteren Molekulargewichtsbereich (<70 kDa) gelegt. In der SDS-PAGE ist eine deutliche Abnahme der Bande von PGA bei ca. 70 kDa zu erkennen. Dieses bestätigt die Annahme, dass die Abnahme der Aktivität nicht alleine durch eine Denaturierung des Enzyms hervorgerufen worden sein kann: Bei einer reinen Denaturierung würde die Bandenintensität gleich bleiben. Es hat demnach auch eine Abnahme der PGA Konzentration stattgefunden. Außerdem ist keine Zunahme von anderen Banden im kleineren Molekulargewichtsbereich bis zu 10 kDa zu erkennen. Eine Fragmentierung des Enzyms in kleinere Peptidfragmente kann daher weitestgehend ausgeschlossen werden. Es besteht demnach nur noch die Möglichkeit, dass das Enzym direkt in sehr kleine Peptidfragmente von weniger als 10 kDa oder sogar Aminosäuren fragmentiert oder dass das Enzym aggregiert. Bei einer Aggregation müsste eine Zunahme von Banden im größeren Molekulargewichtsbereich zu erkennen sein. Bei genauerer Betrachtung ist eine leichte Zunahme von Banden im oberen Molekulargewichtsbereich (100 bis 130 kDa) zu erkennen. Für eine genauere Auswertung der Banden in diesem Molekulargewichtsbereich ist die Auflösung des Gels jedoch unzureichend.

Um eine bessere Auflösung im höheren Molekulargewichtsbereich zu erreichen wurden zwei weitere, 16%ige SDS-PAGE durchgeführt, wovon ein Gel in Abb. 51 A dargestellt ist. Die Banden beider Gele wurden densitometrisch ausgewertet (Abb. 51 B). Anhand beider Abbildungen ist eine gute Korrelation zwischen der Proteinabnahme der PGA und der Zunahme der Fragmente im Nebelkammerreaktor zu erkennen. Die Molekülgröße der Fragmente liegt dabei im Bereich der doppelten Molekülgröße von Penicillin G Acylase. Diese Ergebnisse sind ein starker Hinweis darauf, dass der Aktivitätsverlust des Enzyms im Wesentlichen auf eine Aggregation des Enzyms zurückgeführt werden kann.

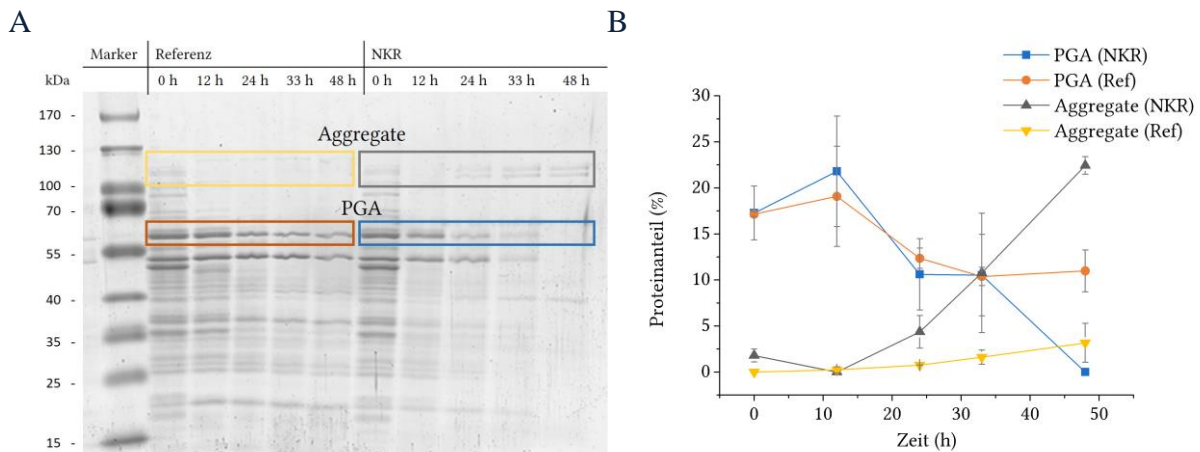


Abb. 51: SDS-PAGE (16 %) (A) und densitometrische Auswertung der markierten Banden (B) des zerstäubten Enzyms Penicillin G Acylase im Nebelkammerreaktor (NKR) und des unzerstäubten Enzyms in der Referenz. Für die densitometrische Auswertung wurde Mittelwerte und Standardabweichungen zweier SDS-Gele verwendet. Markiert sind sowohl die Banden der Penicillin G Acylase (blau und orange) als auch die entstehenden Proteinaggregate (grau und gelb).

Weiterhin wurden die Proben der Enzymlyösung mittels HPLC auf Aminosäuren untersucht, mit dem Ziel eine Fragmentierung des Enzyms in Aminosäuren zu detektieren (Abb. 52). Diese Fragmentierung könnte entweder durch die Ultraschallzerstäubung oder durch im Zelllysat enthaltene Exopeptidasen hervorgerufen werden. Es ist zu erkennen, dass in dem Nebelkammerreaktor die Konzentration einzelner Aminosäuren deutlicher ansteigt als in der Referenz. Betrachtet man die Summe aller Aminosäuren, so entstehen insgesamt im Nebelkammerreaktor etwa 10 Mal mehr Aminosäuren als in der Referenz. Dieses Ergebnis zeigt, dass ein Teil der Proteine auch bis hin zu Aminosäuren degradieren könnte. Setzt man jedoch die Menge an verlorener Proteinkonzentration ins Verhältnis zu der Menge der entstehenden Aminosäuren, so sieht man, dass nur etwa 5 % der verlorenen Proteinkonzentration durch die entstehenden Aminosäuren erklärt werden können. Hierbei müssen jedoch auch die Ergebnisse aus 4.3.2 beachtet werden. Hier wurde gezeigt, dass auch Aminosäuren durch den Ultraschallzerstäubungsprozess beeinträchtigt werden. Es wäre also möglich, dass die entstehenden Aminosäuren selbst beeinträchtigt werden, sodass die tatsächliche Menge an Proteinen, die bis hin zu Aminosäuren degradiert, bedeutend höher sein könnte. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Proteine in Aminosäuren fragmentieren ohne sich vorher in Peptide zu spalten. Wahrscheinlicher scheint daher, dass eine geringe Exopeptidaseaktivität im Zelllysat vorhanden war.

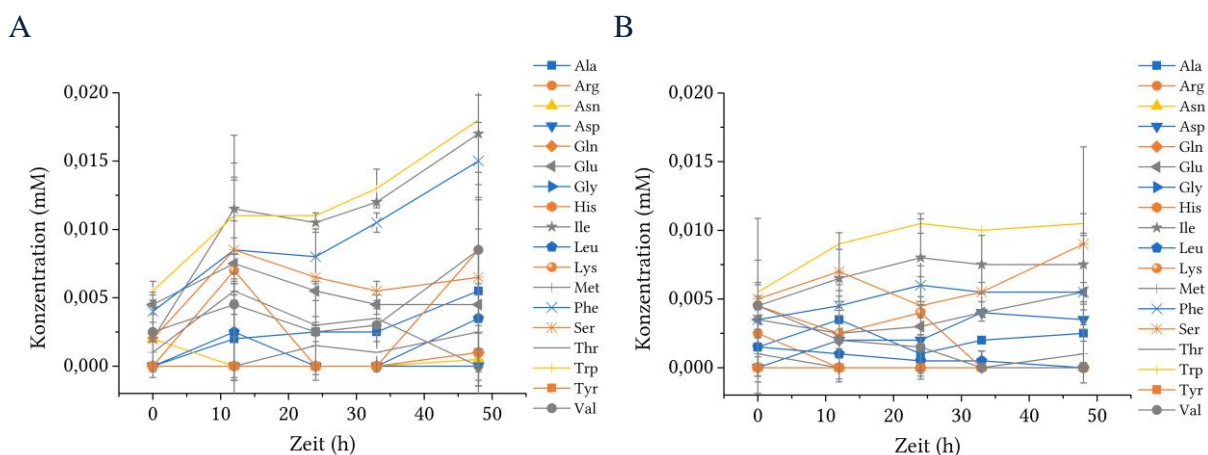


Abb. 52: Aminosäurekonzentrationen während der Zerstäubung des Enzyms Penicillin G Acylase im Nebelkammerreaktor (A) und in der Referenz (B).

Insgesamt ist durch die Ultraschallzerstäubung ein signifikanter Aktivitätsverlust bei Enzymen hervorgerufen worden. Dabei handelte es sich offensichtlich nicht um eine reine Denaturierung des Enzyms. Vielmehr wurde gezeigt, dass durch die Ultraschallzerstäubung Proteinaggregate entstehen. Eine Fragmentierung in Peptide konnte nicht nachgewiesen werden. Es war jedoch ein leichter Anstieg an freien Aminosäuren zu erkennen, sodass eine Fragmentierung in Aminosäuren zwar unwahrscheinlich ist, aber nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Mit einem Aktivitätsverlust des Enzyms PGA von 20 % innerhalb von 12 h, erscheint ein Mediumwechsel alle 12 h sinnvoll.

4.3.4 Zusammenfassung chemische Charakterisierung

In diesem Kapitel wurde untersucht werden ob und in welchem Maß die Medienkomponenten Glukose, Antibiotika, Aminosäuren und Proteine durch die Ultraschallzerstäubung beeinträchtigt werden. Von den untersuchten Mediumkomponenten war kein signifikanter Einfluss der Zerstäubung auf Glukose und das Antibiotikum Penicillin/Streptomycin innerhalb von 72 h zu erkennen. Die Gesamtaminosäurekonzentration und die Aktivität des Enzyms Penicillin G Acylase gingen dagegen im gleichen Zeitraum um 70 % bzw. 100 % zurück. Im Hinblick auf die Enzymaktivität war bereits nach 48 h keine Aktivität mehr messbar. Aufgrund dieser starken Beeinträchtigung der Enzyme wurde der Grund für den Aktivitätsverlust näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nicht nur eine reine Denaturierung für den Aktivitätsverlust verantwortlich war, sondern dass sich wahrscheinlich unlösliche Enzymaggregate bildeten. Eine

Fragmentierung in Peptide konnte in diesem Zusammenhang nicht nachgewiesen werden. Dieses lässt darauf schließen, dass der Energieeintrag der Ultraschallzerstäubung zu einer Aggregation führt. Der Energieeintrag ist jedoch nicht groß genug, um die Peptidkette zu fragmentieren.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Literatur. Hier wurde bereits für das Enzym Laccase eine Aggregation unter Ultraschalleinfluss (20-100 W, 20 – 500 kHz, 50 °C) gezeigt [83, 84]. Dabei sollen Cystein-Seitenketten der Laccase durch ultraschallinduzierte Hydroxylradikale sowie durch hohe Temperaturen und Drücke in den Kavitationsblasen miteinander reagieren und zu einer Aggregation führen. Es ist daher wahrscheinlich, dass bei der Ultraschallzerstäubung von Enzymen und Aminosäuren im Nebelkammerreaktor (20 W, 2,5 MHz, 25 °C) ähnliche Reaktionen stattfinden.

Anhand dieser Ergebnisse konnte insgesamt ein relativ starker Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Nährmedien nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollte bei längeren Kultivierungen im Nebelkammerreaktor das Medium regelmäßig ausgetauscht werden. Auf der Basis der hier durchgeführten Stabilitätsanalysen wird ein Mediumaustausch alle 12 h empfohlen. Zu diesem Zeitpunkt ist kein Einfluss auf Glukose und Antibiotika festzustellen und die Gesamtaminosäurekonzentration und die Enzymaktivität erreichen nach 12 h mit 86 % und 80 % noch ausreichend hohe Werte.

4.4 Biologische Charakterisierung

Bei der biologischen Charakterisierung werden verschiedene Modell-Zellsysteme im Nebelkammerreaktor kultiviert. Als Modell-Zellsysteme wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), der Fadenpilz *Flammulina velupites* (*F. velupites*) und die Fibroblastenzelllinie *NIH-3T3* ausgewählt. Die Kultivierungen sollen dabei mit vergleichbaren konventionellen Kultivierungsmethoden verglichen werden. Das Ziel dieses Kapitel ist die Evaluierung, ob die genannten Zellsysteme in dem neuen Nebelkammerreaktor kultiviert werden können. Gleichzeitig wird durch diese Kultivierungen überprüft, ob der Nebelkammerreaktor alle chemischen, physikalischen und biologischen Ansprüche der Zellsysteme erfüllen kann.

4.4.1 Immobilisierung und Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Hefe *S. cerevisiae* ist ein klassisches Modellsystem für Mikroorganismen und wurde deshalb in dem Nebelkammerreaktor kultiviert. Dabei ist jedoch zu beachten, dass *S. cerevisiae* kein adhärent wachsender Organismus ist und daher nicht ohne eine Immobilisierungsmethode im Nebelkammerreaktor kultiviert werden kann. Daher wurde zunächst die Immobilisierung von Hefezellen in Alginat evaluiert, bevor die eigentliche Kultivierung durchgeführt werden konnte. Als Vergleich für die anschließende Kultivierung im Nebelkammerreaktor wurde die konventionelle Kultivierung im Schüttelkolben gewählt. Bei der Kultivierung im Schüttelkolben wurde weiterhin zwischen einer statischen und einer geschüttelten Kultivierung unterschieden. Beide Kultivierungsmethoden repräsentieren unterschiedliche Kultivierungsbedingungen hinsichtlich des Sauerstoff- und Scherstresseintrags. Während die statische Kultivierung einen geringen Sauerstoffeintrag und eine Umgebung mit wenig Scherstress bereitstellt, hat die geschüttelte Kultivierung einen hohen Sauerstoffeintrag und einen dementsprechend hohen Scherstress. Durch den Vergleich mit diesen konventionellen Kultivierungsmethoden soll die Versorgung mit Sauerstoff im Nebelkammerreaktor evaluiert werden. Außerdem soll der Einfluss der besonderen Kultivierungsumgebung im Nebelkammerreaktor auf das Wachstum und auf grundlegende Stoffwechselfvorgänge (Glukoseverbrauch, Ethanolproduktion) der Zellen erstmals sondiert werden.

4.4.1.1 Immobilisierung in Alginat

S. cerevisiae ist kein adhärent wachsender Organismus. Aus diesem Grund musste eine Immobilisierungsmethode entwickelt werden, welche die Zellen auf den Probenständern im Nebel zurückhalten kann. Bei der Immobilisierung sollten Diffusionslimitierungen durch die Immobilisierungsmatrix sowie das Auswaschen der Zellen aus der Matrix soweit wie möglich vermieden werden. Treten Diffusionslimitierungen auf, ist die Nährstoffversorgung gehemmt, sodass die Zellen nicht mehr optimal mit Nährstoffen versorgt werden. Das Ausschwemmen von Zellen bewirkt, dass eine zweite, nicht immobilisierte Hefekultur im freien Medium auftritt. Diese könnte die eigentliche Hefekultur in den Alginatkugeln überwachsen und die Ergebnisse bei der Kultivierung im Nebelkammerreaktor verfälschen.

Die in dieser Arbeit verwendete Immobilisierungsmethode ist der Einschluss der Hefezellen in Alginat. Hierbei werden die Zellen in einer Alginatlösung suspendiert und anschließend in ein Calciumchlorid-Bad getropft. Die Calcium-Ionen sorgen in diesem Schritt für eine Vernetzung

zwischen den Alginatmolekülen, sodass eine feste, kugelförmige Matrix von 3-5 mm Durchmesser entsteht, in der die Zellen eingeschlossen sind.

Um den Zellaustritt aus der Alginatmatrix zu verhindern, wurde eine relativ hohe Alginatkonzentration von 2 % (w/v) verwendet. Zusätzlich wurde getestet, ob eine zweite, zellfreie Alginatschicht um die Alginat-Zell-Matrix ein Auswaschen der Zellen verhindert. Die Ergebnisse der Einschlussversuche sind in Abb. 53 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Einschluss der Hefezellen in Alginat sowohl für die Kugeln mit einer Alginatschicht als auch für die Kugeln mit zwei Alginatschichten funktioniert hat. Die zweite Alginatschicht ist außerdem nach 24 h Kultivierung weitgehend frei von Hefezellen (Abb. 53 B).

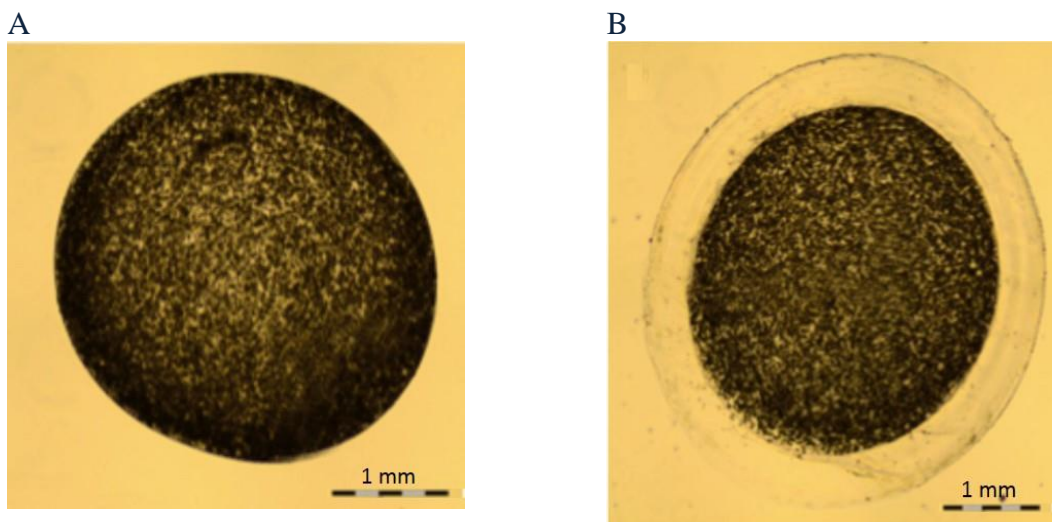


Abb. 53: Mikroskopische Aufnahme von immobilisierten Hefezellen in einer Alginatschicht (A) und in zwei Alginatschichten, wovon die äußere Alginatschicht zellfrei ist (B).

