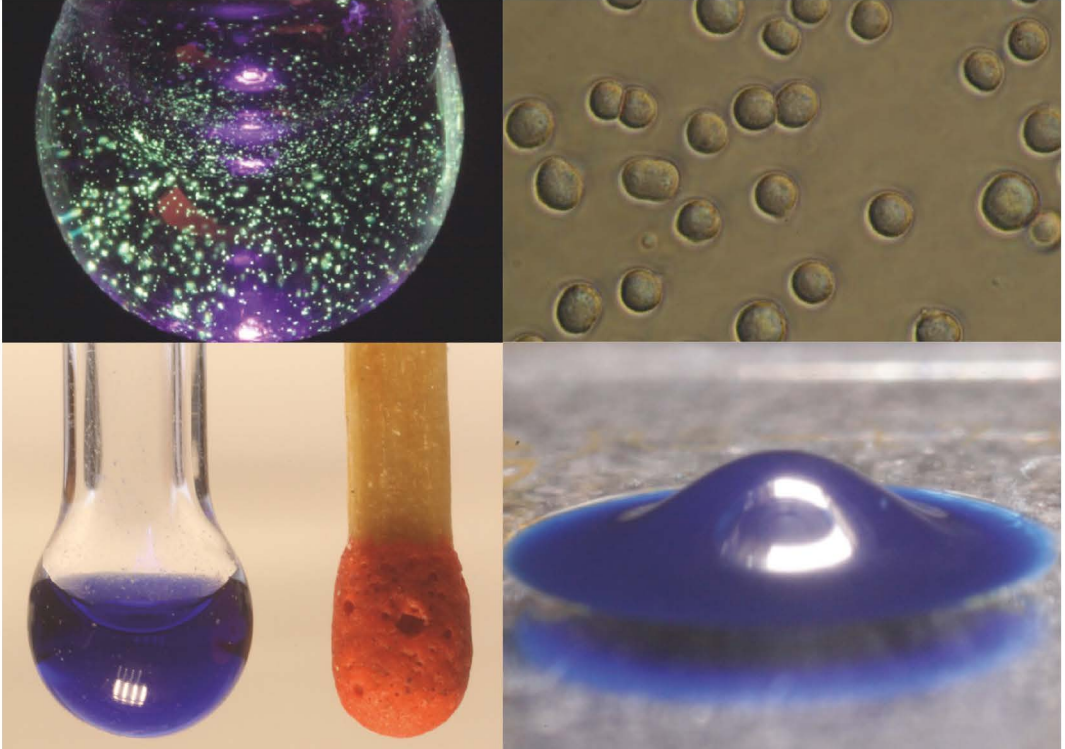




**Technische
Universität
Braunschweig**



Entwicklung und Charakterisierung von Tropfen-Bioreaktoren

Lasse Jannis Frey

Cuvillier Verlag



ibvt-Schriftenreihe

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik
der Technischen Universität Braunschweig

Herausgegeben von Prof. Dr. Rainer Krull

Band 85

**Cuvillier-Verlag
Göttingen, Deutschland**



Herausgeber
Prof. Dr. Rainer Krull
Institut für Bioverfahrenstechnik
TU Braunschweig
Rebenring 56, 38106 Braunschweig
www.ibvt.de

Hinweis: Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2021

© Cuvillier-Verlag · Göttingen 2021
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten
Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2021
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-7369-7508-8
eISBN 978-3-7369-6508-9
ISSN 1431-7230



Entwicklung und Charakterisierung von Tropfen-Bioreaktoren

Von der Fakultät für Maschinenbau
der Technischen Universität *Carolo-Wilhelmina* zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde
eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von: Lasse Jannis Frey, M. Sc. Biotechnologie
geboren in: Mutlangen

Eingereicht am: 18.03.2021

Mündliche Prüfung am: 25.06.2021

Vorsitz: Prof. Dr. Andreas Dietzel
Gutachter: Prof. Dr. Rainer Krull
Prof. Dr. Torsten Mayr

2021



Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2016 bis April 2020 während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bioverfahrenstechnik an der Fakultät für Maschinenbau der Technischen Universität Braunschweig.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Professor Rainer Krull für die Möglichkeit der Erstellung meiner Doktorarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik danken. Durch ihr Vertrauen in meine Arbeit war es mir möglich, selbstständig eine Vielzahl von Forschungsideen umzusetzen. Dabei wurden mir im Laufe meiner Promotionszeit viele Möglichkeiten geboten Verantwortung zu übernehmen und mich persönlich weiterzuentwickeln. Für ihre Förderung sowohl auf persönlicher als auch auf wissenschaftlicher Ebene bin ich ihnen sehr dankbar.

