

CFD als Instrument zur bioverfahrenstechnischen Charakterisierung von single-use Bioreaktoren und zum Scale-up für Prozesse zur Etablierung und Produktion von Biotherapeutika

Von der Fakultät für Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik
der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktor-Ingenieur
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. (FH), M.Sc. in Life Sciences

Christian Löffelholz

aus Halle / Saale (Deutschland)

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. habil. Peter Ay

Gutachter Prof. Dr.-Ing. Dieter Eibl

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2013

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeiten als wissenschaftlicher Assistent bzw. Mitarbeiter an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften (ZHAW).

Mein besonderer Dank gilt *Herrn Professor Dr.-Ing. habil. Peter Ay*, dem Lehrstuhlinhaber für Aufarbeitungstechnik der Brandenburgisch Technischen Universität Cottbus, für das entgegengebrachte Vertrauen und die wissenschaftlichen Diskussion.

Mein spezieller Dank gilt *Herrn Prof. Dr.-Ing. Dieter Eibl* und *Frau Prof. Dr.-Ing. Regine Eibl* von der ZHAW, die mir diese Dissertation im Rahmen unterschiedlichster Projekte ermöglichten. Durch ihre Unterstützung und ihr Vertrauen über die Jahre, aber auch durch die ein oder anderen kritischen Worte habe ich erst diese Arbeit erfolgreich durchführen können. Für ihr unübertroffenes Engagement und die Vielzahl an Möglichkeiten des fachlichen Austausches möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei *Herrn Prof. Dr.-Ing. Klaus Schnitzlein* und *Herrn Prof. Dr.-Ing. Christoph Egbers* für die wissenschaftliche Beratung und Diskussion.

Meinen langjährigen CFD-Kollegen *Herrn Dipl. Ing. Sören Werner* und *Herrn M.Sc. Stephan C. Kaiser* möchte ich besonders für ihre Hilfe, fachlichen Diskussionen und Anregungen sowie die sehr angenehme Zusammenarbeit danken.

Einen ganz besonderen Dank gilt meinen Kollegen der Zellkulturtechnik *Lidija Lisica*, *M.Sc. Nicole Imseng* und *B.Sc. Nina Steiger* für ihre grosse Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Ohne ihr Mitwirken und Geduld hätten die Kultivierungen im Kapitel 4.4 nicht in dieser positiven Art realisiert werden können.

Es sei allen (ehemaligen) Mitarbeitern und Studierenden der ZHAW sowie der Fachgruppe Bioverfahrens- und Zellkulturtechnik herzlich gedankt, die wesentlich oder unwesentlich für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Namentlich sollen *Dipl.-Ing. (FH) Irina Bauer*, *M.Sc. Katharina Blaschczok*, *M.Sc. Ina Dittler*, *B.Sc. Valentin Jossen*, *B.Sc. Nicolai Lehmann*, *Dr.-Ing. Iris Poggendorf*, *M.Sc. Christoph Ries*, *B.Sc. Jaqueline Schmidt* und *M.Sc. Carmen Schirmaier* genannt werden.

Ein Dank gilt auch allen Projektpartnern (Sartorius Stedim Biotech, Thermo Scientific, Levitronix und GE Healthcare), die die Basis für diese Arbeit geschaffen haben. Herausheben möchte ich vor allem *Frau Dipl.-Ing. (FH) Ute Husemann* von Sartorius Stedim Biotech und *Herrn M.Sc. Sebastian Rothe* von GE Healthcare für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit durch ihre Unterstützung zur Seite gestanden haben.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern *Reinhard* und *Bianka Löffelholz* aber auch meiner Familie, die mir all die Jahre mit Rat und Tat zur Seite standen und Rückhalt gaben.

Inhaltsverzeichnis

Symbolverzeichnis	III
Kurzfassung	1
Graphische Kurzfassung.....	2
Abstract	3
1 Einleitung.....	5
2 Stand des Wissens.....	9
2.1 Biopharmazeutika und Produktionsorganismen.....	9
2.2 Single-use Systeme	11
2.2.1 Single-use Bioreaktoren: Kategorisierung und Charakterisierung	12
2.2.2 Haupteinsatzgebiete von single-use Bioreaktoren.....	14
2.3 Verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren.....	20
2.3.1 Grundlegende verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren	21
2.3.2 Erweiterte verfahrenstechnische Charakterisierung.....	32
2.4 Scale-up von single-use Bioreaktoren	39
3 Methodik	43
3.1 Single-use Bioreaktoren	43
3.1.1 UniVessel® SU.....	45
3.1.2 BIOSTAT® STR.....	45
3.1.3 S.U.B.....	47
3.2 Bioreaktorcharakterisierung.....	48
3.2.1 Experimentelle Methoden (Fallstudie I).....	48
3.2.2 Numerische Untersuchungen (Fallstudie II).....	49
3.2.3 Validierung der numerischen Daten mittels berührungslosem Messverfahren	51
3.3 Scale-up Studien (Fallstudie III).....	54
3.4 Kultivierung von CHO-Suspensionszellen (Fallstudie IV).....	54
3.4.1 Zelllinie.....	55
3.4.2 Medien.....	56
3.4.3 Prozess- und Kultivierungsparameter.....	56
3.4.4 Analytik.....	60

4	Resultate und Diskussion	61
4.1	Fallstudie I: Experimentelle Bestimmung verfahrenstechnisch relevanter Parameter von Zellkulturprozessen	61
4.1.1	UniVessel® SU	61
4.1.2	BIOSTAT® STR 50 L	63
4.1.3	S.U.B.	67
4.1.4	Grundlegende, verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren	70
4.2	Fallstudie II: Numerische Charakterisierung und Validierung	73
4.2.1	UniVessel® SU und BIOSTAT® STR 50 L	73
4.2.2	S.U.B. 50 L	78
4.2.3	Zeitlich und örtlich aufgelöste, verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren	82
4.3	Fallstudie III: Maßstabsübertragung	86
4.3.1	BIOSTAT® STR Reihe	86
4.3.2	S.U.B.	93
4.3.3	Maßstabsunabhängige Betrachtung der single-use Bioreaktoren hinsichtlich ihrer verfahrenstechnischen Parameter	98
4.4	Fallstudie IV: Prozessauslegung und -entwicklung	101
4.4.1	Prozessauslegung	101
4.4.2	Prozessentwicklung	103
4.4.3	CFD zur Prozessentwicklung und Bioreaktoroptimierung	108
5	Zusammenfassung	111
6	Literaturverzeichnis	117
7	Abbildungsverzeichnis	133
8	Tabellenverzeichnis	137
9	Anhang	138
	Anhang A: Experimentelle Bestimmung der Mischzeit	138
	Anhang B: Experimentelle Bestimmung des Sauerstofftransfers	140
	Anhang C: Messung der Strömung mittels Particle-Image Velocimetry (PIV)	142
	Anhang D: Messung der Gasblasengrößenverteilung mittels (PIV)/Shadowgraphy	161
	Anhang E: Kultivierung von CHO-Zellen im BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B.	181

Symbolverzeichnis

Symbol	Beschreibung	Einheit
Lateinische Symbole		
A	Fläche	m ²
a	spezifische Phasengrenzfläche	1/m
B	Korrelationsfaktor	-
c	Abstand zwischen zwei Rührern	m
c _{Gluc}	Glukosekonzentration	g/L
c _{Lak}	Laktatkonzentration	g/L
c _{O₂}	Sauerstoffkonzentration in einer Flüssigkeit	kg/m ³
c _{O₂} [*]	Gesättigte Sauerstoffkonzentration in einer Flüssigkeit	kg/m ³
c _{SEAP}	SEAP-Konzentration; Proteinkonzentration	U/mL
c _T	Tracerkonzentration	kg/m ³
c _{T,0}	Tracerkonzentration zu Beginn der Messung	kg/m ³
c _{T,∞}	Tracerkonzentration zum Ende der Messung	kg/m ³
c _x	Zellkonzentration	Zellen/mL
c _{x,0}	Zellkonzentration zu Beginn	Zellen/mL
c/d	Verhältnis zwischen Rührerabstand und Rührerdurchmesser	-
d	Rührerdurchmesser	m
d ₁₀	Mittlerer Gasblasendurchmesser (LaVision)	m
d ₃₂	Sauterdurchmesser	m
d _B	Gasblasendurchmesser	m
dt	Zeitversatz	s
d _x	Zelldurchmesser	m
d/D	Verhältnis von Rührer- zu Bioreaktordurchmesser	-
d/H	Verhältnis von Rührerdurchmesser zu Flüssigkeitshöhe	-
D	Bioreaktordurchmesser	m
D _{eff}	Diffusionskoeffizienten	m ² /s
D _m	Molekularer Diffusionskoeffizient	m ² /s
DO	gelöster Sauerstoff (dissolved oxygen)	%
DO ₂	Diffusionskoeffizient von Sauerstoff	m ² /s
F _k	externe Kräfte einer Phase	N
g	Erdbeschleunigung	m/s ²
h ₁	Höhe des ersten Rührers (im Mittelpunkt) zum Reaktorboden	m
h ₁ /d	Verhältnis der Höhe des ersten Rührers zum Rührerdurchmesser	-
H	Flüssigkeitshöhe	m
H ₁	Höhe des Spargers zum Reaktorboden	m
H _{BR}	Höhe Bioreaktor	m
H _m	Homogenität	-
H/D	Verhältnis von Flüssigkeitshöhe zu Bioreaktordurchmesser	-

k	Turbulente kinetische Energie	m^2/s^2
k_r	Kippfrequenz	$1/\text{s}$
k_L	Stoffübergangskoeffizient	m/s
$k_{L,a}$	Volumenspezifischer Stoffübergangskoeffizient	$1/\text{s}$
L	Bag-Abmaße	m
L_T	Integraler Maßstab der Turbulenz	m
m	Masse	kg
M	Drehmoment	N m
M_d	Drehmoment (gegen Luft)	N m
n_{GB}	Anzahl Gasblasen	-
N	Rührerdrehfrequenz	$1/\text{s}$
OTR	Sauerstofftransferrate	$\text{kg}_{\text{O}_2}/\text{m}^3/\text{s}$
OUR	Sauerstoffaufnahme	$\text{kg}_{\text{O}_2}/\text{m}^3/\text{s}$
P	Leistungseintrag	W
p	Druck	bar
P/V	Spezifischer Leistungseintrag	W/m^3
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck	bar
q_{O_2}	Spezifische Sauerstoffübergangsrate	$\text{kg}_{\text{O}_2}/\text{s}/\text{Zellen}$
R_k	Impulskraft der Phasen	N
t	Zeit	s
t_d	Verdopplungszeit	h
u	Charakteristische Geschwindigkeit	m/s
\tilde{u}	Geschwindigkeit im lokalen Koordinatensystem	m/s
\bar{u}	Richtungsbezogene Geschwindigkeit im globalen Koordinatensystem	m/s
\vec{u}	Vektorielle Geschwindigkeit	m/s
u_G	Gasleerrohrgeschwindigkeit	m/s
u_k	Geschwindigkeit einer Phase	m/s
u_{max}	Maximale Geschwindigkeit	m/s
$u_{\text{max, mod}}$	Modifizierte, maximale Geschwindigkeit	m/s
u_{Tip}	Rührerumfangsgeschwindigkeit (Tip speed)	m/s
V	Arbeitsvolumen	m^3
\dot{V}_G	Gasvolumenstrom	m^3/s
w_1	Höhe des ersten Rührers	m
w_2	Höhe des zweiten Rührers	m
w/d	Verhältnis von Rührerhöhe zu Rührerdurchmesser	-
w/H	Verhältnis von Rührerhöhe zu Flüssigkeitshöhe	-
x	Koordinatenrichtung (auch als Indizes verwendet)	m
x_1 und x_2	Koeffizienten	-
y	Koordinatenrichtung (auch als Indizes verwendet)	m
z	Koordinatenrichtung (auch als Indizes verwendet)	m

Griechische Symbole

α_G	Anteil der Gasphase	-
α_k	Anteil einer Phase	-
β	Begasungsrate (Volumenstrom Luft pro Volumen Medium)	vvm
β_T	Massenanteil eines Tracers	-
γ_{NN}	Lokale Normalgradienten	1/s
γ_{NT}	Lokale Schergradienten	1/s
$\gamma_{NT,m}$	Mittlere, lokale Schergradienten	1/s
ε	Energiedissipation	m^2/s^3
ε_{Lok}	Lokale Energiedissipation	m^2/s^3
ε_{max}	Maximale Energiedissipation	m^2/s^3
ε_T	Turbulente Energiedissipation	m^2/s^3
η	Dynamische Viskosität	Pa s
η_L	Dynamische Viskosität der Flüssigkeit	Pa s
η_t	Turbulente, dynamische Viskosität der Flüssigkeit	Pa s
θ_m	Mischzeit	s
λ	Kolmogorov' scher Längenmaßstab	m
Λ	Makroturbulenz	m
μ	Wachstumsrate	1/h
ν	Kinematische Viskosität	m^2/s
ρ_k	Dichte einer Phase	kg/m^3
ρ_L	Dichte der Flüssigkeit	kg/m^3
φ	Winkel	°
ϕ	Volumenanteil	-
∇	Nabla-Operator	-

Dimensionslose Kennzahlen

Bo	Bond Zahl
Ch	Dimensionslose Mischkennzahl
Fr	Froude Zahl
Ne	Newton Zahl
Re	Reynolds Zahl
Re_{krit}	Kritische Reynolds Zahl
Re_{mod}	Modifizierte Reynolds Zahl
Sc	Schmidt Zahl

Abkürzungen

1-D	Eindimensional
2-D	Zweidimensional
3-D	Dreidimensional
BEVS	Baculovirus-Expressionsvektor-System
BY-2	Bright Yellow-2
CCD	Charge-Coupled Device
CFD	Numerische Strömungsmechanik (Computational Fluid Dynamics)
CHO	Chinese hamster ovary
Co	Kobalt
Cu	Kupfer
DoE	Design of Experiments
EMA	European Medicines Agency
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Eisen
FVM	Finite-Volume-Methode
HCD	Hochzelldichte (High cell density)
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen (human mesenchymal stem cell)
HTS	Hochdurchsatz-Screening (High Throughput Screening)
HWA	Hitzedraht Anemometrie (Hot-wire anemometry)
LDA	Laser Doppler Anemometrie
LIF	Laser induzierte Fluoreszenz
Mn	Mangan
MRF	Multiple Reference Frame (Ansys, Inc.)
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
NT	<i>Nicotiana tabacum</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PIV	Particle Image Velocimetry
RANS	Reynolds gemittelte Navier-Stokes (Reynolds-average-Navier-Stokes)
RT	Rushton Turbine
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SBI	Segmentblatt Rührer (segment blade impeller)
SEAP	Sekretierte alkalische Phosphatase
S.U.B.	Single Use Bioreactor von Thermo Scientific
SIMPLE	Semi-implicit Method for Pressure Linked Equations (Ansys, Inc.)
SO ₄ ²⁻	Sulfation
SO ₃ ²⁻	Sulfition
WIM	Welleninduzierte Bewegung (wave-induced motion)
XD-Prozess	Extreme-Density Prozess

Kurzfassung

Single-use Bioreaktoren sind im biopharmazeutischen Umfeld etabliert und werden heute vor allem im F&E-Bereich sowie bei der klinischen Produktion von biopharmazeutischen Produkten eingesetzt. Für die Herstellung solcher Produkte werden vielfach die single-use Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech (UniVessel® SU und der BIOSTAT® STR) und Thermo Scientific (S.U.B.) genutzt, deren Eignung auf Basis ihrer Strömungseigenschaften in dieser Arbeit diskutiert wird. Hierfür wird sowohl eine grundlegende als auch eine erweiterte, örtlich und zeitlich betrachtende verfahrenstechnische Charakterisierung durchgeführt. Die für Zellkulturbioreaktoren verfahrenstechnisch relevanten Parameter, wie der spezifische Leistungseintrag, die Mischzeit, der Sauerstoffübergang werden durch etablierte, experimentelle Methoden bis zu einem Maßstab von 50 L bestimmt. Mittels der örtlichen und zeitlich auflösenden numerischen Strömungsmechanik (engl.: *Computational Fluid Dynamics*, CFD) werden Prozessgrößen verglichen und detaillierte Strömungsverläufe beschrieben. Die experimentelle Betrachtung des Strömungsverhaltens und der Fluidgeschwindigkeiten sowie der Vergleich der experimentell und numerisch erhaltenen verfahrenstechnischen Parameter dienen der Validierung der CFD-Modelle bis zum 50 L Maßstab. Auf Basis der validierten CFD-Modelle erfolgt die numerische Bestimmung der verfahrenstechnischen Parameter für die unterschiedlichen single-use Bioreaktoren bis zu den jeweiligen maximalen Arbeitsvolumen von 1000 L (BIOSTAT® STR) bzw. 2000 L (S.U.B.). Aufgrund der verfahrenstechnischen Parameter sind die betrachteten single-use Kultivierungssysteme vergleichbar mit konventionellen Zellkulturbioreaktoren (aus Glas oder Edelstahl) und zeigen eine Skalierbarkeit auf.

Eine detailliertere Betrachtung zur Maßstabsübertragung basiert auf den Mischzeit und den mittleren, lokalen Schergradienten. Beide Parameter zeigen eine Abhängigkeit zur Reaktor- und Rührergeometrie, zum spezifischen Leistungseintrag und zum Volumen, wodurch sich deren Bestimmung durch die Etablierung zweier Gleichungen für die aufgeführten single-use Bioreaktoren realisieren lässt. Die numerisch erhaltenen verfahrenstechnischen Parameter werden schließlich für die Prozessauslegung und -entwicklung eines Modellprotein-Produktionsprozesses mit CHO-Zellen herangezogen.

Das üblicherweise eingesetzte Kriterium einer Maßstabsübertragung - der spezifische Leistungseintrag - zeigt dabei nur bedingt erfolversprechende Ergebnisse für die Prozessauslegung auf. Hingegen werden mit den numerischen Mischzeiten und den mittleren, lokalen Schergradienten als Kriterien zur Maßstabsübertragung wesentlich höhere maximale Lebendzellichten erhalten. Zusätzlich sind die gemessenen maximalen Lebendzellzahlen für die Labor- und Pilotmaßstäbe reproduzierbar. Des Weiteren wird für die Prozessentwicklung die Quantität der Proteinexpression des biphasischen Produktionsprozesses (mit CHO XM 111-10 Zellen) herangezogen. Nach der Proteininduktion mittels eines etablierten single-use *Crossflow*-Verfahrens werden Proteinkonzentrationen bis 60 U/mL gemessen. Die aus den Produktionsprozessen gewonnenen Resultate lassen dabei auf die vorteilhafte Nutzung der single-use Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech schließen und zeigen die Möglichkeit einer CFD-basierten Prozessauslegung auf. Die numerische Herangehensweise kann resultierend auch als Grundlage für weitere moderne Produktionsprozesse, wie beispielsweise für die Stammzellexpansionen, dienen.

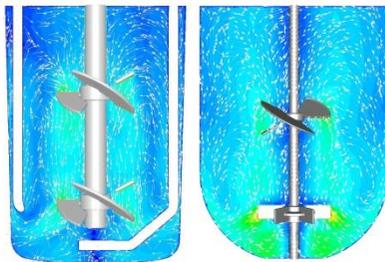
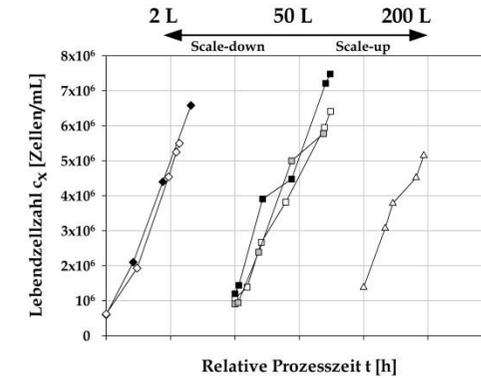
Graphische Kurzfassung

Sartorius Stedim's single-use Bioreaktoren UniVessel® SU und BIOSTAT® STR sowie Thermo Scientific's S.U.B.



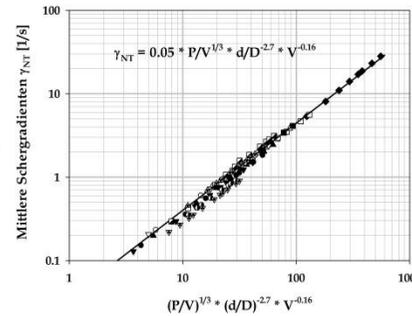
Grundlegende und erweiterte verfahrenstechnische Charakterisierung

Skalierbarkeit und Vergleichbarkeit zu konventionellen Bioreaktoren



Experimentelle und numerische Untersuchungen bis 50 L

Validierung der numerischen Ergebnisse



Numerischer Scale-up bis 2000 L

Definition von scale-up Kriterien

Prozessauslegung und-entwicklung

- Erhöhung der maximale Lebendzellichten um minimal 50 %
- Reproduzierbare Zellzahlen im Labor- und Pilotmaßstab
- Zunahme der Proteinkonzentrationen um minimal 60 %

Abstract

Single-use bioreactors are well established in biopharmaceutical industry and are currently used in the field of R&D as well as for clinical production trials of biopharmaceutical products. In many cases, the manufacturing of such products is realized in single-use bioreactors from Sartorius Stedim Biotech (UniVessel® SU and BIOSTAT® STR) and Thermo Scientific (S.U.B.). Based on their fluid characteristics, the suitability of these single-use bioreactors is discussed. For this reason, a fundamental as well as an advanced engineering characterisation of the investigated single-use bioreactors is carried out. Engineering parameters are important for cell cultivation, such as specific power input, mixing time, and the mass transfer will be determined by well-established methods up to a scale of 50 L. Based on the spatial and temporal solution of the Computational Fluid Dynamics (CFD), a comparison of process parameters and a detailed fluid flow pattern is described. The experimental predicted fluid flow pattern and the velocity distribution as well as the comparison of (experimental and numerical) engineering parameters are used for the validation of the CFD models up to 50 L scale. Based on the validated CFD models, the numerical prediction of engineering parameters is carried out up to the production scale of 1000 L (BIOSTAT® STR) and 2000 L (S.U.B.). The predicted engineering parameters of the single-use systems are comparable to these conventional cell cultivation bioreactors made from stainless steel or glass and reveal full scalability from bench-top to production scale.

Detailed information of scale-up / scale-down is provided by the numerically predicted mixing time and mean, local shear gradients. These two parameters depend on the geometry of the reactor and stirrer, the specific power input, and the working volume. They can be determined by using two equations for the investigated single-use bioreactors. Finally, the numerically predicted engineering parameters are used for the establishment of a CHO cell-based protein production process.

Typically, the specific power input represents the criterion for scale-up / scale-down procedures, but no promising results are obtained for the investigated bioreactors. However, if the numerical mixing time and mean, local shear gradients are used as scale-up / scale-down criteria significantly higher cell densities are obtained and is confirmed in lab and pilot scale. In addition, the protein expression during a biphasic production process (CHO XM 111-10 cell line) is considered for process development. Here, the induction of the protein expression is followed by an established single-use cross-flow filtration procedure delivering up to 60 U/mL. The obtained results indicate advantageous performance of the single-use bioreactors of Sartorius Stedim Biotech and point out the potential of CFD-based process development. Concluding, the numerical approach may be used as the basis for further modern production processes, such as the expansion of stem cells.

1 Einleitung

Die großtechnische Produktion von Biopharmazeutika erfolgt heute mehrheitlich in gerührten Bioreaktoren aus Edelstahl, die hinsichtlich ihrer verfahrenstechnischen Charakterisierung zum Leistungseintrag, zur Geschwindigkeits- und Turbulenzverteilung, den Mischcharakteristika sowie des Stoff- und Wärmeaustauschs detailliert beschrieben sind. Diesen verfahrenstechnischen Parametern kommt in der biopharmazeutischen Industrie ein besonders hoher Stellenwert zu, da sie für die jeweiligen Herstellungsprozesse charakteristisch sind und die Produktqualität und -titer maßgeblich beeinflussen können. Allen voran Proteine (wie Antikörper oder Vakzine) zur Therapie, Diagnose und Prophylaxe von Krankheiten oder auch Stammzellen zur Regenerierung von zerstörten Geweben zählen zu den wichtigsten und umsatzstärksten Biopharmazeutika. Die Produktion von Biopharmazeutika erfolgt durch den Einsatz von Biokatalysatoren, wie tierischen, pflanzlichen oder humanen Zelllinien sowie Mikroorganismen. Aufgrund der Qualität und Quantität sowie der oftmals notwendigen posttranslationalen Modifikationen werden vorwiegend tierische Zellkulturen und allen voran CHO Zellen eingesetzt [1]. Der Umsatz von Proteinen, die mittels CHO-Zellen produziert wurden, belief sich 2011 auf mehrere zehn Milliarden US-Dollar [1, 2]. Unabhängig von der eingesetzten Zelllinie und deren Anforderungen an die Umgebung für die Produktion (Temperatur, Leistungseintrag, Massen- und Stofftransfer, etc.) sind umfangreiche Kenntnisse über die verwendeten Bioreaktoren, welche die unmittelbare Umgebung der Zellen repräsentieren, mit ihren verfahrenstechnischen Kenngrößen essentiell.