Das Wachstum und das mögliche Ausschwemmen der Zellen wurde in einer statischen Kultivierung im Schüttelkolben sowohl für eine als auch für zwei Alginatschichten überprüft (Abb. 54). Um das Wachstum der Zellen innerhalb der Alginatkugeln zu bestimmen, wurden die Alginatkugeln mit Natriumcitrat aufgelöst und die Zellkonzentration mittels einer Neubauer-Zählkammer nach einer Kultivierungszeit von 24 h bestimmt. Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass die Hefezellen mit einer zweiten Alginatschicht schlechter gewachsen sind als Zellen, die in nur einer Alginatschicht oder in Suspension gewachsen sind (Abb. 54 A). Die Hefezellen ohne eine zweite Alginatschicht erreichen dagegen die gleichen Zellkonzentrationen wie in Suspension kultivierte Zellen. Es ist daher wahrscheinlich, dass die zweite Alginatschicht zu einer signifikanten Diffusionslimitierung von Nährstoffen führt.

Das Ausschwemmen der Zellen wurde bei dem gleichen Experiment anhand der Zellkonzentration nach 24 h im Medium untersucht (Abb. 54 B). Es ist bei beiden Einschlussmethoden ein geringes Ausschwemmen der Zellen im Bereich von 0,01 bis 0,1 % der Zellkonzentration in den Alginatkugeln zu erkennen. Wobei die zweite Alginatschicht dazu führt, dass die Zellen mit 0,01 % effektiver in den Kügelchen zurückgehalten werden. Es konnten jedoch auch hier Hefezellen im Medium nachgewiesen werden. Das Ausschwemmen konnte damit durch keine der getesteten Einschlussmethoden komplett verhindert werden.

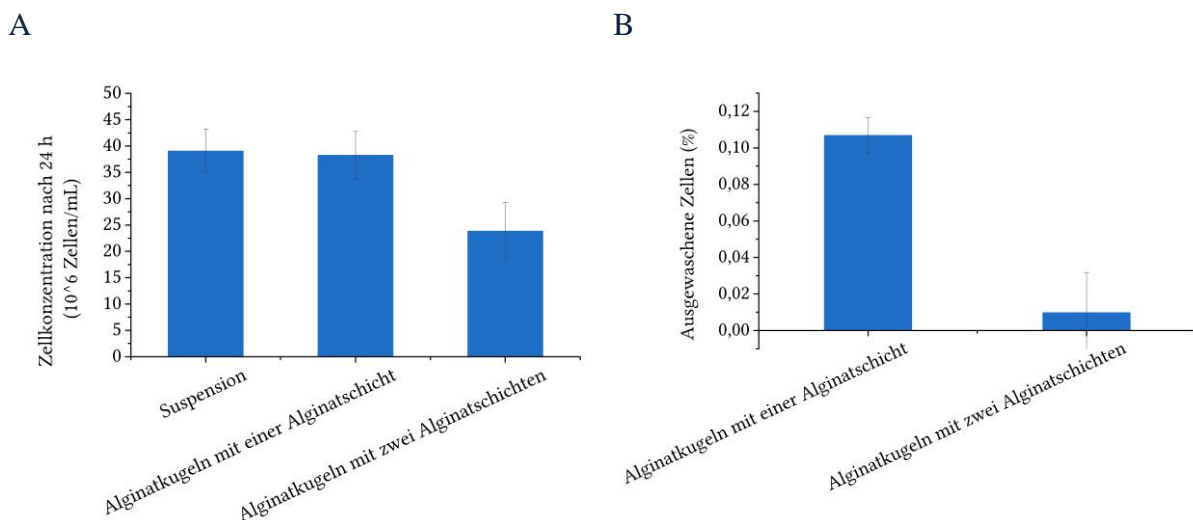


Abb. 54: Zellkonzentration und Anteil der ausgewaschenen von Hefezellen in einer bzw. zwei Alginatschichten nach einer Kultivierungszeit von 24 h.

Insgesamt wurde sich für den Einschluss in nur einer Alginatschicht entschieden, da hier keine Wachstumslimitierungen aufgetreten sind und somit eine gute Nährstoffversorgung der Zellen erreicht werden kann. Die Zellkonzentration der ausgeschwemmten Zellen im Medium liegt hier nach 24 h im Bereich von 0,1 % der Zellkonzentration in den Alginatkugeln und ist daher vernachlässigbar. Es sollte jedoch eine relativ kurze Kultivierungszeit < 24 h gewählt werden, damit die ausgeschwemmten Zellen die Zellen in den Alginatkugeln nicht überwachsen.

4.4.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* im Nebelkammerreaktor wurde mit der zuvor beschriebenen Immobilisierungsmethode in Alginat über einen Zeitraum von 14 h bei 30 °C mit 100 mL YM-Medium durchgeführt. Dabei wurden die Standard-Probenstände für die Zellrückhaltung verwendet. Als Referenz zur Kultivierung der immobilisierten Hefezellen im Nebelkammerre-

aktor dienten ebenfalls in Alginatkugeln immobilisierte Hefezellen in statischen und geschüttelten Kultivierungskolben (150 rpm, ohne Schikanen). Für die Kultivierungsbedingungen wurden die Standard-Zerstäubungsparameter (4.2.1.1) und eine maximale Piezoansteuerung (4.1.3) verwendet. Die Temperatur wurde durch einen Inkubator und eine Temperaturregelung des Thermostaten eingestellt.

Die Ergebnisse der Kultivierungen sind in Abb. 55 bis Abb. 59 dargestellt. Der Verlauf der Zellkonzentration (Abb. 55) zeigt, dass im Nebelkammerreaktor und in den Referenzen (statische und geschüttelte Kultivierungen im Kolben) die Zellkonzentrationen einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Insgesamt scheint der Nebelkammerreaktor damit sehr gute Wachstumsbedingungen bereit zu stellen, die vergleichbar mit den etablierten Kultivierungsmethoden in den Kultivierungskolben sind. Der Anteil der Zellen, die aus den Alginatkugeln ins Medium ausgeschwemmt wurden, ist bei allen Kultivierungsmethoden nach 14 h mit Werten zwischen 2 und 7,5 % gering. Somit wurde ein Großteil der Zellen in den Alginatkugeln zurückgehalten.

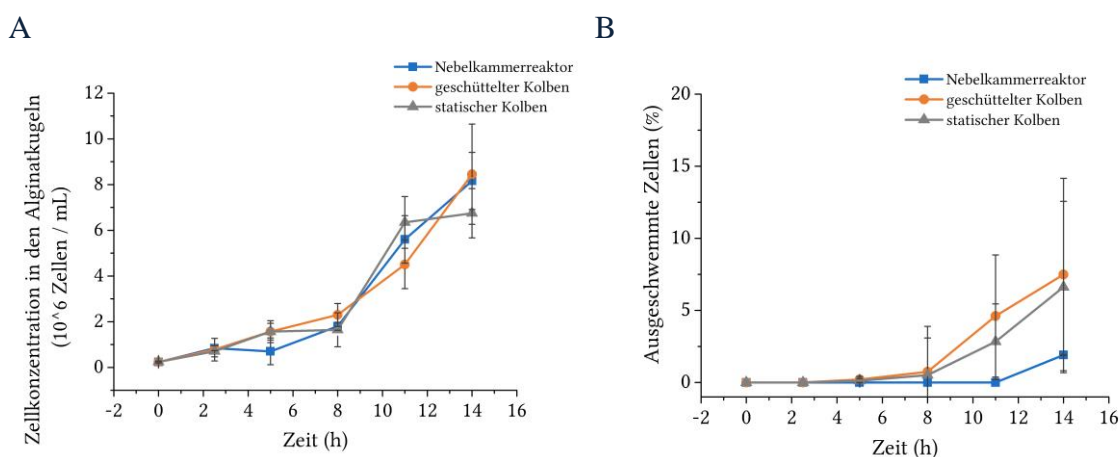


Abb. 55: Zellkonzentration in den Alginatkugeln (A) und Anteil der ausgeschwemmten Zellen (B).

Um die Wachstumsbedingungen genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich der Sauerstoffgehalt sowie die Glukose- und Ethanolkonzentration während der Kultivierung bestimmt. Die Messung des Sauerstoffgehaltes in Abb. 56 zeigt deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsmethoden. Hier ist bei beiden Kultivierungen in den Kultivierungskolben (Referenzen) eine deutliche Abnahme des Sauerstoffgehaltes innerhalb von 3 bzw. 6 h zu erkennen. In dem Nebelkammerreaktor dagegen ist während der gesamten Kultivierungszeit eine optimale Sauerstoffversorgung von 100 % direkt neben den Zellproben zu finden. Mit diesem Experiment wird daher die exzellente Sauerstoffversorgung im Nebelkammerreaktor bestätigt.

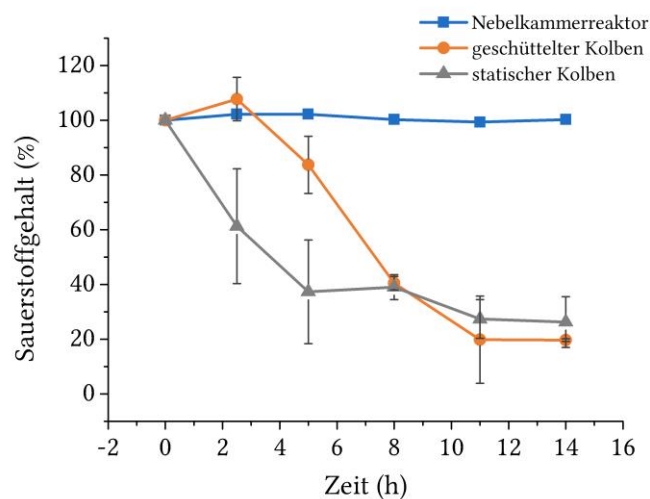


Abb. 56: Sauerstoffgehalt während der Kultivierung von *S. cerevisiae* im Nebelkammerreaktor und in statischen und geschüttelten Kolbenkultivierungen (Referenzen).

Die Glukose- und Ethanolkonzentration während der Kultivierung sind in Abb. 57 dargestellt. Obwohl die Zellkonzentration in den Alginatkugeln während der Kultivierung im Nebelkammerreaktor und in den Referenzen vergleichbar ist, ist der Glukoseverbrauch im Nebelkammerreaktor und in den Referenzen unterschiedlich. So ist die Glukose in den geschüttelten Kolben nach 8 h, in den statischen Kolben nach 11 h und im Nebelkammerreaktor nach 14 h verbraucht. Die geringere Glukoseverbrauchsrate der Zellen im Nebelkammerreaktor wird durch eine frühere Verstoffwechslung von Ethanol kompensiert. Dieses kann anhand der gemessenen Ethanolkonzentration verdeutlicht werden (Abb. 57) Während im Nebelkammerreaktor die Ethanolkonzentration schon nach 8 h abnimmt, weisen die Referenzen erst ab 11 bis 14 h eine Abnahme der Ethanolkonzentration auf.

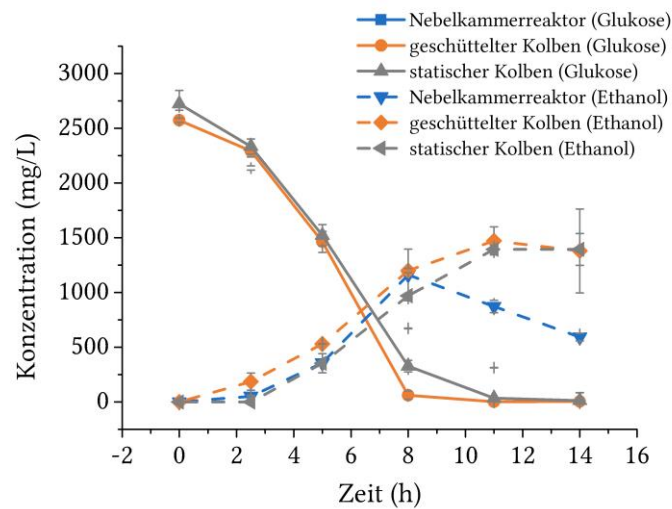


Abb. 57: Glukose- und Ethanolkonzentrationen während der Kultivierungen von *S. cerevisiae* im Nebelkammerreaktor. Die Kultivierung im geschüttelten und im statischen Kolben werden als Referenzen eingesetzt.

Der geringere Glukoseverbrauch im Nebelkammerreaktor im Vergleich zu den Referenzen bei vergleichbarer Gesamt-Zellkonzentration in den Alginatkugeln kann durch die höhere Verfügbarkeit von Sauerstoff erklärt werden. Dieser in der Literatur als Pasteur Effekt [85] bezeichnete Prozess beschreibt einen geringeren Glukoseverbrauch unter aeroben Bedingungen im Vergleich zu der Kultivierung bei anaeroben Bedingungen. Die Sauerstoffversorgung ist dabei im Nebelkammerreaktor bedeutend höher als in den Kultivierungen im Kolben. Daher ist der Pasteur-Effekt hier stärker ausgeprägt. Die schnellere Verstoffwechslung von Ethanol lässt sich vermutlich ebenfalls durch eine höhere Sauerstoffversorgung der Zellen im Nebelkammerreaktor begründen. Vermutlich kann das Oxidationsmittel NAD^+ für die Oxidation von Ethanol unter aeroben Bedingungen durch die Atmung im Nebelkammerreaktor effektiver regeneriert werden, sodass das Ethanol schneller metabolisiert wird. Um dieses zu verifizieren, müssten jedoch weitere Untersuchungen der Stoffwechsellvorgänge der im Nebelkammerreaktor kultivierten Hefezellen durchgeführt werden.

Um eine mögliche Transportlimitierung von Glukose während der Kultivierung zu identifizieren, wurde in Abb. 58 die Glukoseverbrauchsrate mit der Glukosesedimentationsrate (4.2.2) verglichen. Es ist zu erkennen, dass ab einem Zeitpunkt von 11 h die Glukosesedimentationsrate im Bereich der Glukoseverbrauchsrate liegt, sodass eine Transportlimitierung der Glukose auf den Probenständen im Nebelkammerreaktor bei diesen geringen Glukosekonzentrationen ($< 0,3 \text{ g/L}$) möglich scheint. Bei allen anderen Zeitpunkten konnten keine Limitierungen festgestellt werden. Wie in Abb. 55 zu sehen hat diese mögliche Glukoselimitierung jedoch keinen

Einfluss auf das Zellwachstum, sodass insgesamt von einer ausreichenden Nährstoffversorgung ausgegangen werden kann.

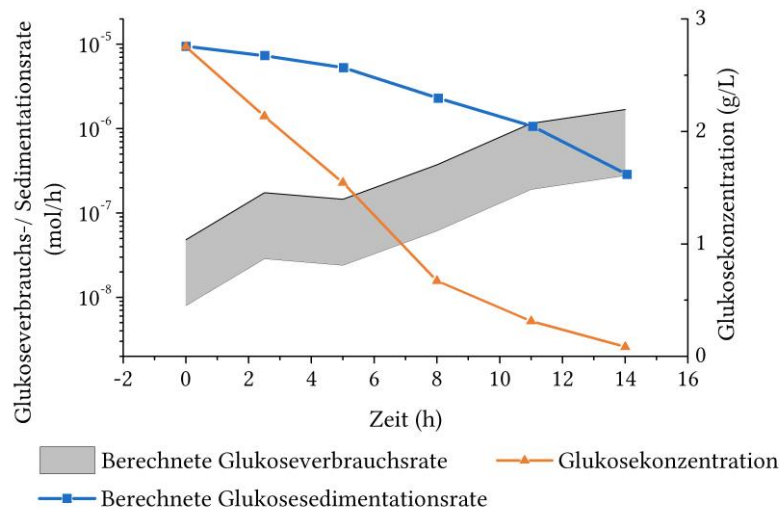


Abb. 58: Vergleich der berechneten Glukoseverbrauchsrate mit der berechneten Glukosesedimentationsrate. Für die Berechnung der Glukoseverbrauchsrate wurde eine Zelltrockenmasse zwischen 10 und 60 pg [86] angenommen. Aus diesem Grund wird die Glukoseverbrauchsrate durch eine graue Fläche angegeben. Die gemessene Glukosekonzentration geht in die Berechnung der Glukosesedimentationsrate ein und wurde daher ebenfalls in dem Diagramm dargestellt.

Zusammenfassend können aus diesen Experimenten die folgenden Schlussfolgerungen gezogen werden. Die Kultivierung von immobilisierten Mikroorganismen in dem Nebelkammerreaktor konnte erfolgreich durchgeführt werden. Dabei werden alle physikalischen, chemischen und biologischen Bedürfnisse der Zellen erfüllt und eine besondere Kultivierungsumgebung den Zellen bereitgestellt. Vor allem die überdurchschnittliche Sauerstoffversorgung kann dabei hervorgehoben werden. Diese hohe Sauerstoffversorgung hat dabei einen Einfluss auf die Stoffwechselvorgänge (Glukose-/Ethanolmetabolismus) der Hefezellen.

4.4.2 Kultivierung von *F. velupites*

Der Fadenpilz *F. velupites* wurde als zweiten, scherstresssensitiven, Protease-produzierenden Modellorganismus mit geringer Wachstumsrate ausgewählt. Der Pilz wurde dabei auf Glutenpellets als Nährstoffquelle über einen Zeitraum von 22 Tagen im Nebel kultiviert. Der Nebel war daher in diesem Fall nicht die hauptsächliche Nährstoffquelle, sondern versorgte die Zellen lediglich mit Wasser und wichtigen Spurenelementen. Der Pilz hat dabei keinen besonders ho-

hen Wasserbedarf, sodass der Zerstäuber gepulst in dem Intervall 1 min an und 12 h aus betrieben wurde. Es ist also eine Festphasenreaktor-ähnliche Kultivierungsumgebung. Die Kultivierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Als Probenständer wurden im Gegensatz zu den Standard-Probenständern nach unten geschlossene Kultivierungsschalen verwendet. Dadurch können sich von dem Pilz produzierte Proteasen in der Kultivierungsschale sammeln, welche am Ende der Kultivierung näher untersucht werden können. Als Referenzkultivierung wurden die gleichen Zellproben auf Probenständer in ein Glasgefäß gegeben und ohne zusätzlichen Nebel kultiviert. Dieses Kultivierungsverfahren entspricht den konventionellen Kultivierungsverfahren des Pilzes.

Das Ergebnis dieser Kultivierungen ist in Abb. 59 dargestellt. Die Bilder in Abb. 59 A und B zeigen, dass die Menge an Pilzmycel im Nebelkammerreaktor ein wenig geringer ist als in der Referenz. Das Mycel im Nebelkammerreaktor ist jedoch sehr filamentös und einzelne Filamente erstrecken sich in Richtung der Gasphase. Bei der Referenz dagegen ist das Pilzmycel eher zusammengefallen und verklebt. Dieses unterschiedliche Aussehen des Mycels könnte darauf hinweisen, dass die Wachstumsbedingungen sich erheblich zwischen der Referenz und dem Nebelkammerreaktor unterscheiden.

