

**Abschlussbericht: Max-Buchner-Forschungstiftung (2018-2019)**  
**Projekt: „Design, Entwicklung und Evaluation 3D-gedruckter Mikrobioreaktoren für biotechnologische Anwendungen“**

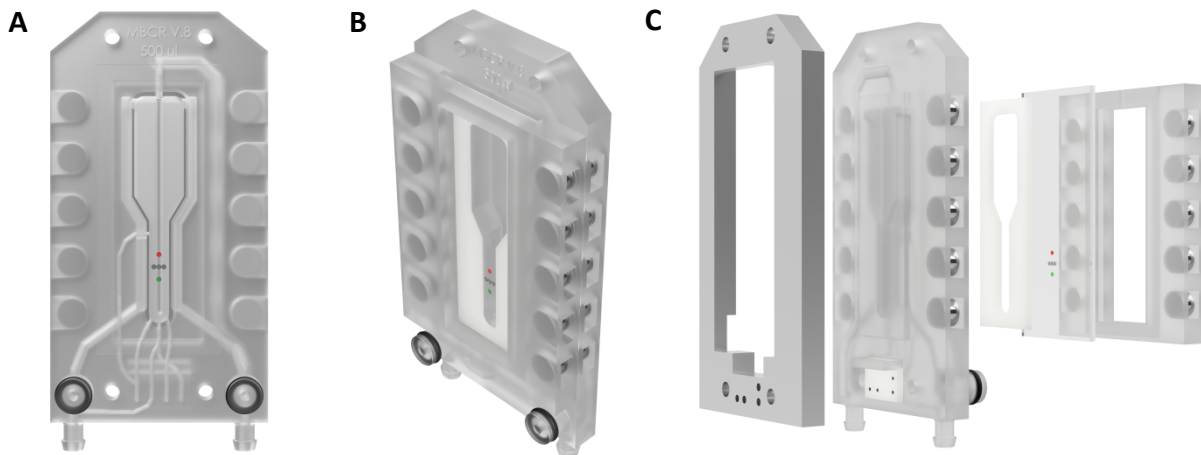
---

Dr. Janina Bahnemann  
DFG Emmy Noether-Nachwuchsgruppenleiterin  
Leibniz Universität Hannover (LUH)  
Institut für Technische Chemie (TCI)  
Callinstraße 5, 30167 Hannover  
Tel.: +49-(0)511/762-2568  
E-Mail: jbahnemann@iftc.uni-hannover.de

Für die Bioprozessentwicklung besteht ein erheblicher Bedarf an leistungsfähigen Mikrobioreaktor (MBR)-Systemen, die einen automatisierten, hochparallelisierten Betrieb bei unabhängiger Variation einzelner Prozessparameter zulassen. Die Herstellung von Mikrosystem- und MBR-Prototypen durch traditionelle Mikrofabrikationstechniken ist jedoch in der Regel recht kompliziert, zeitaufwendig und benötigt zudem teure Geräte sowie moderne Reinraumlaborare. Der dreidimensionale (3D) Druck stellt hierbei eine vielversprechende Alternative und Erweiterung zu traditionellen Techniken, wie z.B. Lithographie und PDMS-Glas-Bonding, dar und ermöglicht eine flexible Gestaltung von Bauteilen und somit eine Anpassung der Reaktorsysteme an verschiedene Prozessbedürfnisse.

Das Ziel des Projektes besteht darin, die Möglichkeiten des hochauflösenden 3D-Druckes für die Bioprozessentwicklung zu nutzen, um maßgeschneiderte MBR-Systeme für spezifische Anforderungen zu erstellen. Dabei sollte ein 500  $\mu$ L-MBR mit integrierter Sensorik (chemischer und biologischer Analyten) und Datenaufnahme zur Überwachung von Kultivierungsparametern für tierische Zellkulturen entwickelt werden. Anschließend sollte durch Variation der Reaktorabmessungen der Einfluss des Designs auf kritische Prozesskenngrößen untersucht werden, um so eine zielgerichtete Optimierung durchzuführen.