Angetrieben durch den internationalen Wettbewerb im Pharmasektor drängen zunehmend single-use Bioreaktoren (auch als Einweg- oder *disposable* Bioreaktoren bezeichnet) auf den Markt [3], die in direkter Konkurrenz zu den dominierenden, wiederverwendbaren, gerührten Reaktorsystemen stehen. Bei single-use Bioreaktoren besteht der Kultivierungsgefäß, im Gegensatz zu standardmäßigen Bioreaktoren aus Glas oder Edelstahl, aus Kunststoffen, welche von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen sind [4, 5]. Für die Fertigung des Kultivierungsgefäßes werden beispielsweise Polyethylen, Ethylen-Vinylacetate, Polycarbonate oder Polystyrol verwendet [6]. Ein single-use Kultivierungsgefäß ist Gamma- oder Beta-sterilisiert und vorkonfektioniert, weshalb dieser mehrheitlich ohne aufwendige Vorbereitung in den (bereits bestehenden) Kultivierungsprozess eingebunden werden können. Nach erfolgter Durchführung des Bioprozesses wird das single-use Kultivierungsgefäß entsorgt und aufwendige Reinigungs- und Sterilisationsprozeduren entfallen [7], wodurch sich höhere Produkt- und/oder Prozesswechsel ergeben [4]. Die daraus resultierende Kosten- und Zeiteinsparung führt zusätzlich zu einer größeren Prozessflexibilität, Verbesserung der Biosicherheit sowie Verringerung von Umwelteinflüssen durch Reinigungsagenzien [8-10]. Daher verwundert es nicht, dass im Bereich der single-use Bioreaktoren während der letzten Dekade mit einer jährliche Wachstumsrate von 30 % gerechnet werden konnte [1]. Grund hierfür sind auch die zunehmende Entwicklung unterschiedlichster single-use Technologien (auch peripherer Elemente) sowie eine grössere Nachfrage von Herstellern biopharmazeutischer Produkte [11]. Zusätzlich führt eine durchschnittlich um das Zehnfache gestiegene Quantität der erreichbaren Produkttiter bei Zellkulturprozessen zur Reduktion großvolumiger Bioreaktoren (10 oder 20 m³) und dem vermehrten Einsatz von Arbeitsvolumina im Bereich von 1 bis 2 m³, für welche single-use Bioreaktoren zur Verfügung stehen [12, 13].

Nichtsdestotrotz sind diverse Nachteile von single-use Bioreaktoren bekannt. So sind neben der Lieferantenabhängigkeit [1] vor allem die Stabilität des Plastikmaterials und dessen Validierung hinsichtlich *leachables/extractables* mit ihren Auswirkungen auf die Produktqualität und -ausbeute zu nennen [14]. Die eingeschränkte Verfügbarkeit und der nicht-universelle Einsatz von single-use Sensortechniken sowie das Fehlen von Equipment zur Einbindung bestehender (single-use) Geräte oder Anlagen zeigen den Nachholbedarf der single-use Technologie auf. Ein wesentlicher Nachteil im Bereich der single-use Bioreaktoren ist deren Vergleich und die fehlende Übertragbarkeit untereinander und zu herkömmlichen, gerührten Bioreaktoren. Grund hierfür sind vor allem neuartige Antriebskonzepte für den Leistungseintrag, wie welleninduzierte Bewegung, orbitales Schütteln oder rotatorische Oszillation, die den notwendigen Massen- und Stofftransfer gewährleisten. Durch die Verwendung von Plastikmaterialien in Verbindung mit den neuartigen Antriebskonzepten ist jedoch eine Vielzahl von Bioreaktorkonstruktionen entstanden, die sich maßgeblich von konventionellen Bioreaktoren aus Glas oder Edelstahl unterscheiden. Zusammenfassend lassen sich folgende Fragestellungen in Verbindung mit single-use Bioreaktoren formulieren:

1. Wie können kommerziell erhältliche single-use Bioreaktoren kategorisiert werden? Bietet sich die Kategorisierung auf Basis der Art des Leistungseintrages an?
2. Ist diese Kategorisierung für eine einheitliche verfahrenstechnische Charakterisierung ausreichend oder ist eine detailliertere Einteilung notwendig?
3. Welche verfahrenstechnischen Kenngrößen sind für eine verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren für zellkulturtechnische Anwendungen relevant?
4. Welche verfahrenstechnischen Ansätze sind für die Charakterisierung von single-use Bioreaktoren geeignet? Ist ausschließlich die experimentelle Bestimmung der verfahrenstechnischen Kenngrößen zu wählen?
5. Ist ein Vergleich zum konventionellen, gerührten Bioreaktor bei allen single-use Systemen möglich?

Basierend auf den aufgeführten Fragestellungen werden kommerziell erhältliche single-use Bioreaktoren und etablierte Methoden zur verfahrenstechnischen Charakterisierung im Hinblick auf deren Einsatz für single-use Systeme betrachtet. Hierbei stehen die für einen Zellkulturprozess essentiellen Parameter zur Beschreibung des Strömungsverhaltens und -regimes, des Leistungseintrages, der Mischeigenschaften und des Sauerstofftransfers im Fokus. Durch die Nutzung von etablierten verfahrenstechnischen, experimentellen Ansätzen, einschließlich deren Modifikationen und einfachster sowie kostengünstigster Methoden sind die single-use Bioreaktoren unter Berücksichtigung des Antriebs- und Designkonzeptes zueinander und zu konventionellen Bioreaktoren vergleichbar. Da gerührte single-use Systeme die dominierende Gruppe der single-use Bioreaktoren darstellen [11, 15], werden die Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech, der UniVessel® SU und der BIOSTAT® STR genutzt. Die an konventionelle Systeme angelehnten Bioreaktorgestalten sind seit der Markteinführung ab dem Jahr 2009 verfügbar. Zusätzlich wird der Single-Use Bioreactor (S.U.B.) 50 L von Thermo Scientific beschrieben, welcher der erste kommerziell erhältliche gerührte, single-use Bioreaktor war (Markteinführung 2006) und daher mit 75 % Marktanteil (Stand: 2011) am weitesten verbreitet ist [16].

Der UniVessel® SU ist ein single-use Bioreaktor im Labormaßstab. Hingegen sind der BIOSTAT® STR und der S.U.B. vom Pilot- bis zum Produktionsmaßstab erhältlich, wodurch Anwender einheitliche Bioreaktortypen während einer Maßstabsübertragung nutzen können. Um ein adäquates Scale-up/Scale-down eines Kultivierungsprozesses zu realisieren, sind die Kenntnisse der verfahrenstechnischen Parameter aller Bioreaktorgrößen unerlässlich. Die numerische Strömungsmechanik (*Computational Fluid Dynamics*; CFD) wird im Rahmen dieser Arbeit als Instrument für die verfahrenstechnische Charakterisierung der single-use Zellkulturbioreaktoren bis zum Produktionsmaßstab herangezogen, wodurch sich die folgenden Fragestellungen ergeben.

6. Ist durch die Nutzung der CFD eine verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren möglich?
7. Liefert die CFD relevante Informationen, die für einen Zellkulturprozess herangezogen werden können? Kann die CFD bei einem Scale-up/Scale-down einbezogen werden?
8. Können diese CFD-Informationen bei einem Zellkulturprozess angewendet werden? Ist die CFD für eine Prozessauslegung im Allgemeinen sinnvoll?
9. Sind mittels der CFD Kriterien für eine Maßstabsübertragung definierbar und ist mit der CFD eine Prozessauslegung für Zellkulturen möglich?

Auf Basis der numerisch erhaltenen, verfahrenstechnischen Kenngrößen erfolgt eine Evaluierung und Validierung durch etablierte, experimentelle Methoden. Darauf aufbauend werden die Maßstabsübertragung und die Etablierung von Parametern für einen Zellkulturprozess zur biopharmazeutischen Proteinproduktion vorgestellt. Ausgehend von der stabil transformierten Zelllinie CHO XM 111-10 wird ein biphasischer Prozess zur Produktion eines rekombinanten Modellproteins in den single-use Bioreaktoren entwickelt. Dabei wird nicht, wie in der Literatur oftmals beschrieben, ein einzelnes Kriterium für die Maßstabsübertragung definiert [17, 18], sondern Bereiche der Mischzeit und der auftretenden Schergradienten für die CHO-Zellkultivierung festgelegt. Diese Prozessauslegung erfolgt für einen Scale-up/Scale-down-Prozess im Maßstab von 2 bis 200 L, wobei sowohl die Wachstumsphase der CHO XM 111-10 Zelllinie als auch deren Produktionsphase auf Basis numerischer ermittelter Parameter realisiert wird. Die erhaltenen Wachstumsraten und Produktkonzentrationen des Modellproteins SEAP (sekretierte, alkalische Phosphatase) zeigen sehr gute Ergebnisse, was den Nutzen der CFD für die Auslegung zellkulturbasierender Prozesse unterstreicht.

2 Stand des Wissens

Im folgenden Kapitel wird der Stand des Wissens im Bereich der Biopharmazeutika, den angewendeten Produktionsorganismen sowie spezielle Anforderungen, die in Abhängigkeit der Produktionsorganismen an die Kultivierung gestellt werden, aufgezeigt. Zusätzlich werden single-use Systeme betrachtet, wozu auch moderne Bioreaktoren wie die single-use Bioreaktoren zählen. Die vorwiegend in der biopharmazeutischen Industrie eingesetzten single-use Systeme sind aufgrund ihrer variierenden Arten des Leistungseintrages nur ansatzweise mit konventionellen Bioreaktoren aus Glas oder Edelstahl zu vergleichen. Somit werden nachfolgend verfahrenstechnisch relevante Kenngrößen für eine Charakterisierung von single-use Bioreaktoren eingeführt, kategorisiert und deren methodische Umsetzung für zellkulturbasierte Prozesse diskutiert. Dabei lehnt sich die Charakterisierung an die Kenntnisse sowie das Vorgehen bei konventionellen Bioreaktoren an, um eine Vergleichbarkeit mit diesen Reaktoren zu gewährleisten. Auf dieser Basis wird abschließend die Maßstabsübertragung der neuartigen Bioreaktorsysteme aufgezeigt.

2.1 Biopharmazeutika und Produktionsorganismen

Der Begriff Biopharmazeutika beschreibt in Europa und den Vereinigten Staaten jene Produkte, die mittels biotechnologischen Methoden aus Organismen oder deren funktionellen Komponenten (auch biologischen Ursprungs) hergestellt werden. In den frühen 1980er Jahren wurde dieser Begriff bei der Einführung des rekombinanten, kommerziell hergestellten Insulins genutzt. Heutzutage umfassen Biopharmazeutika alle rekombinanten Proteine, monoklonale Antikörper, Vakzine, Blut/Plasma-basierte Produkte, nicht-rekombinante kulturbasierte Proteine, Nucleinsäuren und kultivierte Zellen, zu denen auch die Gewebekulturen menschlichen oder tierischen Ursprungs zählen [19, 20]. Diese Biopharmazeutika werden von regulatorischen Organisationen, wie der *Food and Drug Administration* (FDA) oder der *European Medicines Agency* (EMA), eingestuft und freigegeben [21]. Zu den bedeutendsten pharmazeutischen Proteinen gehören Hormone (Insulin, Erythropoetin), Enzyme (bspw. humane Plasminogenaktivatoren, Asparaginase), Impfstoffe (bspw. gegen Grippe, humaner Papillomavirus, diverse Krebsarten) und Antikörper (Bevacizumab, Trastuzumab). Biopharmazeutisch hergestellte Antikörper repräsentieren aufgrund der höchsten wirtschaftlichen Wachstumsraten die wichtigste Gruppe, was zusätzlich durch die hochpreisigen Produkte, die zu Preisen zwischen hunderten und tausenden US-Dollar pro Gramm erhältlich sind, begünstigt wird [21-23].

Pharmazeutische Proteine werden heutzutage überwiegend in rekombinanten Säugerzelllinien produziert. In den letzten 10 Jahren wurden die bis anhin dominierenden Zelllinien wie Hybridoma-Zellen, embryonale Fibroblasten (Katzenlungen), *baby hamster kidney* (BHK) oder *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zelllinien durch die Zelllinien des *Chinese hamster ovary* (CHO) verdrängt [23, 24]. Im Jahre 2006 wurde ca. 70 % aller rekombinanten Proteine in CHO-Zelllinien produziert, weshalb sich der jährliche, weltweite Verkauf von Produkten, die mittels CHO-Zellen hergestellt wurden, auf über 30 Milliarden US-Dollar beläuft [2] und bis ins Jahr 2011 auf 50 Milliarden US-Dollar gesteigert werden konnte [1]. Diese Prävalenz gründet sich auf

einer relativ kurzen Verdopplungszeit der Zelllinien (ca. 24 h), der hohen Produkttiter (mehrere g/L [1]) und der Möglichkeit von posttranslationalen Modifikationen für die Proteinproduktion. Letztere ist entscheidend für die Funktionalität, Verträglichkeit und Wirkungsweise eines Biopharmazeutikums entscheidend. Die Anforderungen bei einer Kultivierung von CHO-Zelllinien sieht eine geringe und homogene Verteilung der eingetragenen Leistung vor, wobei die auftretende Scherbeanspruchung minimiert und ein ausreichender Massen- sowie Stofftransfer gewährleistet werden sollte.

Trotz der Dominanz von CHO-Zelllinien werden besonders für die Herstellung von Impfstoffen auch Insektenzellkulturen in Verbindung mit dem Baculovirus-Expressionsvektor-System (BEVS) eingesetzt [25]. Häufig eingesetzte Insektenzellen sind *Sf-21* (Zellen aus den Ovarien von *Spodoptera frugiperda*) und deren Subklon *Sf-9* sowie HighFive™-Zellen (aus den Eizellen der *Trichoplusia ni*). HighFive™-Zellen bieten für eine Vielzahl von Proteinen eine hohe Expressionsrate, wohingegen *Sf-9* Zelllinien vorzugsweise zur Expression von intrazellulären oder Membranproteinen und *Sf-21* zur Isolierung sowie Vermehrung des Virenbestandes genutzt werden [25]. In Anlehnung an die Kultivierung von CHO-Zellen wird neben einer geringen Scherbeanspruchung durch die homogene Verteilung des Leistungseintrages der Fokus auf eine ausreichende Bereitstellung des gelösten Sauerstoffs gelegt [25], weshalb der Sauerstofftransfer als Scale-up Kriterium für Insektenzellkultivierungen definiert wird [26].

Eine Alternative zur Antikörperherstellung in CHO-Zelllinien bieten pflanzliche Zellkulturen, die zusätzlich auch zur Produktion von Sekundärmetaboliten für den Pharma- und Kosmetiksektor verwendet werden. Hier steht vor allem die Sicherheits- und Kosteneffizienz im Vordergrund, da pflanzliche Zellkulturen frei von humanen Pathogenen sind und kostengünstige Medien zum Einsatz kommen. Die vereinfachte Aufreinigung der Produkte ist ein weiterer Vorteil bei der Nutzung von pflanzlichen Zellkulturen [27]. Eine Vielzahl von Publikationen basiert auf aus Tabak generierte Zellsuspensionen, wie die *Nicotiana tabacum* 1 (NT-1) oder der *Bright Yellow-2* (BY-2) Zelllinie. Im Gegensatz zu tierischen Zelllinien ist jedoch mit einem geringeren Produkttiter, vor allem bei der Produktion von Antikörpern, ausgegangen werden [28]. Hinsichtlich der Kultivierungsanforderung bei NT-1 und BY-2 Zellen muss im Verlauf der Kultivierung mit einem erhöhten Leistungseintrag infolge der Viskositätszunahme der Suspension (nicht Newton'sche Kulturen) gearbeitet werden, um den Massen- und Stofftransfer zu gewährleisten [27].

Im Vergleich zu CHO-Zellen zeigen Mikroorganismen, wie Hefen oder Bakterien, veränderte post-translationale Modifikationen von Proteinen auf, weshalb deren Einsatz zur Produktion von komplexen Biopharmazeutika eingeschränkt ist. Trotz dessen werden vor allem *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* sowie *Escherichia coli* zur Herstellung von einfachen Antigenen genutzt [29]. Im Gegensatz zu tierischen Zellkulturen spielen bei der Fermentation von Mikroorganismen eine geringe und homogene Leistungsverteilung sowie die Zusammensetzung des Mediums lediglich eine untergeordnete Rolle [30]. Aufgrund der Morphologie von Mikroorganismen sind hohe Leistungseinträge und Begasungsraten möglich und gewährleisten einen hohen Stoff- sowie Massentransfer, weshalb ein Scale-up relativ einfach durchgeführt werden kann.

Humane Stammzellen werden zum einen als Produktionsorganismus (z.B. Exosomen) und zum anderen als Zelltherapeutikum genutzt. Die dafür eingesetzten Stammzellen liegen in einer nicht-ausdifferenzierten, adhären wachsenden Form vor. Hinsichtlich der Expansion von Stammzellen werden höchste Anforderungen an den Prozess gestellt, weshalb beispielsweise

die Massenvermehrung von humanen, mesenchymalen Stammzellen (hMSC) noch am Anfang der Entwicklung steht [31]. Beispielsweise beeinflusst unter anderem das Auftreten von Scherstress die Eigenschaften und das Verhalten von hMSCs [32]. Nichtsdestotrotz sind Kultivierungen unter Berücksichtigung minimaler Leistungseinträge, Turbulenzphänomen und Suspendierung der Suspension (wodurch ein hoher Massen- und Stofftransfer resultiert) möglich.

2.2 Single-use Systeme

Single-use Systeme (oftmals auch als „disposable Systeme“ bezeichnet) sind bei einer Vielzahl von biopharmazeutischen Entwicklungs- und Produktionsprozessen vertreten [7]. Ihre Kategorisierung erfolgt auf Basis der Komplexität des Systems sowie des Anwendungsbereiches innerhalb eines Prozesses: Arbeits- und Gebrauchsgegenstände (1), einfache, periphere Elemente (2) sowie Geräte und Anlagen der Plattformtechnologien (3) [4, 7].

- Arbeits- und Gebrauchsgegenstände werden im alltäglichen Laborbedarf genutzt. Hierzu zählen einmalig verwendbare Schutzkleidung, Spritzen, Probenahme-, Test- und Zentrifugenröhrchen sowie Belüftungs- und Flüssigkeitsfilter eingesetzt. Hierdurch resultiert bei den extrem hohen Hygieneanforderungen in biotechnologischen Arbeitsbereichen eine deutliche Zeit- und Kosteneinsparung. Zusätzlich wird ein Teil der Hygieneverantwortung auf den Hersteller verlagert [8].
- Die einfachen, peripheren Elemente umfassen neben Schläuchen, Anschlussteilen, Kupplungen, Stopfen, Verschlüssen, Ventilen oder (aseptischen) Transfersystemen auch Equipment für das sogenannte Fluid-Management. Hierunter fallen einfache Bags (2-D und 3-D) für Flüssigkeiten oder Pulver, Mehrfach-Bag-Systeme (*Manifold-Systeme*) zur Probenahme und Aufbewahrung sowie *Tank liner*.
- Den Geräten und Anlagen der Plattformtechnologien werden neben Sensoren, Pumpen, Zentrifugen, Bioreaktoren und Misch-, Lager- sowie Abfüllsystemen auch Filtrationssysteme für die Tiefen-, Mikro-, Ultra- und Diafiltration zugeordnet. Zusätzlich werden auch Chromatographie-, Einfrier- & Auftau-Systeme, Membranadsorber oder Isolatoren dazugezählt. Die aufgeführten single-use Systeme decken nunmehr alle wichtigen Grundoperationen im Upstream- und Downstream-Prozess ab.

Etablierte single-use Bioreaktoren (Kapitel 2.2.1) und Mischsysteme erlauben bei richtigem Einsatz und korrekter Handhabung eine billigere, grünere, sichere und schnellere Entwicklung und Produktion [33]. Im Downstream-Processing hingegen weist die single-use Technologie eine geringere Entwicklungsrate auf, da beispielsweise für die Filtration im Tangentialfluss oder die Säulenchromatographie noch keine umfassenden Maßstäbe vorhanden sind [22, 34, 35].

Limitationen von single-use Systemen im Allgemeinen umfassen aber auch die Begrenzung durch physikalische Größen, wie beispielsweise Druck, Durchflussraten, Zentrifugalkräfte, Temperatur und die Größenverhältnisse [7] infolge der Materialeigenschaften des Plastiks. Hinzu kommen die erhöhten Kosten für das Verbrauchsmaterial, die fehlende Standardisierung bzw. Kategorisierung, die Liefersicherheit und die noch mangelnde Sensortechnik in Verbindung mit der Automatisierung [7]. Die Anforderung der Materialqualität des Plastiks wird zusätzlich vielfach diskutiert. Die mögliche Sekretion von *leachables and extractables* aus der inneren Schicht der Bags oder Kultivierungsgefäße und dem direkten Kontakt mit dem

(biopharmazeutischen) Produkt setzen analytische Methoden, Methoden zur Extraktion der Zielsubstanz sowie reproduzierbare Ergebnisse voraus [36]. Evaluierete, analytische Methoden mit Akzeptanzkriterien für *leachables and extractables* sowie regulatorische Anforderungen für den Gesamtprozess stehen jedoch noch aus [7].

Viele etablierte Produktionsanlagen (hybride Produktionsanlagen) kombinieren sowohl single-use Bioreaktoren als auch konventionelle Reaktorsystem. Jedoch sind erste Anlagen realisiert, die durchgängig auf die zur Verfügung stehende single-use Technologie zurückgreifen [37, 38]. Hierbei werden Anlagen des geschlossenen Typs und Produktionsanlagen mit Stationsbetrieb unterschieden [7], die am Beispiel der Herstellung von monoklonalen Antikörpern bis zum mittelgroßen, kommerziellen Maßstab beschrieben worden sind [38].

2.2.1 Single-use Bioreaktoren: Kategorisierung und Charakterisierung

Heutzutage können Anwender aus einer Vielzahl an verschiedenen single-use Bioreaktoren wählen, deren Arbeitsvolumen vom Screening- (mL) bis zum Produktionsmaßstab (m^3) erreichen. Wie auch bei konventionellen Bioreaktoren kann eine Kategorisierung der single-use Systeme anhand der Art des Leistungseintrages erfolgen [7], welche in Abbildung 1 aufgeführt ist. Statische Systeme, wie beispielsweise einfache T-Flaschen oder die CellFactory, werden bis zu einem Oberflächengröße von bis zu 6320 m^2 für Routinearbeiten (Erhaltung) eingesetzt und verfügen in der Regel über keine Instrumentierung. Dynamische Systeme werden zusätzlich in mechanisch und pneumatisch angetriebene single-use Bioreaktoren sowie deren Kombination (Hybridsysteme) unterteilt. Gerührte, wellendurchmischte und orbital geschüttelte Systeme repräsentieren die größte Gruppe der single-use Bioreaktoren [39], wohingegen Reaktoren mit taumelndem Rührer, vibrierender Scheibe, rotatorisch oszillierendem und pneumatischen Antrieb seltener eingesetzt werden. Einen Überblick über die beschriebenen und kommerziell erhältlichen single-use Bioreaktoren zeigt Tabelle 1. Dynamische single-use Bioreaktoren stehen sowohl in Form von zylindrischen, rigiden Kultivierungsgefäßen mit maximalen Arbeitsvolumen bis 50 L, als auch als flexible Bags in 2-D oder 3-D Form (Kissen-, zylindrische oder kubische Form; [8]) bis zu einem Arbeitsvolumen von 2 m^3 zur Verfügung. Diese müssen in einem formgebenden Container oder auf einem Tablar fixiert werden. Die Instrumentierung der dynamisch angetriebenen Systeme ist entweder durch klassische Sensoren für pH, DO etc. oder durch deren optische (single-use) Variante realisierbar.

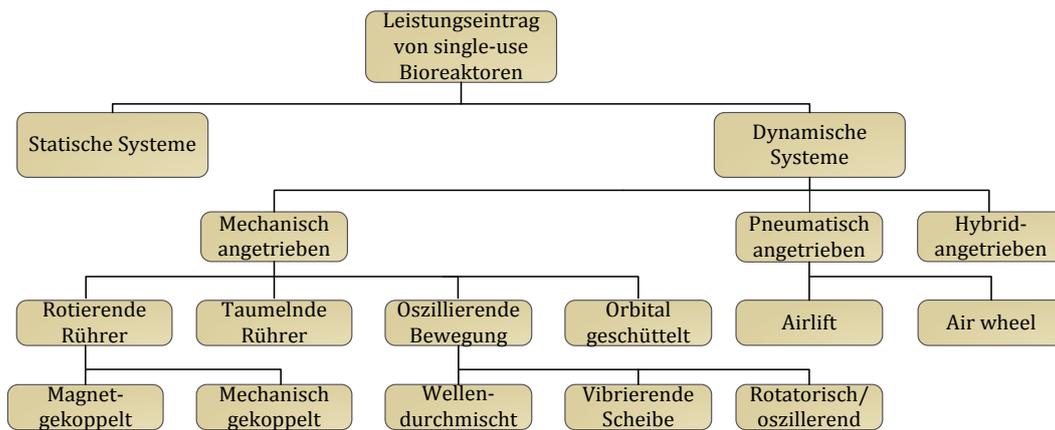


Abbildung 1: Einteilung der kommerziell erhältlichen single-use Bioreaktoren nach der Art des Leistungseintrages [40].

Die aufgeführten mechanisch betriebenen single-use Bioreaktoren mit wellendurchmischem und gerührtem Mischprinzip gehören zu den dominierenden single-use Systemen. Grund hierfür ist zum einen, dass eine welleninduzierte Bewegung (*wave-induced motion; WIM*) im ersten single-use Bioreaktor genutzt wurde. Zum anderen kann in gerührten single-use Systemen auf die Kenntnisse und Erfahrungen von konventionellen Rührreaktoren zurückgegriffen werden.