Der Effekt der unterschiedlichen Kultivierungsumgebungen auf die Produktion von Proteasen wurde durch eine Gelatine Zymographie und drei unterschiedliche Protease-Aktivitätstests weiter untersucht. Die Gelatine Zymographie zeigt, dass die gesamte Menge an produzierten Proteasen in der Referenz höher ist als in dem Nebelkammerreaktor (Abb. 59 C). Dieses unterstützt den visuellen Eindruck, dass ein wenig mehr Mycel in der Referenz produziert wurde. Zusätzlich scheint sich das Expressionsmuster der Proteasen zwischen der Referenz und dem Nebelkammerreaktor zu unterscheiden. Die Banden im Bereich von 25 bis 50 kDa sind in der Referenz stärker ausgeprägt als im Nebelkammerreaktor. Dagegen sind die Banden im Bereich von 150 kDa in der Referenz schwächer. Diese Hypothese einer unterschiedlichen Proteaseexpression wird durch die Protease-Assays unterstützt. Hier sind die Expressionsmuster zwischen dem Nebelkammerreaktor und der Referenz deutlich unterschiedlich (Abb. 59 D). So ist zum Beispiel bei dem Azocaseinaktivitätstest im Nebelkammerreaktor und in der Referenz die gleiche Proteaseaktivität zu sehen, wobei sich bei den anderen Tests die Proteaseaktivitäten erheblich unterscheiden.

Insgesamt war der Nebelkammerreaktor auch für die Langzeitkultivierung von Fadenpilzen unter Festphasen-Bedingungen geeignet. Es konnten alle Anforderungen des Pilzes an den Bioreaktor für das Wachstum erfüllt werden. Dabei konnte ein unterschiedliches Protease-Expressionsmuster zwischen dem Nebelkammerreaktor und der Referenz festgestellt werden. Ob diese unterschiedliche Expressionsmuster auf die einzigartigen Wachstumsbedingungen im Nebelkammerreaktor zurückzuführen sind, konnte hier nicht abschließend geklärt werden.

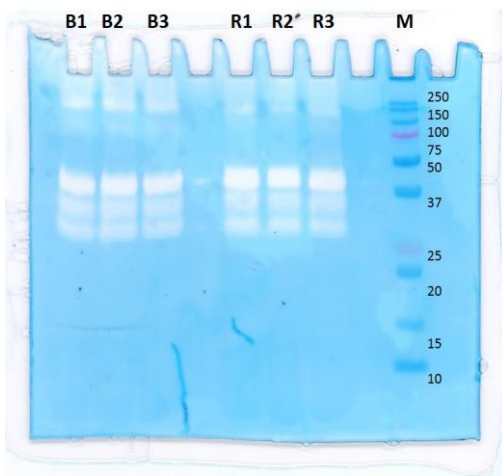
A



B



C



D

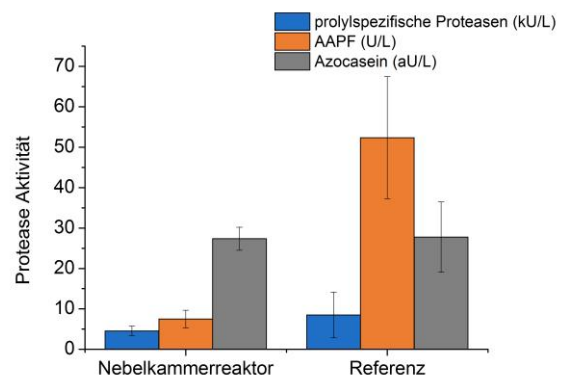


Abb. 59: Ergebnisse der Kultivierung von *F. velupites*. Dargestellt sind Aufnahmen des Pilzmycels nach einer Kultivierungszeit von 22 d im Nebelkammerreaktor (A) und in der Referenz (B). Außerdem sind das Ergebnis der Gelatine-Zymographie (C) und der drei verwendeten Protease-Assays (D) zu sehen. Die Einheit aU (arbitrary Unit) ist eine testspezifische Einheit die definiert ist als die Erhöhung der Extinktion um 0,01 bei 37 °C.

4.4.3 Kultivierung von *NIH 3T3*

Als letzten Modellorganismus als Beispiel für eine Säugetierzelllinie wurde die adhärent wachsende Fibroblastenzelllinie *NIH 3T3* im Nebelkammerreaktor kultiviert. Die Matrizes, die zur Anheftung der Zellen benötigt wurden, waren in diesem Fall Zuschnitte der Collagen-Elastin-Matrix MatriDerm (MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG). Als Medium wurde das auf dem Kohlensäure-Bicarbonatpuffersystem basierende DMEM Medium verwendet, welches täglich ausgetauscht wurde. Dieses Medium ist zur Einstellung des richtigen pH-Wertes von einer angereicherten CO₂-Atmosphäre abhängig, sodass die Kultivierung in einem CO₂-begasteten Brutschrank (5 % CO₂) durchgeführt und das zuvor beschriebene Begasungssystem (4.1.9) verwendet wurde. Die Temperatur wurde durch den Brutschrank und eine PID-Regelung des Thermostaten auf 37 °C eingestellt. Für die Zerstäubung wurden die Standard-Zerstäubungsparameter (4.2.1.1) bei maximaler Potentiometerregelung verwendet. Als Referenz dienten Zellen auf MatriDerm in einer 6-Wellplatte die submers kultiviert wurden.

Das Wachstum wurde dabei durch einen MTT-Vitalitätstest und mikroskopisch über eine DAPI-Zellkernfärbung untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 60 und Abb. 61 dargestellt. Auf beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass die Fibroblastenzellen in dem Nebelkammerreaktor erfolgreich kultiviert werden konnten. Die DAPI-Färbungen zeigen sowohl im Nebelkammerreaktor als auch in der Referenz nach 2 Tagen Kultivierung definierte Zellkerne in ungefähr gleicher Anzahl (Abb. 60). Dieses zeigt, dass die Zellen in diesem Zeitraum im Nebelkammerreaktor und in der Referenz eine ähnliche Zelldichte erreicht haben.

Bei dem MTT-Vitalitätstest ist sowohl in der Referenz als auch im Nebelkammerreaktor eine leichte Zunahme der Zellvitalität in den ersten zwei Tagen zu erkennen (Abb. 61). Am dritten Tag nimmt jedoch die Vitalität deutlich ab. Dieses ist wahrscheinlich nicht auf die Bedingungen in dem Reaktor zurückzuführen, sondern auf eine zu hohe Zelldichte in der Matrix. Dieses wird bei einem Vergleich mit der Referenz und einem Blick auf die mikroskopischen Bilder deutlich. Auch in der Referenz ist nach zwei Tagen ein Abfall der Vitalität zu erkennen, sodass der Rückgang der Zellvitalität nicht allein auf die Bedingungen im Nebelkammerreaktor zurückgeführt werden kann. Die DAPI-Färbungen der Zellen in A.2 und B.2 zeigen allerdings insgesamt eine sehr hohe Zelldichte, sodass diese hohe Zelldichte der wahrscheinlichste Grund für den Rückgang der Vitalität ist.

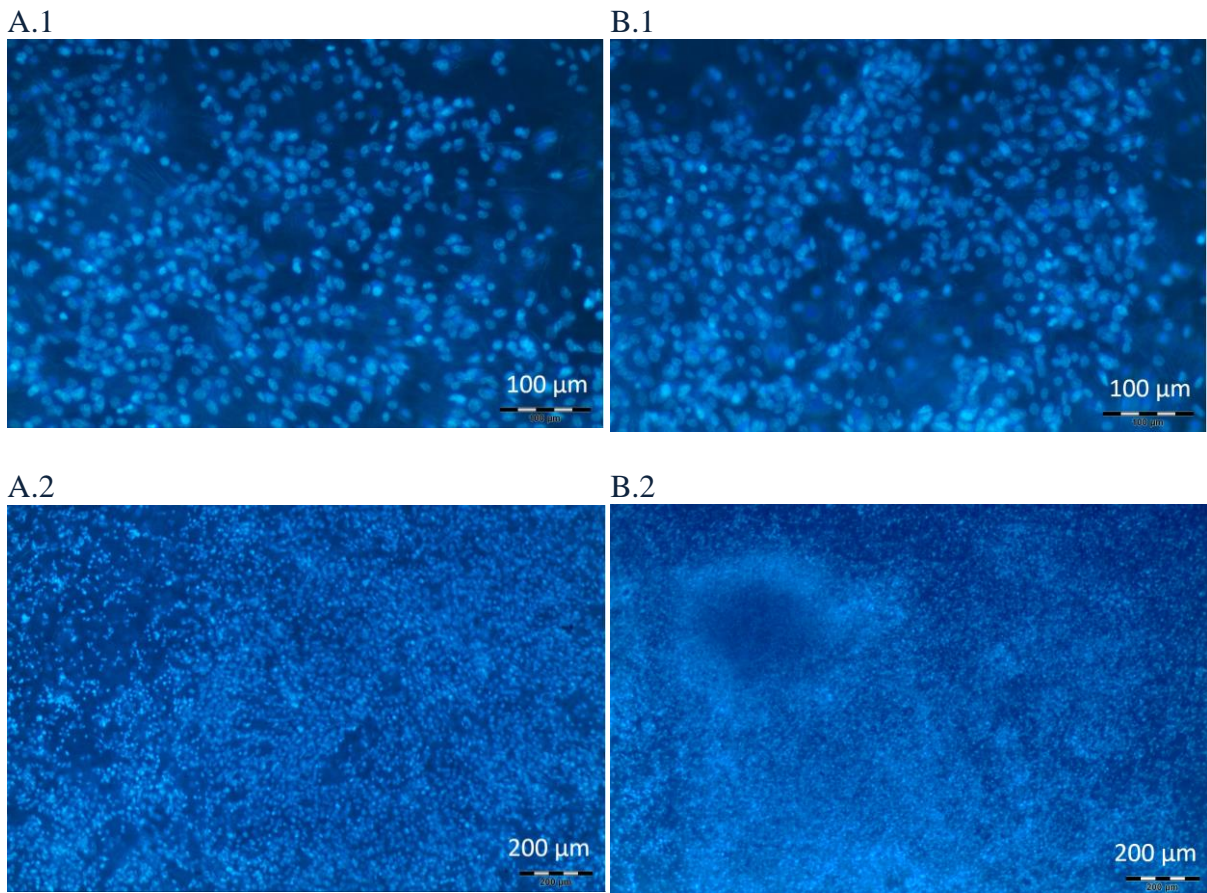


Abb. 60: Mikroskopische Aufnahmen der DAPI-Färbungen der *NIH 3T3*-Zellen im Nebelkammerreaktor (A) und in der Referenz(B) bei zwei unterschiedlichen Vergrößerungen.

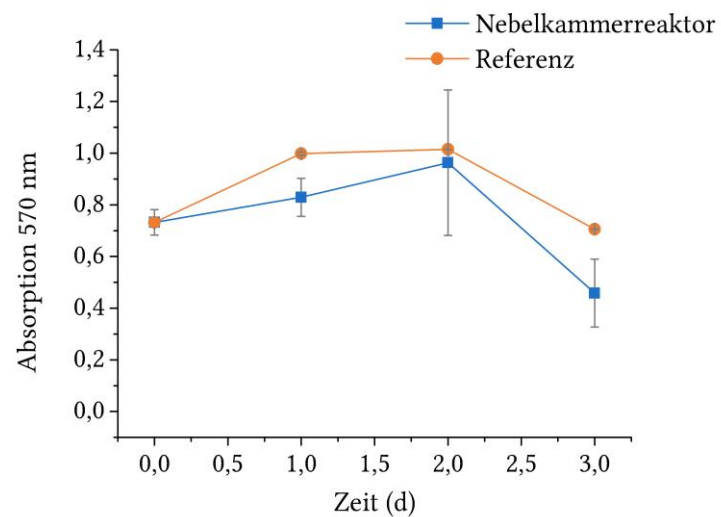


Abb. 61: MTT-Vitalitäts-Assay der *NIH 3T3* Kultivierung im Nebelkammerreaktor und in der Referenz.

Insgesamt war es also möglich die anspruchsvolle Säugetierzelllinie *NIH 3T3* über mehrere Tage im Nebelkammerreaktor zu kultivieren. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zu der Referenz festgestellt werden, sodass der Nebelkammerreaktor als geeignet für die Kultivierung von Säugetierzellen angesehen werden kann.

4.4.4 Zusammenfassung biologische Charakterisierung

Für die biologische Charakterisierung wurden drei verschiedene Modellorganismen in dem Nebelkammerreaktor kultiviert. Als erstes wurde mit der Hefe *S. cerevisiae* ein einzelliger Mikroorganismus im Nebelreaktor kultiviert. Für diese nicht adhärent wachsende Hefe wurde zunächst eine geeignete Immobilisierungsmethode mithilfe von Alginat etabliert und anschließend eine Kultivierung im Nebelkammerreaktor durchgeführt. Bei der Kultivierung von *S. cerevisiae* konnte ein vergleichbares Zellwachstum im Nebelkammerreaktor und in den etablierten Kultivierungskolben erreicht werden. Dabei war die Sauerstoffversorgung im Nebelkammerreaktor jedoch bedeutend höher. So wurde während der gesamten Kultivierung ein Sauerstoffgehalt von 100 % im Nebelkammerreaktor gemessen, wogegen der Sauerstoffgehalt in den Referenzen deutlich abfiel. Außerdem wurden im Nebelkammerreaktor im Vergleich zu den Referenzen in den Kultivierungskolben eine langsamere Glukose- und eine schnellere Ethanol-Metabolisierung beobachtet. Beides kann durch die hohe Sauerstoffversorgung im Nebelkammerreaktor erklärt werden. Die Untersuchung der Transportlimitierung durch den Nebel ergab, dass bei niedrigen Glukosekonzentrationen eine Nährstofflimitierung durch den Transport auftreten kann. Dieses hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum.

Der Fadenpilz *Flammulina velupites* wurde als zweiten Modellorganismus im Nebelkammerreaktor kultiviert. Diese Kultivierung wurde auf Gluten-Pellets und somit unter Festphasen-Bedingungen über einen Zeitraum von 22 Tagen erfolgreich durchgeführt. Bei einem Vergleich mit der etablierten Kultivierung ohne Nebel zeigte sich, dass die einzigartige Umgebung in dem Nebelkammerreaktor einen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie des Pilzes hat. So wurde zwar eine geringere Menge Pilzmycel gebildet, das gebildete Mycel wies jedoch eine filamentösere Struktur auf. Auch anhand der unterschiedlichen Expressionsmuster der gebildeten Pilz-Proteasen konnte ein deutlicher Einfluss der Kultivierungsbedingungen im Nebelkammerreaktor beobachtet werden, sodass auch für Pilze der Nebelkammerreaktor eine vielversprechende alternative Kultivierungsmethode bietet.

Als letztes wurde die scherstressensitive Säugetierzelllinie *NIH 3T3* im Nebelkammerreaktor kultiviert. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch Säugetierzellen, die eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Scherstress sowie große Ansprüche hinsichtlich des Mediums und der Begasung mit Kohlenstoffdioxid haben, im Nebelkammerreaktor kultiviert werden können. Insgesamt war das Wachstum im Nebelkammerreaktor mit der konventionellen Kultivierung in 6-Well Platten vergleichbar, sodass der Nebelkammerreaktor auch zur Kultivierung von Säugetierzellen geeignet ist.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorgelegten Dissertation wurde ein Nebelkammerreaktorsystem zur Kultivierung verschiedener biotechnologisch relevanter Zellsysteme entwickelt. Das Konzept des Nebelkammerreaktors basiert auf der Ultraschallzerstäubung des Nährmediums in kleine Nebeltropfen. Diese Nebeltropfen sedimentieren auf den Zellproben, die sich auf Probenständern im Nebel befinden und versorgen die Zellen mit Nährstoffen. Der wesentliche Vorteil dieses neuen Bioreaktorsystems ist die sehr gute Sauerstoffversorgung der Zellen, die ohne eine scherstress-induzierende Begasung erreicht werden kann. Diese Kombination aus einer optimalen Sauerstoffversorgung und einem geringen Scherstress ist mit bereits etablierten Bioreaktorsystemen nur schwierig zu erreichen. Damit ist der Nebelkammerreaktor vor allem zur Kultivierung von scherstresssensitiven Organismen mit einem hohen Sauerstoffbedarf optimal geeignet. Der entwickelte Nebelkammerreaktor wurde anschließend technisch, chemisch und biologisch charakterisiert.

Entwicklung des Nebelkammerreaktorsystems

Das in dieser Arbeit entwickelte Nebelkammerreaktorsystem besteht aus einem Reaktorkörper, einem Sensor- und Regelungssystem sowie einer Begasungseinheit. Der Reaktorkörper besteht aus einem Glaszylinder mit einem Edelstahldeckel und einer Edelstahlunterkonstruktion. In dem Reaktorinnenraum befinden sich Probenständer, auf denen die Zellen immobilisiert vorliegen, und zwei Spritzschutzvorrichtungen, die die Zellproben vor großen Flüssigkeitstropfen der Zerstäubung schützen.

Das Sensor- und Regelungssystem umfasst eine Temperaturregelung sowie einen Nebeldichtesensor. Die Temperaturregelung gleicht den Wärmeeintrag durch die Zerstäubung aus und ermöglicht eine schnelle Aufwärmzeit des Reaktors. Sie basiert auf einer PID-Reglung der Thermostattemperatur, sodass über eine Kühlkammer die Zerstäubungswärme abgeführt wird. Die entsprechenden Regelungsparameter wurden in dieser Arbeit erfolgreich bestimmt und evaluiert, sodass die Zieltemperatur schnell und ohne großes Überschwingen erreicht werden kann.

Der entwickelte Nebeldichtesensor besteht im Wesentlichen aus einer LED und einer Fotodiode. Das Transmissionslicht der LED wird dabei durch den Nebel abgeschwächt. Diese Abschwächung kann durch die Fotodiode detektiert werden. Für den erfolgreichen Betrieb des Nebeldichtesensors wurde der Aufbau optimiert, der Einfluss von Störgrößen evaluiert und eine Kalibration mit dem Trübungsstandard Formazin durchgeführt. Mithilfe dieses Nebeldichtesensors ist es möglich die Nebeldichte kontinuierlich zu erfassen und zu charakterisieren.

Das Begasungssystem besteht aus einem Sauerstoff- bzw. Kohlenstoffdioxid-geregelten Inkubator und einer Pumpe, die die Inkubatorluft in den Reaktor pumpt. Der Reaktor steht dabei in dem Inkubator. Eine Ablenkplatte verhindert während der Begasung eine Verwirbelung des Nebels. Dadurch ist es möglich, die Sauerstoff und Kohlenstoffdioxidkonzentration innerhalb des Nebelkammerreaktors einzustellen und eine gute Gasversorgung der Zellen zu gewährleisten.