Bei Professor Andreas Dietzel möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes sowie für die hilfreiche wissenschaftliche Unterstützung und die Kooperation im Zuge des DFG-Projektes *Mikrobioreaktoren für biopharmazeutische Applikationen* bedanken. In zahlreichen Projekttreffen konnten gemeinsam Forschungsschwerpunkte erarbeitet und -inhalte geschärft werden. Ebenfalls möchte ich mich bei Sven Meinen für die kooperative Zusammenarbeit sowie für die Fertigung und Bereitstellung der Mikrobioreaktoren bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Professor Torsten Mayr für die Übernahme des Korreferats, vor allem aber für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung von Mikrobioreaktoren. Durch die Integration einer Vielzahl von Sensoren wurden die Analyse-Möglichkeiten meiner Mikrobioreaktoren enorm erweitert, was erst einen erfolgreichen Einsatz mit aussagekräftigen Messergebnissen ermöglichte. Ebenso möchte ich mich bei Bernhard Müller und Dominik Rabl (Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Graz) für die Einbringung der Sensoren in die Mikrobioreaktoren und die praktische Unterstützung bei der Weiterentwicklung der Messaufbauten bedanken.

Mit Detlev Rasch so umfängliches technisches und wissenschaftliches Fachwissen, Sachverstand und Erfahrung im Hintergrund zu haben, war für mich ein großes Glück. Die tiefgehenden Diskussionen sowie technische Umsetzung und Weiterentwicklung der Versuchsaufbauten haben großen Anteil an dieser Arbeit. Vielen Dank für die tolle Unterstützung!

Dr. Rebekka Biedendieck (Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) möchte ich für die Bereitstellung des *E. coli*-Stammes, Professor Thomas Noll (AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld) für die Bereitstellung der CHO-K1 Zelllinie und Dr. Markus Heine (Fraunhofer ITEM, Braunschweig) für die Zurverfügungstellung der CHO-Hit Zellen danken.

Jan-Hendrik Grosch und Astrid Edlich möchte ich für ihre Hilfe in der Mikrobioreaktor-Forschung am ibvt, der Ausrichtung und Strukturierung meiner Arbeit und ihre persönliche Unterstützung und Leitung danken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen Bürokollegen, Susanna Lladó Maldonado und Dominik Hertweck, für die schöne Zeit, die Gesellschaft und die Unterstützung meiner Arbeiten. Allen Doktorandinnen und Doktoranden des ibvt danke ich für die angenehme Atmosphäre und den guten Zusammenhalt.

Yvonne Göcke möchte ich besonders für ihre Hilfe ihrer Unterstützung in analytischen Fragen in der Welt der HPLC danken. Cord Hullmann danke ich sehr für die helfende Hand in Einkauf und Bestellung, aber vor allem für die Versorgung mit energiereicher Hirnnahrung, trotz ungünstigem Aufdruck. Allen Mitarbeitenden am Institut danke ich für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Während meiner Promotion hatte ich die Möglichkeit studentische Abschlussarbeiten betreuen zu dürfen, dabei selbst viel zu lernen und viele wissenschaftliche Erkenntnisse zu gewinnen. Dafür mochte ich mich bei Hendrik Ostsieker, David Vorländer, Viktor Bittermann, Nils Ole Richter, Mateo Castrillón, Hari Om, Carina Kenkel, Marcel Teichert, Fabian Reichert und Kevin Viebrock bedanken.

Meinen Freunden danke ich für die nötige Ablenkung, den Ausgleich und die Treue.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern möchte ich für ihre unermüdliche Unterstützung und die Ermöglichung meiner akademischen Ausbildung danken. Vielen Dank an Annemette, nicht nur für die kulinarische Unterstützung. Matthias möchte ich für sein offenes Ohr und die musikalische Späterziehung danken.