Die WIM wird durch eine sich bewegende Plattform erzeugt, deren Form und Intensität abhängig von Bioreaktortyp, Füllgrad und Maßstab ist und eine Maßstabsübertragung der geometrisch ungleichen Systeme erschwert. Der Leistungseintrag und Massentransfer wird hier durch den Kippwinkel und die ω -rate, das Arbeitsvolumen, die Begasungsrate und die Eigenschaften des Kulturmediums definiert [41]. Im Gegensatz zu gerührten Bioreaktoren sind in WIM-Systemen zusätzliche Begasungselemente nicht notwendig. Aufgrund der (1-D) Wellenbewegung wird ein Massentransfer gewährleistet. Der permanente Austausch der Fluidoberfläche in Verbindung mit einer blasenfreien Oberflächenbegasung unterbindet zudem weitestgehend eine Schaumbildung. Eine Steigerung des Massentransfers ist durch 2-D oder 3-D Bewegungen möglich, die bei Anwendungen mit nicht-Newton'schen Kulturbrühen vorteilhaft ist.

In gerührten single-use Bioreaktoren, für welche sowohl tierische als auch mikrobielle Versionen vorhanden sind (Kapitel 2.2.2), wird der Leistungseintrag über rotierende Rührer (z.B. Segmentblatt-, Schrägblattrührer) und die Begasung über statische Ring-, L- oder Mikrosparger bzw. DipTubes realisiert. Der Rührer, inklusive der Gleitringdichtung (mechanisch gekoppelt; UniVessel® SU, Mobius CellReady 3 L oder S.U.B.) oder Magnetkupplung (magnetisch gekoppelt; BIOSTAT® STR, XDR Single-use Bioreactor oder Mobius CellReady 50 L), und das Begasungsorgan sind aseptisch im Bioreaktor integriert. Eine Maßstabsübertragung ist relativ einfach durchzuführen, da eine geometrische Ähnlichkeit innerhalb der Bioreaktorbaureihen vorliegt und somit die Scale-up Regeln von konventionellen Zellkulturbioreaktoren Anwendung finden können (Kapitel 2.4).

Rotatorisch oszillierende (BayShake Bioreactor; [42, 43]) und orbital geschüttelte single-use Bioreaktoren (Current Bioreactor, OrbShake Bioreactor) besitzen wie die Wave-Versionen keine beweglichen Einbauten, werden über die Fluidoberflächen begast und weisen eine homogene

Energieverteilung auf. Aus diesem Grund können Tromben- und Schaumbildung in diesen Systemen vernachlässigt werden. Aufgrund der neuartigen Antriebe wurden verfahrenstechnische Parameter erstmalig bestimmt und Kriterien für eine Maßstabsübertragung definiert [8, 44-47]. Im Saltus Bioreactor (alte Bezeichnung: Vibromix) erfolgt der Leistungseintrag über eine vibrierende (perforierte) Scheibe und ist abhängig von deren Frequenz und Amplitude [48]. Der Gaseintrag wird über die hohle Welle realisiert. Aufgrund des hohen örtlichen Energieeintrages um die Scheibe(n) eignet sich dieser für mittlere bis hohe Mediumviskositäten.

Die pneumatisch angetriebenen single-use Bioreaktoren sind vergleichbar mit dem Prinzip der klassischen Blasensäulen und gewährleisten einen erhöhten Massentransfer, weshalb sie auch für die Kultivierungen von tierischen Zellen [49] und Mikroorganismen verwendet werden können [50-52]. Einzig beim PBS Bioreactor werden die Gasblasen genutzt, um ein Rad anzutreiben, welches für eine homogene Durchmischung im Bioreaktor sorgt [53]. Diese Art des Leistungseintrages wird auch als *air-wheel*-Prinzip bezeichnet. Nachteilig hierbei ist allerdings eine starke Schaumbildung und Flotation [11].

2.2.2 Haupteinsatzgebiete von single-use Bioreaktoren

Die potentiellen Einsatzgebiete von single-use Bioreaktoren sind in Abhängigkeit des Maßstabes in Abbildung 2 dargestellt und umfassen sowohl Produkte für freie, in Suspension wachsende als auch adhärente, auf Carriern wachsende Zellen. Bei den meisten Applikationen handelt es sich um die Herstellung von Produkten der roten Biotechnologie für die Prophylaxe, Therapie und Diagnostik, die mit Zellkulturen bis zu einem mittleren Produktionsmaßstab produziert werden. Dabei zählen tierische und humane Zellen zu den am meisten genutzten Produktionsorganismen, die mittels Fed-batch oder Perfusionsverfahren kultiviert werden. Letztere werden in Prozessen mit Hochzellichten (HCD) und hohen Produktionstitern genutzt [54], wie z.B. der XD-Prozess [55], der mit Zelldichten von 1×10^8 Zellen/mL und maximalen Antikörpertiter von ca. 25 g/L liefert [56].

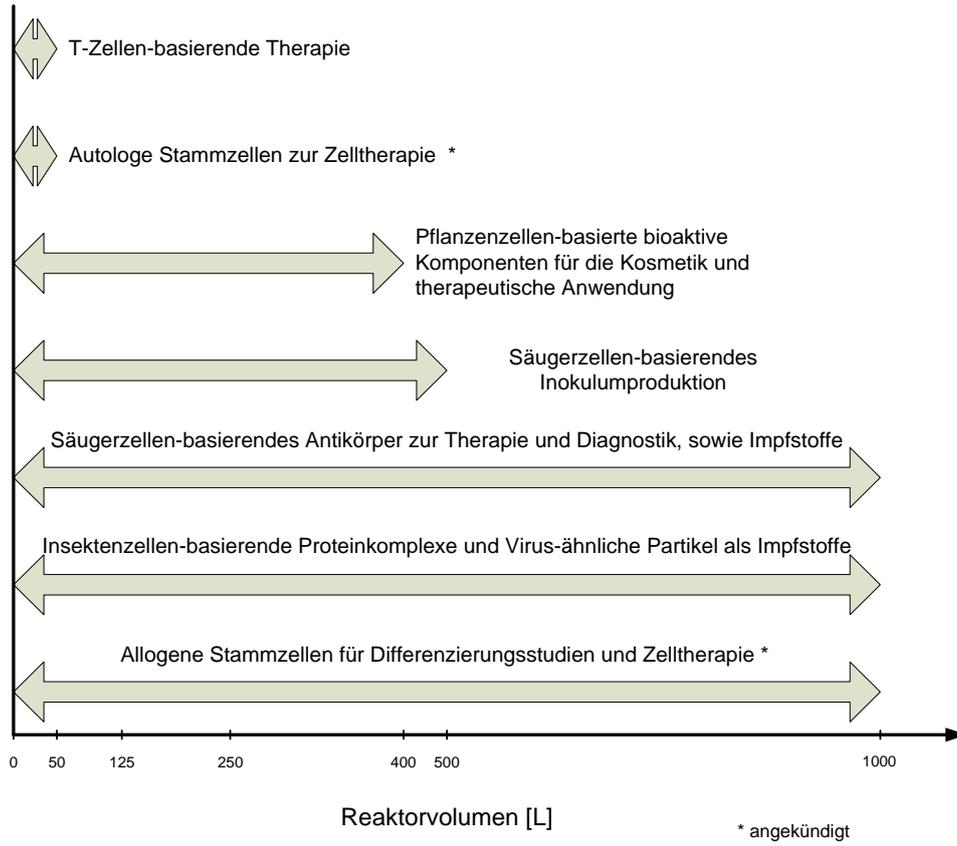


Abbildung 2. Potentielle Anwendungsgebiete von single-use Bioreaktoren in Abhängigkeit ihres Maßstabes [11].

Tabelle 1: Übersicht über kommerziell erhältliche single-use Bioreaktoren.

Anbieter	Bioreaktorbezeichnung	Maximales Arbeits-volumen	Arbeitsprinzip	Reaktorkonfiguration und Instrumentierung	Referenzen
Mechanisch angetrieben, rotierender Rührer					
Sartorius Stedim / Merk Millipore / New Brunswick (ein Eppendorf Unternehmen)	UniVessel® SU / Mobius CellReady / CelliGEN BLU Single-Use Bioreactor	2 L / 2.4 L / 50L	Mechanisch gekoppelt	<ul style="list-style-type: none"> • Rigider Behälter, zylindrische Form • statischer Sparger • Optische und konventionelle pH und DO Sensoren 	[15, 39, 44, 57-60]
DASGIP (ein Eppendorf Unternehmen)	DASbox single-use Bioreactor	250 mL	Magnetisch gekoppelt	<ul style="list-style-type: none"> • Rigider Behälter, zylindrische Form • statischer Sparger • Konventionelle pH und DO Sensoren 	[61]
Merck Millipore / Sartorius Stedim / Xcellerex (jetzt GE Healthcare)	Mobius CellReady / BIOSTAT® STR / XDR Single-Use Bioreactor	200 L / 2000 L** / 2000 L	Magnetisch gekoppelt	<ul style="list-style-type: none"> • Rigider Behälter, zylindrische Form • statischer Sparger • Optische und konventionelle pH und DO Sensoren 	[29, 55, 62-74]
ATMI	iCELLis / Xpansion Multiplate Bioreactor	70 L (500 m ²) /21.9 L (12 m ²)	Magnetisch gekoppelt	<ul style="list-style-type: none"> • Festbettbioreaktoren • Rigider Behälter • Optische und konventionelle pH und DO Sensoren 	[75, 76]
Thermo Scientific	Single Use Bioreactor, S.U.B.	2000 L	Magnetisch gekoppelt	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag, zylindrische Form • statischer Sparger • Optische und konventionelle pH und DO Sensoren 	[27, 53, 77-80]
ATMI Life Sciences	Nucleo Bioreactor	1000 L	Taumelnder Rührer	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag, zylindrische Form, • dynamischer Sparger • Konventionelle Sensoren für pH DO und optische Dichte 	[81-84]

Fortsetzung Tabelle 1

Anbieter	Bioreaktorbezeichnung	Maximales Arbeitsvolumen	Arbeitsprinzip	Reaktorkonfiguration und Instrumentierung	Referenzen
<i>Mechanisch angetrieben, oszillierende Bewegung</i>					
Finesse Solution / Sartorius Stedim / GE Healthcare	SmartBag / BIOSTAT® RM / WAVE Bioreactor	25 L / 300 L / 500 L	1-D wellendurch- mischt	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 2D-Bag • Oberflächenbegasung • Optische pH und DO Sensoren verfügbar 	[27, 41, 65, 85-101]
Applikon Biotechnology	AppliFlex	25 L	1-D wellendurch- mischt	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag • Oberflächenbegasung • Konventionelle und single-use Sensoren für pH und DO verfügbar 	[27, 102, 103]
CELLution Biotech und Lonza	CELL-tainer bag bioreactor	150 L	2-D wellendurch- mischt	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag • Oberflächenbegasung • Konventionelle Sensoren für pH und DO verfügbar 	[104-110]
PALL Life Sciences und New Brunswick (ein Eppendorf-Unternehmen)	XRS 20 Bioreactor system	20 L	3-D wellendurch- mischt	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag • Oberflächenbegasung 	[111]
Meissner Filtration Inc.	Saltus bioreactor (alte Bezeichnung: Vibromix)	2000 L**	Vibrierende Scheibe	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag, zylindrische Form • dynamischer Sparger • Optische Sensoren für pH und DO verfügbar 	[48, 112-115]
<i>Mechanisch angetrieben, rotatorisch oszillierende Bewegung</i>					
Bayer Technology Service	BayShake Bioreactor	1000 L		<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag, kubische Form • statischer Sparger oder Oberflächenbegasung • Optische Sensoren für pH und DO verfügbar 	[42, 43, 116]

Fortsetzung Tabelle 1

Anbieter	Bioreaktorbezeichnung	Maximales Arbeitsvolumen	Arbeitsprinzip	Reaktorkonfiguration und Instrumentierung	Referenzen
<i>Mechanisch angetrieben, oszillierende Bewegung</i>					
Sartorius Stedim	SENSOLUX Erlenmeyer Kolben	1 L*		<ul style="list-style-type: none"> • Rigider Schüttelkolben • Oberflächenbegasung • Optische Sensoren für pH und DO verfügbar 	[117]
TPP	TubeSpin Bioreactor	400 mL		<ul style="list-style-type: none"> • Rigide U-Form • Oberflächenbegasung • Keine Instrumentierung 	[118, 119]
m2pLabs / PALL Life Sciences	Biolector / Micro-24 MicroReactor	2 mL* / 7 mL		<ul style="list-style-type: none"> • Multiwellplatte • Oberflächenbegasung • Optische Sensoren für pH und DO verfügbar 	[64, 120]
Adolf Kühner AG und Sartorius Stedim / AmProtein	SB200-X OrbShake / CURRENT Bioreactor	200 L / 300 L		<ul style="list-style-type: none"> • Flexible 3D-bag • Oberflächenbegasung • Optische Sensoren für pH und DO verfügbar 	[121-128]
<i>Pneumatisch angetrieben</i>					
PBS Biotech	PBS Bioreactor	2000 L	<i>Air wheel</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag, kubische Form • statischer Sparger oder Oberflächenbegasung • Optische Sensoren für pH und DO verfügbar 	[49, 129]
Cellexus	CellMaker Regular	50 L	Blasensäule	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag, asymmetrische Form • statischer Sparger • Optische Sensoren für pH und DO verfügbar 	[50-52]
<i>Mechanisch und pneumatisch angetrieben (Hybrid)</i>					
Cellexus	CellMaker Plus	50 L	Pneumatisch angetrieben, <i>Airlift</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Flexibler 3D-Bag, asymmetrische Form • statischer Sparger • Optische Sensoren für pH und DO verfügbar 	[50]

* Gesamtvolumen; ** angekündigt

In modernen Produktionsverfahren haben sich wellendurchmischte Bag-Bioreaktoren (vom Typ BIOSTAT® RM und Wave Bioreactor) durchgesetzt und werden für Produktionen des *Seed*-Inokulums bis zu einem Arbeitsvolumen von 500 L genutzt. Neben der etablierten *Seed*-Inokulum Produktion kommen wellendurchmischte Bioreaktoren vor allem dann zum Einsatz, wenn schersensitive Zellen (z.B. T-Zellen oder adulte, mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark und der Nabelschnur) kultiviert werden [130-132]. Wellendurchmischte Bag-Systeme und der Saltus VibroMix Bioreactor (100 L Kulturvolumen) haben sich auch bei der kommerziellen Produktion sekundärer Pflanzenstoffe für die Kosmetikindustrie bewährt [11]. Obwohl es sich hier um Nischenprodukte handelt sind Produkte zum Schutz und gegen die Alterung der menschlichen Haut auf Basis pflanzlicher Zellen erhältlich (PhytoCellTec-Produkte: *Malus domestica* Uttwiler Spätlauber, *Vitis vinifera* Gamay Teinturier Fréaux Grap und *Arganum spinosum*; sowie RESISTEM) [133, 134]. Zusätzlich werden auch Kultivierungen von Mikroalgen (*Cryptocodinium cohnii*, *Phaeodactylum tricornutum*) in wellendurchmischten single-use Bioreaktoren (BIOSTAT® RM und CELL-tainer) erfolgreich durchgeführt [92, 106].

Weniger im Gebrauch sind single-use Bioreaktoren bisher für die Herstellung von pflanzenzellbasierte Proteinen. Eine Ausnahme ist das erst kürzlich zugelassene Produkt ELELYSO (Protalix), welches aus genetisch manipulierten Karottenzellen (*Daucus carota*) zur Behandlung der Gaucher-Krankheit gewonnen wird [135]. Hierfür werden Einwegblasensäulen mit 400 L Kulturvolumen genutzt, die auf dem LifeReactor von Osmotek basieren [7].

Hingegen werden für die Produktion von therapeutischen Wirksubstanzen (z.B. Antikörper, Vakzine) aus Säugerzellen mehrheitlich gerührte single-use Bioreaktoren bis 1 m³ Kulturvolumen genutzt. Gerührte Einwegbioreaktoren mit 2 m³ Kulturvolumen werden trotz ihrer Verfügbarkeit bisher eher selten eingesetzt, was auf die kürzliche Einführung und die beschränkten Anwendungen zurückzuführen ist. Des Weiteren werden Kultivierungen von pflanzlichen Zellen und die Fermentation von Mikroorganismen für hochpreisige Produkte zunehmend in single-use Bioreaktoren realisiert [92, 106, 136]. Für letztere standen bislang nur single-use Bioreaktoren mit limitiertem Massentransfer in Bezug auf den Leistungs- und Sauerstoffeintrag zur Verfügung. Mit dem CELL-tainer und der mikrobiellen Version des XDR sowie des BIOSTAT® STR MO (Prototyp) sind erste Einwegbioreaktoren nutzbar, die Hochzelldichtekultivierungen von *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas fluorescens* und *Aspergilli* erlauben [29, 66, 71, 107, 137]. Andererseits werden bestehende Bag-Systeme genutzt (Bsp.: BIOSTAT® RM) [66, 94, 138], um mit geringen Arbeitsvolumina (ca. 20 %) und mit speziellen Feeding-Strategien maximale Hochzelldichten mit optischen Dichten von bis zu 140 zu erreichen.

Für adhärent wachsende Zellen steht mit dem iCELLis ein single-use Festbett-Bioreaktor zu Verfügung, dessen Matrix aus Mikrofasern besteht. Die verfügbare Fläche von bis zu 500 cm² ermöglicht Hochzelldichtekultivierungen mit hohen Produkttitern in der Säugerzell-basierenden Vakzinproduktion [75, 76] sowie die Zellexpansionen von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) [31, 139, 140]. Kultivierungen mit adhärent wachsenden hMSCs sind auch in gerührten single-use Bioreaktoren mit Arbeitsvolumen bis 2 L realisierbar [31, 44] und Zellexpansionen für größere Reaktorvolumina etabliert [141].

2.3 Verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren

Eine verfahrenstechnische Charakterisierung von Zellkulturbioreaktoren ist auf Grundlage der klassischen Verfahrenstechnik gegeben und kann in parametrische, experimentelle und numerische Ansätze unterteilt werden (Abbildung 3). Diese Ansätze erlauben die Bestimmung sowohl von dimensionslosen Parametern und des Strömungsregimes als auch der Mischzeit, des Sauerstofftransfers oder der Fluidströmung und Geschwindigkeitsverteilung. Zusätzlich sind über die Ermittlung des spezifischen Leistungseintrages, der Rührerumfangsgeschwindigkeit und der Energiedissipation Aussagen über eine mechanische Beanspruchung und eine auftretende Zellschädigung möglich. Außerdem werden die für eine Charakterisierung von Bioreaktoren verwendeten verfahrenstechnischen Parameter, wie Rührerumdrehung, Rührerumfangsgeschwindigkeit, spezifischer Leistungseintrag, Mischzeit oder k_{La} oft auch als Scale-up Kriterien genutzt [17, 18]. Eine Charakterisierung der Wärmeleistung ist in Zellkulturprozessen nicht notwendig [142]. Die experimentell zu bestimmenden Parameter können jedoch nicht nur mittels klassischer Methoden sondern auch durch die Verwendung der numerischen Strömungsmechanik (Computational Fluid Dynamics; CFD) bestimmt werden. Auf Basis von mathematischen Modellen sind örtliche und zeitliche Betrachtungen der Geschwindigkeitsverteilungen, des Strömungsfeldes, des Leistungseintrags, der Mischzeit und der Energiedissipation möglich.

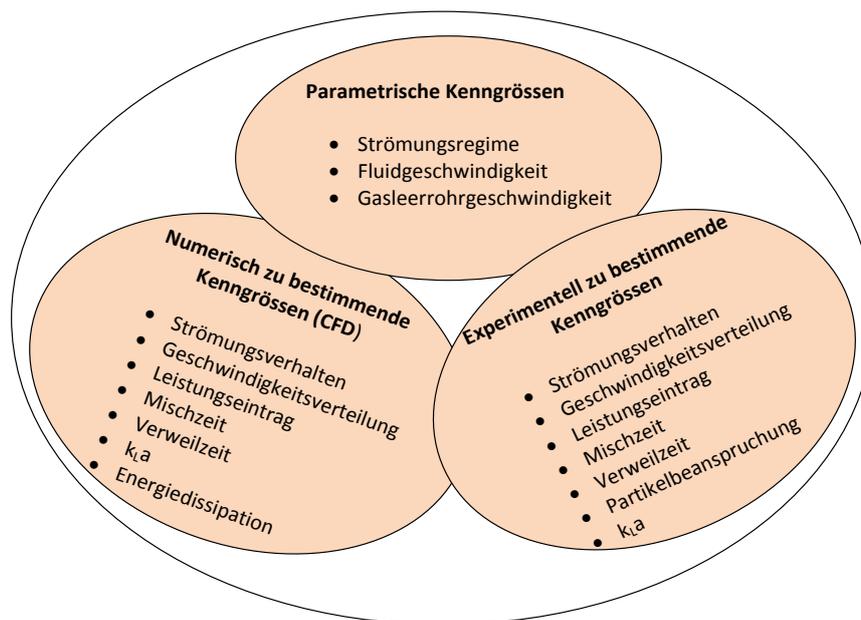


Abbildung 3: Verfahrenstechnische Kenngrößen von zellkulturbasierenden Bioreaktoren, die über die parametrischen, experimentellen und numerischen Ansätze bestimmt werden [40].

Unter Berücksichtigung der aufgeführten verfahrenstechnischen Kenngrößen wird der Fokus einer Charakterisierung von Bioreaktoren für zellkulturbasierende Prozesse vor allem auf eine schnelle und homogene Verfügbarkeit von Nährstoffen oder Gasen bei gleichzeitig minimalem Leistungseintrag und Scherkräften gelegt. Letzteres basiert auf der zellulären Besonderheit tierischer Zellkulturen, deren Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Beanspruchungen durch die fehlende Zellwand limitiert ist [30, 143]. Zusätzlich dienen die verfahrenstechnischen Kenngrößen der Vergleichbarkeit der Bioreaktoren.

Standardmäßig werden in Zellkulturprozessen gerührte Reaktorsysteme aus Glas oder Edelstahl eingesetzt, deren Leistungseintrag über die Rührerbewegung erfolgt. Single-use Bioreaktoren (Kapitel 2.2.1) zeichnen sich durch unterschiedliche Arten des Leistungseintrages und konstruktive Gegebenheiten der Bioreaktoren aus. Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen single-use Bioreaktoren untereinander und mit den konventionellen Systemen zu gewährleisten, muss für die Beschreibung eines Bioreaktorsystems eine grundlegende Charakterisierung erfolgen (Kapitel 2.3.1ff). Diese umfasst neben den parametrischen Ansätzen auch die experimentelle Bestimmung verfahrenstechnischer Kenngrößen (Abbildung 3), die die Auslegung und den Transfer eines zellkulturbasierenden Prozesses ermöglichen [40]. Auf Basis der erweiterten verfahrenstechnischen Charakterisierung, die den numerischen Ansatz der CFD, die Methode der Partikelbeanspruchung und des Strömungsverhaltens umfasst, können lokale und zeitlich abhängige Aussagen der Strömung getroffen werden. Die erhaltenen Informationen dienen nicht nur einem detaillierten Vergleich von Bioreaktoren, sondern sind zusätzlich für eine umfangreichere Prozesscharakterisierung und -entwicklung notwendig.

2.3.1 Grundlegende verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren

2.3.1.1 Parametrische Ansätze

Die parametrischen Ansätze für die Charakterisierung von Bioreaktoren sind durch die Dimensionen des Reaktors (D , H_{BR} , etc.) und des Mischorgans (d , h , c , etc.) vorgegeben und werden ins Verhältnis zueinander gesetzt (H_{BR}/D , d/D , etc.). Konventionell gerührte Bioreaktoren aus Glas oder Edelstahl besitzen zumeist einen Schlankheitsgrad (Verhältnis Reaktorhöhe zu Reaktordurchmesser) von 1:3 mit einem Durchmesser Verhältnis von Rührer zu Reaktor (d/D) zwischen 0.3 bis 0.5. Hingegen wird in der chemischen Industrie ein Schlankheitsgrad von ca. 1 angestrebt [144], bei dem die Größe der Rührer abhängig vom Fließverhalten der Edukte oder Produkte ist und durch den Einsatz von wandgängigen Rührern ein d/D -Verhältnis bis 1 erreicht werden kann. Zusätzlich bestimmt die Anzahl der Rührer die Rührereinbauhöhen bzw. deren Abstand zueinander (c). Für die Kultivierung von tierischen Zellen wird eine geringe Anzahl an Rührern bevorzugt, da bei mehrstufigen Rührern Effekte der gegenseitigen Beeinflussung auftreten können. Um diesem Effekt entgegen zu wirken wird das Verhältnis $c/d > 1.5$ (für Scheibenrührer) empfohlen, bei dem die eingebauten Rührer eigenständig wirken [18]. Zusätzlich sind die parametrischen Ansätze von den physikalischen Eigenschaften des Mediums abhängig.

In Säugerzellkulturprozessen werden überwiegend wasserähnliche Medien verwendet, deren physikalischen Eigenschaften sich über den Verlauf der Kultivierung nicht wesentlich ändern. Im Gegensatz dazu zeigen pflanzliche Zellkulturen (z. B. *Nicotiana tabacum* BY-2) ein nicht-Newton'sches Fluidverhalten im Verlauf des Prozesses auf. Zur Gewährleistung des Massentransfers muss die Anpassung des Leistungseintrages erfolgen, was bei einer Charakterisierung berücksichtigt werden muss. Die nachfolgend aufgeführten Methoden umfassen ausschließlich Größen, welche ohne experimentelle Messungen bestimmt werden können und eine erste Aussage über den Bioreaktor zulassen.