Technische Charakterisierung

Zur technischen Charakterisierung des Nebelkammerreaktors wurde zunächst der Zerstäubungsprozess des Mediums näher untersucht. Dabei wurden wichtige Zerstäubungsparameter wie das Füllvolumen des Nebelkammerreaktors, die Temperatur und das Auftreten von Gasblasen in der Kühlkammer sowie der Volumenstrom der Kühlflüssigkeit identifiziert und charakterisiert. Um eine reproduzierbare Zerstäubung zu erhalten, wurden auf dieser Grundlage Standard-Zerstäubungsparameter definiert und die maximale Zerstäuberleistung (527 $\mu\text{L}/\text{min}$) sowie die maximale Nebelmenge (44 μL) im Reaktor ermittelt.

Anschließend wurde der Nebel hinsichtlich einer potentiellen Scherbelastung durch die Nebeltropfen sowie einer zeitlichen und räumlichen Verteilung der Nährstoffe charakterisiert. Der Scherstress auf die Zellen wurde anhand einer Analyse der Nebelausbreitung sowie über eine Nebeltropfengrößenverteilung untersucht. Hierbei kann aufgrund einer langsamen Sedimentationsgeschwindigkeit der Nebeltropfen von 0,2 cm/s und einer geringen Nebeltröpfchengröße (mittlerer Tropfendurchmesser: 18 μm) von einem geringen Scherstress auf die Zellen ausgegangen werden.

Durch die Analyse der Nebelaufbauzeit und der Nebeldichte in Abhängigkeit der Höhe konnte gezeigt werden, dass der Nebelkammerreaktor weniger als 1 min benötigt um eine homogene

Nährstoffverteilung im Reaktor zu erreichen. Die Bestimmung der Sedimentationsrate auf einen Standard-Probenständer zeigte die Abhängigkeit der Nährstoffversorgung von der Nebel-dichte.

Anschließend wurde ein Modell zur Berechnung der Nährstoffversorgung der Zellen basierend auf der maximalen Zerstäubungsrate bzw. der Sedimentationsrate aufgestellt. Mithilfe dieses Modells wurde die Nährstoffversorgung durch den Nebel berechnet und evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass Biotrockenmassen bis in den Gramm Maßstab sowie Zellzahlen von annähernd 1×10^{10} Zellen im Nebelkammerreaktor ohne Transportlimitierungen versorgt werden können.

Die Mischzeiten im Mediumreservoir und im Nebel lieferten zusätzliche Informationen über die Verteilung von gelösten Komponenten wie zum Beispiel Nährstoffen im Reaktor und wurden daher anschließend untersucht. Hierbei wurden relativ hohe Mischzeiten von 5,6 min im Mediumreservoir und 54,8 min im Nebel ermittelt. Es ist daher möglich, dass Nährstoff oder pH-Gradienten zwischen der flüssigen Phase und dem Nebel auftreten. Dieses sollte bei Kultivierungen mit schnellen Konzentrationsänderungen, wie sie zum Beispiel bei einer pH-Regelung entstehen, beachtet werden.

Die Evaluation der Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidversorgung zeigte, dass durch das in dieser Arbeit entwickelte Begasungssystem eine ausreichende Gasversorgung bereitgestellt werden kann.

Eine homogene Temperaturverteilung im Reaktor ist für einen effektiven Betrieb des Nebelkammerreaktors wichtig. Daher wurde eine Temperaturverteilung im Nebelkammerreaktor mittels eines Temperaturarrays aufgenommen. Hier konnte gezeigt werden, dass mithilfe eines Inkubators und der PID-Temperaturregelung eine homogene Temperaturverteilung in der gesamten Kultivierungszone erreicht werden kann.

Chemische Charakterisierung

In der chemischen Charakterisierung wurde untersucht, ob der Energieeintrag des Zerstäubungsprozesses einen Einfluss auf die Mediumbestandteile Glukose, Antibiotika (Penicillin/Streptomycin), Aminosäuren und Proteine (Penicillin G Acylase) hat.

Von den untersuchten Mediumkomponenten war kein großer Einfluss der Zerstäubung auf Glukose und das Antibiotikum Penicillin/Streptomycin innerhalb von 72 h zu erkennen. Die Gesamtaminosäurekonzentration und die Aktivität des Enzyms Penicillin G Acylase dagegen gingen im gleichen Zeitraum um 70 % bzw. 100 % zurück. Im Hinblick auf die Enzymaktivität war sogar schon nach 48 h keine Aktivität mehr messbar. Dabei stellte sich heraus, dass nicht nur eine reine Denaturierung der Enzyme für den Aktivitätsverlust verantwortlich war, sondern dass sich wahrscheinlich unlösliche Enzymaggregate bildeten. Der Energieeintrag der Ultraschallzerstäubung war jedoch nicht groß genug um die Peptidkette zu fragmentieren.

Zusammenfassend wurde somit ein bedeutender Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf die Komponenten des Nährmediums nachgewiesen. Aus diesem Grund sollte bei länger andauernden Kultivierungen im Nebelkammerreaktor das Medium regelmäßig ausgetauscht werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird ein Mediumaustausch alle 12 h empfohlen. Nach einer Kultivierungszeit von 12 h ist kein Einfluss auf Glukose und Antibiotika festzustellen. Die Gesamtaminosäurekonzentration und die Enzymaktivität sind nach 12 h mit 86 % und 80 % noch ausreichend hoch. Werden extrazelluläre Produkte in dem Nebelkammerreaktor produziert, muss deren Stabilität gegenüber der Ultraschallzerstäubung überprüft werden.

Biologische Charakterisierung

Als Letztes wurde eine biologische Charakterisierung des Nebelkammerreaktors durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Modellorganismen ausgewählt und die Möglichkeit evaluiert, den Nebelkammerreaktor für die Kultivierung des entsprechenden Zellsystems einzusetzen.

Der erste Modellorganismus, der im Nebelkammerreaktor kultiviert wurde, war die Hefe *S. cerevisiae*. Um die nicht adhärent wachsenden Hefezellen im Nebel zurückzuhalten, wurde zunächst eine geeignete Immobilisierungsmethode mithilfe von Alginat entwickelt. Bei der Kultivierung von *S. cerevisiae* im Nebelkammerreaktor konnte ein vergleichbares Zellwachstum im Nebelkammerreaktor und in den etablierten Kultivierungskolben erreicht werden. Die Sauerstoffversorgung war jedoch im Nebelkammerreaktor deutlich besser. So wurde während der gesamten Kultivierung ein Sauerstoffgehalt von 100 % im Nebelkammerreaktor gemessen wogegen der Sauerstoffgehalt in den Referenzen deutlich abfiel. Zusätzlich wurden der Glukoseverbrauch und die Ethanolproduktion überwacht. Hierbei konnte eine langsamere Glukose- und eine schnellere Ethanol-Metabolisierung im Nebelkammerreaktor beobachtet werden.

Diese Beobachtungen können durch die höhere Sauerstoffversorgung der Hefezellen im Nebelkammerreaktor erklärt werden. Mögliche Transportlimitierungen der Nährstoffe durch den Nebel bei sehr geringen Glukosekonzentrationen hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum.

Als zweiten Modellorganismus wurde der Fadenpilz *Flammulina velupites* im Nebelkammerreaktor kultiviert. Die Kultivierung wurde unter Festphasen-Bedingungen auf Gluten-Pellets über einen Zeitraum von 22 Tagen erfolgreich durchgeführt. Bei einem Vergleich mit der etablierten Kultivierung ohne Nebel zeigte sich, dass die einzigartige Umgebung im Nebelkammerreaktor einen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie des Pilzes hat. So wurde zwar eine geringere Menge Pilzmycel gebildet, das gebildete Mycel wies jedoch eine filamentösere Struktur auf. Auch anhand der unterschiedlichen Expressionsmuster der gebildeten Pilz-Proteasen konnte ein deutlicher Einfluss der Kultivierungsbedingungen im Nebelkammerreaktor beobachtet werden, sodass auch für Pilze der Nebelkammerreaktor eine vielversprechende alternative Kultivierungsmethode bietet.

Die Säugetierzelllinie *NIH 3T3* wurde als letzten scherstresssensitiven Modellorganismus im Nebelkammerreaktor kultiviert. Dabei zeigte sich, dass auch Säugetierzellen, die eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Scherstress sowie große Ansprüche hinsichtlich des Mediums und der Begasung mit Kohlenstoffdioxid haben, im Nebelkammerreaktor kultiviert werden können. Insgesamt war das Wachstum im Nebelkammerreaktor mit der konventionellen Kultivierungen in 6-Well Platten vergleichbar, sodass der Nebelkammerreaktor auch zur Kultivierung von Säugetierzellen geeignet ist.

6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein Nebelkammerreaktorsystem erfolgreich entwickelt werden, das in der Lage ist, alle physikalischen, chemischen und biologischen Ansprüche der verwendeten Zellsysteme zu erfüllen. Dabei konnten mehrere Vorteile dieses neuen Reaktorsystems für die verschiedenen Zellsysteme identifiziert werden. Hier ist besonders die gute Sauerstoffversorgung ohne eine scherstressinduzierende Begasung hervorzuheben. Aus diesem Grund ist der entwickelte Nebelkammerreaktor besonders für scherstressensitive Zellen oder Gewebe mit einem hohen Sauerstoffbedarf geeignet. Als Beispiele für scherstressensitive Zellsysteme mit einem hohen Bedarf an Sauerstoff können z. B. Haut-, Augenhornhaut- (Cornea) oder Lungengewebe aufgeführt werden. Daher kann besonders die regenerative Medizin als mögliches Anwendungsfeld für den Nebelkammerreaktor genannt werden. Optimierungspotenzial gibt es jedoch noch in der Stabilität des Nährmediums. Hier sollte versucht werden, den Energieeintrag zu minimieren, um eine längere Stabilität des Mediums zu erreichen.

Zusätzlich zu der hohen Sauerstoffversorgung bei geringem Scherstress kann auch der geringe Mediumverbrauch als Vorteil des Nebelkammerreaktors aufgeführt werden. Dieses führt neben dem hohen wissenschaftlichen auch zu einem hohen wirtschaftlichen Potenzial des Reaktors. Dabei könnte auch die räumliche Trennung der Zellen im Nebel vom unzerstäubten flüssigen Medium zukünftig eine bedeutende Rolle spielen. Durch diese Trennung ist es zum Beispiel möglich ein sekretiertes Produkt unterhalb der Probenstände aufzufangen, sodass eine starke Verdünnung des Produktes durch das flüssige Medium verhindert wird. Dieses führt zu einer sehr hohen Produktkonzentration, welches die Aufarbeitung des Produktes erheblich erleichtert. Auch eine kontinuierliche Prozessführung mit einem regelmäßigen Mediumaustausch ist durch die Trennung von Zellen und Medium einfach umzusetzen. Dadurch ergibt sich neben der Kultivierung von scherstresssensitiven Zellen und Gewebe auch ein bedeutendes Potenzial zur effektiven und kostengünstigen Produktion von hochwertigen biotechnologisch hergestellten Produkten. Dafür könnten, wie in dieser Arbeit gezeigt, sowohl Mikroorganismen als auch Fadenpilze oder Säugetierzellen verwendet werden.

Insgesamt besitzt das in dieser Arbeit entwickelte Nebelkammerreaktorsystem daher ein enormes wissenschaftliches und wirtschaftliches Potenzial und sollte zukünftig für die Kultivierung von verschiedenen Zellsystemen in Betracht gezogen werden.

Anhang

A Material

A.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
4,6 Diamino-2-phyllindol (DAPI)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Agar	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Alginat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Aminosäurestandard, AAS18	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Ammoniumsulfat	Fluka, Buchs, Schweiz
Borsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
BTEE	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Coomassie Brilliant Blue G250	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Glukose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Glutenpellets	Nestle, Singen, DE
Glycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Hefeextrakt	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Hexamethylentetramin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Hydrazinsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
L-Asparagin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, DE

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
L-Tryptophan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Matriderm	Medskin Solution Dr. Suwelack AG, Billerbeck, DE
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Natrium-Citrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Natriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Natriumsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Nonidet-P40	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Penicillin G Acylase	ASA Spezialenzyme, Wolfenbüttel, Deutschland, DE
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe, DE
Phosphorsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Phthaldialdehyde Reagenz (OPA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Salzsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris HCL	Fluka, Buchs, Schweiz
Trypton	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
α -Chymotrypsin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE
β -Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz

A.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Einstabmesskette, Easyferm 120 Plus	Hamilton, Höchst, DE
Flügelrad-Durchflussmesser	Conrad, Hannover, DE
Gaschromatograph, Shimadzu GC-14b, JA	Shimadzu, Duisburg, DE
Glukose Analyzer, YSI 2300	YSI Brannum, USA
Hygrometer, HygroPalm 22	Rotronic AG, Ettlingen, DE
Inkubator, Binder C150	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Kamera, Canon EOS 700D	Canon, Tokyo, Japan
Mikroskop, Olympus IX50	Olympus, Hamburg, DE
pH-Sensor, pH4-mini	PreSens, Regensburg, DE
Pipette (100 µL-1000 µL, 20 µL-200 µL)	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, DE
Sauerstoffsensoren, Oxy-4 mini	PreSens, Regensburg, DE
Silikonschläuche	VWR International GmbH, Darmstadt
Thermostat, DC30	Thermo Haake, Karlsruhe, DE
Trockenschrank, WTB Binder	Binder, Tuttlingen, DE
Ultraschallzerstäuber (24 W, 1,5 MHz)	BOGA Gerätetechnik, Soest, DE
Ultraschallzerstäuber, NB-80E-01-H (20 W, 2,5 MHz)	TDK, Achern, DE
Ultra-Turrax, Micra D-9	Micra, Mühlheim, DE
Waage LPS6200S	Sartorius, Göttingen, DE
Wasseraufbereitungsanlage, Arium 611	Arium 611, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Zählkammer (improved Neubauer)	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, DE
Zellsieb (Porengröße: 100 µm)	Corning, Durham, USA

A.3 Verwendete Zelllinien

Organismus	Hersteller
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS, Niederlande, H1024
<i>F. velupites</i>	DSMZ, Nr. 1658
<i>NIH 3T3</i>	DSMZ, Nr. ACC-59

A.4 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Minimalmedium

Chemikalie	Menge
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 g/L
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,5 g/L
Spurgenelementslösung (s. u.)	1 mL

SNL-Medium

Chemikalie	Menge
D-Glukose	30 g/L
L-Asparagin x H ₂ O	4,5 g/L
Hefeextrakt	3 g/L
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 g/L
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,5 g/L
Spurgenelementslösung (s. u.)	1 mL

Spurenelementlösung

Chemikalie	Menge
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,08 g/L
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,09 g/L
MnSO ₄ x H ₂ O	0.03 g/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g/L
Triplex III (EDTA)	0,4 g/L

DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Das DMEM-Medium wurde von Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE bezogen.

Chemikalie	Menge	Chemikalie	Menge
Calciumchlorid	0,2 g/L	L-Phenylalanin	0,066 g/L
Eisennitrat x 9 H ₂ O	0,0001 g/L	L-Serin	0,042 g/L
Magnesiumsulfat	0,09767 g/L	L-Threonin	0,095 g/L
Kaliumchlorid	0,4 g/L	L-Tryptophan	0,016 g/L
Natriumchlorid	6,4 g/L	L-Tyrosin x 2 Na x 2 H ₂ O	0,10379 g/L
Natriumhydrogenphosphat	0,109 g/L	L-Valin	0,094 g/L
Glukose	4,5 g/L	Cholinchlorid	0,004 g/L
L-Arginin x HCl	0,084 g/L	Folsäure	0,004 g/L
L-Cystin x 2 HCl	0,0626 g/L	Myoinositol	0,0072 g/L
L-Glutamin	0,584 g/L	Nicotinamid	0,004 g/L
Glycin	0,03 g/L	D-Pantothensäure	0,004 g/L
L-Histidin x HCl x H ₂ O	0,042 g/L	Pyridoxal x HCl	0,004 g/L
L-Isoleucin	0,105 g/L	Riboflavin	0,0004 g/L
L-Leucin	0,105 g/L	Thiamin x HCl	0,004 g/L
L-Lysin x HCl	0,146 g/L	Phenolrot x Na	0,0159 g/L
L-Methionin	0,03 g/L	Brenztraubensäure x Na	0,11 g/L

LB-Medium

Chemikalie	Menge
Hefeextrakt	5 g/L
Trypton	10 g/L
Natriumchlorid	5 g/L
Agar	15 g/L

YM-Medium

Chemikalie	Menge
Glukose	10 g/L
Malzextrakt	3 g/L
Pepton	5 g/L
Hefeextrakt	3 g/L

DAPI Färbepuffer

Chemikalie	Menge
Tris, pH 7	100 mM
Natriumchlorid	150 mM
Calciumchlorid	1 mM
Magnesiumchlorid	0,5 mM
Nonidet-P40	0,1 %

DAPI-Stammlösung

500 µg/mL DAPI in H₂O

DAPI-Färbelösung

2 μ L DAPI-Stammlösung pro mL DAPI Färbepuffer

Phosphatpuffer (PBS, pH 7)

Chemikalie	Menge
Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	10,1 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,8 mM

B Methoden

B.1 Aufbau und Entwicklung des Nebelkammerreaktors

B.1.1 Aufbau des Kühlsystems

Die Temperatur in dem Nebelkammerreaktor wird durch einen Inkubator (Binder C 150, Binder, Tuttingen, DE) und ein Kühlsystem, welches die entstehende Zerstäubungswärme abführt, eingestellt. Der Aufbau des Standard-Kühlsystems ist in Abb. 64 dargestellt. Das Kühlsystem besteht aus einem Thermostat (DC 30, Thermo Haake, Karlsruhe, DE), dem Schlauchsystem, einem Flügelrad-Durchflussmesser und einem Ventil. Das Thermostat ist über eine serielle Schnittstelle mit dem PC verbunden und die Temperatur des Thermostaten kann mithilfe eines Modbus-Protokolls und der Software ProfiSignal eingestellt werden. Neben der Thermostattemperatur haben auch der Kühlflüssigkeitsstrom und die Wärmeabgabe über das Schlauchsystem einen Einfluss auf die Kühlleistung des Reaktors. Bei dem Standard-Kühlsystem wurden daher immer ein Kühlfluss von 150 mL/min und das in Abb. 64 dargestellte Schlauchsystem verwendet.