Meinem Bruder Magnus danke ich für die motivierende Aufbauarbeit, für die Ablenkung, für die kulturelle Versorgung und Verpflegung, fürs Dasein und den großen Support.

In tiefer Verbundenheit danke ich meiner Lebensgefährtin Rike für ihre wertvolle fachliche Unterstützung, fürs Zusammenfallen und wieder Geraderücken, für die Strukturierung meiner Arbeit und Forschung, fürs Lesen abenteuerlicher (ungenauer) Manuskripte, fürs Aushalten, Zusammenhalten, Zuhören und für ihr Vertrauen.

Lasse Frey

Ulm, im März 2021

Publikationen und wissenschaftliche Arbeiten

Teilaspekte der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Maschinenbau der Technischen Universität Braunschweig, vertreten durch Prof. Dr. Rainer Krull, in nachfolgenden Beiträgen bereits veröffentlicht.

Artikel in Fachzeitschriften und Buchkapitel

Frey LJ, Krull R (2020). Microbioreactors for process development and cell based screening studies. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Microfluidics in Biotechnology*. Springer Berlin, Heidelberg (10), doi: 10.1007/10_2020_130.

Frey LJ, Vorländer D, Rasch D, Meinen S, Grosch JH, Müller B, Mayr T, Dietzel A, Krull R (2020). Defining mass transfer in a capillary wave micro-bioreactor for dose-response and other cell-based assays. *Biochem Eng J*, 161, 107667, doi: 10.1016/j.bej.2020.107667.

Frey LJ, Vorländer D, Rasch D, Ostsieker H, Müller B, Schulze M, Schenkendorf R, Mayr T, Grosch J, Krull R (2019). Novel electrodynamic oscillation technique enables enhanced mass transfer and mixing for cultivation in micro-bioreactor. *Biotechnol Prog* 35, e2827, doi: 10.1016/j.bej.2019.04.023.

Meinen S, **Frey LJ**, Krull R, Dietzel A (2019). Resonant mixing in glass bowl microbioreactor investigated by microparticle image velocimetry. *Micromachines* 10, e284, doi:10.3390/mi10050284.

Al-Halhouli A, Albagdady A, Al-Faqheri W, Kottmeier J, Meinen S, **Frey LJ**, Krull R, Dietzel A. (2019). Enhanced inertial focusing of microparticles and cells by integrating trapezoidal microchambers in spiral microfluidic channels. *RSC Adv* 9, 19197-19204, doi: 10.1039/c9ra03587g.

Konferenzbeiträge

Vorträge

Frey LJ, Vorländer D, Rasch D, Meinen S, Müller B, Mayr T, Dietzel A, Krull R (2019). Tailoring mass transfer in a droplet reactor by capillary waves for biological applications. Oral presentation, DECHEMA-Himmelfahrtstagung 2019 – Intensification and digitalisation for integral bioprocessing, P059, Book of abstracts 32, Besenbinderhof, Hamburg, Germany.

Vorländer D, **Frey LJ**, Krull R (2019). Anwendungen von Mikrobioreaktoren zur Entwicklung von Bioprozessen. Oral presentation, LABVOLUTION, Individualisierte und personalisierte Medizin meets BioRegioN - Netzwerk Life Sciences Niedersachsen / Innovationszentrum Niedersachsen GmbH, Hannover, Germany.

Frey LJ, Vorländer D, Meinen S, Rasch D, Mayr T, Dietzel A, Krull R (2019). Intensification of mass transfer in a micro-cavity reactor using capillary waves. Oral presentation, 5th International Conference Implementation of microreactor technology in biotechnology (IMTB 2019), Book of extended abstracts: Session B: Cells within microreactors, BO3, 46 – 47, Cavtat, Croatia.

Meinen S, **Frey LJ**, Krull R, Dietzel A (2018). Velocimetry in a micro cavity: Characterization of a novel microreactor for biopharmaceutical application using oscillation mixing technique. 15th International Conference on Micro Reaction Technology (IMRET) 2018. Karlsruhe, Germany.

Frey LJ, Rasch D, Lladó Maldonado S, Meinen S, Dietzel A, Krull R (2017). Development of a microbioreactor system for biopharmaceutical applications and analysis of scale down effects. 4th International Conference Implementation of microreactor technology in biotechnology (IMTB 2017), Book of extended abstracts: Session D: Process intensification and integration, DO3, 89 – 90, Bled, Slovenia.