Strömungsregime

Das Strömungsregime eines Bioreaktors beschreibt die vorliegende Strömung und unterscheidet zwischen laminarem, transientem und turbulenter Zustand und wird durch die Reynolds Zahl beschrieben. In Zellkulturprozessen wird überwiegend im turbulenten Strömungsbereich gearbeitet, um einen adäquaten Massen- und Stofftransport zu gewährleisten. Bei Kultivierungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen wird ein quasi-transienter Bereich angestrebt, um die mechanische Beanspruchung zu minimieren [31]. Ein vollturbulenter Strömungsbereich wird oberhalb einer kritischen Reynolds Zahl erhalten, wo es in der Strömung zu zeitlichen und örtlichen Schwankungen der Fluidgeschwindigkeit mit der Entstehung von 3-D-Wirbeln kommt [145]. In gerührten Bioreaktoren sind Strömungsregime und Turbulenzphänomen umfangreich untersucht [146] und basieren auf der ursprünglich für Rohre entwickelten Reynolds-Gleichung. (Gleichung 1). Unter Berücksichtigung der Rührerumdrehung (N), Dichte (ρ_L), Viskosität (η_L) und des Rührerdurchmessers (d) kann die Reynolds Zahl und damit das Strömungsregime bestimmt werden. Oberhalb der kritischen Reynolds Zahl (Re_{krit}) von 10'000 kommt es zur Ausprägung einer turbulenten Strömung [17, 147], bei der die Wirbellängen gleich dem Rührerdurchmesser und der -höhe sind [17, 146]. In gerührten single-use Bioreaktoren ist Gleichung 1 für die Bestimmung des Strömungsregimes zu nutzen [11].

$$Re = \frac{\rho_L * N * d^2}{\eta_L}$$

Gleichung 1

In orbital geschüttelten Multiwell-Platten, Tubes, Schüttelkolben [148-150], Flaschen [151, 152] oder Bags [26, 153] wird die Fluidbewegung nicht über ein Mischorgan sondern durch das Bewegen der Kultivierungseinheit erzeugt. Deshalb wird für diese Bioreaktorsysteme der Rührerdurchmesser gleich dem maximalen Reaktordurchmesser gesetzt [40]. Unter Verwendung des maximalen, inneren Durchmessers des Schüttelkolbens und der Gleichung 1 wurde für dieses System eine kritische Reynolds Zahl $Re_{krit} > 60'000$ bestimmt [149, 150, 154]. Eine einfache Modifikation der Gleichung 1 erlaubt auch für rotatorisch oszillierende Bioreaktoren die Bestimmung des Strömungsregimes, bei der die charakteristisch Länge des Rührers gleich dem Reaktordurchmesser gesetzt wird [42, 43].

Für wellendurchmischte Bioreaktoren ist eine vereinfachte Anpassung der Gleichung 1 allerdings nicht möglich. Vielmehr zeigt die Berücksichtigung des Reaktorvolumens (V), der Kippfrequenz (k_r), der Füllhöhe (H) und die Abmaß des Kultivierungs-Bags (L) eine modifizierte Reynolds Zahl (Gleichung 2) [88]. In Abhängigkeit der Korrelationsfaktoren (B ; mit $0.00747 < B < 0.312$) sind turbulente Strömungszustände im BioWave (heute BIOSTAT® RM) oberhalb einer kritischen Reynolds Zahl von 1'000 zu erwarten [3, 88].

$$Re_{mod} = \frac{V * k_r * B * \rho_L}{\eta_L * (2 * H + L)}$$

Gleichung 2

Maximal eingetragene Geschwindigkeit

Die Geschwindigkeitsberechnung berücksichtigt die in das Fluid maximal eingetragene Fluidgeschwindigkeit (u_{max}) durch ein Mischorgan. In gerührten (single-use) Bioreaktoren ist diese Kenngröße von der Rührerdimension abhängig. In wellendurchmischten, orbital geschüttelten und rotatorisch oszillierenden wiederum vom Durchmesser des Support-Containers oder des Tablars. Aufgrund der Schersensitivität von tierischen Zellen [155] werden

für eine Vielzahl der Zellkulturprozesse kritische Werte von 1.0 bis 2.0 m/s veranschlagt, die jeweils abhängig von der eingesetzten Zelllinie sind [156]. Zusätzlich ist auf Basis der Geschwindigkeiten die Berechnung der mittleren Scherraten möglich [157], die bei Werten von $1 - 3 \times 10^5$ 1/s zum physiologischen Zelltod führen.

In gerührten Standard- sowie single-use Bioreaktorsystemen lässt sich die maximal eingetragene Geschwindigkeit durch die Rührerumfangsgeschwindigkeit (u_{Tip}) beschreiben (Gleichung 3). Jedoch zeigen experimentelle und numerische Untersuchungen von Stoots und Calabrese, 1995 sowie Wollny, 2010 eine relative, maximale Geschwindigkeiten von 1.4 bis 1.5 im Nachlauf von radialfördernden Rührern auf [158, 159], deren Ursache unter anderem durch den Nachlaufwirbel zu erklären ist. Um eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Rührer zu gewährleisten, sollte in jedem Fall auf die Rührerumfangsgeschwindigkeit zurückgegriffen werden.

$$u_{max} = u_{Tip} = \pi * N * d$$

Gleichung 3

Aufgrund der unterschiedlichen Arten des Leistungseintrages von single-use Bioreaktoren (Kapitel 2.2.1; Abbildung 1) muss Gleichung 3 für die jeweiligen Reaktorsysteme angepasst werden, wodurch eine modifizierte, maximale Geschwindigkeit ($u_{max, mod}$) resultiert. Zur Berechnung dieser Geschwindigkeit werden die Rührerdrehzahl und der -durchmesser in rotatorisch oszillierenden Systemen mit der mittleren Drehfrequenz und dem Reaktorbehälter ersetzt oder in Systemen mit vibrierender Scheibe durch die Gleichung der harmonischen Schwingung beschrieben [42, 43, 48, 113].

Gasleerrohrgeschwindigkeit

In begasten Prozessen ist die Bestimmung der Gasleerrohrgeschwindigkeit (u_G) ein wichtiger Parameter für die Vorhersage des Dispergierverhaltens eines Wasser/Luft-Stoffsystems. In Abhängigkeit des Gasvolumenstroms und des verwendeten Spargers mit dessen Fläche (A) ist nach Liepe 1998 die Gasleerrohrgeschwindigkeit bestimmbar (Gleichung 4) [160]. In konventionellen Rühr- und Blasensäulenbioreaktoren kann u_G außerdem zur Bestimmung des volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten herangezogen werden [161]. Dieser ist abhängig von der Gasleerrohrgeschwindigkeit und spezifisch für das eingesetzte Medium, die Reaktorkonstruktion und den verwendeten Sparger [162].

$$u_G = \frac{\dot{V}_G}{A}$$

Gleichung 4

Während in der Verfahrenstechnik diese Kenngröße für eine Charakterisierung von Reaktoren verwendet wird und zur Prozessauslegung dient, wird für zellkulturbasierende Prozesse überwiegend die Begasungsrate (β) angegeben. Diese beschreibt das Verhältnis von Arbeitsvolumen zu nominalem Gasvolumenstrom, wobei keine Sparger-spezifischen Eigenschaften berücksichtigt werden und einen Vergleich von single-use Systeme untereinander erlaubt. In Zellkulturprozessen kann es aufgrund der Zusammensetzung des Mediums zu einer

starken Schaumbildung und zur irreversiblen Zellzerstörung durch das Platzen von Gasblasen kommen. Dies wird durch den Einsatz von Antischaummitteln und Schutzstoffen (Pluronic F68), durch die Verringerung der Oberflächenspannung, reduziert [163]. Zusätzlich werden lediglich maximale Begasungsraten von 0.1 bis 0.2 vvm verwendet [164]. Auf Basis der Gasleerrohrgeschwindigkeit ist jedoch die Bestimmung des Überflutungspunktes des Rührers bei konstantem u_G möglich [18]. Trotz geringer Begasungsraten werden in Zellkulturprozessen geringe Rührerumdrehungen bzw. Leistungseinträge veranschlagt und überwiegend Schrägblatt- oder Segmentblatt-Rührer verwendet, was zu einem verminderten Dispergierverhalten führt. Daher ist auch in gerührten (single-use) Zellkulturbioreaktoren mit typischen Begasungsraten von 0.1 bis 0.2 vvm eine Überflutung des Rührers zu beobachten [15, 57], was die Bildung einer unerwünschten permanenten Schaumschicht fördert.

2.3.1.2 Experimentelle Methoden

Bedingt durch die baulichen Gegebenheiten von single-use Bioreaktoren ist eine Bestimmung der verfahrenstechnischen Kenngrößen mit je einer Methode ausgeschlossen. Daher werden in dem nachfolgenden Kapitel die experimentellen Methoden diskutiert, die für eine Charakterisierung von single-use Bioreaktoren notwendig sind.

Leistungseintrag

Die Bestimmung des Leistungseintrags ist eine der wichtigsten experimentellen Methoden der verfahrenstechnischen Charakterisierung. Zusätzlich ist der Leistungseintrag essentiell für eine Maßstabsübertragung von Bioreaktoren [165-167], die in Kapitel 2.4 aufgezeigt wird. Der Leistungseintrag ist verantwortlich für das Suspendieren von Feststoffen, die Homogenität des Fluides und das Dispergieren von Gasblasen im Bioreaktor. Die Bestimmung des Leistungseintrages erfolgt meist indirekt über die Messung des Drehmomentes und korreliert trotz der unterschiedlichen Arten des Leistungseintrages der single-use Bioreaktoren mit der Rührerdrehzahl (Gleichung 5), der Kipp- und Schüttelrate oder einer periodischen Bewegung [11]. Um Reibungseffekte und Lagerwiderstände ausschließen zu können, wird für die Untersuchungsparameter das Drehmoment immer im Fluid (M) und anschließend in Luft (M_d) aufgenommen. Unter Berücksichtigung des Arbeitsvolumens wird der spezifische Leistungseintrag (P/V) erhalten, der für Zellkulturprozesse ein essentieller Parameter ist und in einem Bereich zwischen 10 und 250 W/m³ liegen sollte [142, 162]. Im Gegensatz dazu stehen Fermentationen mit Mikroorganismen bei denen mit einem ca. zehnfach höheren Leistungseintrag gearbeitet werden muss [168].

$$\frac{P}{V} = \frac{(M - M_d) \cdot 2 \cdot \pi \cdot N}{V}$$

Gleichung 5

Aufgrund der relativ einfachen Installation eines Drehmoment-Messers sind Angaben zur Leistung bzw. dem spezifischen Leistungseintrag in gerührten [17, 70, 146, 169-171], orbital geschüttelten [45, 149, 150, 167] und rotatorisch oszillierenden single-use Bioreaktoren [42, 43, 116] vorhanden. Im Fall von wellendurchmischten single-use Bioreaktoren ist die Drehmoment-Messung theoretisch möglich, jedoch aufgrund der Installations- und Lagerbedingungen des Drehmomentenaufnehmers sowie durch die transiente Bewegung nur schwer realisierbar [40].

Hierfür bietet sich die Temperaturmethode als Alternative in wellendurchmischten Bioreaktoren zur Bestimmung der Leistung bzw. des spezifischen Leistungseintrages an, ohne die zeitliche Abhängigkeit des Strömungscharakters betrachten zu müssen [40]. In Schüttelkolben oder dem BayShake Bioreactor wird die Temperaturmethode genutzt [43, 167, 172], deren Vorteil auf einer hochauflösenden Messtechnik basiert, ohne dabei Reibungsverluste durch Dichtungen oder mechanische Bauteile zu berücksichtigen. Die Temperaturmethode basiert auf der Energiebilanz des Bioreaktors [43, 173], welche durch Thermometer im Fluid und in der Umgebung aufgenommen werden kann [167]. Jedoch ist die Ableitung der Leistung durch die benötigten hochsensitiven Instrumentierungen und Reaktorisolierungen sowie die Veränderung der Strömung durch das Einbringen von Sonden problematisch [169]. Im pneumatisch angetriebenen CellMaker Regular kann die Leistung anhand des Gaseintrages bestimmt werden [157]. Die Methode über die Bestimmung der Motorleistung ist aufgrund der großen Messfehler und einer nicht aufnehmbaren Leistungskennlinie für single-use Bioreaktoren ungeeignet [17].

Anhand der ermittelten Leistung kann die Newton Zahl bestimmt werden (Gleichung 6), die unter Berücksichtigung der Leistungscharakteristik wiederum für die Bestimmung des Strömungsregimes (Kapitel 2.3.1.1) herangezogen werden kann. Unter turbulenten Strömungsbedingungen (oberhalb einer kritischen Reynolds Zahl) wird eine konstante Newton Zahl in bewehrten Bioreaktoren oder bei exzentrischem Einbau des Rührers erhalten. Der Einbau von Stromstörern ist aufgrund der geringen Rührerumdrehungen in Zellkulturreaktoren nicht notwendig, jedoch werden exzentrische Rührer beispielsweise im S.U.B. verwendet, um eine Trombenbildung zu verhindern. Daher wird in nicht-bewehrten Zellkulturreaktoren lediglich eine quasi-konstante Newton Zahl erhalten, die im turbulenten Bereich aufgrund der Wirbelausbildung minimal absinkt [145, 146, 160]. Unter diesen Bedingungen ist eine Bestimmung des Rührertyps auf Basis der Newton Zahl möglich, die beispielsweise für Rushton Turbinen typischerweise im Bereich von 3 bis 10 [18, 174] und für Rührer im Bereich von 0.3 bis 3 [174, 175] liegt.

$$Ne = \frac{P}{\rho_L * N^3 * d^5}$$

Gleichung 6

Des Weiteren kann durch den spezifischen Leistungseintrag respektive der turbulenten Energie der Kolmogorov'sche Längenmaßstab (λ) errechnet werden, der zur Beurteilung der mechanischen Beanspruchung der Zellen genutzt wird. Ausgehend von der Theorie, dass Zellen eine Schädigung durch Wirbel mit identischer Größe erfahren, ist unter Voraussetzung lokaler isotopischer Turbulenz die Größe der kleinsten Wirbel nach Gleichung 7 zu berechnen. Hierbei besitzen kleinere Wirbel eine zu geringe Energie für eine Zellbeanspruchung und Zellen folgen größeren Wirbeln konvektiv. Neben der Betrachtung der Mikroturbulenz (mit λ) ist auch die Makroturbulenz (Λ) zu erwähnen, deren Abmessungen ca. 10 % des Rührerdurchmessers (bei $h/d = 0.2$) betragen. Die Makroturbulenz spielt in der Zellkulturtechnik jedoch nur eine untergeordnete Rolle.

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4}$$

Gleichung 7

Homogenität (Mischzeitbestimmung)

Das Mischen stellt einen orts- und zeitabhängigen Prozess dar und basiert auf der Verteilung von mindestens zwei Komponenten in einem Volumen. Dabei unterscheiden sich die beiden Komponenten in mindestens einer Eigenschaft, wie beispielsweise der Konzentration, Temperatur, Farbe, Dichte, Viskosität, Partikelgröße und Form [17, 18, 144]. Zudem wird das Durchmischen von den geometrischen Merkmalen des Bioreaktors und den Besonderheiten des Fluides (Mischqualität, Untersuchungsbedingungen, materielle und charakteristische Eigenschaften, Leistungseintrag und Energiedissipation) beeinflusst [17, 146, 176]. Die Misch- oder Homogenisierzeit (θ_m) wird als die Zeit definiert, die benötigt wird, um eine definierte Homogenität eines Stoffgemisches zu erhalten [177].

In single-use Bioreaktoren kann die Mischzeit über den Farbumschlag (mittels Redox- oder Neutralisationsreaktion) oder die Probenmethoden (Temperatur- oder Leitfähigkeitsmessung) ermittelt werden [40]. Für die Redox- oder Neutralisationsreaktion werden dem Fluid ein Farbstoff und Indikator zugegeben, die nach der Zugabe eines Entfärbungsreagenz einen Farbwechsel oder eine Entfärbung hervorrufen. Die Zeit zwischen Zugabe des Entfärbungsreagenz und dem eintretenden Farbwechsel bzw. der vollständigen Entfärbung wird gemessen und bildet die Mischzeit für eine vollständig durchgemischtes Fluid. Üblicherweise werden für die Redoxreaktion die Reagenzien Thiosulfat, Iod und Stärke (Indikator) sowie für die Neutralisationsreaktion die Reagenzien Salzsäure, Natriumhydroxid und Phenolphthalein (Indikator) verwendet. Die Vorteile der Farbumschlagmethode sind die kostengünstige und simple Durchführung sowie die Möglichkeit zur Lokalisierung von Totzonen oder Bereichen mit geringer Durchmischung in den Bioreaktoren [154]. Hierfür wird jedoch zwingend ein optischer Zugang zum Fluid benötigt, der für alle Maßstäbe in wellendurchmischten und *air-wheel* (PBS Bioreactor, Kapitel 2.2.1) sowie für die kleineren Maßstäbe in orbital geschüttelten und gerührten Bioreaktorsystemen gegeben ist [39, 70, 178, 179]. Aufgrund der Container-Bauweise des BIOSTAT® STR mit den zwei hemisphärischen Türen ist auch bis zu einem Arbeitsvolumen von 200 L eine Farbumschlagmessung möglich. Oberhalb eines Arbeitsvolumens von 200 L sollte dies aus Sicherheitsgründen nicht erfolgen, wohingegen die Draufsicht für die Messung des Farbumschlages bei geschlossenen Türen genutzt werden kann [40]. Da jedoch bei den Bag-Bioreaktoren für die unterschiedlichsten Maßstäbe der Container einen optischen Zugang zum Fluid verhindert, ist die Bestimmung der Mischzeit mittels Sondenmethoden unumgänglich. Hierfür muss mindestens eine Sonde in das Fluid eingebracht werden, die eine physikalische Eigenschaft detektiert. Die einfachste Sondenmethode für die Bestimmung der Mischzeit ist die Messung des pH-Wertes. Hierfür ist an allen single-use Bag-Bioreaktoren ein entsprechender Anschluss vorhanden [40]. Eine weitere Möglichkeit stellt die Messung der Leitfähigkeit (Leitfähigkeitsmethode) dar, wobei die Standard-Sonden mit ihrem Standardgewinde (12 mm) nur über spezielle Sterilverbindungen in das Fluid der meisten single-use Kultivierungssysteme integriert werden können. Bei beiden Ansätzen wird die Mischzeit über die zeitliche Änderung der Säure-/Basekonzentration oder der Leitfähigkeit von einem Tracer gemessen. Die Berechnung der Homogenität (H_m) berücksichtigt neben der aktuellen Konzentration ($c_T(t)$) auch die Anfangs- und Endkonzentrationen ($c_{T,0}$ und $c_{T,\infty}$) (Gleichung 8). Üblicherweise wird eine Mischgüte von 95 % als angemessene Durchmischung angenommen [17, 18, 41, 70, 180-182].

$$H_m(t)_{95\%} = \frac{c_{T,0} - c_T(t)}{c_{T,0} - c_{T,\infty}}$$

Gleichung 8

Die Sondenmethode eignet sich vor allem für größere Bioreaktormaßstäbe ab 50 L Arbeitsvolumen und wurde bereits im S.U.B. [183], dem XDR Single-Use Bioreactor, dem BaySHAKE-Bioreactor [116] und dem BIOSTAT® STR angewendet [70]. Die aufgezeigten Sondenmethoden bieten einen einfachen und praktischen Ansatz zur Mischzeitbestimmung in single-use Bioreaktoren ohne optischen Zugang zum Fluid. Im Gegensatz zu den Entfärbungsmethoden ist jedoch zu berücksichtigen, dass durch das Einbringen von Sonden in das Fluid eine Änderung des Strömungsfeldes hervorgerufen wird. Zusätzlich ist die erhaltene Mischzeit immer abhängig von der Anzahl und Position der Sonden sowie der Ansprechzeit der Sonde. Daher ist streng genommen die erhaltene Mischzeit nur für die entsprechende Position gültig, da während einer Messung beispielsweise Totzonen oder Gebiete mit geringen Geschwindigkeiten im übrigen Bioreaktorraum nicht gemessen werden können.

Einen weiteren Ansatz zur Mischzeitbestimmung bietet die Laser-induzierte Fluoreszenz-Methode (LIF) [184-187]. Die Bestimmung der Mischzeit erfolgt dabei durch die Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen in das Fluid, wobei die Mischzeit bei einer homogenen Verteilung der Fluoreszenzpartikel erreicht ist. Diese Methode erhöht zwar die Genauigkeit der Mischzeitbestimmung [154], setzt aber einen hohen und kostenintensiven technischen Aufwand voraus. Zusätzlich ist sie nur für Bioreaktoren mit optischem Zugang zum Fluid geeignet, der in rigiden Bioreaktoren zwar vorhanden ist, aber in Bag-Systemen den Einsatz eines Reaktor-Ersatzmodelles erfordert. Die Methode eignet sich daher nicht zur Bestimmung der Mischzeit in single-use Bioreaktoren [11].

Den größten Einfluss auf die Durchmischung hat der Leistungseintrag des Mischorgans. Unter turbulenten Strömungsbedingungen erfolgt eine Homogenisierung zweier Komponenten aufgrund der Wirbelausprägung, die mit zunehmender Turbulenz eine Verringerung der Mischzeit hervorruft [17]. Von dem Ansatz der Turbulenztheorie ausgehend, ist die Mischzeit abhängig vom Rührertyp und der Turbulenzdiffusion, die durch die turbulente Energiedissipation (ε_T) und dem integralen Maßstab der Turbulenz (L_T) beschrieben wird (Gleichung 9; [142, 188]).

$$\theta_m \propto \left(\frac{\varepsilon_T}{L_T^2} \right)^{-1/3}$$

Gleichung 9

Wird zusätzlich die Proportionalität des integralen Maßstabes der Turbulenz zum Reaktordurchmesser berücksichtigt, ist eine Bestimmung der Mischzeit nach Gleichung 10 unter Einbezug des spezifischen Leistungseintrages, der Reaktor- sowie Rührergeometrie möglich (bei $H = D$) [142, 188, 189]. In Bioreaktoren mit einem $H/D > 1$ ist ein weiterer Term ($H/D^{2.43}$; Gleichung 30) zu berücksichtigen, der ursprünglich für mehrstufige Rührer entwickelt wurde, aber auch den Einfluss der Flüssigkeitshöhe bei einstufigen Rührern beschreibt.

$$\theta_m \propto \left(\frac{P}{V} \right)^{-1/3} * \left(\frac{d}{D} \right)^{-1/3} * D^{2/3}$$

Gleichung 10

In gerührten Bioreaktoren wird zusätzlich auch die dimensionslose Mischkennzahl (c_H) betrachtet (Gleichung 11), die unter turbulenten Strömungsbedingungen einen konstanten Wert annimmt [145] und die Anzahl an Rührerumdrehungen bis zur Durchmischung beschreibt. Bei einer Maßstabsübertragung mit identischen Rührer- und Reaktorverhältnissen ist von einer konstanten Mischkennzahl auszugehen [190].

$$c_H = \theta_m \cdot N$$

Gleichung 11

Typische Mischkennzahlen für single-use Bioreaktorsysteme liegen in einem Bereich zwischen 20 und 50, die von denen in herkömmlichen Bioreaktoren aus Glas oder Edelstahl nicht abweichen. In zellkulturbasierenden Prozessen werden Mischzeiten von unter 30 s für Labor-Bioreaktoren [11, 15, 39] und unter 2 min für den Produktionsmaßstab angestrebt.

Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient ($k_L a$)

Der Sauerstofftransfer ist einer der wichtigsten kritischen Faktoren zur verfahrenstechnischen Charakterisierung bestehender Systeme sowie der Auslegung neuer Bioreaktoren und dem Scale-up von bestehenden Zellkulturprozessen [47, 70]. Die Bereitstellung von Sauerstoff für aerobe Prozesse wird vorwiegend über Sparger bzw. Membranen, Dip Tubes oder die Fluidoberfläche realisiert. Der Übergang von Sauerstoff aus der Gas- in die Flüssigphase kann durch die Zwei-Film- oder die Penetrationstheorie beschrieben werden und wird in der Sauerstofftransfer rate (OTR) zusammengefasst [191]. Diese wird durch den Massentransferkoeffizienten (k_L), der spezifischen Phasengrenzfläche (a) und dem Konzentrationsunterschied des gelösten Sauerstoffs in dem Fluid ($c_{O_2}^* - c_{O_2}$) bestimmt und ist neben dem Begasungsorgan im Wesentlichen von dem Mischorgan, der eingetragenen Leistung, den Fluideigenschaften sowie der Begasungsrate abhängig [161].

In aeroben Prozessen wird zudem der gelöste Sauerstoff durch den Transfer aus der Flüssig- in die Gasphase (Sauerstoffverbrauchsrate; OUR) verbraucht, die eine spezifische physiologische Beschreibung des Zellwachstums zulässt [192] und von der spezifischen Sauerstoffaufnahme rate (q_{O_2}) sowie der Zellkonzentration (c_x) abhängig ist. Der zeitliche Verlauf von gelöstem Sauerstoff im Medium (dc_{O_2}/dt) ergibt sich aus der Subtraktion von OTR zu OUR, und ist durch Gleichung 12 beschrieben.

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = [k_L \cdot a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2})] - [q_{O_2} \cdot c_x]$$

Gleichung 12

Für die Bestimmung des OTR werden k_L und a benötigt, die jedoch einzeln experimentell schwer zu bestimmen sind. Daher werden beide Parameter zu dem volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten ($k_L a$) zusammengefasst [192]. Der $k_L a$ ist definiert als die reziproke Zeit für den Massentransfer von Sauerstoff aus der Gas- in die Flüssigphase und setzt für seine Bestimmung ein ideal durchmischtes Fluid voraus. Die Kenntnis des $k_L a$ in zellkulturbasierenden Prozessen ist für eine adäquate Begasungsstrategie wichtig, da Änderungen des Zellmetabolismus oder Zellzerstörung bei anhaltender Sauerstofflimitation

auftreten. Daher werden für die Kultivierung von Zellkulturen k_{La} -Werte von 1 bis 35 1/h vorgeschlagen [142, 162, 190, 193, 194].