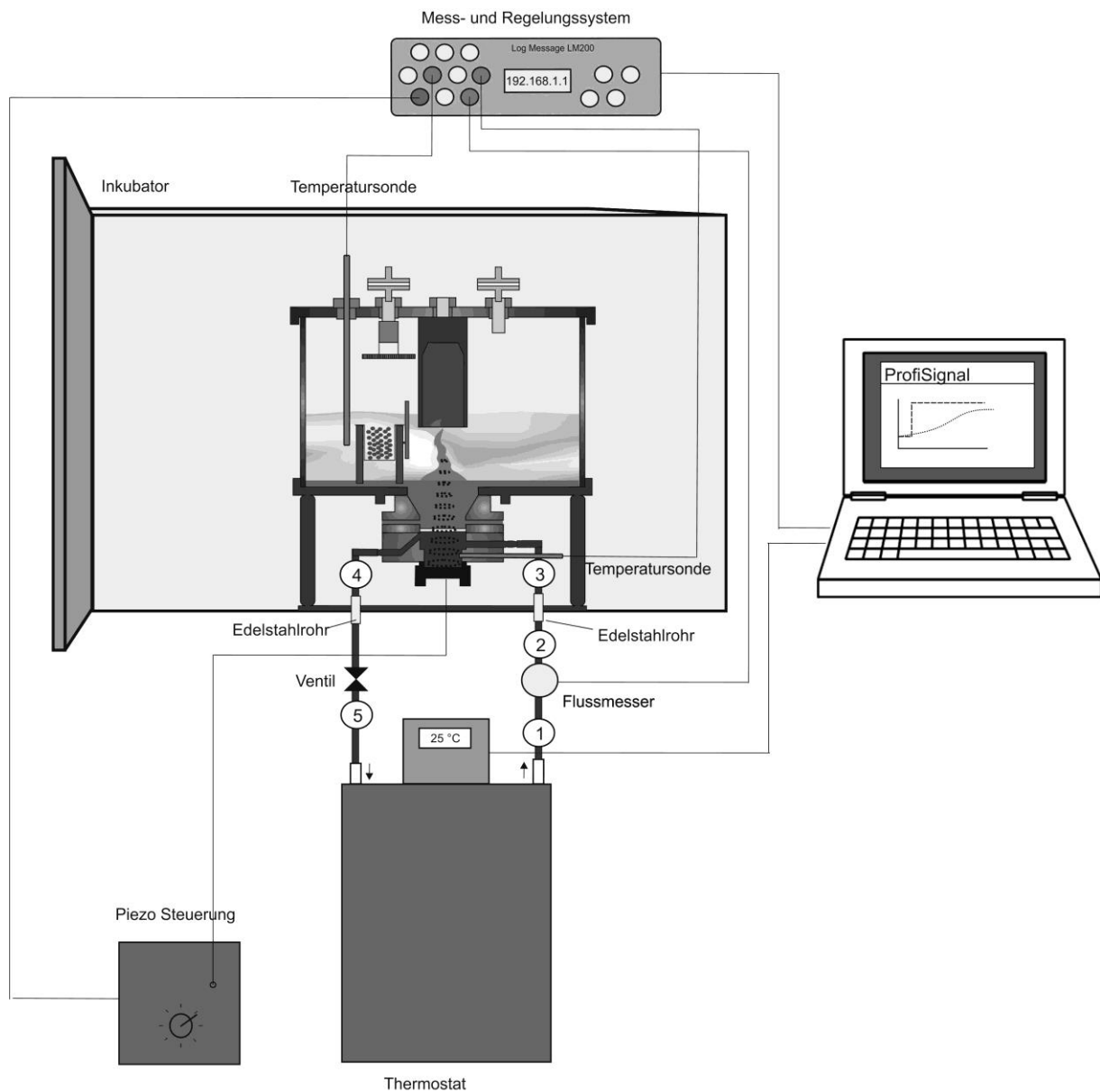


Abb. 62: Darstellung des verwendeten Kühlsystems des Nebelkammerreaktors. Die verwendeten Silikonschläuche sind in der Abbildung mit den Nummern 1-5 gekennzeichnet. Länge und Durchmesser der Schläuche sind in Tab. 12 dargestellt.

Nr.	Länge/Innendurchmesser/Außendurchmesser der Silikonschläuche (cm)	Nr.	Länge/Innendurchmesser/Außendurchmesser der Silikonschläuche (cm)
1	90/7/9	4	40/3,5/6
2	70/7/9	5	130/7/9
3	80/3,5/6		

B.1.2 Einstellung des Kühlflüssigkeitsstroms

Der Kühlflüssigkeitsstrom wird während der Experimente mit einem digitalen Flügelrad-Durchflussmesser bestimmt und durch ein Ventil eingestellt: Dieser Durchflussmesser besteht aus einem Flügelrad dessen Umdrehungsgeschwindigkeit proportional zur Durchflussrate ist und durch einen Impulszähler erfasst werden kann. Die Funktion des Impulszählers wird durch die Mess- und Regelbox übernommen, welche die Daten daraufhin zu der Software Profi-Signal weiterleitet. Anhand einer Kalibrationsgeraden kann die Impulsrate in eine Durchflussrate umgerechnet werden. Diese Kalibration ist in Abb. 63 bei drei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ein nur sehr leichter Einfluss der Temperatur auf die Kalibration vorhanden ist. Aus diesem Grund wurde eine gemittelte Kalibrationskurve erstellt. Diese ist in dem Temperaturbereich zwischen 15 und 35 °C gültig und hat immer noch einen guten RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration) von 15,761 mL/min. Diese Kalibrationsgerade wurde in der Software hinterlegt, sodass die Durchflussrate direkt überwacht werden kann.

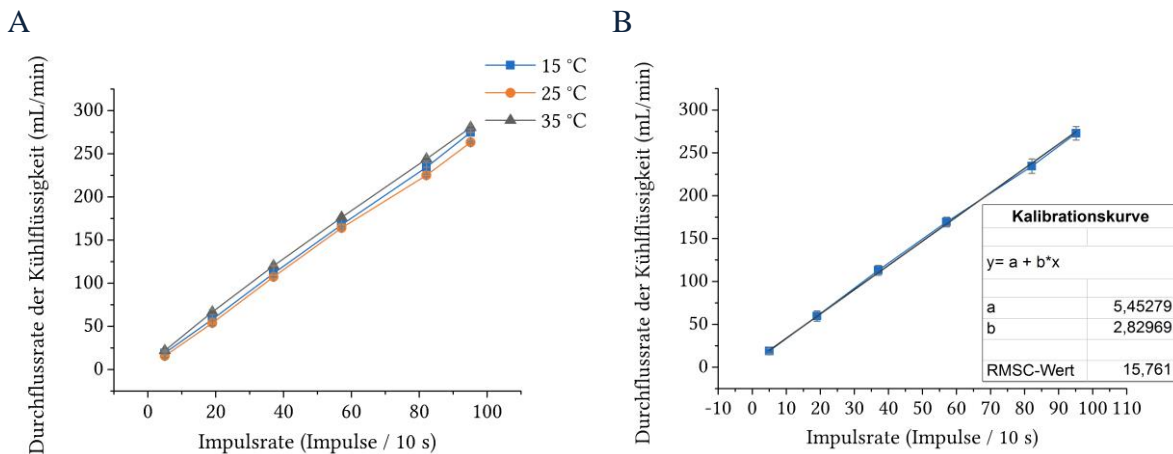


Abb. 63: Kalibration des digitalen Durchflussmessers bei verschiedenen Temperaturen (A) und über die gemessenen Temperaturen gemittelt (B).

B.1.3 Bestimmung der PID-Temperaturregelungsparameter

Die Bestimmung der PID-Temperaturregelungsparameter erfolgte mithilfe einer Sprungfunktion nach Chien Hrones und Reswik [72] und durch das T-Summenverfahren [69] und wird in 4.1.7 beschrieben.

B.1.4 Entwicklung eines Nebeldichtesensors

Der in dieser Arbeit verwendete Nebeldichtesensor wurde am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover entwickelt und gebaut. Der Aufbau dieses Nebeldichtesensors ist in Abb. 64 dargestellt. Der Nebeldichtesensor misst die Abschwächung des Transmissionslichtes einer LED (JET-660-05, Roithner, Wien, Österreich, Wellenlänge: 660 nm, Stahlendivergenz: 5 deg.) durch den Nebel mittels einer Photodiode (IPL 10530, IPL, Dorset, UK). Ein Bandpassfilter (FB650-40, Thorlabs, Munich, Germany) verhindert dabei einen zu großen Einfluss des Umgebungslichts. Für die Experimente wurde wie in 4.1.8 beschrieben eine Messstrecke von 22 mm und eine LED Ansteuerungsstromstärke von 0,15 mA ohne Tropfen auf der Glaswand bzw. 0,24 mA mit Tropfen auf der Glaswand verwendet. Außerdem wurde vor jedem Experiment der Signalanteil des Umgebungslichts von dem Gesamtsignal abgezogen. Der Signalanteil des Umgebungslichts wurde bei ausgeschalteter LED durch die Photodiode gemessen.

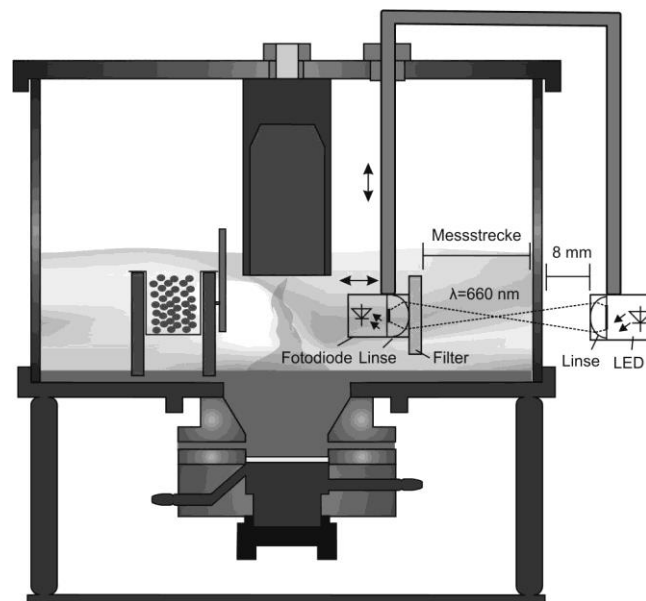


Abb. 64: Aufbau des Nebeldichtesensors und dessen Integration in den Nebelkammerreaktor.

B.1.5 Herstellung eines Formazinstandards

Für die Kalibration des Nebeldichtesensors wurde ein Formazinstandard benötigt. Dadurch kann das Signal des Nebeldichtesensors (mV) in die Trübungseinheit NTU umgerechnet wer-

den. Für die Herstellung einer Formazindispersion mit 4000 NTU wurden 5,0 g Hydraziniumsulfat und 50 g Hexamethylentetramin in je in 400 mL dd H₂O gelöst. Beide Lösungen wurden zusammengegeben, auf 1 L mit dd H₂O aufgefüllt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich die Kristalle der Formazindispersion. Die optische Dichte wurde am Photospektrometer bei 600 nm überprüft. Diese Standard-Formazindispersion kann anschließend mit einer Verdünnungslösung (50 g/L Hexamethylentetramin, 5,38 g/L Natriumsulfat) auf die entsprechende Trübung für die Kalibration eingestellt werden. Dafür wurde die folgende Formel verwendet:

$$\frac{(\text{Gewünschtes Volumen}) * (\text{Gewünschte Trübung in NTU})}{(\text{Trübung des Standards in NTU})} = \text{Volumen des Standards}$$

B.1.6 Kalibration des Nebeldichtesensors

Für die Kalibration des Nebeldichtesensors wurde der Reaktor zunächst gründlich mit Isopropanol und dd H₂O gespült. Danach wurde ein am Institut gefertigter PVC-Verdrängungskörper in den Reaktor eingesetzt. Dieser verringerte das benötigte Volumen der Kalibrationsdispersion auf 200 mL. Die Messstrecke des Sensors wurde auf 22 mm und die auf Höhe 10 mm (gemessen von der äußeren Kante des Reaktors bis zur Unterkante der LED) eingestellt. Die Formazinkalibrationsdispersion wurde direkt vor der Messung für 10 sec gemischt und dann in den Reaktorgegeben. Danach wurde das Signal an der Photodiode bei 0,15 mA LED Ansteuerungsstromstärke gemessen und das Umgebungslicht abgezogen. Anschließend wurde der Reaktor gespült und die nächste Kalibrationsdispersion verwendet.

B.1.7 Bestimmung der Nebeldichte mit dem Nebeldichtesensor

Für die Bestimmung der Nebeldichte mit dem Nebelsensor wurde die Messstrecke des Sensors auf 22 mm und die auf Höhe 10 mm (gemessen von der äußeren Kante des Reaktors bis zur Unterkante der LED) eingestellt. Danach wurde das Signal an der Photodiode bei 0,24 mA LED Ansteuerungsstromstärke gemessen und das Umgebungslicht von dem Signal abgezogen.

B.1.8 Bestimmung des Nebelaustrags mit und ohne Ablenkplatte

Der Nebelaustrag wurde mit und ohne einer am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover gefertigten Ablenkplatte bei verschiedenen Begasungsraten gemessen. Dafür wurde der in 4.1.9 beschriebene Aufbau des Begasungssystems verwendet. Dabei wurde an dem Begasungsausgang eine Kühlfalle angeschlossen, die mit flüssigem Stickstoff in einem Dewargefäß gekühlt wurde. Dadurch kondensierte der ausgetragene Nebel in der Kühlfalle und es konnte die Menge an ausgetragenen Nebel durch Wiegen der Kühlfalle bestimmt werden. Am Ausgang der Kühlfalle wurde ein 50 cm langer Silikon-Schlauch angeschlossen und am Ende des Schlauches die Luftfeuchtigkeit mit einem Hygrometer (HygroPalm 22, Rotronic AG, Bassersdorf, Schweiz) überprüft.

B.2 Technische Charakterisierung

B.2.1 Bestimmung der optimalen Zerstäubungsparameter

Als wichtige Parameter, die einen Einfluss auf den Zerstäubungsprozess haben, wurden in dieser Arbeit das Füllvolumen, die Temperatur in der Kühlkammer, Gasblasen in der Kühlkammer und der Volumenstrom der Kühlflüssigkeit identifiziert. Der Einfluss dieser Parameter auf die Zerstäubung wurde mithilfe des Nebeldichtesensors bestimmt. Dafür wurde jeweils ein Parameter variiert, während die anderen Parameter konstant gehalten wurden. Für die Experimente wurden ein Füllvolumen von 100 mL, Raumtemperatur (25 °C), und ein Volumenstrom der Kühlflüssigkeit von 150 mL/min verwendet. Zur Reinigung der Edelstahl-Trennfolie wurde diese gründlich mit Spülmittel und einem Tuch abgewischt. Gasblasen in der Kühlkammer unterhalb der Trennfolie wurden durch Abschrauben des Zerstäubers identifiziert.

B.2.2 Maximale Zerstäuberleistung, Nebelmenge und Nebeldichte

Die maximale Zerstäuberleistung und die maximale Nebelmenge wurden mit den in 4.2.1.1 bestimmten Standard-Zerstäubungsparametern in einem Inkubator bei 37 °C über den Gewichtsverlust des Reaktors, während der Nebel mit Druckluft ausgeblasen wurde, bestimmt. Um Verdunstungseffekte, die nicht durch den Zerstäubungsprozess hervorgerufen werden, zu vermeiden, wurde die Druckluft, bevor sie in den Reaktor geleitet wurde, angefeuchtet. Dafür wurde die Luft mittels eines Spargers durch eine mit 30 °C warmen Wasser gefüllte druckre-

sistente 1 L Duran[®] Laborflasche geleitet. Die Luftfeuchtigkeit wurde dabei mittels eines Hygrometers (HygroPalm 22, Rotronic AG, Bassersdorf, Schweiz) kontrolliert. Der Nebelaustrag wurde über einen Zeitraum von 3 min mit einem Gasdurchfluss von 41 L/min und drei offenen Deckelports gemessen. Der Gewichtsverlust des Reaktors wurde über eine LPS6200S Waage (Sartorius, Göttingen, DE) bestimmt. Die Zerstäuberleistung wurde über den Gewichtsverlust bei angeschaltetem Zerstäuber bestimmt. Für die Messung der Nebelmenge im Reaktor wurde der Zerstäuber vor dem Ausblasen des Nebels ausgeschaltet, sodass nur der im Reaktor vorhandene Nebel ausgetragen wird. Die Nebeldichte wurde mit dem in dieser Arbeit entwickelten Nebeldichtesensor bestimmt.

B.2.3 Bestimmung der Sedimentationsrate auf einem Standard-Probenständer

Die Sedimentationsrate auf einen Standard-Probenständer wurde mit den Standard-Zerstäubungsparametern und einem Spritzschutz an den Probenständern durchgeführt. Dafür wurde das Zellsieb des Probenständers unten mit Aluminiumfolie verschlossen. Die Probenständer wurden in den Reaktor gestellt und der Reaktor mit 100 mL dd H₂O befüllt. Die sedimentierte Nebelmenge konnte nach 1 bzw. 2 h durch Wiegen der Probenständer bestimmt werden. Die Nebeldichte wurde mit dem Nebelsensor bestimmt.

B.2.4 Evaluation der Nebelausbreitung

Die Evaluation der Nebelausbreitung erfolgte mithilfe von Serienbildaufnahmen, die mit der Kamera Canon EOS 700D angefertigt wurden. Die Einzelbildaufnahmerate lag bei 200 fps. Die Geschwindigkeit der Nebeltropfen konnte mithilfe des Durchmessers (5,4 cm) des Reaktorzylinders und der Zeit zwischen den Bildern abgeschätzt werden.

B.2.5 Bestimmung der Größe der sedimentierten Nebeltropfen

Die Größe der sedimentierten Nebeltropfen auf einen Standardprobenständer wurde mikroskopisch bestimmt. Dafür wurde ein Deckgläschen auf einen Standard-Probenständer gelegt und mit einem am Institut für Technische Chemie entwickeltem Deckel abgedeckt. Dieser Deckel konnte ohne Öffnung des Reaktordeckels durch einen Port im Reaktordeckel geöffnet werden. Dadurch konnte eine Störung des Zerstäubungsprozesses durch das Abnehmen des Reaktordeckels verhindert werden. Die Zerstäubung wurde angeschaltet und für 1 min vorgenebelt. Danach wurde der Deckel des Deckgläschens für 10 sec angehoben und der Nebel konnte auf dem

Deckgläschen sedimentieren. Anschließend wurde der Deckel wieder auf das Deckgläschen abgesenkt und die entstandenen Nebeltropfen am Mikroskop (Olympus IX50, Olympus, Tokyo, Japan) vermessen.