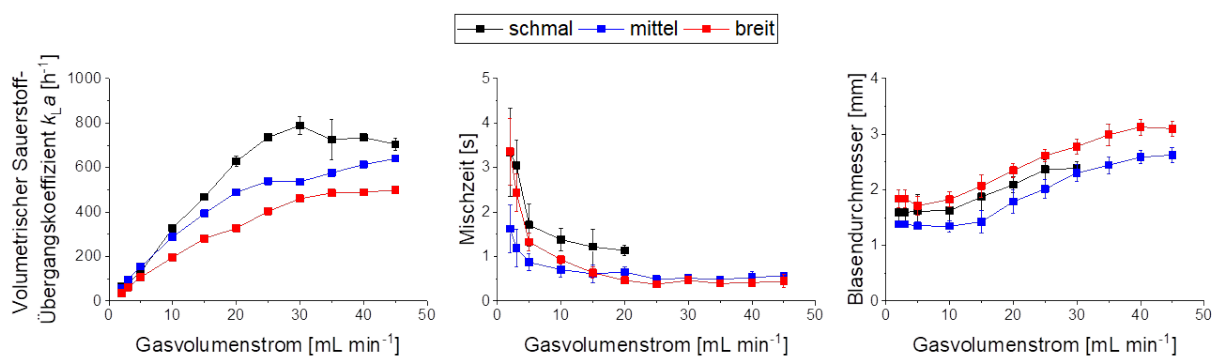
Zu Beginn des Projekts wurden zunächst verschiedene MBR-Prototypen mittels geeigneter Software (Solidworks) entworfen und anschließend mittels hochauflösendem Multijet Printing (MJP) gefertigt. Hierfür wurde der 3D-Drucker „Projet 2500 Plus“ (Fa. 3D-Systems) verwendet. Ein erster Prototyp eines 3D-gedruckten MBR-Systems ist in Abbildung 1 dargestellt. Der Reaktionsraum ( $V_L = 500 \mu\text{L}$ ) des MBR befindet sich auf einem aus transparenten Polymethylacrylat gefertigten Chip, in welchem Mikrokanäle zur Versorgung, Probenahme und Begasung integriert sind, wodurch ein monolithischer Aufbau entsteht. Eine Polycarbonat Deckplatte, welche in einer Halterung magnetisch an die Grundplatte angebracht ist, schließt den Reaktorraum ab und dient gleichzeitig als Träger für optisch-chemische Sensor Spots. Über einen Aluminiumrahmen wird der MBR auf eine Halterung aufgesteckt, wo das Auslesen der Sensoren sowie die Versorgung des Reaktors erfolgen. Das Reaktionsvolumen wird über aufsteigende Gasblasen, die am Reaktorboden über einen Mikrokanal ( $d_i = 300 \mu\text{m}$ ) eintreten, effektiv durchmischt und gleichzeitig mit Sauerstoff versorgt. Hierdurch werden bewegliche Teile im Reaktorinnenraum vermieden, was die Zuverlässigkeit der Versuchsdurchführung erhöht. Hierfür befindet sich über dem säulenförmigen Reaktionsraum ein breiterer Kopfraum, wodurch der Austritt der Gasblasen erleichtert und die Schaumbildung begrenzt wird. Durch einen integrierten Heizmantel in der Grundplatte, in Verbindung mit dem geringen Reaktionsvolumen, können exzellente Wärme- und Stofftransport Eigenschaften erzielt werden.



**Abb. 1:** Prototyp eines 3D-gedruckten Mikroblasensäulen-Reaktors mit integrierten optischen Sensoren. Frontansicht auf Grundplatte mit Reaktionsraum, Versorgungskanäle und magnetische Befestigung (A). MBR mit Grund- und Deckplatte (B). Modularer Aufbau für den Einsatz verschiedener Reaktorgeometrien (C).