Gassing-out Methode

Eine experimentelle Bestimmung des k_{La} ist durch verschiedene Methoden möglich, die in [161, 191, 195] publiziert sind. Der meistgenutzte Ansatz für die k_{La} Bestimmung ist die *gassing-out* Methode, bei der in einem Modellmedium der Sauerstoff mittels Stickstoff verdrängt wird (Abbildung 4; A). Durch die anschließende Zugabe von Sauerstoff bis zu einer maximalen gelösten Sauerstoffkonzentration und die Aufzeichnung der DO-Aufsättigung ist die Bestimmung des k_{La} Wertes möglich. Hierfür wird die DO-Konzentration logarithmisch aufgetragen und graphisch ausgewertet, wobei der Anstieg der Funktion den k_{La} repräsentiert. Da bei dieser Methode kein biologisches System verwendet wird, ist der OUR (Gleichung 12) zu vernachlässigen. Diese kostengünstige und simple Methode wurde bereits für eine Vielzahl von gerührten single-use Bioreaktoren genutzt, wie beispielsweise dem UniVessel® SU [179], dem Mobius CellReady [196], dem BIOSTAT® STR [69, 70] oder dem S.U.B. [183]. Aufgrund des empirischen Ansatzes nach Gleichung 13 [191, 197-200] ist eine Übertragung der gerührten Systeme auf konventionelle Bioreaktoren gegeben. [11]. Hierbei ist die Bestimmung des k_{La} über die Korrelation des spezifischen Leistungseintrages und der Gasleerrohrgeschwindigkeit möglich, wobei die empirischen Koeffizienten C , x_1 und x_2 abhängig von dem Bioreaktorsystem sind. In single-use Bioreaktoren konnte ein größerer Einfluss des spezifischen Leistungseintrages ($x_1 > x_2$) beobachtet werden [15, 39], was gegensätzlich zu den konventionellen Reaktorsystemen ist, jedoch durch ein geringeres Dispergierverhalten der Rührer unter Zellkulturbedingungen erklärt werden kann [11].

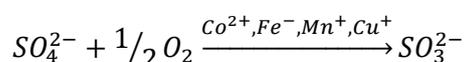
$$k_{La} = B * \left(\frac{P}{V}\right)^{x_1} * u_G^{x_2}$$

Gleichung 13

Zusätzlich findet die *gassing-out* Methode in rotatorisch oszillierenden [116], orbital geschüttelten [201] und wellendurchmischten [136, 202] single-use Bioreaktoren Anwendung. Während in wellendurchmischten und rotatorisch oszillierenden single-use Bioreaktoren mit ihren 2-D Bewegungen (BIOSTAT® RM, Appliflex, BaySHAKE Bioreactor) geringe k_{La} -Werte bis 20 1/h gemessen werden konnten [3, 136], sind im Cell-tainer aufgrund der 3-D Bewegung und des daraus resultierenden Leistungseintrages (bis 3.8 kW/m³) k_{La} -Werte bis zu 700 1/h erreichbar [109].

Sulfit-Methode

In nicht-instrumentierten single-use Bioreaktoren im mL - Maßstab ist das Einbringen von Sonden nicht möglich, weshalb auf die Sulfit-Methode zurückgegriffen werden muss [203]. Diese beruht auf der chemischen Reaktion von Sulfit zu Sulfat unter Anwesenheit von Sauerstoff und einem Katalysator (Kobalt, Eisen, Mangan und Kupfer) (Gleichung 14).



Gleichung 14

Da die chemische Reaktion durch Katalysatorkonzentration, pH, Temperatur und Lichteinfall, beeinflusst wird [195] und zusätzlich Schwermetalle verwendet werden müssen [40], ist eine Durchführung dieser Methode kritisch. Des Weiteren eignet sich diese Methode nur bei einer Oberflächenbegasung [204], weshalb deren Einsatz vorwiegend für orbital geschüttelte single-use Bioreaktoren, wie Mikrotiterplatten [203, 205], Tubespinn Bioreaktoren [206], Schüttelkolben [207] und den BioLector [208] beschrieben ist. In Mikrotiterplatten werden dabei $k_{L,a}$ -Werte bis 200 1/h (Schüttelfrequenz oberhalb von 1000 rpm; [209]) und in Schüttelkolben bis ca. 100 1/h ($V = 200$ mL, 210 rpm; [206]) ermittelt, die im Vergleich zu den größeren Maßstäben um ein Vielfaches höher sind. Ein empirischer Ansatz für geschüttelte Systeme ist außerdem durch Gleichung 15 gegeben, der mit der Schmidt- (Sc), Froude- (Fr) und Bond-Zahl (Bo) sowie der horizontalen Schüttel-Auslenkung in x - und z - Richtung die $k_{L,a}$ -Bestimmung ermöglicht.

$$k_{L,a} = 31.35 * D_{O_2} * a * Re^{0.68} * Sc^{0.36} * Fr^x * Bo^z$$

Gleichung 15

Werden die beiden Ansätze hinsichtlich ihrer Anwendung für single-use Bioreaktoren verglichen, wird ersichtlich, dass die baulichen Gegebenheiten des Bioreaktors sowie die Art des Leistungseintrages die Wahl zur Methoden der $k_{L,a}$ -Bestimmung entscheidend beeinflusst. Außerdem sind die Untersuchungsbedingungen, wie Temperatur oder Mediumszusammensetzung, ausschlaggebend damit die Vergleichbarkeit zu konventionellen Bioreaktoren gewährleistet bleibt [146]. Die Temperatur lässt sich über die Korrelationen nach Boogerd *et al.*, 1990 für den $k_{L,a}$ berücksichtigen [210]. Hingegen ist die Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellkulturmedien nicht definiert. Im einfachsten Fall wird der $k_{L,a}$ in deionisiertem Wasser bestimmt. In Zellkulturprozessen werden jedoch oft Tenside (Antischaummittel oder Pluronic) eingesetzt, die eine Verringerung der Oberflächenspannung des Mediums und somit geringere $k_{L,a}$ -Werten hervorrufen [40]. Da die Tensid-Konzentration sowie das Zugabevolumen abhängig vom jeweiligen Zellkulturprozess sind, jedoch das Medium annähernd reale Prozessbedingungen wiedergeben soll, wird für vergleichbare Untersuchungen ein salzhaltiges Medium (bspw. PBS) bevorzugt [40]. Auf die Zugabe von Tensiden wird bei der $k_{L,a}$ -Messung vorzugsweise verzichtet, da deren Einsatz prozessabhängig und somit für eine vergleichende Charakterisierung nicht zu empfehlen ist [40].

Respiratory gassing-out Methode

Für eine Charakterisierung der Bioreaktoren unter prozessrelevanten Bedingungen (reale Mediumzusammensetzung, Konzentration Antischaum und Pluronic, Einfluss der Biomasse) bietet sich die *respiratory gassing-out* Methode an, die jedoch prozessspezifisch ist und nicht für einen Vergleich genutzt werden kann. Die von Tagucchi 1966 entwickelte Bestimmung des $k_{L,a}$ -Wertes erfolgt unter der Anwesenheit von Biomasse [191, 192, 195, 211-213], die durch den OUR berücksichtigt wird (Gleichung 12). Während eines Kultivierungsprozesses erfolgt der Sauerstoffverbrauch nach dem Unterbinden der Begasung (Abbildung 4; B). Die atmende Biomasse zehrt den Sauerstoff auf, was durch die Abnahme des gelösten Sauerstoffs ersichtlich wird (Gleichung 16). Unter Berücksichtigung der Zellkonzentration (c_x) ist die Bestimmung des OUR über den graphischen (negativen) Anstieg des DO als Funktion der Zeit möglich. Wird eine für die Zellen kritische Sauerstoffkonzentration erreicht, erfolgt die Begasung des Bioreaktors. Über den Anstieg des gelösten Sauerstoffs bis zu einer stationären Konzentration als Funktion

der Zeit und unter Berücksichtigung der Zellkonzentration kann der $k_{L,a}$ graphisch ermittelt werden (Gleichung 17).

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = OUR = -q_{O_2} \cdot c_x$$

Gleichung 16

$$q_{O_2} \cdot c_x \cdot \Delta t + \Delta c_{O_2} = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \cdot \Delta t$$

Gleichung 17

Mit der *respiratory gassing-out* Methode ist zwar eine zuverlässige und realistische $k_{L,a}$ -Bestimmung gegeben, jedoch ist der Vergleich unterschiedlicher Bioreaktoren mit dieser Methode unrealistisch. Für einen Vergleich von Bioreaktoren, Mischern oder Begasungsorganen müssen identische Prozess- und Kultivierungsbedingungen (Zusammensetzung des Mediums, Zellstadium, Vitalität und Konzentration der Zellen, Konzentration von Metaboliten etc.) gewährleistet sein, was bei dieser Methode nur bedingt realisierbar ist. Zusätzlich zählen die eingeschränkten Betriebsparameter innerhalb des Zellkulturprozesses, der sich permanent ändernde Biomassezustand, hohe Mediumkosten und die Gewährleistung eines aseptischen Prozesses, weitere Limitationen der Methode für bioreaktorübergreifende Aussagen [11]. Die Methode ist jedoch für die Charakterisierung eines spezifischen Zellkulturprozesses sinnvoll, bei dem der Einfluss des $k_{L,a}$ unter definierten Prozess- und Kultivierungsbedingungen im Fokus steht.

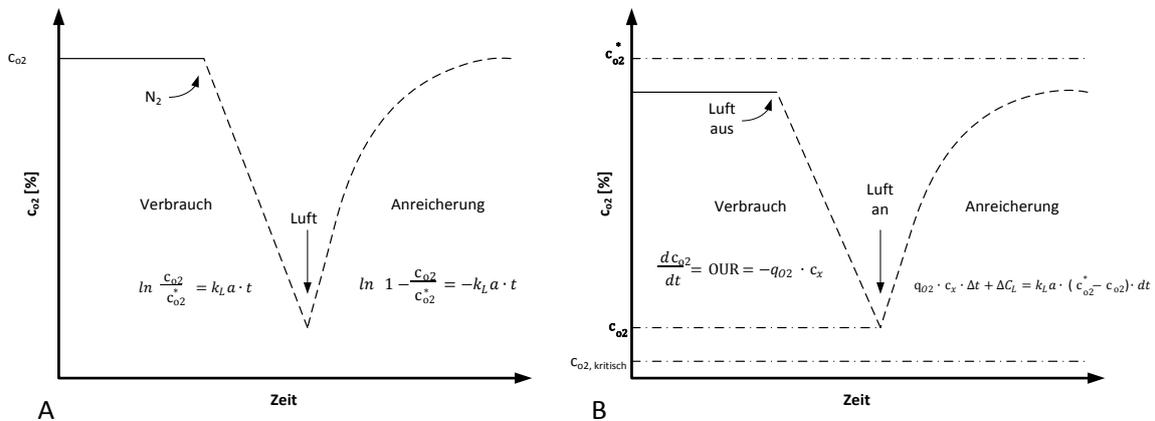


Abbildung 4: Schematische Darstellung zur Bestimmung des $k_{L,a}$ -Wertes mittels *gassing-out* (A) und *respiratory gassing-out* Methode (B; modifiziert nach [191]).

2.3.2 Erweiterte verfahrenstechnische Charakterisierung

Die erweiterte verfahrenstechnische Charakterisierung erfordert wesentlich umfangreichere Labor- oder Untersuchungsausstattung sowie fundierte Kenntnisse der Mathematik, Physik und Informatik und unterscheidet sich dadurch wesentlich von der grundlegenden Charakterisierung von Bioreaktoren. Die in Kapitel 2.3.1ff erhaltenen Parameter werden durch die Nutzung einer örtlich und zeitlich aufgelösten Betrachtungsweise ergänzt, die zu einem detaillierten Verständnis der Fluidströmung in (single-use) Bioreaktoren beitragen. Diese Herangehensweise wird bis zum heutigen Tage für die Charakterisierung von herkömmlichen Bioreaktoren genutzt und wird nachfolgend für die Anwendung in single-use Bioreaktoren erklärt und diskutiert.

2.3.2.1 Computational Fluid Dynamics (CFD)

Die numerische Strömungsmechanik (Computational Fluid Dynamics, CFD) ist ein computerbasierter Ansatz zur Beschreibung von Fluidströmungen. Voraussetzung hierfür ist neben der erforderlichen Rechentechnik auch die entsprechende Software, die kommerziell (FLUENT oder CFD von ANSYS, Inc. oder STAR-CD von CD-adapco) oder frei verfügbar ist (Softwarepakete wie OpenFOAM, FreeCFD, Salome etc.) [53]. Mit Hilfe der CFD können die in Kapitel 2.3.1 aufgezeigten parametrischen und methodischen Charakterisierungen parallel durchgeführt werden. Hierfür sind im einfachsten Fall lediglich „digitale Zeichnungen“ und keine Prototypen von single-use Bioreaktoren notwendig, was bei der Entwicklung von Bioreaktoren sowohl Zeit als auch Kosten einspart.

Prinzip der CFD, Strömungsverhalten und Geschwindigkeitsverteilung

Zur Berechnung der Strömung in einer „digitalen Zeichnung“, eines Prototypen oder eines bestehenden (single-use) Bioreaktors mittels des numerischen Ansatzes, ist der Prozess der CFD in drei Schritte einzuteilen. Er umfasst das (1) pre-processing, (2) das processing und (3) das post-processing. Das pre-processing beinhaltet neben der Konstruktion einer computerbasierten Geometrie, das Aufteilen des Volumens in eine finite Anzahl an Volumenelementen und das Definieren von Rand- und Eingangsbedingungen [53]. In Abhängigkeit der Anwendung, des Mischprinzips bzw. der Art des Leistungseintrages ist der Lösungsansatz zu wählen, der für welleninduzierte, orbital geschüttelte, rotatorisch oszillierende und für die Bewegung einer vibrierenden Scheibe einen zeitabhängigen Ansatz vorsieht. Gerührte Systeme können jedoch sowohl zeitabhängig als auch stationär berechnet werden, wobei letzteres die zeitliche Dauer und den numerischen Aufwand deutlich reduziert.

Die CFD basiert auf den Erhaltungsgleichungen der Masse, des Impulses und der Energie (Abbildung 5, processing). Unter Berücksichtigung spezifischer Fluideigenschaften kann, unter anderem für zellkulturbasierende Prozesse, von einem inkompressiblen und instationären Fluid mit konstanter Viskosität ausgegangen werden, was den numerischen Aufwand zusätzlich reduziert. Die Energieerhaltung ist für eine numerische Beschreibung von Zellkulturbioreaktoren vernachlässigbar, was bereits zuvor auch für die experimentellen Charakterisierungsansätze (Kapitel 2.3.1ff) aufgezeigt wurde. Die resultierenden

Erhaltungsgleichungen für die Masse (Gleichung 18) und den Impuls (Gleichung 19) werden dadurch vereinfacht und als Reynolds-gemittelte-Navier-Stokes (RANS) Gleichungen bezeichnet.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla * (\rho * \vec{u}) = 0$$

Gleichung 18

$$\frac{\partial(\rho*\vec{u})}{\partial t} + \nabla * (\rho * \vec{u} * \vec{u}) = -\nabla p + \nabla * \bar{\tau} + \vec{g} * \rho + \vec{F}$$

Gleichung 19

Die RANS-Gleichungen enthalten den Reynolds-Stress Tensor ($\bar{\tau}$), der eine Betrachtung der turbulenten Schwankungsgeschwindigkeiten über zu integrierende Turbulenzmodelle ermöglicht. Die am häufigsten eingesetzten Turbulenzmodelle sind die k-ε [214] oder k-ω [215] Zwei-Gleichungsmodelle. Die nicht-linearen partiellen Differentialgleichungen zweiter Ordnung können zumeist nicht analytisch gelöst werden, weshalb eine Diskretisierung des Fluidraumes in die finite Anzahl an Volumen erfolgen muss und durch die Finite-Volumen-Methode (FVM) beschrieben wird [216]. Durch diese Aufteilung und die Berechnung der Erhaltungsgleichungen in jedem Volumenelement werden die partiellen Differentialgleichungen in ein nichtlineares Gleichungssystem überführt, welches iterativ gelöst wird [217-221]. Eine numerisch adäquate Lösung wird über die Konvergenzkriterien definiert und ist in einem Bereich zwischen 10⁻⁴ und 10⁻⁶ gegeben [78].

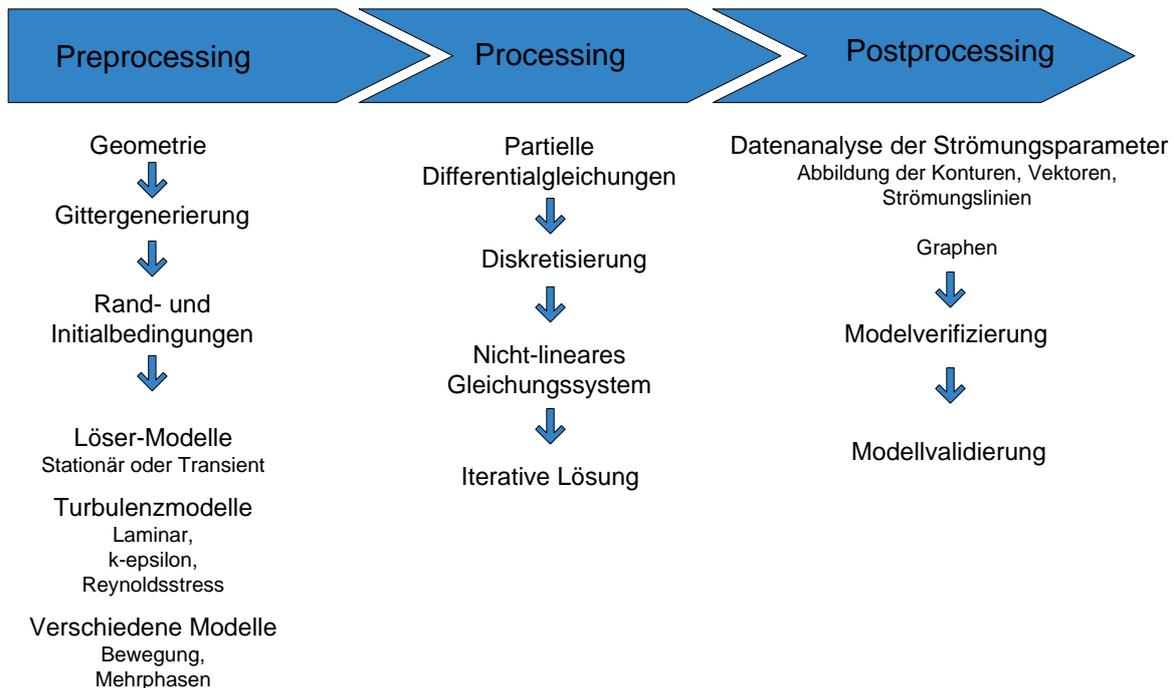


Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Durchführung von CFD Untersuchungen (modifiziert nach [53]).

Aufgrund der hochauflösenden Betrachtungsweise der CFD wird eine Vielzahl an Informationen generiert, die in 2- und 3- dimensionaler Form dargestellt werden können (Abbildung 5, post-processing). Eine erste Modellevaluierung erfolgt auf Basis der erhaltenen, physikalischen Parameter, die abschließend mittels analytischen Verfahren (Particle-Image Velocimetry (PIV)

oder Laser-Doppler Anemometrie (LDA)) validiert werden müssen (Kapitel 2.3.2.2). Untersuchungen in unterschiedlich gerührten single-use Bioreaktoren zeigen, dass die CFD zur Charakterisierung des Strömungsverhaltens und zur Bestimmung der zeitlich und örtlich abhängigen Geschwindigkeitsverteilung genutzt wird [11, 15, 31, 39, 77, 78, 179, 222]. In Zellkulturbioreaktoren kommen überwiegend axialfördernde Segmentblatt-, Schrägblatt- und/oder Marine-Rührer aber auch radialfördernde Rushton Turbinen zum Einsatz [142, 189]. Auch die Leistungscharakteristik und der spezifische Leistungseintrag werden bei einer numerischen Beschreibung berücksichtigt. Zusätzlich zu den gerührten single-use Bioreaktoren sind erste Charakterisierungsansätze der Fluidströmung im L-Maßstab für wellendurchmischte [3, 88, 223], rotatorisch oszillierende [42, 43], orbital geschüttelte [26], pneumatisch [53, 129] und mittels vibrierender Scheibe angetriebene Bioreaktoren [53, 112, 153] vorhanden. Im mL-Maßstab wird vor allem die Strömungs- und Oberflächenausprägung des Fluides in Schüttelkolben [224] TubeSpin [119] und Mikrotiterplatten [225] betrachtet, da diese Bioreaktorsysteme im Bereich der Inokulumproduktion und bei Screening-Versuchen umfangreich genutzt werden. Die numerischen Untersuchungen der aufgezeigten single-use Bioreaktoren werden in Abhängigkeit unterschiedlicher Betriebsparameter (Kippwinkel, Kipptrate, Schüttelrate, Frequenz, Auslenkung) gesetzt, um aussagekräftige Resultate hinsichtlich der Belastung von Zellkulturen zu erhalten.

Hierfür wird die lokale Betrachtung der lokalen spezifischen Energiedissipation (ϵ_{lok}) herangezogen, die ein wichtiger Parameter für die mechanische Belastung von Zellen darstellt und mittels CFD in jedem Kontrollvolumen bestimmt werden kann. Diese Größe wird für die Bestimmung des Kolmogorov'schen Längenmaßstabes genutzt (Gleichung 20) und gibt im Gegensatz zu Gleichung 7 nicht den globalen, sondern den örtlich und zeitlich abhängigen Längenmaßstab an. Der turbulente Mikromaßstab definiert die Größe der kleinsten turbulenten Wirbel, die bei annähernd identischer Größe verglichen zu einem biologischen System ($\lambda / d_x \approx 1$) eine Schädigung von Zellen verursachen [155, 226-229]. Gerade bei Kultivierungen sensibler Zellen, wie mesenchymalen Stammzellen (hMSC) oder CHO-Zellen, wird der Kolmogorov'sche Wirbelmaßstab bei der Auslegung der Kultivierungsparameter berücksichtigt [11, 15, 31, 78, 230], obwohl dieser die physikalischen Eigenschaften der Zellen nicht berücksichtigt und die Gültigkeit der Theorie nicht bewiesen ist [142, 189].

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\epsilon_{lok}} \right)^{1/4}$$

Gleichung 20

Ein weiterer Ansatz der Rückschlüsse der Fluidströmung auf ein biologisches System erlaubt, ist die Betrachtung der Geschwindigkeitsgradienten [129, 231]. Hierfür zeigen Untersuchungen verschiedenster Autoren den Einfluss von Normal- und Schergradienten (γ_{nn} und γ_{nt}) auf Zellen [232]. Mittels CFD ist eine separate Betrachtung der Normal- und Schergradienten nicht nur in (single-use) Bioreaktoren [11, 15, 159, 233], sondern auch in Pumpen möglich [234], die in Anlehnung an die von Wollny, 2010 aufgezeigte Koordinatentransformation des Scherbeanspruchungstensors hin zu einem lokalen Koordinatensystem erfolgt [159]. Die ursprünglichen richtungsbezogenen Geschwindigkeiten ($\overline{u_x}, \overline{u_y}, \overline{u_z}$) werden durch eine Transformationsmatrix in die lokalen Geschwindigkeiten ($\widetilde{u_x}, \widetilde{u_y}, \widetilde{u_z}$) überführt und können für die Berechnung der Normal- (Gleichung 21) und Schergradienten (Gleichung 22) herangezogen werden.

$$\gamma_{nn} = \sqrt{2 * \left(\frac{\partial \bar{u}_x}{\partial \bar{x}}\right)^2}$$

Gleichung 21

$$\gamma_{nt} = \sqrt{\left(\frac{\partial \bar{u}_x}{\partial \bar{y}} + \frac{\partial \bar{u}_y}{\partial \bar{x}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \bar{u}_x}{\partial \bar{z}} + \frac{\partial \bar{u}_z}{\partial \bar{x}}\right)^2}$$

Gleichung 22

In den von Wollny, 2010 untersuchten radial- und axialfördernden Bioreaktoren ist eine Dominanz der Schergradienten festzustellen, was für gerührte single-use Bioreaktoren bestätigt werden konnte [11, 15, 159]. Der Vergleich beider Rührertypen zeigt zusätzlich eine höhere Scherbeanspruchung von axialfördernden Rührer bei gleichem spezifischem Leistungseintrag auf. Die Normal- und Richtungsgradienten nehmen einen geringen Anteil der Geschwindigkeitsgradienten in (single-use) Bioreaktoren ein und können resultierend vernachlässigt werden [11, 15, 78]. Aufgrund der Berechnung der lokalen Schergradienten in jedem Kontrollvolumen ist eine Berücksichtigung der Verteilung der Gradienten mit ihren korrespondierenden Volumen gegeben [11, 15, 78, 234]. Neben der Betrachtung der maximalen Werte sind vor allem die medianen Schergeschwindigkeiten von Interesse, da deren volumenbezogener Anteil in einem Bioreaktor überwiegt und sich die Zellen im Verlauf einer Kultivierung in diesem befinden. Für die Geschwindigkeitsgradienten wird einen kritischer Bereich zwischen $1 - 3 \times 10^5$ 1/s angegeben [155], bei dem bereits ein Zelltod zu erwarten ist. Ab einem Bereich von 500 bis 5000 1/s muss mit physiologischen Effekten gerechnet werden, die die Änderung der Morphologie, der Wachstumscharakteristik, der Produktbildungs- oder Substratverbrauchsrate zur Folge haben [235].