Die Auswertung der Bilder und die Bestimmung der Nebeltropfendurchmesser erfolgten mit dem am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover entwickelten Bildbearbeitungsprogramm *Particle Analyzer* (Entwickelt von Lindner und Prediger [73, 74]).

B.2.6 Evaluation der Kohlenstoffdioxidversorgung

Die Kohlenstoffdioxidversorgung wurde mittels der Veränderung des pH-Wertes eines Kohlen säure-Bicarbonat gepufferten DMEM Mediums getestet. Dafür wurde der in 4.1.9 beschriebene Aufbau des Begasungssystems verwendet. Für das Experiment wurde 100 mL frisches DMEM-Medium in den Reaktor gefüllt und in einen CO₂-geregelten Inkubator gestellt. Anschließend wurde die Begasung eingestellt und die Veränderung des pH-Wertes durch eine Einstabmesskette (EasyFerm 120 Plus, Hamilton GmbH, Höchst, DE) im Medium gemessen.

B.2.7 Bestimmung der Mischzeit

Es wurde die Mischzeit des Nebelkammerreaktors für die flüssige Phase und für die Nebel-Phase mithilfe der pH-Methode [79] bestimmt. Zur pH-Messung wurde das faseroptische System pH4-mini der Firma PreSens (PreSens, Regensburg, DE) verwendet. Dieses hat den Vorteil, dass sowohl in der flüssigen Phase als auch in der Nebel-Phase gleichzeitig der pH-Wert bestimmt werden kann. Die Kalibration des Sensors wurde wie im Handbuch beschrieben durchgeführt [87]. Als Messorte wurden in radialer Richtung des Reaktorzyinders die Mitte der Kultivierungszone verwendet ($r = 4,5$ cm) und in axialer Richtung für die flüssige Phase 0,1 cm über dem Reaktorboden bzw. 2 cm für die Nebel-Phase. Letzteres entspricht ungefähr der Position der Zellproben im Reaktor. Die Experimente wurden bei Standard-Zerstäubungsparametern mit maximaler Zerstäuberleistung des Potentiometers der Ultraschallsteuerung durchgeführt. Für die Experimente wurden 100 mL eines 10 mM Phosphatpuffers in den Reaktor gegeben. Dann wurde die Zerstäubung angestellt und so lange vorgenebelt bis der pH-Wert im Mediumreservoir und im Nebel gleich und konstant war. Anschließend wurden 250 μ L einer 2 M HCl-Lösung mithilfe einer Spritze mit einer Kanüle in der Mitte des Mediumreservoirs dazugegeben und der pH-Wert in der flüssigen Phase und im Nebel aufgezeichnet. Als Mischzeit wurde die Zeit definiert zu der 90 % des finalen pH-Wertes erreicht waren.

B.2.8 Bestimmung der Temperaturverteilung

Die Temperaturverteilung wurde mit dem in 4.2.6 beschriebenen Temperaturarray bestimmt. Dafür wurde der Temperaturarray in den Reaktor befestigt und der Reaktor in den Inkubator gestellt. Die Regelung der Temperatur wurde durch die in 4.1.7 bestimmten Regelungsparameter des Thermostaten übernommen. Die Temperaturverteilung wurde nach der Aufwärmphase des Reaktors aufgenommen. Zur Visualisierung der Temperaturverteilung wurden die Werte zwischen den Temperatursensoren mit einer Normalverteilung extrapoliert.

B.3 Chemische Charakterisierung

Für alle Experimente in diesem Kapitel wurde der folgende Aufbau verwendet.

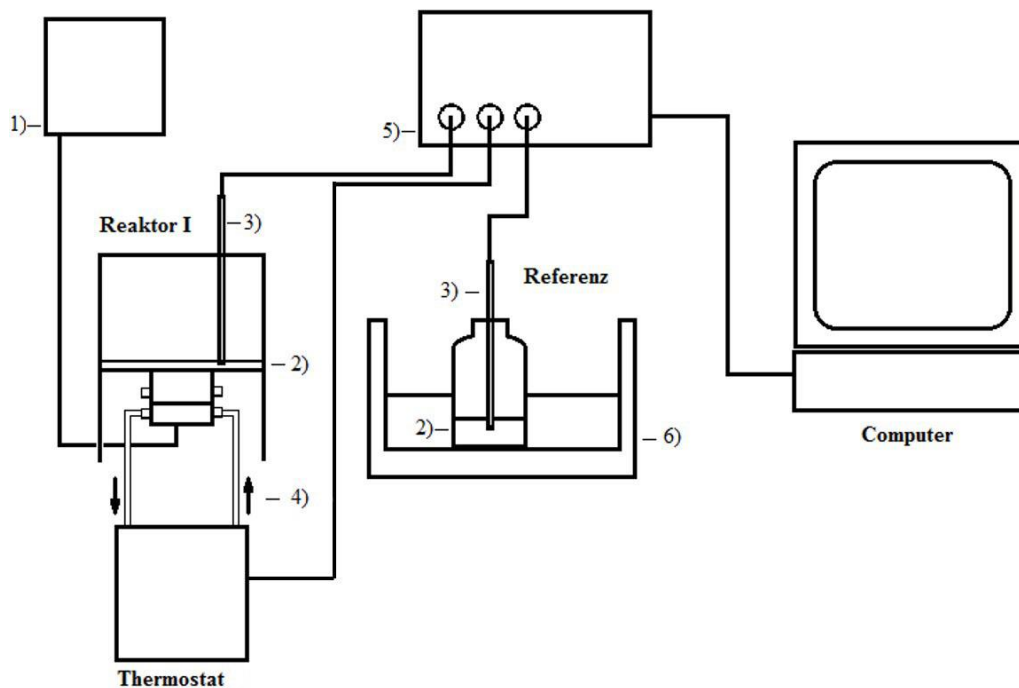


Abb. 65: Experimentaufbau für die Untersuchung der Mediumkomponentenstabilität. 1) Steuerungseinheit des Ultraschallzerstäubers 2) Probelösungen 3) Pt-100 Temperatursonden 4) Kühlsystem 5) Datenlogger 6) Wasserbad

Die Experimente wurden jeweils mit 100 mL Probelösung bei einer Temperatur von 25 °C bei maximaler Zerstäuberleistung durchgeführt. Bei diesem Experimentdesign wurde besonderen Wert auf die Überwachung und Regelung der Temperaturen der Probelösungen gelegt. Dafür wurden je eine Pt-100 Temperatursonde in der Probelösung des Nebelkammerreaktors und in

der Probelösung der Referenz installiert. Die Temperatur der Referenz wurde durch ein Wasserbad mit der Temperatur von 25 °C eingestellt. Diese Temperatur wurde während des Experimentes konstant gehalten. Die Temperatur des Nebelkammerreaktors wurde durch ein angeschlossenes Thermostat auf die Temperatur der Referenzprobelösung geregelt. Dafür wurden folgende Regel- und Prozessparameter verwendet: PID (K_p : 0,07, T_i : 1556,71 s, T_D : 393,90 s), Kühlflüssigkeitsstrom (150 mL/min), Füllvolumen (100 mL), Zerstäuberleistung (100 %). Sowohl der Nebelkammerreaktor als auch die Referenz wurden zuvor zur Vermeidung von Kontaminationen autoklaviert.

Die Probennahme fand durch einen der 18,5 mm Ports im Deckel des Reaktors statt. Die Probenflüssigkeit wurde mit einer 1 mL Spritze und einer 15 cm Kanüle durchgeführt. Zum Schutz der Metalltrennfolie wurde ein 1 cm langes Schlauchstück über die Spitze der Kanüle gesteckt. Vor der Probennahme wurde der Reaktor und die Referenz für 3 min stark geschüttelt und durch mehrmaliges Wenden sichergestellt, dass keine Ablagerungen an den Wänden und an dem Deckel verbleiben.

B.3.1 Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Glukose und Antibiotika

Der Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Glukose und Antibiotika wurde zusammen in DMEM Medium mit 1 g/L Glukose, 3,7 g/L NaHCO_3 und 10 % Penicillin/Streptomycin mit dem in B.3 beschriebenen Aufbau und den dort erwähnten Regel- und Prozessparametern gemessen. Als Referenz diente jeweils eine Probe, die nicht zerstäubt wurde. Für die Glukosemessung wurde ein Glukoseanalyzer (YSI 2300, YSI, Brannum, USA) verwendet. Für die Bestimmung der Wirksamkeit des Antibiotikums Penicillin/Streptomycin wurde eine frisch autoklavierte warme LB-Medium-Agar-Lösung (Hefeextrakt 5 g/L, Trypton 10 g/L, Natriumchlorid 5 g/L und Agar 15 g/L) in Petrischalen überführt. Nach dem Abkühlen und Aushärten des Agars wurden aus einer Vorkultur von *E.coli-K12*-Bakterien jeweils 100 μL auf eine Agarplatte gleichmäßig ausplattiert. Auf der Agarplatte wurden runde Filterpapierausschnitte ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) gelegt. Auf diese Filterpapiere wurden je 10 μL der Proben des Nebelkammerreaktors sowie der Referenz der Antibiotikatestlösung (DMEM mit 10 % Pen/Strep) pipettiert. Die Agarplatte wurde anschließend bei 37 °C für 24 h inkubiert und die Hemmhöfe ausgemessen. Die Messung der Hemmhofdurchmesser erfolgte nach dem Einscannen der Agarplatten mit dem Programm ImageJ.

B.3.2 Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Aminosäuren

Für die Untersuchung des Einflusses der Ultraschallzerstäubung auf Aminosäuren wurden die in 4.3 beschriebenen Regel- und Prozessparameter verwendet. Die Probelösung bestand aus einer Standardaminosäurelösung mit 0,04 mM jeder Aminosäure in 0,4 M Boratpuffer (pH 9,5). Dafür wurde ein Aminosäurestandard (AAS18, Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE) zusätzlich mit den Aminosäuren Asparagin, Glutamin und Tryptophan (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE) versetzt (Endkonzentration aller Aminosäuren 0,04 M) und steriltfiltriert. 75 mL Boratpuffer wurden in den Reaktor und die Referenz vorgelegt. Das Wasserbad, das Thermostat und die Regelung wurden eingeschaltet und gewartet bis die Temperaturen in beiden Gefäßen gleich und konstant waren. Anschließend wurden 25 mL der Standardaminosäurelösung in den Nebelkammerreaktor und in die Referenz gefüllt, sodass sich eine Endkonzentration von 0,01 mM der Probelösung für den Nebelkammerreaktor und die Referenz ergab. Diese Lösung wurde in den Nebelkammerreaktor gegeben und zerstäubt. Als Referenz diente eine unzerstäubte Aminosäurelösung. Die Auswertung erfolgte mit der in B.3.8 beschriebenen Aminosäureanalytik.

B.3.3 Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Proteine und Enzyme

Für die Untersuchung des Einflusses der Ultraschallzerstäubung auf Proteine und Enzyme wurde als Probelösung zunächst 100 µL Penicillin G Acylase (PGA) oder 0,1 g α -Chymotrypsin (CT) in 25 mL Phosphatpuffer (Konzentration: 50 mM, Ionenstärke 150 mM, pH-Wert 7,5) gelöst. Zusätzlich wurden 75 mL des Phosphatpuffers vor dem Experiment zur Einstellung der Temperatur in den Nebelkammerreaktor und in die Referenz gegeben. Nachdem die Temperaturen in der Referenz und im Nebelkammerreaktor gleich und konstant waren, wurden die 25 mL der Enzymlösung dazugegeben und kräftig durchmischt. Durch diese Methode konnte sichergestellt werden, dass die sehr temperaturempfindlichen Enzyme in der Referenz und im Nebelkammerreaktor den gleichen Temperaturen ausgesetzt waren. Die Zerstäubung des Nebelkammerreaktors wurde angeschaltet und regelmäßig Proben mithilfe einer 1 mL Spritze und einer 15 cm Kanüle durch einen Deckel-Port genommen. Nach der Probenahme wurden die Proben mit der folgenden Tests analysiert (B.3.4 bis B.3.8).

B.3.4 Aktivitätsassay Penicillin G Acylase (PGA)

Bei diesem Test wird 2-Nitro-5-(Phenylacetyl)amino-benzoesäure (NIPAB) durch PGA enzymatisch in Phenylelessigsäure (PAA) und 3-Amino-6-Nitrobenzoesäure gespalten. NIPAB wurde zuvor nach dem Protokoll von Gabor und Janssen synthetisiert [88]. Die Entstehung der intensiv gelb gefärbten 3-Amino-6-Nitrobenzoesäure kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert werden. Es wurde folgende Lösungen für den Test verwendet.

Blindwerte		Vermessene Probe	
Phosphatpuffer (50mM, pH 7,4)	450 μ L	Phosphatpuffer (50mM, pH 7,4)	450 μ L
NIPAB-Lösung	250 μ L	NIPAB-Lösung	250 μ L
		Enzymprobe	50 μ L

Wird die Absorption gegen die Zeit aufgetragen, kann anhand der Steigung ($\Delta E / \Delta t$), des Küvettenesamt volumens $V_{Küv}$ (750 μ L), des Extinktionskoeffizienten ϵ (590 L/(mol x cm)), der Schichtdicke d (1 cm) und des Probenvolumens V_{Probe} (50 μ L) mit der Formel (14) die Volumenaktivität (A) des Enzyms berechnet werden.

$$A = \frac{\frac{\Delta E}{\Delta t} * V_{Küv}}{\epsilon * d * V_{Probe}} \quad (14)$$

B.3.5 Aktivitätsassay α -Chymotrypsin (CT)

Bei diesem Test wird das Substrat N-Benzoyl-L-tyrosinethylester (BTEE) von dem Enzym α -Chymotrypsin in N-Benzoyl-L-tyrosin und Ethanol gespalten. Das entstehende N-Benzoyl-L-tyrosin kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 256 nm detektiert und quantifiziert werden. Es wurde folgende Lösungen für den Test verwendet:

Blindprobe		Vermessene Probe	
Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)	500 µL	Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4)	500 µL
BTEE-Lösung*	500 µL	BTEE-Lösung*	500 µL
		Enzymprobe	20 µL

*BTEE-Lösung: 0,0248 g BTEE in 42 mL Methanol und 34 mL ddH₂O

Wird die Absorption gegen die Zeit aufgetragen, kann anhand der Steigung ($\Delta E / \Delta t$), des Küvettengesamtvolumens $V_{Küv}$ (750 µL), des Extinktionskoeffizienten ϵ (964 L/(mol x cm)), der Schichtdicke d (1 cm) und des Probenvolumens V_{Probe} (50 µL) mit der Formel (14) die Volumenaktivität (A) des Enzyms berechnet werden.

$$A = \frac{\frac{\Delta E}{\Delta t} * V_{Küv}}{\epsilon * d * V_{Probe}} \quad (15)$$

B.3.6 BCA-Assay

Die Proteinbestimmung fand mit einem QuantiPro-Kit (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, DE) statt und wurde genau nach Anweisung durchgeführt.

B.3.7 SDS PAGE

Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte durch denaturierende Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinproben mit einer äquivalenten Menge Laemmli-Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert und zentrifugiert (4000 g, 3 min).

Es wurden Sammelgele (6 %) und Trenngele (10 % bzw. 16 %) verwendet (siehe unten). Hierfür wurden 3,5 mL der Trenngellösung in eine Gelkammer gegeben, mit Isopropanol (70 %) überschichtet und für 30 min auspolymerisiert. Das Isopropanol wurde abgenommen und das Sammelgel über das Trenngel eingefüllt. Danach wurde ein Kamm zur Bildung der Probentischen eingeführt und 30 min bis zur vollständigen Polymerisation gewartet.

Nach dem Entfernen des Kamms wurde das Gel in die Laufkammer gegeben, die mit 1 x TGS (3,03 g/L Tris HCL, 14,41 g/L Glycine, 19,0 g/L SDS, pH 8,3) befüllt war. Es wurden je 10 µL

Probe und 4 μL Marker in eine Geltasche gefüllt und für 30 min eine Spannung von 100 mV angelegt. Danach wurde die Spannung auf 150 mV erhöht und gewartet bis die Proben aufgetrennt waren.

Die Gele wurden für 30 min in einer Entfärberlösung (80 mL Essigsäure, 400 mL Ethanol und 400 mL H_2O) inkubiert, danach mit H_2O gewaschen und mit colloidalen Coomassie (20 % Ethanol, 1,6 % Phosphorsäure, 8 % Ammoniumsulfat, 0,08 % Coomassie Brilliant Blue G250) gefärbt.

Laemmli-Auftragspuffer	80 % (v/v) SDS Probenpuffer
	10 % (v/v) Glycerin (55 % ig (v/v))
	10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
SDS Probenpuffer	20 mmol/L Tris HCl
	2 mmol/L EDTA
	5 % SDS (w/v)
	0,02 % Bromphenolblau
	Auffüllen mit H_2O auf 90 mL

Substanz	Sammelgel (6 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (16 %)
Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1), 40 %ig	750 μL	2,5 mL	4,0 mL
SDS (1 %)	300 μL	1,0 mL	1,0 mL
Tris-HCl (1,5 mol/L), pH 8,8	-	2,8 mL	2,8 mL
Tris HCl (1,5 mol/L), pH 6,6	630 μL	-	-
H_2O	3,770 mL	3,7 mL	2,2 mL
TEMED	10 μL	20 μL	20 μL
APS (25 %)	10 μL	20 μL	20 μL

B.3.8 Aminosäureanalytik

Die Proteinproben wurden zur Probenvorbereitung für 5 min bei 4000 g zentrifugiert. 0,1 mL des Überstandes wurden mit 0,4 mL eiskaltem Methanol versetzt. Die Proteine wurden anschließend über Nacht bei -18 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben 5 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand 1:50 mit 0,4 M Natriumboratpuffer (pH 9,5) verdünnt und mittels RP-HPLC analysiert. Die Proben der zerstäubten Standard-Aminosäurelösung aus B.3.2 wurden ohne Probenvorbereitung direkt mittels RP-HPLC vermessen.

Für die RP-HPLC Analyse wurden 30 µL der Proben mit 50 µL OPA-Reagenz derivatisiert. Je 10 µL der OPA-derivatisierten Proben wurden injiziert und bei einer Flussrate von 1 mL/min und linearem Gradienten an einer Waters Resolve C₁₈-Säule (5 µm, 150 x 3,9 mm) bei 30 °C getrennt. Die Detektion erfolgte mittels eines Fluoreszenz-Detektors (Extinktion: 330 nm, Emission: 420 nm)

OPA-Reagenz: 270 mg Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) in 5 ml Ethanol auflösen. 200 µl Mercaptoethanol (MCE) zufügen und mit 0,4 M Boratpuffer (12,36 g Borsäure/500ml) pH 9,5 auf 50 mL auffüllen. Die Lösung wurde vor dem Gebrauch für 24 h inkubiert. Als Oxidationsschutz wurde jede Woche 20 µL MCE zugeben.