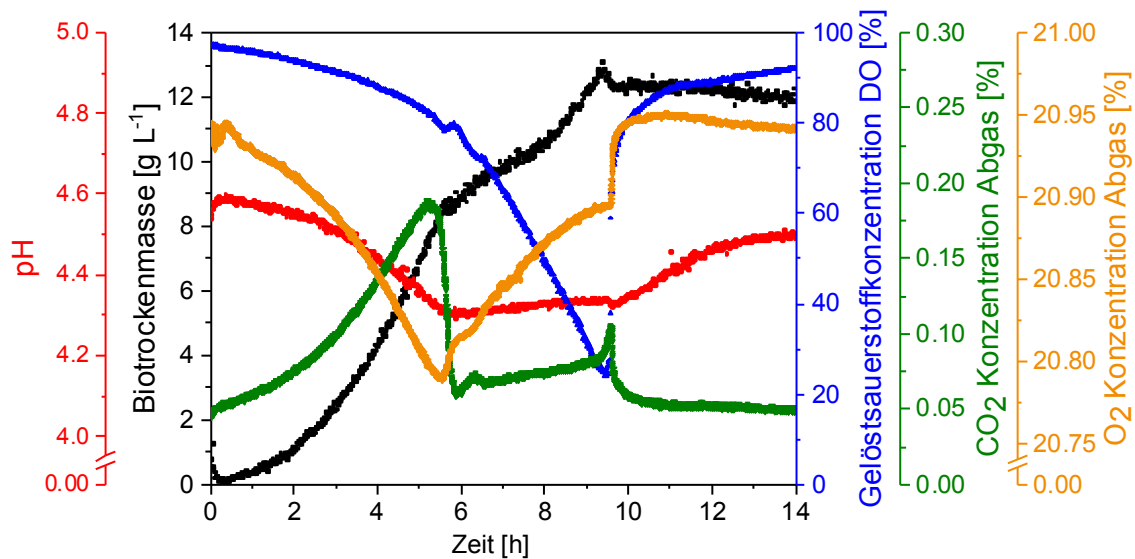
Durch optische Messverfahren können essentielle Kenngrößen biologischer Kultivierungen online erfasst werden. Dabei wird das Biomassewachstum mittels Lichtstreuung über ein USB-Spektrometer erfasst, wodurch ein breiter linearer Messbereich mit nur einem optischen Zugang erreicht wird. Mit einer zusätzlichen LED zur Anregung bei einer Wellenlänge von 472 nm kann mit demselben Spektrometer das Fluoreszenzsignal zur Bestimmung von etwa *grün fluoreszierendem Protein* erfolgen. Über chemisch-optische Sensor-Spots werden die Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen und der pH-Wert non-invasiv gemessen und über ein Infrarotthermometer wird die Kultivierungstemperatur aufgezeichnet. Zusätzlich erfolgt eine Abgasanalytik zur Bestimmung von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>-Gehalt. So erhält man on-line ein detailliertes Bild der ablaufenden Kultivierung, ohne über eine Probenahme in den Prozess einzugreifen (Minimierung des Kontaminationsrisikos).

Durch den modularen Aufbau in Verbindung mit der additiven Fertigungsmethode konnte die Reaktorgeometrie variiert und der Einfluss auf verfahrenstechnische Kenngrößen untersucht werden. Bei einem konstanten Arbeitsvolumen von 500 µL wurden so drei unterschiedliche Designs erstellt, die sich in der Breite (und folglich auch in der Höhe) des Reaktionsraumes unterscheiden. Die drei Geometrien (schmal, mittel und breit) wurden hinsichtlich Sauerstoffeintrag, Mischzeit und Blasendurchmesser charakterisiert. Die Ergebnisse der Charakterisierung sind in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb. 2:** Volumetrischer Sauerstoffübergangskoeffizient  $k_L a$ , Mischzeit und Blasendurchmesser drei verschiedener Reaktorgeometrien (schmal, mittel, breit) der 3D-Mikroblasensäule.

Bei allen drei Prototypen wurden sowohl eine sehr schnelle Durchmischung als auch ein hoher Sauerstoffeintrag erzielt, wobei der Einfluss der Reaktorabmaße deutlich zu erkennen ist. So führt eine schmale Geometrie zu höherem Sauerstoffeintrag, was auch durch die höhere Blasensäule und der einhergehenden gesteigerten Verweilzeit im Reaktor bedingt ist. Bei der mittleren Geometrie wird bei gleichem Volumenstrom eine kürzere Mischzeit sowie kleinere Blasendurchmesser erzielt. Auf Grund dieser drei Kenngrößen wurde im Folgenden mit der mittleren Geometrie eine biotechnologische Applikation durchgeführt und eine Kultivierung mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Proof-of-Concept durchgeführt (s. Abb. 3).