Mischzeitbestimmung

Die numerische Bestimmung der Mischzeit basiert auf einem stationär ermittelten Strömungsfeld, in dem nachfolgend und einzig die transiente Verteilung eines inerten Tracers ermittelt wird. Die hierfür genutzte Transportgleichung der Diffusion und der Tracer-Verteilung ist in Gleichung 23 und Gleichung 24 aufgeführt und berücksichtigt den Massenanteil (β_T) und den Diffusionskoeffizienten (D_{eff}) des Tracers. Letzteres setzt sich aus dem molekularen Diffusionskoeffizienten (D_m) und der turbulenten Viskosität (η_t) zusammen.

$$\frac{\partial(\rho * \beta_T)}{\partial t} + \nabla * (\rho * \bar{\mathbf{u}} * \beta_T) = -\nabla * (\rho * D_{eff} * \nabla \beta_T)$$

Gleichung 23

$$D_{eff} = D_m + \frac{\eta_t}{Sc}$$

Gleichung 24

Die numerische Bestimmung der Mischzeit entspricht der Herangehensweise der experimentellen Methoden (Kapitel 2.3.1.2) und kann über eine punktuelle (entspricht der Sondenmethode) oder volumenintegrale Betrachtung (entspricht der Farbumschlagmethode) erfolgen. Der große Vorteil des numerischen Ansatzes ist die Nutzung aller Kontrollvolumina,

die als „Sonden“ zur Verfügung stehen, wodurch eine hochauflösende Mischzeitbestimmung realisiert wird.

Während in herkömmlichen Bioreaktoren für diverse Rührertypen die numerische Betrachtung der Mischzeit erfolgt [166, 171, 236-238], wird dieser Ansatz für single-use Bioreaktoren bisher selten genutzt. Numerische Untersuchungen im Labormaßstab zeigen für einen Prototypen des UniVessel® SU [15] und den etablierten 3 L Mobius CellReady 2 L [39, 53] Mischzeiten von unter 10 s bei zellkulturtypischen Leistungseinträgen und einem Arbeitsvolumen von 2 L. Im 50 L Maßstab hingegen ist eine homogene Verteilung zwischen 40 und 10 s für den S.U.B. und den BIOSTAT® STR 50 L zu beobachten [11, 15, 179, 239]. Bei geringen Rührerumfangsgeschwindigkeiten und in den 2 L Maßstäben zeigen die verwendeten k - ε Turbulenzmodelle jedoch eine Überbewertung des normierten Massenanteiles des Tracers auf, die nach Min und Gao, 2006 sowie Jahoda *et al.*, 2007 auf die RANS-Ansätze und auf die Unterbewertung der turbulenten Schwankungsgeschwindigkeit zurückzuführen sind [240, 241]. Die numerischen Untersuchungen in den aufgeführten single-use Bioreaktoren stimmen jedoch gut mit den experimentellen Werten und mit denen konventioneller Zellkulturbioreaktorsysteme überein.

Energiedissipation

Ein neuartiger Ansatz für einen Vergleich von single-use Bioreaktoren wird von [26, 41, 153] aufgezeigt, der die Verteilung des relativen Volumens der Gitterzellen als Funktion der spezifischen turbulenten Energiedissipation umfasst. Der Vergleich unterschiedlichster Bioreaktoren erfolgt auf Basis des Anstieges der lokalen Energiedissipation, der bei einer vorliegenden homogenen Verteilung umso steiler ist. Bei Vergleichsuntersuchungen im BIOSTAT® RM (2 und 200 L Maßstab) ist eine homogenere Verteilung der Energiedissipation zu beobachten, verglichen mit dem single-use Vibromix Bioreaktor und einem gerührten, konventionellen 2 L Bioreaktorsystem mit Rushton Turbine bzw. Paddelrührer [26, 53, 153, 182]. Die Betrachtung der Energiedissipation ist jedoch nur möglich, wenn die Gitterabhängigkeit der Energiedissipation ausgeschlossen werden kann. Bei einer Maßstabsübertragung ist dieser Ansatz kaum anwendbar, da mit zunehmendem Arbeitsvolumen um das 1000-fache (bspw. von 2 auf 2000 L) die Anzahl der Gitterzellen äquivalent ansteigen muss.

Volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient ($k_L a$)

Die numerische Beschreibung von mehrphasigen Prozessen ist mittels Euler-Euler oder Euler-Lagrange-Ansatz möglich und führt aufgrund der Berücksichtigung weiterer Phasen in den Erhaltungsgleichungen zu einer Zunahme des rechnerischen Aufwandes. Die Erhaltungsgleichung der Masse ist in Gleichung 25 unter Berücksichtigung der Phase aufgeführt. Zusätzlich werden die Interaktionen der einzelnen Phasen zueinander in die Impulsgleichungen (Gleichung 26) integriert. Hierbei repräsentiert k die jeweilige flüssige oder gasförmige Phase mit dem dazugehörigen Phasenanteil (α_k) [217, 218, 220, 242, 243].

$$\frac{\partial(\alpha_k \rho_k)}{\partial t} + \nabla(\alpha_k \rho_k \vec{u}_k) = 0$$

Gleichung 25

$$\frac{\partial(\alpha_k \rho_k \bar{u}_k)}{\partial t} + \nabla(\alpha_k \rho_k \bar{u}_k * \bar{u}_k) = \nabla * \bar{\tau} - \alpha_k * \nabla p + \alpha_k * \bar{g} * \rho_k + \bar{F}_k + \bar{R}_k$$

Gleichung 26

In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wird dieser Ansatz für die Beschreibung des mehrphasigen Systems in herkömmlichen Bioreaktoren oder Blasensäulen genutzt, der zusätzlich auch die Verwendung von Modellen für Gasblasenkoaleszenz und -bruch umfasst [244-254]. In single-use Bioreaktoren hingegen werden Vereinfachungen angenommen, bei denen, ausgehend von einem koaleszenzhemmenden Zellkulturmedium und der zu geringen eingetragenen Leistung, eine Koaleszenz und ein Bruch der Gasblasen vernachlässigt werden kann. Der numerischen Bestimmung des k_L wird die Higby'sche Penetrationstheorie zugrunde gelegt, die über die turbulente Dissipationsrate (ε) zu berechnen ist [244, 246, 255] und die Erneuerungsrate der Gasblasenoberfläche repräsentiert. Zusätzlich wird bei der Bestimmung der spezifischen Gasblasenoberfläche (a) von einem konstanten Gasblasendurchmesser (d_B) ausgegangen, was resultierend eine örtliche Betrachtung des $k_L a$ nach Gleichung 27 mit dem Diffusionskoeffizienten (D_{O_2}) zulässt.

$$k_L * a = \left[\frac{2}{\sqrt{\pi}} * \sqrt{D_{O_2}} * \left(\frac{\varepsilon * \rho_L}{\mu_L} \right)^{0.25} \right] * \left[\frac{6 * \alpha_G}{d_B} \right]$$

Gleichung 27

Übereinstimmende experimentelle und numerische Ergebnisse konnten in unterschiedlichen single-use Bioreaktoren mit Arbeitsvolumen bis 2 L und variierendem Gasvolumenstrom sowie Leistungseintrag trotz umfangreichen Vereinfachungen nachgewiesen werden [11, 15, 39]. Ein Vergleich des begasteten und des unbegasteten Strömungsfeldes ergab lediglich im Rührernachlauf und in unmittelbarer Nähe zur Rührerwelle minimale Abweichungen der Fluidgeschwindigkeiten und -strömung. Das ist auf die geringen Begasungsraten zurückzuführen und bestätigt Untersuchungen von [171]. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass in den single-use Bioreaktoren ein konstanter Gasblasendurchmesser von 0.4 mm (Mobius CellReady) und von 1 mm (UniVessel® SU) verwendet wurde, bei dem von kugelförmigen Gasblasen auszugehen ist [247]. Bei Blasendurchmessern grösser 3 mm muss eine Anpassung für die Berechnung der spezifischen Phasengrenzfläche erfolgen.

2.3.2.2 Strömungsverhalten

Die Bestimmung des Strömungsverhaltens basiert auf der traditionellen Charakterisierung von Rührern in herkömmlichen Edelstahl- oder Glasbioreaktoren. In Abhängigkeit des Rührertypes sind drei Strömungsformen bekannt. Ein radiales Strömungsverhalten wird durch Rushton Turbinen induziert [180], wohingegen *Elephant ear*-, Marine-, Segment-, Schrägblatt-Rührer ein axiales Strömungsprofil erzeugen [17]. Diese Rührertypen werden vorwiegend für Newton'sche und mittelviskose Fluide genutzt, wie sie in zellkulturbasierenden Prozessen vorliegen. Bei hochviskosen Fluiden werden vorzugsweise Ankerrührer mit ihrer tangentialen Strömungsform genutzt.

Eine Bestimmung des Strömungsverhaltens ist mittels der nicht-invasiven Laser-Doppler Anemometrie (LDA) und Particle Image Velocimetry (PIV) oder der invasiven Hitzedraht-Anemometrie (HWA) möglich. Zusätzlich erlauben diese Methoden eine Betrachtung der Fluidgeschwindigkeiten, weshalb sie auch für eine Beurteilung numerisch ermittelter Strömungen herangezogen werden können. Im Gegensatz zu herkömmlichen Bioreaktoren oder Blasensäulen werden berührungslose LDA oder PIV-Methoden kaum für die Strömungscharakterisierung in single-use Bioreaktoren genutzt [48]. Grund hierfür ist die benötigte optische Zugänglichkeit in das Fluid, die nur in rigiden single-use Systemen gegeben ist. Für Bag-Bioreaktoren wird hingegen ein Ersatzmodell (aus Glas oder Plexiglas) mit identischen geometrischen Dimensionen benötigt, bei dem die formgebenden Falten des Bags vernachlässigt werden müssen [40]. Im Gegensatz dazu wird für die HWA kein optischer Zugang benötigt, jedoch muss hier eine Sonde in das Fluid eingebracht werden, was rückwirkend Änderungen der Fluidströmung bewirkt.

In gerührten single-use Bioreaktoren überwiegen die axialfördernden Segmentblatt-, Marine- und Schrägblattrührer [39, 78, 142, 189] und werden einzeln oder in zweistufigen Rührerkonfigurationen verwendet. Im BIOSTAT® STR wird neben dem Segmentblatt-Rührer auch eine radialfördernde Rushton Turbine für den Leistungseintrag genutzt [11], deren Strömungsverhalten und Fluidgeschwindigkeit detailliert in Kapitel 4.2.1. diskutiert werden. Auch der axialfördernde und exzentrisch eingebaute Schrägblattrührer des S.U.B. wird nachfolgend in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

Bei der Vielzahl an gerührten single-use Systemen spielt die Identifizierung der Strömungsform eine untergeordnete Rolle, da die eingesetzten Rührer auf konventionellen Rührertypen basieren und keine Neuentwicklung darstellen. Einzig in Spinner-Flaschen beschreibt [222] anhand numerischer und experimenteller PIV Versuche eine Ausprägung eines tangentialen Strömungsprofils mit übereinstimmenden Strömungsgeschwindigkeiten beider Untersuchungsansätze. Hingegen weisen die single-use Bioreaktoren mit ihren unterschiedlichen Arten des Leistungseintrages sowohl bekannte (axiale und radiale) als auch neuartige Strömungsformen auf. Im Vibromix Bioreactor konnte durch numerische und auch experimentelle (LDA/PIV) Untersuchungen eine axiale Strömungsform und übereinstimmende Strömungsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Scheibengeometrien festgestellt werden [48, 112]. Im NucleoBioreactor wird durch die taumelnde Bewegung eines Paddels eine quasi-tangentiale Strömung mittels 3D-PIV ermittelt [256]. In wellendurchmischten single-use Bioreaktoren zeigten Vergleichsuntersuchungen (mittels HWA) übereinstimmende experimentelle und numerischen Fluidgeschwindigkeiten an unterschiedlichsten Positionen und Eintauchtiefen [257].

Werden die Methoden der PIV, LDA oder HWA für eine Validierung numerischer Strömungen herangezogen, erfolgt diese ausschließlich über die visuelle Betrachtung des Strömungsverhaltens und der Geschwindigkeiten. Zudem werden Strömungsprofile der Geschwindigkeiten genutzt, um mit (dimensionslosen) Koordinaten eine detaillierte Betrachtung vorzunehmen und einen Vergleich zu gewährleisten [78, 106]. Weitere Validierungsansätze zwischen numerischen und experimentellen Resultaten können durch die Berechnung der prozentualen Abweichung [258, 259] oder der relativen Diskrepanz [260, 261] erfolgen. Jedoch sind für diese Ansätze keine eindeutigen Grenzwerte definiert, die eine Validierung zulassen oder ausschließen. Folglich wird für die Validierung der numerischen Ergebnisse (Kapitel 4.2) die visuelle und prozentuale Auswertung genutzt.

2.4 Scale-up von single-use Bioreaktoren

In der biopharmazeutischen Industrie muss der Transfer eines Kultivierungsprozesses vom Labor- hin zum Produktionsmaßstab gewährleistet werden [262]. Die herkömmliche Maßstabsübertragung eines Kultivierungsprozesses basiert auf der geometrischen Ähnlichkeit [17, 168, 263] und verfahrenstechnischen Kenndaten der Bioreaktoren. Bis auf die wellendurchmischen Systeme (BIOSTAT® RM oder Cellbag Bioreaktor) ist eine geometrische Ähnlichkeit bei den jeweiligen Anbietern für (single-use) Bioreaktoren gegeben, da bei der Maßstabsvergrößerung der Bioreaktorsysteme die Dimensionsverhältnisse von Rührer- und Reaktordurchmesser und Einbau- und Fluidhöhen vorzugsweise konstant sind (Kapitel 3.1; Tabelle 2). Zur Ermittlung der verfahrenstechnischen Kenndaten ist die Charakterisierung in Bezug auf die Rührerdrehzahl (nur in gerührten und geschüttelten Bioreaktoren), den spezifischen Leistungseintrag, die Schergradienten, den Kolmogorov'schen Längenmaßstab, die Gasleerrohrgeschwindigkeit bzw. volumenbezogene Begasungsrate, den volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizient und die Mischzeit notwendig [168, 264, 265]. Für mikrobielle Fermentationen ist zusätzlich die Wärmeaustauschfläche bei der Maßstabsübertragung zu berücksichtigen [142]. Alle aufgeführten Parameter werden als Scale-up/Scale-down Kriterien in der Biotechnologie genutzt.

Bei der Maßstabsübertragung ist ein gleichzeitiges Konstanthalten aller Kenngrößen jedoch nicht möglich [47, 168, 252]. Daher wird zumeist ein einzelner Parameter für ein Scale-up verwendet, wodurch die Übrigen beeinflusst und abgeändert werden. Deshalb muss der Parameter mit dem größten Einfluss auf den Prozess (wie beispielsweise k_{La} , spezifischer Leistungseintrag, Mischzeit) identifiziert und über alle Maßstäbe konstant gehalten werden [18]. Von einer konstanten Rotation des Rührers [17] und dessen Umfangsgeschwindigkeit wird jedoch abgeraten, da diese bei einer Maßstabsvergrößerung sehr geringe Rührerumdrehungen liefert [47]. Nach Euzen *et al.*, 2009 besitzt der P/V den größten Einfluss auf die Massen- und Stofftransferparameter [266] und stellt mit den Büche-Theorem einen erfolgreichen Kompromiss für einen erfolgreichen Scale-up dar [17]. Hieraus resultiert unter turbulenten Strömungsbedingungen eine Erhöhung der Mischzeit. Vor allem in größeren Maßstäben führt eine inhomogene Durchmischung infolge der lokalen Hydrodynamik zur Ausbildung von pH- und Nährstoffgradienten [190] und somit zu einem verminderten Zellwachstum und einer verminderten Produktbildung [267, 268]. Zusätzlich ist die Proportionalität zum maximalen, lokalen Energieeintrag (ϵ_{max}) gegeben, die überwiegend in Bezug zu der auftretenden mechanischen Beanspruchung gesetzt wird (Gleichung 28). Bis auf [265] werden die Geschwindigkeitsgradienten und der Kolmogorov'sche Längenmaßstab zumeist bei einem Scale-up/Scale-down nicht betrachtet. Auch im Hinblick auf die Kultivierung scherempfindlicher tierischer Zellen spielen die hydrodynamischen Eigenschaften durch die Verwendung von oberflächenaktiven Stoffen (bspw. Pluronic F68) nur eine untergeordnete Rolle [142].

$$\frac{P}{V} \approx \epsilon_{max} \approx \frac{u_{Tip}^3}{d}$$

Gleichung 28

Wird eine konstante Mischzeit angestrebt [269], führt diese beim Scale-up zu erhöhten spezifischen Leistungseinträgen (Gleichung 29) [18, 270]. Die resultierende Zunahme der mechanischen Beanspruchung kann zu einer verminderten Zellexpansion und Produktbildung bei der Kultivierung von tierischen oder humanen Zellen führen.

$$\theta_m \propto \left(\frac{P}{V}\right)^{-1/3}$$

Gleichung 29

Für die Betrachtung der Mischzeit wird nach Nienow, 1997 und Nienow, 2006 der spezifische Leistungseintrag mit der Reaktorgeometrie in Bezug zur Mischzeit gesetzt und ist mit Gleichung 30 zu beschreiben [142, 188]. Der Proportionalitätsfaktor wird mit 5.9 angegeben [142, 189].

$$\theta_m = B * \left(\frac{P}{V}\right)^{-1/3} * \left(\frac{d}{D}\right)^{-1/3} * \left(\frac{H}{d}\right)^{2.43} * D^{2/3}$$

Gleichung 30

Ein weiterer, für die Maßstabsübertragung genutzter, Parameter ist der Sauerstofftransfer in aeroben Prozessen. Tierische Zellen besitzen im Vergleich mit Hefen oder Bakterien eine geringere Stoffwechselrate und einen verminderten Sauerstoffbedarf. Vor allem in Hochzellichteprozessen mit Säugerzellen (Lebendzellzahlen größer 1×10^7 Zellen/mL) kann jedoch der mangelnde Sauerstofftransfer zu Limitationen im Stoffwechselweg führen [271]. Zusätzlich steigt bei einer Blasenbegasung das Risiko der Zellzerstörung durch das Platzen von Gasblasen [155, 272-274], welches mit steigendem Blasendurchmesser zunimmt [156]. Gegenteiliges zeigen Boulton-Stone und Blake, 1993, die eine Zunahme der Zellzerstörung bei kleineren Gasblasen nachweisen [275]. Um die mechanischen Beanspruchungen platzender Gasblasen zu minimieren, ist infolge des geringer gewählten Gaseintrages zusätzlich mit Sauerstofflimitationen zu rechnen. Aus diesem Grund werden in größeren Maßstäben vorwiegend Ringsparger oder Mikrosparger eingebaut, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff zu gewährleisten [276, 277]. Eine schonende blasenfreie Begasung über die Oberfläche ist bei Hochzellichteprozessen nicht ausreichend [163] bzw. über eine Membranbegasung durch die Prozesskomplexität, der nötigen Membranfläche oder die Änderung der Membraneigenschaften über den Prozessverlauf nachteilig [162, 163, 278]. Da mit zunehmendem Volumen (bspw. 1 L auf 1000 L) die mechanische Beanspruchung um den Faktor 10 minimiert wird [162, 163] wird bei einer Maßstabsübertragung der Fokus auf den volumenbezogenen Sauerstofftransferkoeffizienten gelegt [45, 127, 128, 279, 280].

Die unterschiedlichen Herangehensweisen zur Maßstabsübertragung zeigen die Schwierigkeit des Scale-up/Scale-down für zellkulturbasierende Prozesse auf. In Bioreaktoren treten lokale Regionen mit hohen Energiedissipationen auf, deren lokale Strömung abhängig von der Reaktorgeometrie und den Betriebsparametern ist. Diese werden überwiegend durch globale Ansätze beschrieben, die keine adäquate Beschreibung zulassen. Hierfür sind örtlich aufgelöste Informationen durch experimentelle Techniken [265] und numerische Methoden notwendig, die für Untersuchungen zur Maßstabsübertragung herangezogen werden [281].

Zusätzlich zu der lokalen Strömung ist bei einer Maßstabsübertragung auf das biologische System zu achten, welches auf externe Einflüsse mit der Änderung der Morphologie, der Proliferation, der Differenzierung, des Metabolismus oder mit dem Zelltod reagieren kann [282]. Dieser biologische Effekt ist zusätzlich abhängig von den Eigenschaften des Kulturmediums

(Metabolitkonzentration, Viskosität, Sauerstoffsättigung, Additive, etc.) und ist abhängig vom Zelltyp, Zelllinie und deren Eigenschaften (Ursprung, Alter, Anzahl der Subkultur) [39, 283, 284]. Aufgrund der Komplexität des Zellmechanismus und der variierenden Faktoren, die in der Literatur beschrieben werden, ist eine generelle, zellbasierende Aussage für eine adäquate Maßstabsübertragung kaum möglich. Jedoch zeigt sich, dass eine minimale Leistung eingetragen werden sollte, die eine ausreichende Durchmischung erlaubt und eine Zellsedimentation, Sauerstofflimitation und Inhomogenitäten unterbindet.

3 Methodik

Im Folgenden wird Methodik dargestellt, die sowohl die Beschreibung der genutzten single-use Bioreaktoren und deren experimentelle und numerische Charakterisierung als auch den numerisch durchgeführten Scale-up umfasst. Des Weiteren wird der Kultivierungsprozess der CHO-XM 111-10 Zelllinie mit induzierbarer Produktbildung in unterschiedlichen Maßstäben vorgestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die nachfolgend aufgeführten Kapitel der Methodik den jeweiligen Fallstudien (Kapitel 4) zugeordnet.

3.1 Single-use Bioreaktoren

Die in dieser Arbeit angewandte Nomenklatur für die verwendeten gerührten single-use Bioreaktoren ist der Abbildung 6 zu entnehmen. Die Angaben zu den Reaktor- und Flüssigkeitsabmessungen sind mit Großbuchstaben (H_{BR} , D , etc.) sowie die zum Rührer mit Kleinbuchstaben (d , w , etc.) versehen (Tabelle 2). Bei mehreren Rührern bezeichnet das Indizes 1 den unteren und 2 den oberen Rührer. Anhand des in Abbildung 6 aufgeführten kartesischen Koordinatensystems beschreibt die y -Achse die Reaktorhöhe. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist jedoch das Koordinatensystem links von den Reaktoren dargestellt, wobei der Koordinatenursprung immer im Mittelpunkt der Reaktorböden definiert ist (Abbildung 6).

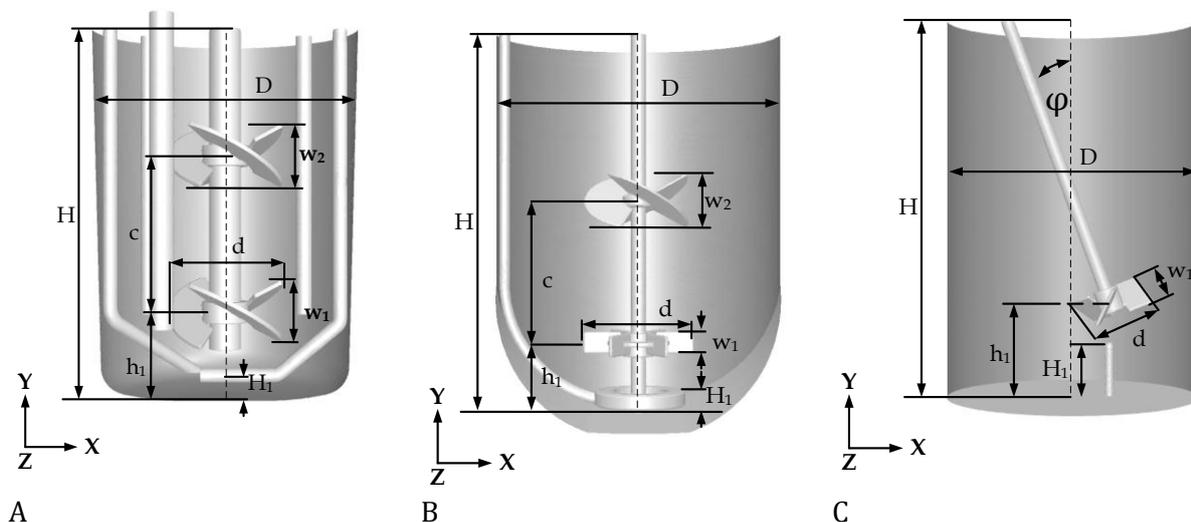


Abbildung 6: CFD-Darstellung des UniVessel® SU, des BIOSTAT® STR (RT x SBI) 50 L und des S.U.B. 50 L mit der jeweiligen Symbolik für die Bemaßung (Tabelle 2). Die Reaktorhöhen repräsentieren die Fluidhöhe bei maximalem Arbeitsvolumen.

Tabelle 2: Übersicht der geometrischen Dimensionen des UniVessel® SU, der BIOSTAT® STR-Reihe und der S.U.B.-Reihe.