Posterpräsentationen

Viebrock K, Rabl D, **Frey LJ**, Krull R, Mayr T. (2019). Optimization of optical glucose sensors for microbioreactor applications. Poster prize award, 2nd EUROMBR International Training Course 2019, Innovative microbioreactor applications in bioprocess development, Poster 23, Center of Pharmaceutical Engineering, TU Braunschweig, Germany.

Breitfeld M, Vorländer D, **Frey LJ**, Harvey J, Marques M, Krull R, Szita N (2019). Challenges of growing cells in bioreactor systems - Two case studies. 2nd EUROMBR International Training Course 2019, Innovative microbioreactor applications in bioprocess development, Poster 17, Center of Pharmaceutical Engineering, TU Braunschweig, Germany.

Frey LJ, Vorländer D, Ostsieker H, Lohse JL, Rasch D, Grosch JH, Krull R, Bahnemann J (2019). Rapid prototyping enables flexible process development of μ -bubble column reactor for biotechnological application. Poster prize award, DECHEMA-Himmelfahrtstagung 2019 – Intensification and digitalisation for integral bioprocessing, P035, Book of abstracts 90, Besenbinderhof, Hamburg

Ostsieker H, **Frey LJ**, Vorländer D, Müller B, Lladó Maldonado S, Rasch D, Mayr T, Krull R (2018). Innovative microbioreactor applications in bioprocess development. 9th Workshop of Chemical and Biological Micro Laboratory Technology, Elgersburg, Ilmenau, Germany.

Frey LJ, Ostsieker H, Rasch D, Krull R (2018). Oscillation-actuated motion on surfaces: Characterization and application of a novel microbioreactor system using electrodynamic exciter. Dechema-Himmelfahrtstagung 2018 – Heterogeneities: A key for understanding and upscaling of bioprocesses in up- and downstream, Proc. 86, Herrenkrug, Magdeburg, Germany.

Ostsieker H, **Frey LJ**, Lohse J, Bahnemann J, Mayr T, Grosch JH, Krull R (2018). Sensor integration and application of a 3D-printed micro bubble column reactor for cell cultivation. 1st EUROMBR International Training Course 2018, Innovative microbioreactor applications in bioprocess development, Center of Pharmaceutical Engineering, TU Braunschweig, Germany.

Vorländer D, **Frey LJ**, Rasch D, Meinen S, Müller B, Mayr T, Dietzel A, Krull R (2018). Vertical oscillated microbioreactors – characterization and sensor integration of spherical cavities at the micro scale. Poster, 1st EUROMBR Training Course 2018, Innovative microbioreactor applications in bioprocess development, Center of Pharmaceutical Engineering, TU Braunschweig, Germany.

Frey LJ, Meinen S, Vorländer D, Rasch D, Müller B, Mayr T, Dietzel A, Krull R (2018). Cultivation in a micro cavity: characterization of a novel micro reactor for biopharmaceutical application using oscillation mixing technique. 15th International Conference on Micro Reaction Technology (IMRET), Karlsruhe, Germany.

Frey LJ, Rasch D, Lladó Maldonado S, Meinen S, Dietzel A, Krull R (2017). A novel microscale cell culturing system using electrodynamic mixing for biopharmaceutical application. Poster prize on the MMPE 2017, 3rd International Symposium on Multiscale Multiphase Process Engineering (MMPE), Proc. P-15, 265-266, Toyama, Japan.

Ostsieker H, **Frey LJ**, Rasch D, Krull R (2017). Fluid characterization and application of a novel microbioreactor system for screening of active pharmaceutical ingredients. 2nd Braunschweig International Symposium on Pharmaceutical Engineering Research (SphERE 2), Proc. P.101, TU Braunschweig, Germany.

Meinen S, **Frey LJ**, Krull R, Dietzel A (2017). Fs-Laser induzierte Ätzstrukturen in Foturan für hoch parallelisierte Mikroreaktoren. MikroSystemTechnik Kongress 2017, München, Germany.

Studentische Abschlussarbeiten

Viebrock K (2020). Integration of an optical glucose sensor in vertical oscillating micro-bioreactors for bacterial and cell culture applications, Masterarbeit.