Geräte: Pumpe: Agilent 1200
Detektor: Fluoreszenzdetektor Shimadzu RF-10AxL
Autosampler: Triathlon von Spark, Holland
Degasser: 3-Kanal-Degasser von Sykam
Säulenofen: Techlab T-1
Datensystem: Clarity 3.0 (DataApex Ltd.)

Aminosäure-Standard: Sigma AAS18 versetzt mit Glutamin, Asparagin und Tryptophan (Konzentration aller Aminosäuren im Reaktor 0,1 M)

B.4 Biologische Charakterisierung

B.4.1 Immobilisierung in Alginat

Um die Hefezellen im Nebel zurückzuhalten wurde ein Zelleinschluss in Alginat (Immobilisierung) durchgeführt. Dafür wurde zu einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL hitzesterilisiertes Alginatpulver dazugegeben. Die finale Alginatkonzentration betrug 2 % (w/w). 10 mL dieser Lösung wurden mittels einer Spritze mit einer Kanüle (Innendurchmesser: 0,8 mm) in ein 0,1 M CaCl_2 -Bad getropft. Die entstehenden Alginatkugeln härteten anschließend für 10 min aus und wurden gefiltert sowie mehrmals mit dd H_2O gründlich abgespült.

Für die Alginatkugeln mit zwei Alginatschichten wurden die Alginatkugeln anschließend in 5 mL dd H_2O transferiert. Diese Suspension wurde leicht gerührt, um eine Verklumpung der Alginatkugeln zu vermeiden. Danach wurden unter Rührung 30 mL einer 1 oder 2 %igen zellfreie Alginatlösung dazu gegeben und ebenfalls für 10 min ausgehärtet und mit dd H_2O abgespült.

B.4.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* wurde bei einer Temperatur von 30 °C mit Standard-Zerstäubungsparametern in 100 mL YM-Medium mit einer Glukosekonzentration von 2,5 g/L durchgeführt. Die zuvor in Alginat immobilisierten Zellen wurden dabei auf den Standard-Probenständern im Nebel gehalten. Bei der Kultivierung wurde keine aktive Begasung verwendet. Der Sauerstoffgehalt wurde über das Oxy-4 mini System der Firma PreSens (PreSens, Regensburg, DE) direkt neben den Probenständern gemessen. Als Referenz dienten statische und geschüttelte (150 rpm) Kultivierungskolben ohne Schikane unter den gleichen Bedingungen ohne Nebel. Alle 3 h wurde eine Probe unter der Sterilbank genommen. Dabei wurden aus dem Reaktor und den Kultivierungskolben jeweils 3 Alginatkugeln entnommen und in 400 μL Natrium-Citrat (0,1 M) aufgelöst. Außerdem wurden je 500 μL des Mediums für die Analyse der Glukose- und Ethanolkonzentration entnommen und zentrifugiert (4000 g, 5 min, 4 °C). Die Analyse der Glukosekonzentration erfolgte mittels des Glukoseanalysators YSI 2300 (YSI, Brannum, USA). Die Ethanolkonzentration wurde mittels Gaschromatographie (Shimadzu GC-14b, JA) mit den unten aufgeführten Parametern bestimmt.

Parameter	Wert/ Eigenschaft
Säule	Chromosorb 101, 80/100 6'-18
Säulentemperatur	160°C
Injektionstemperatur	180°C
Detektortemperatur	220°C
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Retentionszeit	3,5 Minuten
Injektionsvolumen	0,5 µL
Interner Standard	n-Propanol (8 g/L)
Trägergas	Stickstoff

B.4.3 Kultivierung von *F. velupites*

Für die Vorkultur des Fadenpilzes *F. velupites* wurden Erlenmeyerkolben (300 mL, ohne Schikane) mit 100 mL SNL Medium befüllt und zusammen autoklaviert. Von einer bewachsenen Agarplatte wurde ein 1 cm² großes Stück ausgestochen, in den Kolben gegeben und mit einem Ultra Turrax zerkleinert. Die Kulturen wurden anschließend bei ca. 24 °C über 6-8 Tage inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich Mycelpellets, die weiter verwendet wurden.

Für die Kultivierung von *F. velupites* wurden nicht die Standard-Probenständer mit einem Zellsieb, sondern unten geschlossene Pilz-Probenständer aus Edelstahl verwendet (Abb. 66). Als Substrate kamen Glutenpellets auf denen die Zellen wuchsen und ein Minimalmedium, das zerstäubt wurde, zum Einsatz. 5 g der Glutenpellets wurden vor der Kultivierung auf die Probenständer überführt und trocken bei 130- 135 °C für mindestens 8 h in einem Trockenschrank sterilisiert. Der Reaktor und das Referenzgefäß wurden separat autoklaviert. Anschließend wurden die Probenständer steril in den Reaktor bzw. das Referenzgefäß gestellt und mit 7,5 mL Zellsuspension der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung wurde mit einer gepulsten Zerstäubung bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Zerstäubungsintervall war 1 min bei maximaler Zerstäuberleistung an und 12 h aus. Für die Begasung wurde der Deckel täglich für 30 s unter der Sterilbank angehoben.

Nach 22 Tagen wurden Bilder des Pilzmycels angefertigt und der Inhalt der Probenständer in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Minimal Medium wurde bis zu einem Volumen von

10 mL dazugeben und die Röhren wurden für 1 min stark geschüttelt. Anschließend wurden die Röhren bei 4000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand für die folgenden Peptidasetests verwendet.

Die Bestimmung der Peptidaseaktivität von prolylspezifische Peptidasen sowie die Bestimmung der Peptidaseaktivität mittels Gelatinezymografie, synthetischer Peptide (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-paraNitroanilid (AAPF) und Azocasein wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover nach den Protokollen von [89], [90] und [91] durchgeführt.

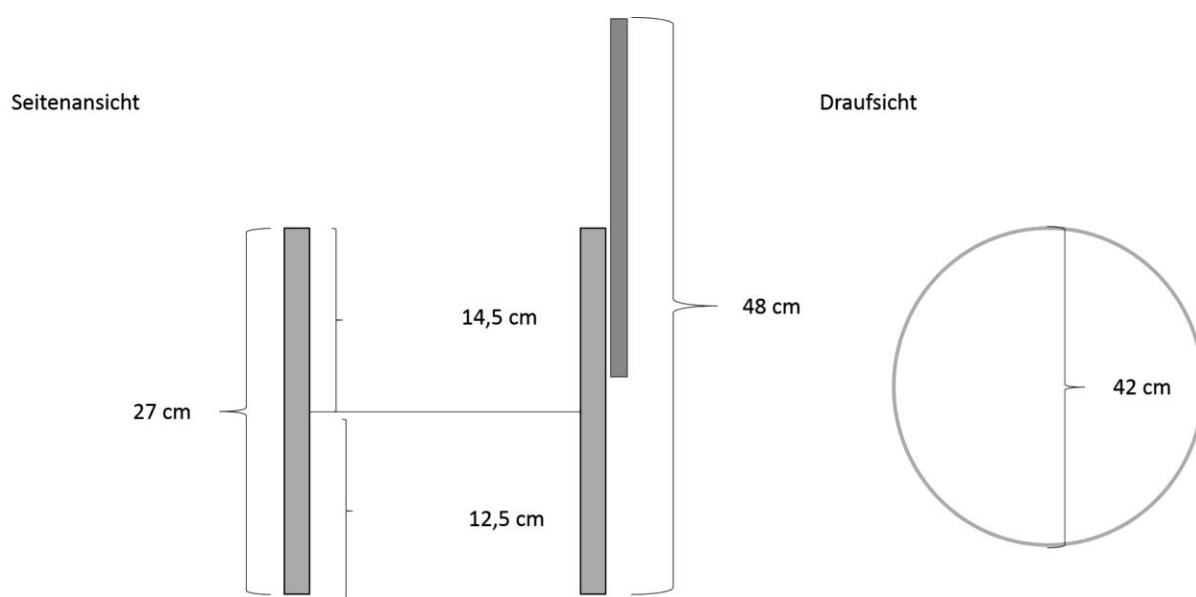


Abb. 66: Schematische Darstellung der verwendeten Probenstände zu Kultivierung von *F. verlupites*.

B.4.4 Besiedelung der Zellmatrix Matriderm® mit NIH 3T3 Zellen

Für die Besiedelung der Zellmatrix Matriderm® (Medskin Solution Dr. Suwelack AG, Germany) mit NIH 3T3 Zellen wurden 20 000 Zellen auf jede Seite einer runden, 1 mm dicken Matriderm-Zellmatrix mit einem Durchmesser von 7 mm gegeben. Diese Scheiben wurden in eine 24-well Platte gegeben und bei 37 °C / 5 % CO₂ für 72 h in 1 mL DMEM-Medium inkubiert.

B.4.5 Kultivierung der NIH 3T3 Zellen

Die besiedelten Zellmatrices wurden steril in den Nebelkammerreaktor auf die Standard-Probenstände überführt. Anschließend wurde die Kultivierung der NIH 3T3 Zellen in einem Nebel

von DMEM-Medium bei 37 °C / 5 % CO₂ mit dem in 4.1.9 dargestellten Begasungssystem (Begasungsrate: 100 mL/min) und den Standard-Zerstäubungsparametern durchgeführt. Die Temperatur wurde durch das in 4.1.7 beschriebenen Kühlsystem geregelt. Jeden Tag wurden 4 Zellmatrices entnommen und eine DAPI-Färbung sowie ein MTT-Vitalitätstest durchgeführt. Als Referenz dienten Zellmatrices in 24-well Platten mit 5 mL DMEM Medium.

B.4.6 DAPI-Färbung

Die bewachsenen Matriderm[®]-Zellmatrices wurden in eine neue 24-well Platte transferiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Matrices mit PFA (para-Formaldehyd) überschichtet und für 20 min inkubiert. Das PFA wird abgenommen und die Matrices dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellfärbung wurde mit einer DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) Färbelösung bestehend aus 1 µL DAPI und 999 µL DAPI-Färbepuffer durchgeführt. Anschließend wurden die Matrices für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX50, Olympus, Tokyo, Japan) ausgewertet.

B.4.7 MTT-Vitalitätstest

Für den MTT-Vitalitätstest wurden die Matrices mit 300 µL einer 10 % MTT-Lösung überschichtet. Danach wurden die Matrices für 4 h inkubiert und mit 200 µL einer SDS-Lösung (10 % in 0,01 M HCl) versetzt. Anschließend wurden die Matrices über Nacht bei 37 °C und 700 rpm in einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Extinktion bei 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen und der Blindwert abgezogen. Als Blindwert diente eine Matriderm-Matrix ohne Zellen, die der gleichen Prozedur unterzogen wurde.

C Abkürzungsverzeichnis

A. Niger	Aspergillus niger
AAPF	N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-paraNitroanilid
Abb.	Abbildung
BAL	Bioartificial Liver
BCA	Bicinchoninsäure
BHK (Zellen)	Baby Hamster Kidney (Zellen)
BTEE	Benzoyl-L-tyrosinethylester
BTM	Biotrockenmasse
CHO (Zellen)	Chinese Hamster Ovary (Zellen)
CT	α Chymotrypsin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
E. coli	Escherichia coli
F. velupites	Flammulina velupites
FKS	Fetales Kälber Serum
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MRS	Mess- und Regelungssystem
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinamidadeninukleotid
NIPAB	2-Nitro-5-(Phenylacetyl)amino-benzoesäure
NKR	Nebelkammerreaktor
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
PAA	Phenyllessigsäure
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PGA	Penicillin G Acylase
PID-Regler	Proportional-, Integral- und Differentialregler

Ref	Referenz
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration
rpm	Rounds per minute
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
SmB	Submers-Bioreaktor
SMD	Surface-Mount Device
SSB	<i>Solid State Bioreactor</i> (Feststoffbioreaktor)
STR	<i>Stirred Tank Reactor</i> (Rührkesselreaktor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	T-Summenverfahren
T-Sonde	Temperatursonde
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WT	Wendetangentenverfahren
ZT	Zieltemperatur
ZTK	Zieltemperaturkorridor

D Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Rührkessel- (A), Blasensäulen- (B) und eines Airliftreaktors (C).	6
Abb. 2: Schematischer Aufbau von zwei Festbettreaktoren.	7
Abb. 3: Schematische Darstellung eines Hohlfaserreaktors.....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung eines Wannenreaktors (A) und eines Festbettreaktors (B).....	10
Abb. 5: Schematische Darstellungen von Sprayreaktoren (A) und Nebelreaktoren (B).	12
Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Rührkesselreaktors	18
Abb. 7: Schematische Darstellung des Nebelkammerreaktorprototyps	25
Abb. 8: Darstellung verschiedener Möglichkeiten zur Erzeugung eines Aerosols	27
Abb. 9: Aufbau des Nebelkammerreaktors	32
Abb. 10: Aufbau des Deckels (B) und der Unterkonstruktion (A) des Nebelkammerreaktors.	33
Abb. 11: Darstellung des Zerstäubungskreislaufes (A) und der Reaktorzonen (B).	35
Abb. 12: Vergleich von zwei verschiedenen Ultraschallzerstäubern.	36
Abb. 13: Darstellung des Effektes der Potentionmeterregelung (A) und der Pulsung (B) auf die Nebeldichte. ...	38
Abb. 14: Schematische Darstellung (A) und Foto (B) des Standard-Probenständers zur Zellrückhaltung.	38
Abb. 15: Fotografische und schematische Darstellung der Ultraschallzerstäubung	40
Abb. 16: Darstellung des Nebelkammerreaktors mit Spritzschutz.....	41
Abb. 17: Mikroskopische Aufnahme von sedimentierten Nebeltropfen auf den Probenständern.....	41
Abb. 18: Foto des verwendeten Mess- und Regelungssystems (MRS).....	42
Abb. 19: Darstellung des Temperaturverlaufes während der Ultraschallzerstäubung in der Kultivierungszone ...	43
Abb. 20: Darstellung des Temperaturregelungsaufbaus.	44
Abb. 21: Darstellung einer Sprungfunktion zur Ermittlung der PID-Regelungsparameter.....	46
Abb. 22: Bestimmung der PID-Regelparameter mit dem Wendetangentenverfahren.	47
Abb. 23: Bestimmung der PID-Regelparameter mit dem T-Summenverfahren.	48
Abb. 24: Evaluation der ermittelten PID-Regelparameter.	50
Abb. 25: Schematischer Aufbau des Nebeldichtesensors.	52
Abb. 26: Einfluss von Tropfen auf das Sensorsignal des Nebeldichtesensors	53
Abb. 27: Anteil des Umgebungslichtes am Sensorsignal	55
Abb. 28: Einfluss von Tropfen auf das Signal des Nebeldichtesensors bei einer Zerstäubung über 14 h.....	56
Abb. 29: Darstellung der Kalibration des Nebelsensors mit Formazin.	58
Abb. 30: Schematische Darstellung des Begasungssystems und der Sauerstoffmesstechnik.	59
Abb. 31: Evaluation einer Begasung mit und ohne Ablenkplatte.	60
Abb. 32: Überblick über das Nebelkammerreaktorsystem.....	61
Abb. 33: Evaluation der Zerstäubungsparameter Füllvolumen und Temperatur.	63
Abb. 34: Nebeldichte in Abhängigkeit des Volumenstroms der Kühlflüssigkeit.....	64
Abb. 35: Serienbildaufnahme der Nebelproduktion im Nebelkammerreaktor	66
Abb. 36: Darstellung der Nebelausbreitung (A) und der Sedimentation auf einen Standard-Probenständer (B)..	67
Abb. 37: Mikroskopische Aufnahme von Nebeltropfen die auf den Probenständern sedimentiert sind.	69
Abb. 38: Größenverteilung der sedimentierten Nebeltropfen auf einem Probenständer.....	69
Abb. 39: Bestimmung der Nebelaufbauzeit t_{90} mithilfe des Nebeldichtesensors.....	71
Abb. 40: Nebeldichte im Nebelkammerreaktor in Abhängigkeit der Höhe.	72
Abb. 41: Gemessene Sedimentationsrate auf einem Standard-Probenständer in Abhängigkeit der Nebeldichte. 72	
Abb. 42: Bestimmung der Mischzeit im Medium (blau) und im Nebel (orange).	78
Abb. 43: Effekt einer aktiven Begasung auf die Einstellung des pH-Wertes.....	81
Abb. 44: Schematischer Aufbau des Temperaturarrays zur Messung einer Temperaturverteilung.	82

Abb. 45: Temperaturverteilung der Kultivierungszone ohne (A.1 bis A.3) und mit Inkubator (B.1 bis B.3).....	83
Abb. 46: Experimentdesign zur Untersuchung des Einflusses der Ultraschallzerstäubung auf das Medium.	86
Abb. 47: Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Glukose (A) und Penicillin/Streptomycin (B).	87
Abb. 48: Einfluss der Ultraschallzerstäubung auf Aminosäuren	88
Abb. 49: Enzymaktivität während der Ultraschallzerstäubung	89
Abb. 50: Enzymaktivität des Enzyms Penicillin G Acylase	91
Abb. 51: SDS-PAGE und densitometrische Auswertung des zerstäubten Enzyms Penicillin G Acylase	93
Abb. 52: Aminosäurekonzentrationen während der Zerstäubung des Enzyms Penicillin G Acylase	94
Abb. 53: Mikroskopische Aufnahme von immobilisierten Hefezellen	97
Abb. 54: Zellkonzentration und Anteil der ausgewaschenen von Hefezellen	98
Abb. 55: Zellkonzentration in den Alginatkugeln (A) und Anteil der ausgeschwemmten Zellen (B).	99
Abb. 56: Sauerstoffgehalt während der Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> im Nebelkammerreaktor.....	100
Abb. 57: Glukose- und Ethanolkonzentrationen während der Kultivierungen von <i>S. cerevisiae</i>	101
Abb. 58: Vergleich der berechneten Glukoseverbrauchsrate mit der berechneten Glukosesedimentationsrate..	102
Abb. 59: Ergebnisse der Kultivierung von <i>F. velupites</i>	104
Abb. 60: Mikroskopische Aufnahmen der DAPI-Färbungen der <i>NIH 3T3</i> -Zellen	106
Abb. 61: MTT-Vitalitäts-Assay der <i>NIH 3T3</i> Kultivierung im Nebelkammerreaktor und in der Referenz.....	106
Abb. 62: Darstellung des verwendeten Kühlsystems des Nebelkammerreaktors.	123
Abb. 63: Kalibration des digitalen Durchflussmessers	124
Abb. 64: Aufbau des Nebeldichtesensors und dessen Integration in den Nebelkammerreaktor.	125
Abb. 65: Experimentaufbau für die Untersuchung der Mediumkomponentenstabilität.	130
Abb. 66: Schematische Darstellung der verwendeten Probenstände zu Kultivierung von <i>F. verlupites</i>	139

E Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die in dieser Arbeit besprochenen Bioreaktoren und die verwendeten Zellsysteme. ...	13
Tabelle 2: Überblick über einige häufig überwachte Betriebsparameter	17
Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten der Ultraschallzerstäubung.....	29
Tabelle 4: Berechnung der PID-Regelparameter mit dem Wendetangentenverfahren	47
Tabelle 5: Formeln zur Bestimmung der PID-Regelungsparameter nach dem T-Summenverfahren.....	48
Tabelle 6: Ergebnisse der PID-Parameterermittlungen mit dem Wendetangentenverfahren (.....	49
Tabelle 7: Ergebnis der Evaluation der ermittelten Parametersets aus den Wendetangentenverfahren.....	51
Tabelle 8: Berechnung der maximalen Biomassen, die im Nebelkammerreaktor kultiviert werden können.....	76

F Literaturverzeichnis

1. Salehi-Nik, N., et al., *Engineering Parameters in Bioreactor's Design: A Critical Aspect in Tissue Engineering*. BioMed research international, 2013. 2013.
2. Villadsen, J., J. Nielsen, and G. Lidén, *Bioreaction engineering principles*. 2011: Springer.
3. Storhas, *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen: Ein Leitfaden für die Hochschulausbildung, für Hersteller und Anwender*. 1994, Vieweg Verlag.
4. Bhattacharyya Bimal Chandra, B.S., Gosh Tapan Kumar, *Bioreactors: Functions in fermentation processes*, in *Advances in Fermentation Technology*, P. A, Editor. 2008: New Delhi.
5. Chmiel, H., *Bioprozesstechnik*. Vol. 3. Auflage. 2011, Heidelberg: Spektrum Verlag.
6. G. Catapano, P.C., R. Eibl, D. Eibl, R. Pörtner, *Bioreactor Design and Scale-Up*, in *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 2009, Springer Verlag: Heidelberg.
7. Doran, P.M., *Bioprocess engineering principles*. 1995: Academic Press.
8. Michaels, J.D., A.K. Mallik, and E.T. Papoutsakis, *Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: Do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells?* *Biotechnology and bioengineering*, 1996. 51(4): p. 399-409.
9. Nienow, A.W., *Reactor engineering in large scale animal cell culture*. *Cytotechnology*, 2006. 50(1-3): p. 9-33.
10. Cong, C., et al., *A novel scale-up method for mammalian cell culture in packed-bed bioreactor*. *Biotechnology letters*, 2001. 23(11): p. 881-885.
11. J.N. Warnock, K.B., M. Al-Rubeai, *Packed Bed Reactors*, in *Bioreactors for Tissue Engineering*, M.A.-R. J.B Chaudhuri, Editor. 2005, Springer Verlag: Dordrecht.
12. Park, S. and G. Stephanopoulos, *Packed bed bioreactor with porous ceramic beads for animal cell culture*. *Biotechnology and bioengineering*, 1993. 41(1): p. 25-34.
13. Meuwly, F., et al., *Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: bioprocess and biomedical applications*. *Biotechnology advances*, 2007. 25(1): p. 45-56.
14. Kurosawa, H., et al., *Polyurethane membrane as an efficient immobilization carrier for high-density culture of rat hepatocytes in the fixed-bed reactor*. *Biotechnology and bioengineering*, 2000. 70(2): p. 160-166.
15. Ali, H.K.Q. and M. Zulkali, *Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2011. 25(2): p. 255-266.
16. Krishna, C., *Solid-state fermentation systems-an overview*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2005. 25(1-2): p. 1-30.
17. Lonsane, B., et al., *Engineering aspects of solid state fermentation*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1985. 7(6): p. 258-265.
18. Desgranges, C., et al., *Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991. 35(2): p. 200-205.
19. Durand, A., C. Vergoignan, and C. Desgranges, *Biomass estimation in solid state fermentation*, in *Advances in Solid State Fermentation*. 1997, Springer. p. 23-37.
20. Martin, Y. and P. Vermette, *Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances*. *Biomaterials*, 2005. 26(35): p. 7481-7503.
21. Durand, A., *Bioreactor designs for solid state fermentation*. *Biochemical Engineering Journal*, 2003. 13(2): p. 113-125.
22. 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.
23. Perry, R.H., et al., *Perry's chemical engineers' handbook*. Vol. 7. 1997: McGraw-hill New York.
24. Weathers, P. and R. Zobel, *Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells*. *Biotechnology advances*, 1992. 10(1): p. 93-115.
25. Weathers, P.J., M.J. Towler, and J. Xu, *Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products*. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010. 85(5): p. 1339-1351.
26. R. Eibl, D.E., *Plant Cell-Based Bioprocessing*, in *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 2009, Springer Verlag: Heidelberg.
27. Palazón, J., et al., *Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of Panax ginseng using a novel bioreactor*. *Planta medica*, 2003. 69(4): p. 344-349.

28. Friberg, J.A., P.J. Weathers, and D.G. Gibson III, *Culture of amebocytes in a nutrient mist bioreactor*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 1992. 28(3): p. 215-217.
29. Kim, Y., *Assessment of bioreactors for transformed root cultures*, 2001, Worcester Polytechnic Institute.
30. Bais, H.P., et al., *Performance of hairy root cultures of Cichorium intybus L. in bioreactors of different configurations*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2002. 38(6): p. 573-580.
31. Boron, W.F., *Regulation of intracellular pH*. *Advances in physiology education*, 2004. 28(4): p. 160-179.
32. Madshus, I.H., *Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells*. *Biochemical Journal*, 1988. 250(1): p. 1.
33. Harms, P., Y. Kostov, and G. Rao, *Bioprocess monitoring*. *Current opinion in biotechnology*, 2002. 13(2): p. 124-127.
34. Sonnenleitner, B., *Instrumentation of Biotechnological Processes*, in *Advances in Biochemical Engineering*, B.S. T. Scheper, Editor. 1999, Springer: Heidelberg.
35. Veeriah Jegatheesan, L.S., Chettiyappan Visvanathan, Bui Xuan Thanh, *Aerobic environmental processes*, in *Advances in Fermentation Technology*, C.L. Ashok Pandey, Editor. 2008, Asiatech Publishers: New Delhi.
36. Panda, T., *Bioreactors Analysis and Design*. 2011, Neu Delhi.
37. Lopez-Ruiz, B., *Biosensors*, in *Advances in Fermentation Technology*, C.L. Ashok Pandey, Editor. 2008, Asiatech Publishers: New Delhi.
38. Singh, B.K., *Exploring microbial diversity for biotechnology: The way forward*. *Trends in biotechnology*, 2010. 28(3): p. 111-116.
39. Berlec, A. and B. Štrukelj, *Current state and recent advances in biopharmaceutical production in Escherichia coli, yeasts and mammalian cells*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2013. 40(3-4): p. 257-274.
40. Walsh, G., *Biopharmaceutical benchmarks 2010*. *Nature biotechnology*, 2010. 28(9): p. 917.
41. Demain, A.L. and P. Vaishnav, *Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms*. *Biotechnology advances*, 2009. 27(3): p. 297-306.
42. Chen, R., *Bacterial expression systems for recombinant protein production: < i> E. coli</i> and beyond*. *Biotechnology advances*, 2012. 30(5): p. 1102-1107.
43. Daniel Jameson, M.V., Hans V. Westerhoff, *Methods in Enzymology*. Vol. 500. 2011: John N. Abelson und Melvin I. Simon.
44. Wildt, S. and T.U. Gerngross, *The humanization of N-glycosylation pathways in yeast*. *Nature Reviews Microbiology*, 2005. 3(2): p. 119-128.
45. Taylor, J., *Microorganisms and Biotechnology*, ed. J.J. Thompson. Vol. 2. 2001, Cheltenham UK: Nelson Thornes Ltd.
46. Spier M.R., P.d.S.V.L., Bianchi Pedroni Medeiros A., Soccol C.R., *Application of different types of bioreactors in bioprocesses*, in *Bioreactors - Design, Properties and Applications*, L.Z. Antolli P. G., Editor. 2012, Nova Science Publisher: New York.
47. Cecile Milton, C.P.-B., Pierre Peyret, *New tools for the isolation and identification of micro-organisms*, in *Advances in Fermentation Technology*, A.P.e. al., Editor. 2008, Asia Tech Publisher Inc. : New Delhi.
48. Yarden, O., *Cell Biology of Hyphae*, in *Handbook of Fungal Biotechnology*, D.K. Arora, Editor. 2004.
49. Adrio, J.L. and A.L. Demain, *Fungal biotechnology*. *International Microbiology*, 2003. 6(3): p. 191-199.
50. Gustavo Viniegra-Gonzalez, E.F.-T., *Basic Principle for the Production of Fungal Enzymes by Solid-State Fermentation*, in *Handbook of Fungal Biotechnology*, D.K. Arora, Editor. 2004, Marcel Dekker: New York.
51. Nevalainen, K., V.S. Te'o, and P.L. Bergquist, *Heterologous protein expression in filamentous fungi*. *TRENDS in Biotechnology*, 2005. 23(9): p. 468-474.
52. Gibbs, P., R. Seviour, and F. Schmid, *Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions*. *Critical reviews in biotechnology*, 2000. 20(1): p. 17-48.
53. Gao, J., et al., *Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal Aspergillus terreus M11 under solid-state cultivation of corn stover*. *Bioresource Technology*, 2008. 99(16): p. 7623-7629.
54. Kalogeris, E., et al., *Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw*. *Bioresource Technology*, 2003. 86(3): p. 207-213.
55. D. Eibl, R.E., R. Pörtner, *Mammalian Cell Culture Technology: An Emerging Field*, in *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 2009, Springer Verlag: Heidelberg.
56. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities*. *Science*, 2002. 295(5557): p. 1009-1014.
57. Bebbington, C., et al., *High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker*. *Nature Biotechnology*, 1992. 10(2): p. 169-175.

58. Cotter, T.G. and M. Al-Rubeai, *Cell death (apoptosis) in cell culture systems*. Trends in biotechnology, 1995. 13(4): p. 150-155.
59. Pörtner, R., *Characteristics of Mammalian Cells and Requirements for Cultivation*, in *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 2009, Springer Verlag: Heidelberg.
60. Walsh, G. and R. Jefferis, *Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins*. Nature biotechnology, 2006. 24(10): p. 1241-1252.
61. D. Eibl, R.E., *Bioreactors for Mammalian Cells: General Overview*, in *Cell and Tissue Reaction Engineering*. 2009, Springer Verlag: Heidelberg.
62. M. Ellis, M.J.-S., J.B. Chaudhuri, *Bioreactor Systems for Tissue Engineering: A Four-Dimensional Challenge*, in *Bioreactors for Tissue Engineering*, M.A.-R. Julian Chaudhuri, Editor. 2005, Springer: Dordrecht.
63. Dreimann, J., *Evaluierung eines neuartigen Bioreaktorsystems mit Ultraschallzerstäubung*, in *Institut für Technische Chemie*2013, Leibniz Universität Hannover.
64. Barreras, F., H. Amaveda, and A. Lozano, *Transient high-frequency ultrasonic water atomization*. Experiments in Fluids, 2002. 33(3): p. 405-413.
65. Avvaru, B., et al., *Ultrasonic atomization: effect of liquid phase properties*. Ultrasonics, 2006. 44(2): p. 146-158.
66. Wozniak, G., *Zerstäubungstechnik: Prinzipien, Verfahren, Geräte*. 2013: Springer-Verlag.
67. 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.
68. Lass, J.S., A. Sant, and M. Knoch, *New advances in aerosolised drug delivery: vibrating membrane nebuliser technology*. 2006.
69. DelphinTechnology, *Handbook of LogMessage*, 2010: Bergisch-Gladbach.
70. Tieste, K.-D. and O. Romberg, *Keine Panik vor Regelungstechnik*. Verlag Vieweg, 2011.
71. Linke, P., *Grundlagen zur Automatisierung*, in *Grundlagen Automatisierung*. 2015, Springer. p. 1-28.
72. K.L. Chien, J.A.H., J.B. Reswick, *On the Automatic Control of Generalized Passive Systems*. Transactions of the American Society of Mechanical Engineers, 1952. 74: p. 175-185.
73. Prediger, A., et al., *In Situ Microscopy for Online Monitoring of Enzymatic Processes*. Chemical Engineering & Technology, 2011. 34(5): p. 837-840.
74. Prediger, A., *Entwicklung von In-situ- und Durchfluss- Mikroskopen für die Bioprozesstechnik*, in *Institut für Technische Chemie*2013, Leibniz Universität Hannover.
75. Bergman, L., *Growth and Maintenance of Yeast*, in *Two-hybrid systems: methods and protocols*, P.N. MacDonald, Editor. 2001, Springer Science & Business Media.
76. Jasmund, I., *Entwicklung und Funktionsprüfung eines oxygenierten Hohlfaserreaktors zur Kultivierung von Leberzellen*, in *Gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät*2003, Technische Universität Braunschweig.
77. Wayman, F. and M. Matthey, *Simple diffusion is the primary mechanism for glucose uptake during the production phase of the Aspergillus niger citric acid process*. Biotechnology and Bioengineering, 2000. 67(4): p. 451-456.
78. Kuhlmann, W., *Untersuchungen zur On-Line Prozesslenkung der Satzweisen und kontinuierlichen Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae*, in *Institut für Technische Chemie*1983, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: Hannover.
79. Van't Riet, K. and J. Tramper, *Basic bioreactor design*. 1991: CRC Press.
80. Schütze, D.-B.J., *Die numerische Simulation von Strömung und Stoffaustausch in gerührten, begasten Bioreaktoren*, 2001, PhD thesis, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Germany.
81. Thomas, P., *Oxygen Measurement during cell culture: From multiwell-plates to microfluidic devices*, in *Department of Chemical and Biomolecular Engineering*2011, University of Maryland: Maryland.
82. Van der Valk, J., et al., *Optimization of chemically defined cell culture media—Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods*. Toxicology in vitro, 2010. 24(4): p. 1053-1063.
83. Basto, C., et al., *Stability and decolourization ability of Trametes villosa laccase in liquid ultrasonic fields*. Ultrasonics sonochemistry, 2007. 14(3): p. 355-362.
84. Rehorek, A., M. Tauber, and G. Gübitz, *Application of power ultrasound for azo dye degradation*. Ultrasonics Sonochemistry, 2004. 11(3): p. 177-182.
85. Racker, E., *History of the Pasteur effect and its pathobiology*. Molecular and cellular biochemistry, 1974. 5(1-2): p. 17-23.
86. Delgado, F.F., et al., *Intracellular water exchange for measuring the dry mass, water mass and changes in chemical composition of living cells*. PloS one, 2013. 8(7): p. e67590.
87. GmbH, P.-P.S., *Instruction Manual pH-4 mini 4-channel Fiber-Optic pH Meter*, 2004.

88. Gabor, E.M. and D.B. Janssen, *Increasing the synthetic performance of penicillin acylase PAS2 by structure-inspired semi-random mutagenesis*. Protein Engineering Design and Selection, 2004. 17(7): p. 571-579.
89. Grimrath, A., *Neue Peptidasen aus Basidomyceten für die Glutenhydrolyse*, in *Institut für Lebensmittelchemie* 2011, Leibniz Universität Hannover.
90. Yim, S.-K., et al., *Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: application for separation of peptides*. Analytical biochemistry, 2002. 305(2): p. 277-279.
91. Rosenberg, I.M. and L.C. Packman, *Protein analysis and purification, benchtop techniques*. Protein Science, 1998. 7(3): p. 806-806.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bernd Michael Tscheschke
Geburtsdatum	12.04.1986
Geburtsort	Lippstadt
Nationalität	deutsch

Universitäre Ausbildung

2011-2015	Promotion Chemie am Institut für Technische Chemie Hannover, Leibniz Universität Hannover, Betreuung: Prof. Dr. Thomas Scheper
2009-2011	Masterstudiengang Life Science, Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Master of Science (M.Sc.), Abschlussnote: ausgezeichnet
2006-2009	Bachelorstudiengang Life Science, Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Bachelor of Science (B.Sc.), Abschlussnote: ausgezeichnet

Zivildienst

2005-2006	Evangelisches Seniorenzentrum von Bodelschwingh, Lippstadt
-----------	--

Schulbildung

1997-2005	Evangelisches Gymnasium Lippstadt, Abschluss: Abitur
-----------	--

Publikationsliste

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Tscheschke B., Dreimann J., von der Ruhr J. W., Schmidt T., Stahl F., Just L., Scheper, T. (2014). Evaluation of a new mist-chamber bioreactor for biotechnological applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, **112**(14) : p. 1155-1164. DOI 10.1002/bit.25523

Dreimann J., Schmidt T., Tscheschke B., Just L., Stahl F., Scheper T. (2014), Der Nebelkammer-Reaktor – Neuartiges Reaktorkonzept für anspruchsvolle Kultivierungen. *Chemie Ingenieur Technik*. 2015, **87**(6) : p. 773-780. DOI: 10.1002/cite.201400079

Mutz K.O., Tscheschke B., Walter J.-G., Stahl F., Scheper T. Authentication and Quantification of Medicinal Plants Using Real-Time PCR. *Phytomedicine*. Eingereicht Mai 2015

Kongressbeiträge

Tscheschke B., Dreimann J., von der Ruhr J., Schmidt T., Just L., Stahl F. Scheper T. Characterization of Mist-chamber Bioreactors with ultrasonic vaporization DECHEMA-Jahrestagung 2013

Li S., Tscheschke B., Sambale F., Rinas U., Scheper T. Production of cytokines for tissue engineering and stem cell culture applications. REBIRTH 2013

Tscheschke B., Dreimann J., von der Ruhr J., Schmidt T., Just L., Stahl F. Scheper T. Mist-chamber Bioreactor - Evaluation of a new bioreactor system. DECHEMA-Jahrestagung 2012

Bonk S., Sandor M., Rüdinger F., Tscheschke B., Prediger A., Babitzky A., Solle D., Beutel S., Scheper T. In-situ microscopy and 2D fluorescence spectroscopy as online methods for monitoring CHO cells during cultivation. European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting on Cell based Technologies 2011