			UniVessel® SU	BIOSTAT® STR				S.U.B.			
Arbeitsvolumen [L]	min.	V	0.6	12.5	50	125	250	25	125	500	1000
	max.		2	50	200	500	1000	50	250	1000	2000
Rührerdurchmesser [mm]		d	53	143*; **	225*; **	310*; **	379*; **	117	200	321	398
Reaktor-durchmesser [mm]		D	122	370	585	815	997	349	597	959	1194
Flüssigkeitshöhe [mm]		H	180	480	783	1005	1360	521	914	1422	1787
Rührerabstand [mm]		c	70	186	300	403	493	-	-	-	
Rührereinbauhöhe [mm]		h ₁	49	90	142	195	239	117	200	321	398
Rührerwinkel (zum Lot) [°]		φ	0	0	0	0	0	19	19	19	19
Verhältnisse		d/D	0.43	0.39	0.38	0.38	0.38	0.33	0.33	0.33	0.33
		d/H	0.29	0.30	0.29	0.31	0.28	0.22	0.22	0.23	0.22
		H/D	1.48	1.30	1.34	1.23	1.36	1.49	1.53	1.48	1.50
		c/d	1.32	1.30	1.33		1.30	-	-	-	-
		h ₁ /d	0.92	0.63	0.63		0.63	1.00	1.00	1.00	1.00
		w ₁ /d	0.19*	0.48* / 0.19**	0.48* / 0.19**	0.48* / 0.19**	0.48* / 0.19**	0.14	0.14	0.14	0.14
		w ₂ /d	0.19*	0.19	0.19	0.19	0.19	-	-	-	-

* Segmentblatt-Rührer; ** Rushton Turbine

3.1.1 UniVessel® SU

Der UniVessel® SU (Sartorius Stedim Biotech) besteht aus einem rigiden Kunststoffbehälter und muss nicht in ein formgebendes Gehäuse eingebracht werden (Abbildung 7; A und B). Der Durchmesser des zylindrischen Behälters (D) steigt aufgrund des Herstellungsprozesses mit zunehmender Höhe von 118 auf 126 mm. Die konisch geformte Reaktorwand bietet ohne die Temperaturmanschette eine optische Zugänglichkeit zur Flüssigkeit. Der UniVessel® SU ist standardmäßig mit zwei Segmentblatt-Rührern ausgestattet, die bei einem Anstellwinkel von 30 ° einen Durchmesser (d) von 55 mm besitzen und in einem Abstand von 70 mm angebracht sind (Tabelle 2; Abbildung 7; C). Das minimale Arbeitsvolumen von 0.6 L wird durch die Rührerposition des unteren Rührers bestimmt. Die eingebauten optischen Sensoren für pH und pO₂ können für die computerbasierte Konstruktion vernachlässigt werden. Das Verhältnis von maximaler Flüssigkeitshöhe und Reaktordurchmesser (H/D) beträgt 1.3 und ermöglicht ein maximales Arbeitsvolumen von 2 L (Tabelle 2) [11]. Da im UniVessel® SU zusätzlich konventionelle Sonden verwendet werden können, die im Rahmen der experimentellen, verfahrenstechnischen Charakterisierung genutzt wurden, werden diese bei der computerbasierten Konstruktion berücksichtigt. Des Weiteren werden der Sparger und die unterschiedlichen Ernte- und Steigrohre integriert.

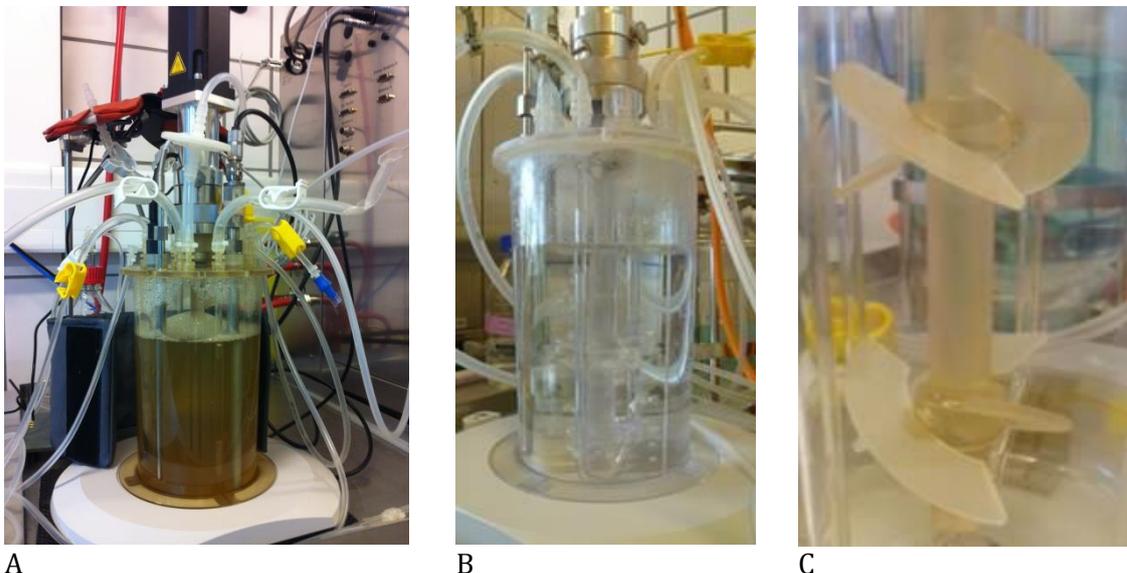


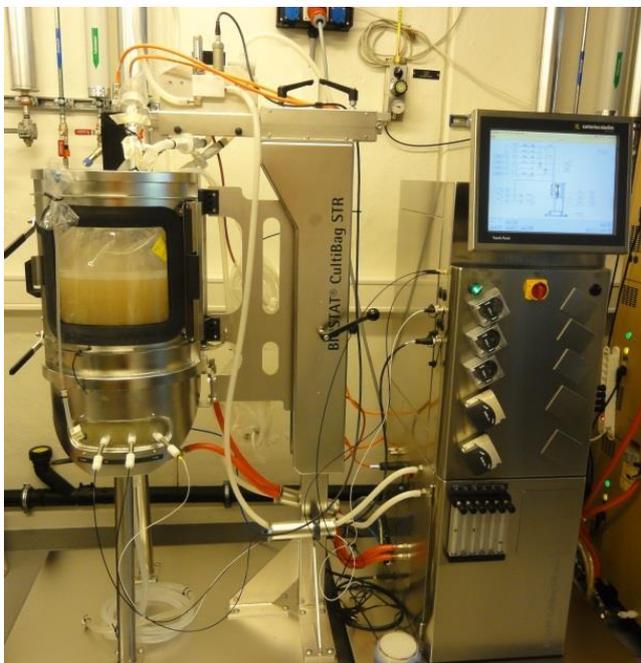
Abbildung 7: Der UniVessel® SU ist ein rigider single-use Bioreaktor und ist mit diversen Schläuchen für zellkulturbasierte Prozesse ausgestattet (A und B). Der Leistungseintrag erfolgt über zwei mehrstufige Segmentblatt-Rührer (SBI; C).

3.1.2 BIOSTAT® STR

Der zweite single-use Bioreaktor von Sartorius Stedim Biotech (Abbildung 8; A) ist ein flexibler 3-D Bag-Bioreaktor, der in einen formgebenden Edelstahl-Container eingespannt werden muss. Über den Containerboden erfolgt die Temperierung des Mediums mittels Doppelmantel oder Heizmatten. Der zylindrische Teil des Bioreaktors wird durch zwei halbkreisförmige Türen

gebildet, durch die einfache Installation des Kultivierungs-Beutel und eine Betrachtung des Fluides bei maximalen Arbeitsvolumina (nur bis zu einem Arbeitsvolumen von 200 L empfohlen) realisiert werden kann (Abbildung 8; B). Der 3-D Bag, der Edelstahlcontainer und die Steuerung werden zusammengefasst als BIOSTAT® STR bezeichnet. Wird hingegen nur das Kultivierungsgefäß, der 3-D Bag, beschrieben, wird vom CultiBag® STR gesprochen.

Im BIOSTAT® STR sind standardmäßig zwei Rührerkonfigurationen kommerziell erhältlich, wobei zwischen einer Rushton Turbine (RT) und einem Segmentblatt-Rührer (SBI) oder zwei Segmentblatt-Rührern gewählt werden kann. Die Rührerwelle ist an der Ober- und Unterseite des Bags fixiert und wird über eine Magnetkupplung zwischen Antrieb und Welle in Bewegung gesetzt. Abhängig von der Rührerkonfiguration beträgt der Rührerdurchmesser 143, 225, 310 und 379 mm für die jeweiligen maximalen Arbeitsvolumen von 50, 200, 500 und 1000 L (Tabelle 2). Vergleichend mit dem UniVessel® SU weisen die Verhältnisse der BIOSTAT® STR-Reihe (d/D, H/D, c/d) eine geometrisch ähnliche Reaktorkonstruktion auf. Bis auf einen Tauchschlauch, den am Boden integrierten Sparger, der gleichzeitig zur Fixierung der Welle genutzt wird, und dessen Schlauchanbindung sind im Fluidraum keine weiteren Elemente im BIOSTAT® STR vorhanden. Der Bag ist zusätzlich mit diversen Schläuchen, für den Inokulum- und Fluidtransfer, sowie Opta-Sterilverbindungen (zur Anbindung der Sterilfilter). Für die Messung von pH und DO sind optische Sensoren im Bag und am oberen Rand des Bodens integriert. Aufgrund des vernachlässigbaren Einflusses der optischen Sensoren auf die Strömung werden diese bei den computerbasierten Konstruktionen der BIOSTAT® STR-Reihe nicht berücksichtigt. Da bei sachgerechter Installation des Bags in den Container von keiner Faltenbildung auszugehen ist, wird diese auch nicht für die Konstruktionen beachtet.



A



B

Abbildung 8: Der Bioprosesseinheit des BIOSTAT® STR 50 L besteht aus einer Steuereinheit und einem Edelstahl-Container (A), der aus im zylindrischen Teil aus zwei halbkreisförmige Türen besteht (B). In den Edelstahl-Container wird der separat erhältliche und flexible Bag integriert.

3.1.3 S.U.B.

Der S.U.B. ist ähnlich wie der BIOSTAT® STR ein flexibler 3-D Bag-Bioreaktor und muss in den aus Edelstahl gefertigten Bag-Container eingesetzt und fixiert werden. Die Temperierung des Mediums (Fluides) über den Bag-Container ist ebenfalls mittels Doppelmantel oder Heizmatte realisierbar. Oberhalb des Containers ist der Antrieb angebracht (Abbildung 9; A). Die aus Hartplastik bestehende Welle wird durch den Antrieb und die im Bag integrierte Gleitringdichtung zum Rührorgan geführt. Ein Wellenschlauch verhindert den Kontakt zwischen Rührerwelle und Fluid. Für die Messung von pH und DO können herkömmliche Sonden verwendet werden. Spezielle Kleenpak-Sterilverbindungen ermöglichen die Sterilisation der konventionellen Sonden [156] und deren sterile Kopplung am Bag (Abbildung 9; B). Der flexible Bag (Abbildung 9; C) passt sich beim Füllen der Form des Containers an, wodurch für die nachfolgenden numerischen und experimentellen Untersuchungen von einer vereinfachten S.U.B.-Geometrie ausgegangen werden kann. Die beim Einsetzen des Bags entstehenden Falten werden wieder vernachlässigt [78]. Die flexiblen Bag-Bioreaktoren sind im Maßstab von 50 bis 2000 L kommerziell erhältlich, wobei deren Durchmesser von 349 – 1194 mm den jeweiligen Containerdurchmessern entsprechen (Abbildung 6, B; Tabelle 2). Bei maximalem Arbeitsvolumen beträgt die Reaktorhöhe 1.5 D. Das um 19.6° geneigte, exzentrisch eingebaute Mischorgan ist mit einem Schrägblattrührer versehen. Der Rührerdurchmesser beträgt 0.33 D für die Maßstäbe bis 2000 L. Die drei Rührerblätter sind in einem Winkel von 45° angestellt. Der eingebaute Mikrosparger mit einer Höhe von 100 mm ist direkt unterhalb des Rührers angeordnet.

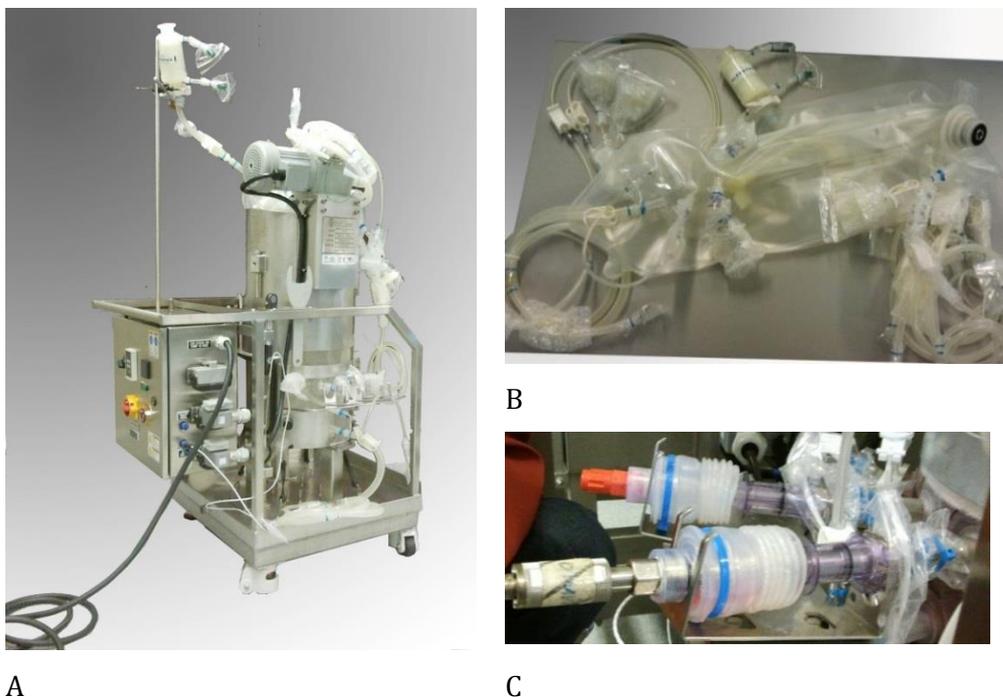


Abbildung 9: In die Bioprozesseinheit des 50 L Single-Use Bioreactor (S.U.B.) (A) wird der separat erhältliche und flexible Bag (B) integriert. Der Bag ist mit diversen Anschlüssen, sterilen Filtern, einer Gleitringdichtung sowie dem Rührorgan versehen. Eine sterile Kopplung von herkömmlichen Sonden erfolgt über spezielle Kleenpak-Verbindungen am Bag (C).

3.2 Bioreaktorcharakterisierung

Im Rahmen der Charakterisierung der single-use Bioreaktoren werden experimentelle Verfahren genutzt. Zusätzlich erfolgt die Nutzung der CFD, um die numerischen und experimentellen Resultate zu vergleichen. Abschließend wird mittels der berührungslosen Messtechnik der PIV zu Bestimmung des Strömungsverhalten und der Fluidgeschwindigkeiten der numerische Ansatz validiert.

3.2.1 Experimentelle Methoden (Fallstudie I)

Im folgenden Kapitel werden die Methoden zur experimentellen Bestimmung der verfahrenstechnischen Kenngrößen Leistungseintrag, Mischzeit und $k_L a$ detailliert beschrieben. Diese sind nachfolgend einzelnen Bioreaktorsystemen zugeordnet und deren Eignung wird bewertet. Um die notwendige Anzahl der experimentellen Versuche zu minimieren wurden die „*Design of Experiments*“ Software-Versionen STAVEX (für den S.U.B. 50 L) und VisualX-Sel (UniVessel® SU) verwendet.

3.2.1.1 Bestimmung des Leistungseintrages

Die Bestimmung des Leistungseintrages erfolgte mittels der Aufnahme des Drehmomentes. Der Drehmoment-Aufnehmer (1 Nm; HBM) wurde in die Rührerwelle des S.U.B. 50 L und des BIOSTAT® STR 50 L integriert sowie motor- und rührerseitig gelagert. Die Datenverarbeitung und -aufzeichnung erfolgte mittels eines Messverstärkers (Spider 8; HBM) und der Software CatmanEasy (Version: 5.2.2; HBM). Die Bestimmung der Leistungseinträge erfolgte ausschließlich in den aus Plexiglas bestehenden Ersatzbehältern des S.U.B. 50 L und des BIOSTAT® STR 50 L, die bis zu ihrem maximalen Arbeitsvolumen mit destilliertem Wasser gefüllt wurden. Vor jeder Messung wurde eine Kalibrierung des Nullpunktes durchgeführt. Nach Ausbildung einer Strömung wurde in Abhängigkeit der Rührerumfangsgeschwindigkeit das anliegende Drehmoment mit einer Frequenz von 2 Hz aufgenommen. Zur Ermittlung von M_d wurden die Messungen mit Luft wiederholt. Für eine statistische Genauigkeit wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und nachfolgend der Mittelwert gebildet. Die Berechnung des spezifischen Leistungseintrages erfolgt nach Gleichung 5. Im UniVessel® SU wurde keine Messung des Leistungseintrages durchgeführt.

3.2.1.2 Mischzeitbestimmung

Die Untersuchungen des Mischprozesses wurden im 50 L S.U.B. und dem BIOSTAT® STR 50 L in den dazugehörigen Kunststoffbags durchgeführt. Zur Bestimmung der Mischzeit wurde für beide Bioreaktorsysteme die Sondenmethode verwendet. Hierbei wird der Konzentrationsverlauf von Natriumchlorid mittels einer Leitfähigkeitssonde gemessen und aufgezeichnet (Anhang A). Als Mischkriterium wurde eine Mischgüte von 95% veranschlagt. Des Weiteren wurde im BIOSTAT® STR 50 L und im UniVessel® SU die Entfärbemethode (iodometrisch) verwendet [70]. Hierfür werden 1% Stärke-, 0.1 M Natriumthiosulfat- und Lugol'sche-Lösung hergestellt. Die Reaktorsysteme werden mit destilliertem Wasser gefüllt und die Rührerparameter eingestellt.

Durch die Zugabe von 0.2 vol% der Lugolsche-Lösung und 0.5 vol% der Stärkelösung wird das Fluid intensiv blau gefärbt. Nachdem die Chemikalien im Fluid homogen verteilt sind, wird 0.4 % der Natriumthiosulfat-Lösung zugegeben und die Zeit bis zur vollständigen Entfärbung der Flüssigkeit gemessen (Anhang A). Für eine Auswertung wird die Gleichung 8 herangezogen. Die Arbeitsanweisungen für beide Ansätze zur Bestimmung der Mischzeit sind dem Anhang A beigelegt.

3.2.1.3 Bestimmung des $k_{L,a}$

Die Bestimmung des volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten ($k_{L,a}$) im UniVessel® SU, BIOSTAT® STR 50 und 200 L [69] sowie S.U.B. 50 L wurde mittels der *gassing-out* Methode und unter Verwendung von herkömmlichen pO_2 Clark-Sonden (Mettler Toledo, Schweiz) durchgeführt (Anhang B). Zur korrekten Bestimmung des $k_{L,a}$ -Wertes ist eine kurze Ansprechzeit der Sauerstoffsonde erforderlich. Für die experimentelle Bestimmung der Sondenansprechzeit wurde eine Sprungantwort aufgenommen. Hierfür wurde die Sonde aus sauerstofffreier Lösung in eine mit Sauerstoff gesättigte Lösung überführt und die Änderung des Sauerstoffgehaltes über die Zeit mit der Sonde aufgenommen. 1 % PBS-Lösung wurde als Medium für die Untersuchungen verwendet. Bevor die Untersuchungen durchgeführt wurden, erfolgte die Kalibrierung der Sonde bei 0 und 100 % gelöstem Sauerstoff. Für die Untersuchungen wurde Stickstoff über das Begasungsorgan zugegeben, um den gelösten Sauerstoff auszutreiben ($pO_2 < 10 \%$). Unter Variation des spezifischen Leistungseintrages (Rührerdrehzahl), des Volumens und der Begasungsrate wurde die Änderung des gelösten Sauerstoffes gemessen und mittels der Software BORIS, LabJack aufgezeichnet. Nach Erreichen eines konstanten Sauerstoffgehaltes um 100 % wurde die Datenaufzeichnung beendet. Die logarithmierten und normierten Konzentrationen des gelösten Sauerstoffs werden als Funktion der Zeit graphisch aufgetragen. Der Anstieg der Funktion beschreibt den $k_{L,a}$ Wert, dessen Messbereich zwischen 10 bis 90 % des logarithmierten Gelöstsauerstoffes liegen sollte. Die $k_{L,a}$ -Berechnung erfolgt gemäß Gleichung 12, wobei der OUR vernachlässigt werden kann. Die Arbeitsanweisung ist dem Anhang B beigelegt

3.2.2 Numerische Untersuchungen (Fallstudie II)

Die numerischen Untersuchungen wurden mit dem kommerziell erhältlichen Softwarepaket Fluent (ANSYS, Inc.; Version 6.3 und 14) durchgeführt. Mittels des Pre-Prozessors Gambit bzw. DesignModeler (ANSYS, Inc. Version 14) wurden die Bioreaktorgeometrien (Tabelle 2) des UniVessel® SU, der BIOSTAT® STR- und der S.U.B.-Reihe konstruiert sowie der Fluidbereich mittels unstrukturierter Gittern diskretisiert. Für die hochaufgelöste Diskretisierung der Rührerzone wurden *Boundary Layer*-Funktionen genutzt. Die generierten tetraedrischen Kontrollvolumen wurden nachfolgend mittels Fluent in ca. 0.5 bis 2.5×10^6 Polyeder überführt. Die Diskretisierung des Gleichungssystems erfolgte auf Basis des *First Order Upwind* Schemas mit einer Druck-Geschwindigkeits-Kopplung über den *SIMPLE*-Algorithmus. Die Konvergenz der numerischen Simulationen wurde beim Unterschreiten der Residuen von 10^{-6} definiert.

Zusätzlich wurden für die numerische Charakterisierung Vereinfachungen definiert, die eine Beschreibung der verfahrenstechnischen Parameter bei überschaubarem Rechenaufwand gewährleisten.

- Bei der Konstruktion der flexiblen single-use Bag-Bioreaktoren wird von einer faltenfreien Geometrie ausgegangen, die den geometrischen Dimensionen der Bioprozess-Container entspricht.
- Der Kopfraum wird für die numerischen Simulationen nicht berücksichtigt.
- Die Implementierung der Rührerbewegung für die stationären Simulationen erfolgte mit Hilfe der *Multiple Reference Frames* (MRF) Methode bzw. für transiente Rechnungen über das *Sliding Mesh* Verfahren.
- Die Berechnung der Turbulenz erfolgt ausschliesslich mit Zweigleichungs-Turbulenzmodellen, die sowohl eine stabile Simulation als auch adäquate Resultate gewährleisten. Für alle Simulationen im turbulenten Strömungsbereich wurde das *standard-k- ϵ* Turbulenzmodell und für den Übergangsbereich das *k- ω* Turbulenzmodell genutzt.
- Wandfunktionen werden nicht verwendet.
- Die Ausbildung einer Trombe ist aufgrund der geringen Rührerumfangsgeschwindigkeiten zu vernachlässigen.
- Bis auf die Bestimmungen der k_{La} -Werte werden die Simulationen einphasig mit Wasser unter Standardbedingungen durchgeführt.
- Eine weitere Phase, die die einzelnen Zellen der Zellkulturen berücksichtigt, wird nicht implementiert.
- Ein konstanter Gasblasendurchmesser am Sparger wird für die Bestimmungen der k_{La} -Werte herangezogen und mittels Euler-Euler-Verfahren berechnet.

Die Berechnung der Geschwindigkeitsgradienten erfolgt nach [159] (Gleichung 21 und Gleichung 22) und wird mittels einer *user-defined-function* eingebunden. Diese speichert zusätzlich die ermittelten Werte. Nachfolgend werden die Geschwindigkeitsgradienten in 250 Klassen eingeteilt und die erhaltene Verteilungsfunktion für die Auswertung herangezogen.

Die Kolmogorov'schen Längenmaßstäbe werden nach Gleichung 20 ermittelt und in drei unterschiedlichen Bereichen der single-use Bioreaktoren bestimmt. Die Rührerzone umfasst dazu die an den Rührer direkt anliegenden Kontrollvolumen. Hingegen wurde als Rotationszone ein Zylinder in die Geometrie implementiert, dessen Mittelpunkt im Rührermittelpunkt liegt und die Strömung nicht beeinflusst. Die Fluiddomäne umfasst den das jeweilige Arbeitsvolumen ohne die Rotationszone.

Die Simulationen des Mischprozesses basieren auf den stationären Strömungsfeldern, in denen nachfolgend die Konzentrationsverteilung eines inerten Tracers durch transiente Berechnungen ermittelt wird. Das Tracer-Volumen wurde mit 0.1 % des Reaktorvolumens veranschlagt und dessen Konzentration an unterschiedlichen Orten im Fluid aufgenommen, an denen geringe Geschwindigkeiten ersichtlich waren. Zusätzlich erfolgte hauptsächlich die Betrachtung der minimalen und maximalen Tracer-Konzentration über den gesamten Fluidbereich. Die Mischzeit wurde als die Zeit definiert, bei der an allen Punkten die gewählte Homogenität von 95 % erreicht ist. Für eine Betrachtung der Mischzeiten wurde Gleichung 8 herangezogen.

3.2.3 Validierung der numerischen Daten mittels berührungslosem Messverfahren

3.2.3.1 Particle Image Velocimetry (PIV)

Die experimentellen Untersuchungen zur Strömungsgeschwindigkeit und Fluidströmung wurden mittels der zweidimensionalen Particle-Image-Velocimetry (2-D PIV) durchgeführt (Anhang C). Hierfür wurden Reaktorersatzmodelle der flexiblen Bags aus Acrylglas angefertigt. Die Reaktoren wurden in einen quaderförmigen und mit Wasser gefüllten Glasbehälter gestellt, um Störungen durch Reflektionen des Fluides und Krümmungen des Acrylglasmodells zu minimieren (Abbildung 10; [285]). Außerdem wurden dem Reaktorinhalt Rhodamin überzogene, fluoreszierende Partikel mit einem Durchmesser von 20 – 50 μm (1002192, LaVision) zugegeben. Zu den verwendeten PIV-Komponenten (LaVision GmbH) gehören ein Nd:YAG Doppel-Puls-Laser (LM0720/1103069, LaVision), der über eine Lichtoptik die Lichtebene mit einer Wellenlänge von 532 nm erzeugt. Die Laserlichtebene wurde vertikal auf die Reaktorwelle ausgerichtet. In einem Winkel von 90° zum Laser wurde die Imager Pro X 4M Kamera (Auflösung: 2048 x 2048 Pixeln, LaVision) aufgestellt (Abbildung 10; A). Laser und Kamera wurden für die Vermessung des gesamten Behälterquerschnittes auf einer Traversierung positioniert. Synchronisation, Positionierung und die Datenauswertung sowie -verarbeitung erfolgten mittels der Software DaVis (Version: 7.2.2.283). Für die zeitaufgelösten Geschwindigkeitsuntersuchungen wurde eine Laserlichtschranke (Sick AG) verwendet (Abbildung 10; A), die beim Durchqueren eines bestimmten Rührerblattes mit der hinteren und äußeren Ecke die Laser-Kamera-Synchronisation auslöst (Abbildung 10; B).