Reichert F (2019). Implementierung optischer Sensoren zur Messung der Biomassekonzentration in parallelisierten Mikroreaktoren, Bachelorarbeit.

Kenkel C (2019). Etablierung tierischer Zellkulturtechnik zum Einsatz in vertikal oszillierten Mikroreaktoren, Masterarbeit.

Kurakin S (2019). Integration and Application of Optical Carbon Dioxide Sensors in Microbioreactors, Masterarbeit.

Breitfeld M (2019). Investigation of cell growth in microbioreactor systems and validation of an analysis algorithm for fluorescence imaging, Masterarbeit.

Teichert M (2019). Einfluss einer kolloid-dispersen Ubichinon-Formulierung bei oxidativem Stress in *Saccharomyces cerevisiae* in einem innovativen Mikrobioreaktor, Masterarbeit.

Castrillon M (2018). In-situ Measurements for Flow Analysis in Microreactor Systems using Computer Vision, Studienarbeit.

Ostsieker H (2018). Sensorintegration und Evaluation 3D-gefertigter Mikrobioreaktoren für die Zellkultivierung, Masterarbeit.

Vorländer D (2018). Vertikal oszillierte Mikrobioreaktoren – Charakterisierung und Vergleich sphärischer Reaktorgeometrien im Mikrolitermaßstab, Masterarbeit.

Richter NO (2018). Skalenübergreifende Wachstumsoptimierung von *Saccharomyces cerevisiae* N34 im Batch-Betrieb mittels statistischer Versuchsplanung, Bachelorarbeit.

Bittermann V (2018). Systemübergreifende Untersuchung und Analyse von oxidativem Stress an *Saccharomyces cerevisiae* N34, Studienarbeit.

Ostsieker H (2017). Entwicklung und Charakterisierung eines Mikrobioreaktors mit neuartiger elektrodynamischer Excitermischtechnik, Studienarbeit.

Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
$\mu_{\max}$	Spezifische Wachstumsrate	h^{-1}
a	Spezifische Phasengrenzfläche	$\text{m}^2 \text{m}^{-3}$
C_{O_2}	Sauerstoffkonzentration	mg L^{-1}
$C_{O_2}^*$	Sauerstoffsättigungskonzentration	mg L^{-1}
d_0	Schütteldurchmesser	m
D_W	Well-Durchmesser	m
f_n	Resonanzfrequenz	s^{-1}
g	Erdbeschleunigung	m s^{-2}
h_m	Mittlere Tropfenhöhe	m
j	Schwingungsmodus	-
$k_L a$	Volumetrischer Stoffübergangskoeffizient	h^{-1}
L	Tropfenlänge	m
L_{krit}	Kritische Kapillarlänge	m
N	Zellkonzentration	Zellen mL^{-1}
n_{krit}	Kritische Schüttelfrequenz	min^{-1}
OTR	Sauerstofftransferrate, engl. oxygen transfer rate	$\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$
OUR	Sauerstoffaufnahme, engl. oxygen uptake rate	$\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$
p	Bogenlänge	m
q	Kreiswellenzahl	m^{-1}
q_{Gluc}	Spezifische Glucoseverbrauchsrate	$\mu\text{mol } 10^{-6} \text{ Zellen d}^{-1}$
R	Tropfenradius	m
Re	Reynoldszahl	-
t_m	Mischzeit	s
V_L	Flüssigkeitsvolumen	m^{-3}
λ	Wellenlänge	m
ρ	Dichte	kg m^{-3}
σ	Oberflächenspannung	kg s^{-2}
ω	Kreisfrequenz	s^{-1}



Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
μPIV	Micro particle image velocimetry
cwMBR	Engl. Capillary wave microbio reactor
DMF	Engl. digital microfluidics
EWOD	Engl. electrowetting on dielectric
HTP	High throughput
LB	Engl. Lysogeny Broth
LED	Engl. Light emitting diode
LS	Lichtstreuung
MBR	Mikrobioreaktor
MSR	Micro Sphere Reactor
MTP	Mikrotiterplatte
NTU	Engl. nephelometric turbidity unit
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. polymerase chain reaction
PLA	Engl. Poly lactic acid