**Abb. 3:** Batch-Kultivierung der Crabtree-positiven Hefe *S. cerevisiae* CCOS538 in modifiziertem Verduyn-Medium ( $20 \text{ g L}^{-1}$  Glucose).

Es ist deutlich ein diauxischer Wachstumsverlauf zu erkennen, wobei zuerst Glucose (spezifische Wachstumsrate  $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$ ) und dann Ethanol ( $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$ ) verstoffwechselt werden, was zu zwei Wachstumsphasen führt. Mit der ersten Wachstumsphase ist ein Abfall des pH-Wertes zu erkennen, der im Zuge des zweiten Wachstums wieder zunimmt. Auch durch die Abgasanalytik sind die zwei Phasen der Kultivierung zu erkennen.

Mit der 3D-gedruckten Mikroblasensäule konnten somit vorteilhafte Wachstumsbedingungen für die eingesetzte Hefe geschaffen werden, die zu mit der Literatur vergleichbaren Ergebnissen führen [1-3], bei deutlich geringerem Kultivierungsvolumen, jedoch gleichem Informationsgehalt. Dies verdeutlicht das enorme Potential für die schnelle und anwendungsfreundliche Generierung von Prozessdaten mit dem entwickelten Mikroreaktorsystem.

Es wurde zusammenfassend ein modulares, 3D-gedrucktes Mikrobioreaktor-System erfolgreich entworfen, getestet und evaluiert. Durch das reproduzierbare und flexible 3D-Design in Verbindung mit dem hohen Maß an integrierter Sensorik ist eine gezielte Prozess- und Reaktorentwicklung möglich, die weiter zur Modellbildung und Prozessoptimierung genutzt werden kann. Mit der eingesetzten Mischtechnik werden ausgezeichnete Sauerstoffeinträge und Mischzeiten ohne die Verwendung beweglicher Teile im Reaktorraum ermöglicht. Hierdurch werden im Mikroreaktor gute, reproduzierbare Bedingungen für biologisches Zellwachstum und Produktion (z.B. Proteine) geschaffen.

Im Rahmen der genehmigten Max-Buchner-Förderung wurden zwei Masterarbeiten in Kooperation zwischen dem ibvt der TU Braunschweig (Prof. Rainer Krull) und dem TCI der LUH (Dr. Janina Bahnemann) erfolgreich angefertigt. Zudem wurde ein Konferenzbeitrag mit dem Titel „Rapid prototyping enables flexible process development via 3D-printed  $\mu$ -bubble column reactor for biotechnological application“ bei der DECHEMA Himmelfahrtstagung 2019 in Hamburg präsentiert (ausgezeichnet mit „Best Poster Award“). Basierend auf den positiven Ergebnissen, die innerhalb dieses Max-Buchner-Projekts erzielt werden konnten, wurde bereits ein gemeinsamer DFG-Antrag (Janina Bahnemann (TCI) und Rainer Krull (ibvt)) für die Fortführung des Projekts eingereicht (Entscheidung ausstehend).

## Quellen

- [1] Paalme, T., Elken, R., Vilu, R., and Korhola, M. (1997). *Enzyme and Microbial Technology* 20, 3, 174–181.
- [2] Bisschops, M. M., Vos, T., Martínez-Moreno, R., Cortés, P. T., Pronk, J. T., and Daran-Lapujade, P. (2015). *Microbial cell* 2, 11, 429–444.
- [3] Beck, C. and Meyenburg, H. K. von. (1968). *Journal of Bacteriology* 96, 2, 479–486.

**5-zeiliges Abstract:**

Im Zuge des Projekts wurde ein modulares, 3D-gedrucktes Mikrobioreaktor (MBR)-System ( $V_L = 500 \mu\text{L}$ ) entworfen, getestet und evaluiert. Erste Kultivierungen wurden mit der Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt, welche ausgezeichnete Sauerstoffeinträge und Mischzeiten des MBRs zeigen. Durch das reproduzierbare und flexible 3D-Design des MBR-Systems in Verbindung mit dem hohen Maß an integrierter Sensorik wird eine gezielte Prozess- und Reaktorentwicklung ermöglicht, die zukünftig zur Modellbildung und Prozessoptimierung genutzt werden kann.