Kurzfassung

Miniaturisierte Kultivierungssysteme mit einem hohen Maß an integrierter Sensorik und Kontrollmöglichkeit haben sich als leistungsfähige Werkzeuge in der Entwicklung moderner Bioprozesse erwiesen. Besonders Tropfen-basierte Mikrobioreaktorsysteme (tMBR) eröffnen weitreichende Möglichkeiten zur parallelisierten Kultivierung von Zellen im Hochdurchsatzverfahren bei geringem Probeneinsatz. Das abgeschlossene Fluidelement eines Flüssigkeitstropfens wird dabei genutzt, um eine Kompartimentierung zu erzeugen und separate biologische Prozesse durchzuführen. Zur Erhebung umfangreicher Mengen an experimentellen Daten kommen tMBR in der biopharmazeutischen Forschung zunehmend bei Screening-Anwendungen zum Einsatz. Dabei kann in kurzer Zeit eine Vielzahl von Parametern und Einflussfaktoren mit verringerten Aufwendungen untersucht werden. Im Gegensatz zur Tropfen-basierten Mikrofluidik mit kontinuierlicher Fluidförderung, ermöglichen Kultivierungssysteme mit sessilen Tropfen eine erhöhte Flexibilität in der Fluidhandhabung sowie eine Integration von kontinuierlicher online-Analytik. Allerdings bergen das Aufrechterhalten einer optimalen Kultivierungsumgebung als auch die Förderung von Zellwachstum in einem Flüssigkeitstropfen inhärente Herausforderungen, besonders in Bezug auf Stofftransport und Verdunstung.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Tropfen-basierten Kultivierungssystems zur Kultivierung und Untersuchung von Zellen. Durch die Implementierung einer aktiven Mischtechnik und umfangreicher Sensorik wurde ein leistungsfähiges Kultivierungssystem entwickelt, das als analytisches Werkzeug für biopharmazeutische Applikationen eingesetzt werden kann.

Aktive Durchmischung und Stofftransport wurden durch die Anregung von Kapillarwellen auf der Tropfenoberfläche mittels vertikaler Oszillation erzeugt. So kann der gesamte Reaktorinhalt innerhalb von 3 s homogenisiert und $k_L a$ -Werte von bis zu 345 h^{-1} erzeugt werden, ohne bewegte Mischelemente in den Reaktionsraum zu integrieren. Durch die Kontrolle der Kultivierungsbedingungen kann direkter Einfluss auf das Zellwachstum genommen werden. Die Flüssigkeitstropfen sind dabei in einen Glas-Chip eingebettet, der für eine definierte Tropfenform und die Integration optischer Sensoren sorgt. Das hohe Potential des entwickelten Tropfen-basierten Mikroreaktorsystems, das aufgrund der eingesetzten Mischtechnik als *capillary wave microbioreactor* (cwMBR) bezeichnet wird, wurde in einem *proof-of-concept* durch die Kultivierung von *Escherichia coli* und der Steuerung der Wachstumsbedingungen aufgezeigt. Neben dem Einsatz für bakterielle Anwendungen konnten die Vorteile des cwMBR ebenfalls für Kultivierung tierischer Zellkulturen dargestellt werden, deren metabolische Aktivität umfassend überwacht werden konnte.



Das in dieser Arbeit entwickelte MBR-System verbindet somit die Vorteile von Tropfen-basierten MBR mit den vielseitigen Kontrollmöglichkeiten klassischer Bioreaktoren, wodurch effiziente Screeninganwendungen in der biopharmazeutischen Forschung ermöglicht und beschleunigt werden können.

Abstract

Miniaturized cultivation systems with extensive measures for control and analytics have proven to be both effective and indispensable tools for modern bioprocess development. Particularly droplet based microbioreactors (MBR) open up profound possibilities for parallelized cultivation of cells in high-throughput manner with reduced sample expense. These systems use segregated fluid droplets for compartment enabling the application of several biological processes at a time. In biopharmaceutical research MBRs are progressively applied for screening applications allowing for the generation of high volumes of data. In less time multiple parameters and influencing factors can be examined with lower expenses. In contrast to droplets in microfluidics with continuous flow, MBR systems with sessile (stationary) droplets allow for enhanced flexibility in fluid manipulation and handling as well as in implementation of online analytics. However, ensuring a biologically active environment promoting cell growth in a fluid droplet of a few microliters implies intrinsic challenges, especially concerning mass transport and evaporation.

This thesis therefore aims to develop a droplet-based MBR system to cultivate cells and examine cellular processes. By the implementation of an active mixing technique and surround analytical methods, a potent cultivation system was generated, which can be applied as analytical tool for diverse biopharmaceutical purposes.

In this MBR system with a reaction volume of 7 μL , active mixing is induced via the excitation of capillary waves on the droplet surface by vertical oscillation enhancing mass transfer into and inside the fluid. The entire reaction volume can thus be homogenized within 3 s and k_La values up to 345 h^{-1} can be achieved, without implementing movable mixing parts inside the fluid volume. By controlling the process conditions in the MBR, cellular metabolism and growth can be directly affected. Each fluid droplet is embedded in a glass chip ensuring a defined droplet shape as well as the integration of online sensors. Because of its unique mixing technique, the MBR is called *capillary wave microbioreactor* (cwMBR) and its considerable potential was demonstrated in a *proof-of-concept* cultivating *Escherichia coli* under controlled growth conditions. Besides bacterial applications, the cwMBR could proof its benefits for mammalian cell culture monitoring its metabolic activity.

The MBR system developed in this thesis combines advantages of droplet based MBRs with the control capabilities of lab-scale bioreactors, facilitating its application for efficient screenings in biopharmaceutical research.



Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1 NUTZEN VON MINIATURISIERTEN KULTIVIERUNGSSYSTEMEN	5
2.1.1 Einsatz von Mikrobioreaktoren in der Prozessentwicklung.....	6
2.1.2 Einsatz von Mikrobioreaktoren als analytisches Messinstrument.....	10
2.2 EINSATZ AKTIVER MISCHTECHNIKEN IN MIKROBIOREAKTOREN	13
2.3 SCHWINGUNG VERTIKAL OSZILLIERTER TROPFEN	17
2.4 INTEGRATION OPTISCHER SENSOREN IN MBR-SYSTEME	20
2.4.1 Nephelometrische Methoden zur Bestimmung der Biomassekonzentration	21
2.4.2 Opto-chemische Lumineszenz-Sensoren.....	22
2.5 GRUNDLAGEN MIKROBIELLEN WACHSTUMS	25
2.6 DER MODELLORGANISMUS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	27
2.7 CHINESE HAMSTER OVARY (CHO) ZELLEN.....	28
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 MIKROBIOREAKTOREN UND IMPLEMENTIERTE SENSORIK.....	30
3.1.1 <i>Micro Sphere Reactor</i> als Modell-Mikroreaktor für die Homogenisierung über vertikale Oszillation	30
3.1.2 Der <i>capillary wave micro-bioreactor</i> als Modellreaktor für sessile Tropfen.....	33
3.2 ELEKTROMAGNETISCHE OSZILLATIONSPLATTFORM	37
3.3 ANALYSE DER MISCHZEITEN UND PARTIKELVERFOLGUNG	38
3.4 ANALYSE DES VOLUMENBEZOGENEN SAUERSTOFFÜBERGANGSKOEFFIZIENT $K_L a$	40
3.5 KULTIVIERUNG VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21 (DE3) PMGBM41	41
3.6 KULTIVIERUNG VON CHO-K1- UND CHO-HIT-ZELLEN	44
3.6.1 Kultivierung im Schüttelkolben.....	44
3.6.2 Bestimmung der Zellkonzentration und Zellviabilität.....	49
3.6.3 Kryokonservierung der CHO-Zellen.....	50
3.6.4 Auftauen von CHO-Zellen und Zellaussaat	51
3.6.5 Kultivierung im Mikroreaktorsystem cwMBR.....	51
3.6.6 Analytische Methoden.....	52
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	54
4.1 HOMOGENISIERUNG VON KLEINSTVOLUMINA	54
4.1.1 Homogenisierung mittels vertikaler Oszillation	54
4.1.2 Entwicklung einer Plattform für die gezielte vertikale Oszillation.....	56
4.1.3 Homogenisierung durch Oszillation der Flüssigkeitsoberfläche	60
4.1.4 Charakterisierung des Stofftransports im <i>Micro Sphere Reactor</i>	63
4.1.5 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> im <i>Micro Sphere Reactor</i>	69