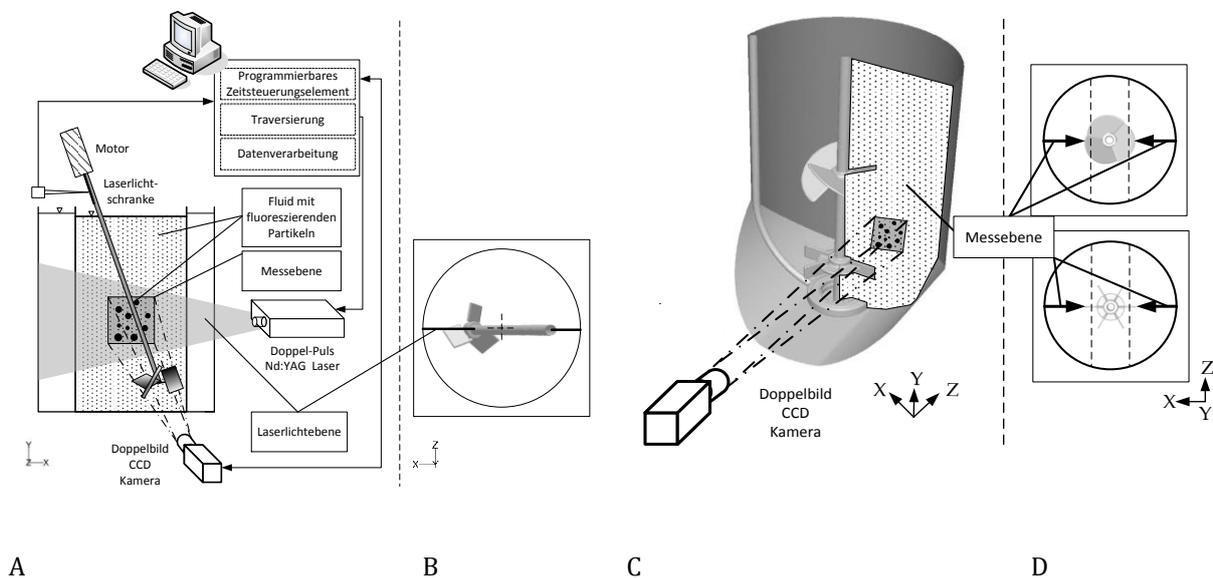


Abbildung 10.: Schematischer Aufbau der experimentellen Untersuchungen im S.U.B. 50 L mittels Particle-Image-Velocimetry (PIV) als Frontansicht (A) und Draufsicht (B). Zusätzlich ist der schematische Aufbau für den BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L als Iso-Ansicht (C) und als Draufsicht für die beiden Rührertypen dargestellt (D).

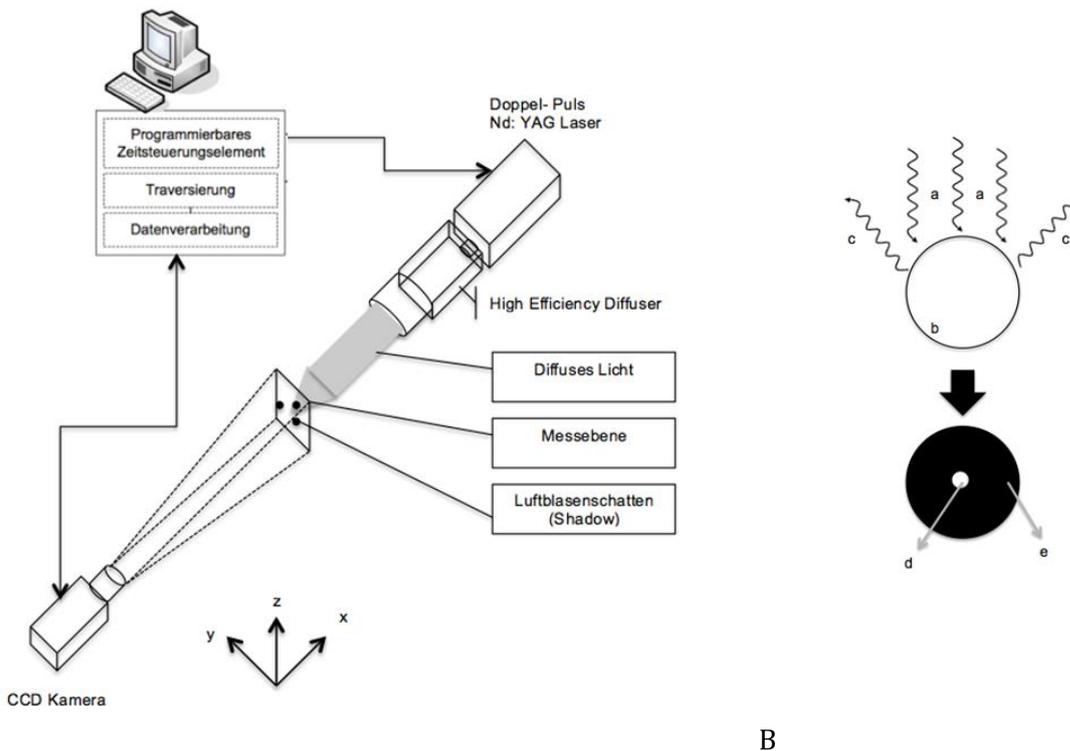
Die Reaktorebene (x-y) wurde in Koordinatenpunkte eingeteilt und die Fluidströmung durch je 500 Doppelbildaufnahmen aufgezeichnet. Im Gegensatz zu den von Menzel *et al.*, 2007 veranschlagten 2500 Doppelbildaufnahmen beschreibt die aufgeführte Methode mit der geringen Anzahl von Aufnahmen einen ersten Versuchsansatz für die Ermittlung der

Fluidströmung und -geschwindigkeiten [286]. Bei einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s betrug der zeitliche Versatz (Δt) zwischen erster und zweiter Aufnahme eines Doppelbildes 1000 μs . Die Bildverarbeitung erfolgte durch eine mehrfach durchgeführte Kreuzkorrelation. Während des ersten Durchlaufes wurden die Aufnahmen in 64 x 64 Pixel große Abfragebereiche eingeteilt. Für jeden weiteren Durchlauf (zwei bis vier) wurde eine Größe von 32 x 32 Pixel verwendet. Innerhalb der Bildnachbearbeitung reduzierte ein *high-pass* Filter auftretende Störvektoren, deren absolute Geschwindigkeit um das Zweifache grösser als die Standardabweichung der Geschwindigkeiten für die umliegenden Vektoren waren. Die Arbeitsanweisung ist dem Anhang C beigelegt.

3.2.3.2 Shadowgraphy

Die Bestimmung der Blasengrößenverteilung erfolgt mittels der Shadowgraphy-Methode. Hierbei wird der zu untersuchende Bereich mit Hilfe von diffusem Licht angestrahlt (Abbildung 11; A). Das verwendete diffuse Licht wird durch den *Nd:YAG* Laser (LaVision) und den nachgeschalteten *High Efficiency Diffuser* (LaVision) erzeugt. Durch Anstrahlen der aufsteigenden Blasen wird ein Teil der Photonen an den Rändern der Blasen reflektiert (c). Im mittleren Bereich der Blasen kommt es aufgrund des Lichteinfallwinkels zu keiner Reflektion der Photonen (d). Dadurch gelangt ein Teil des diffusen Lichtes durch die Blasen und es entstehen helle, runde Bereiche im Gasblasenmittelpunkt. Durch die Reflexion des diffusen Lichtes an den Blasenrändern entstehen die „Schatten“ der Blasen (e), welche mit einer CCD-Kamera und einem vorgeschalteten Teleobjektiv mit Dioptrie-Linse (+1 Dioptrien, beides Nikon) erfasst werden (Abbildung 11; B). Zur Bestimmung der Gasblasenverteilung über eine Reaktorebene und für eine gleichbleibende Fokussierung werden Kamera und Laser auf einer Traversierung positioniert. Die Bilderaufnahme und Auswertung erfolgt mit der Software DaVis (Version: 7.2.2.283, LaVision).

Zur Bestimmung der Gasblasengrößenverteilung müssen alle Komponenten aufeinander abgestimmt werden. Dazu wird der diffuse Lichtstrahl in Richtung des aufsteigenden, zu untersuchenden Blasenstromes ausgerichtet, so dass eine parallel zur Rührwelle liegende Ebene fokussiert wird. Um eine optimale Belichtung der aufsteigenden Blasen zu erhalten, wird vor Messbeginn eine Adjustierung der Belichtung vorgenommen. Dazu wird die Laserintensität schrittweise erhöht, bis 90 % des A/D-Konverters der Kamera gesättigt sind. Bei der verwendeten 4 Bit Kamera wird unter Verwendung einer Blende von 22 mm eine 90 %-Sättigung des A/D-Konverters bei einer Laserintensität von ca. 37 % für Laser A erreicht. Die benötigte Laserintensität variiert jedoch abhängig von der gewählten Blendengröße am Objektiv sowie der Trübung des verwendeten Fluides. Damit die Durchmesser der Blasen während des Prozessierens über den Algorithmus berechnet werden können, wird nach der Adjustierung der Belichtung eine Kalibrierung der Bildskalierung (Verhältnis von Länge zu Pixel) durchgeführt.



A

B

Abbildung 11: Vereinfachter schematischer Aufbau der Shadowgraphy-Messung (A). Zusätzlich ist das Messprinzip dargestellt (B). Die Blasen (b) werden mittels diffusem Lichts (a und c) angestrahlt, was an den Rändern der Blasen (e) zu einer Reflexion des Lichtstrahles (c) und im mittleren Bereich zur Durchleuchtung (d) führt. Der erhaltene schwarze Bereich mit hellem Mittelpunkt wird für die weitere Auswertung genutzt.

Die Untersuchungen im S.U.B. 50 L und im BIOSTAT® STR werden bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm und einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s durchgeführt (Anhang D). Je Messposition werden 800 Prozessbilder aufgezeichnet und ausgewertet. Zur Bildauswertung wird ein benutzerdefiniertes *Batch-Processing* verwendet. Dabei wird aus jedem Prozessbild ein Referenzbild errechnet, mit welchem das Prozessbild anschließend invertiert wird. Um die Qualität der Prozessbilder bei der Parametervariation zu erhöhen, werden diese vor der Invertierung mittels eines 3×3 *avg. Filters* bearbeitet, wodurch Schwankungen der Belichtungsintensität und eine Unschärfe der Blasenränder unterbunden werden können. Um auch kleinste Gasblasen erfassen zu können, werden die Grenzwerte angepasst [287]. Zur Ergebnisevaluierung werden die ausgewerteten Prozessbilder, Blasengrößenverteilungen, die statistischen Werte (d_{10} , d_{32} etc.) sowie eine Partikelliste der erkannten Blasen genutzt. Die Arbeitsanweisung ist dem Anhang D beigelegt.

3.3 Scale-up Studien (Fallstudie III)

Der Scale-up der BIOSTAT® STR- und S.U.B.-Baureihe erfolgt ausschließlich auf numerischer Basis der in Tabelle 2 aufgeführten Reaktorgeometrien. Für den BIOSTAT® STR wird die numerisch ermittelte Strömung bis zu einem Arbeitsvolumen von 1000 L und im S.U.B. bis 2000 L ermittelt. Eine direkte Proportionalität zwischen der Anzahl der Kontrollvolumen und dem Arbeitsvolumen ist nicht möglich, da bei den maximalen Arbeitsvolumen eine Anzahl der Kontrollvolumen von ca. 80 Millionen Zellen resultieren würde. Bei den maximalen Arbeitsvolumen werden ca. 6 Millionen Zellen verwendet. Die numerischen Berechnungen während des Scale-up erfolgen gemäß Kapitel 3.2.2.

3.4 Kultivierung von CHO-Suspensionszellen (Fallstudie IV)

Die Kultivierungen der CHO-Suspensionszellen erfolgt ausgehend von der Erhaltungskultur bis zum Endmaßstab von 2, 50 und 200 L mit unterschiedlichen, chemisch definierten Minimalmedien (Abbildung 12). Die Erhaltungskultur der CHO-XM 111-10 (Kapitel 3.4.1) wird in T-Flaschen (Corning) mit dem ChoMaster FMX-8 Erhaltungsmedium (Kapitel 3.4.2) geführt. Die sich anschließende Expansion erfolgt in Schüttelkolben (Corning) mit ChoMaster HP-1 Wachstumsmedium. In Abhängigkeit des jeweiligen Endmaßstabes (2, 50 oder 200 L) werden weitere Bioreaktorsysteme für die Inokulumproduktion (BIOSTAT® RM 10, 20 oder 50 L; alle Sartorius Stedim Biotech) und das ChoMaster HP-1 Wachstumsmedium genutzt (Kapitel 3.4.2). Für die Wachstumsversuche werden die an der ZHAW etablierten Kultivierungsvorschriften für die Zellexpansion im BIOSTAT® STR und S.U.B. verwendet, die zusammengefasst dem Anhang E beigelegt sind.

Die Inokulumproduktion für die Kultivierungen im UniVessel® SU erfolgt ausschließlich in Schüttelkolben, wohingegen für den 50 L-Maßstab die CHO-Zelllinie aus dem Schüttelkolben in einen BIOSTAT® RM 20 L überführt werden muss, um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erhalten. Die Kultivierungen mit 200 L werden über den BIOSTAT® RM 10 und 50 L (Sartorius Stedim Biotech) realisiert. In allen Bioreaktoren wird mit dem vom Hersteller angegebenen minimalen Arbeitsvolumen, einer Lebendzellzahl von 0.5×10^6 Zellen/mL und einer Vitalität oberhalb 95 % inokuliert (Kapitel 3.4.4). Als Feeding-Medium wurde das ChoMaster HP-5 Wachstumsmedium (Kapitel 3.4.2) genutzt.

Die Produktbildung des Modellproteins SEAP (Kapitel 3.4.1) wurde durch einen vollständigen Mediumwechsel mittels *Crossflow*-Filtration induziert. Dabei wurde das ChoMaster HP-5 Wachstumsmedium durch ChoMaster HP-5 Produktionsmedium ersetzt (Kapitel 3.4.3). Zusätzlich ist eine Temperaturabsenkung von 37 auf 31 °C von Vorteil. Während der Filtration, die eine Konzentration der Suspension und eine Diafiltration umfasst, wird der UniVessel® SU und der BIOSTAT® STR 50 L als Vorlagegefäß verwendet.

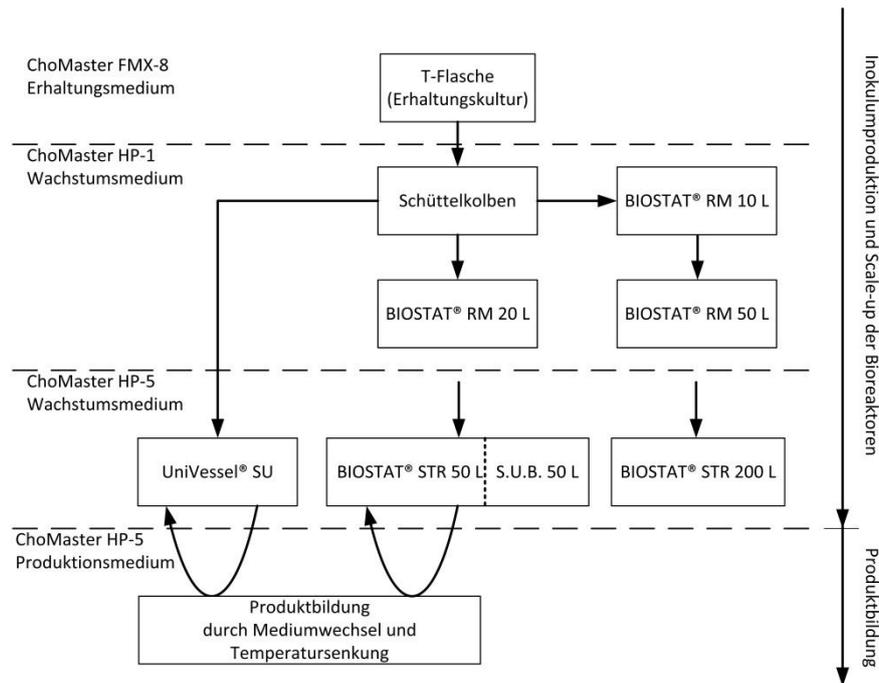


Abbildung 12: Übersicht zum Vorgehen der Kultivierungsversuche mit CHO XM 111-10 Zellen. Ausgehend von der Erhaltungskultur wird ein Scale-up bis zu einem Arbeitsvolumen von 200 L durchgeführt. Die induzierte Produktbildung wird im 2 und 50 L Maßstab durchgeführt. Zusätzlich sind die unterschiedlich genutzten Medien aufgeführt.

3.4.1 Zelllinie

CHO-Zellen sind eukaryotische Zellen. Sie wurden ursprünglich aus den Ovarien des chinesischen Hamsters isoliert, werden 16 bis 20 μm groß und haben eine Verdopplungszeit von ca. 24 h. Die serumfrei kultivierten CHO XM 111-10 Zelllinie (ETH Zürich, Prof. Dr. Martin Fussenegger [288-293]) ist eine Suspensionskultur, die sich anders als der adhären wachsende Wildtyp CHO-K1 nicht an inerte Oberflächen anlagert. Ein charakteristischer Aspekt für die CHO XM 111-10 Zelllinie ist die Sensibilität gegenüber hydrodynamischen Beanspruchungen. Die gründet sich auf dem Vorhandensein einer Zellmembran anstatt einer Zellwand, wie sie bei pflanzlichen Zellkulturen oder Mikroorganismen zu finden ist. Hinzu kommt die genetische Modifikation der Zelllinie, bei der durch homologe Rekombination ein tet-off System integriert worden ist. Das tet-off System wird zur gezielten Induktion der Proteinexpression genutzt und erlaubt es die Zellproliferation und Produktbildung zeitlich voneinander zu trennen (biphasischer Prozess). Infolge dessen werden höhere Zellzahlen und Produkttiter erhalten.

Das tet-off System der CHO XM 111-10 Zelllinie basiert auf einem Tetrazyklin-regulierten Promoter ($P_{hCMV^{*-1}}$) und enthält das nachgeschaltete Reportergen SEAP. Unter der Anwesenheit von Tetrazyklin wird eine Bindungsstelle am Promoter durch das Antibiotikum besetzt, wodurch das Modellprotein SEAP nicht exprimiert werden kann. Durch Entzug von Tetrazyklin binden Transkriptionsfaktoren an den Promoter, das Modellprotein SEAP wird exprimiert und anschließend ins Medium ausgeschüttet. Zusätzlich ist ein Absenken der Temperatur auf 31° C notwendig um die Zellen auf die Proteinexpression zu fokussieren. Der indirekte Nachweis von SEAP erfolgt mittels photometrischer Messung von para-Nitrophenol, welches durch die katalytische Phosphatase-Aktivität aus para-Nitrophenolphosphat gebildet wird (Kapitel 3.4.4) [294, 295].

3.4.2 Medien

Die Kultivierung der CHO XM 111-10 Zelllinie erfolgt ausschließlich in chemisch definierten Minimalmedien. In chemisch definiertem Minimalmedium sind alle Bestandteile (Aminosäuren, Zucker, Salze, Puffer etc.) bekannt und ihre Konzentrationen definiert, was die Verwendung für die Produktion von pharmazeutischen Produkten sowie deren Aufreinigung deutlich vereinfacht [30]. In Abhängigkeit des Kultivierungsgefäßes, der Art des Leistungseintrages und der Zellzahlen werden Medienmodifikationen des ChoMaster-Mediums verwendet (Abbildung 12). Die Medien werden in Reagenzien-Kit's bezogen und nach den Angaben des Herstellers (Cell Culture Technologies) rekonstituiert.

Die Erhaltungskultur wird in T-Flaschen (statischer Bioreaktor, Kapitel 2.2.1) kultiviert, wofür das ChoMaster FMX-8 Erhaltungsmedium (Cell Culture Technologies) verwendet und mit Antibiotika (Tetrazyklin, Puromycin und G-418-Sulfate) versetzt wird. Zur Inokulumproduktion in dynamischen Bioreaktoren wird das ChoMaster HP-1 Wachstumsmedium genutzt und 0.1-0.2 % Pluronic F68 zugegeben. ChoMaster HP-5 Wachstumsmedium wird oberhalb einer Lebendzellichte von 1 bis 2×10^6 Zellen/mL eingesetzt (Abbildung 12; UniVessel® SU, S.U.B. 50 L, BIOSTAT® STR 50 und 200 L). Die Produktbildung wird durch ChoMaster HP-5 Produktionsmedium induziert, welches ebenfalls 0.1-0.2 % Pluronic F68 jedoch kein Tetrazyklin beinhaltet.

Die Medien werden steril-filtriert und in sterile, vorkonfektionierte Medium-Bags (Flexboy; Sartorius Stedim Biotech) abgefüllt. Je nach Bioreaktormaßstab und Anwendung (Inokulumproduktion oder Mediumwechsel) variiert die Größe der Medium-Bags zwischen 3 und 50 L.

3.4.3 Prozess- und Kultivierungsparameter

Die Kultivierungen der CHO-Suspensionszellen erfolgen in den unterschiedlichen single-use Bioreaktoren im Feeding-Modus und bei einer Temperatur von 37 °C (Produktion: 31 °C) (Tabelle 3). Aufgrund des variierenden Arbeitsvolumens sowie der in Fallstudie IV (Kapitel 4.4) veranschlagten Kriterien erfolgt eine Anpassung der Drehzahl. Der pO_2 -Wert wird über die Zugabe von Luft/ O_2 und der pH-Wert über die Zugabe von CO_2 reguliert, deren Sollwerte im Bereich von 40 - 50 % bzw. 7.2 liegen. Regulierender Stickstoff oder Basen werden nicht benötigt. Bei manueller Regelung können für die Sollwerte auch 0.1 bis 0.2 vvm Luft mit 5 bis 10 % CO_2 in die Bioreaktoren eingetragen werden. Während der Produktionsphase des Modellproteins SEAP wird ein Absinken des pH-Wertes auf ca. 6.5 durch die Lyse der Zellen beobachtet.

Zum Erhalt maximaler Lebendzellichten werden Kriterien für die Medienzugabe definiert, die neben dem Zellwachstum auch die Metabolitenkonzentrationen im Medium berücksichtigen (Kapitel 3.4.3). Die Medienzugabe erfolgt nur bei typischen Verdopplungszeiten ($t_d \leq 24$ h; Gleichung 31 und Gleichung 32), einer Vitalität grösser 95 %, oberhalb einer Glukosekonzentration von 1 - 1.5 g/L und unterhalb einer Laktatkonzentration von 2 g/L, was

das Auftreten limitierender, osmolarischer Bedingungen unterbindet. Wird eines der Kriterien nicht erfüllt, wird der Versuch abgebrochen. Während der Produktion erfolgt der Versuchsabbruch bei einer Vitalität von unter 30 %. Bei unterschiedlichen Kultivierungsansätzen (bspw. auch im gleichen Bioreaktor-System) können daher die Anzahl und die Zeitpunkte der Mediumzugabe voneinander abweichen.

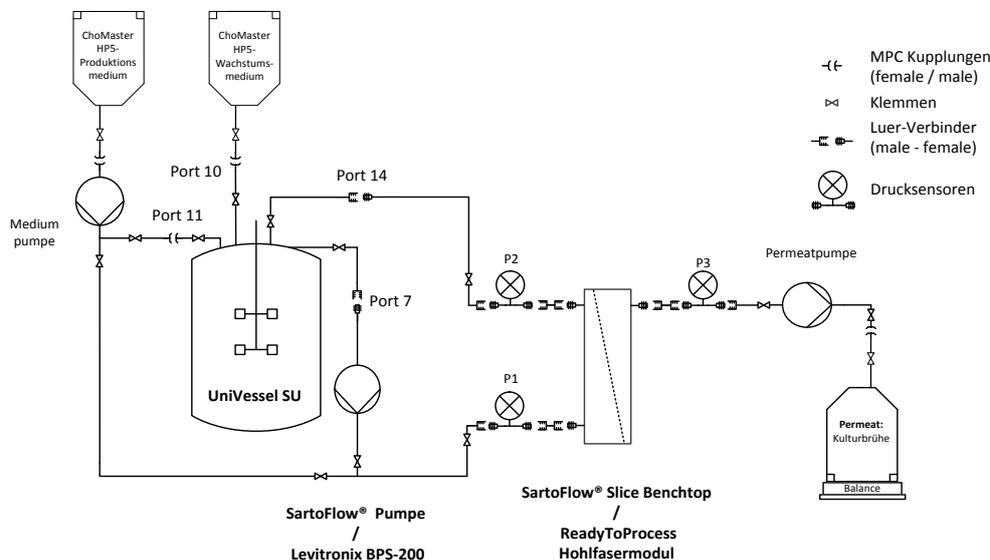
$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Gleichung 31

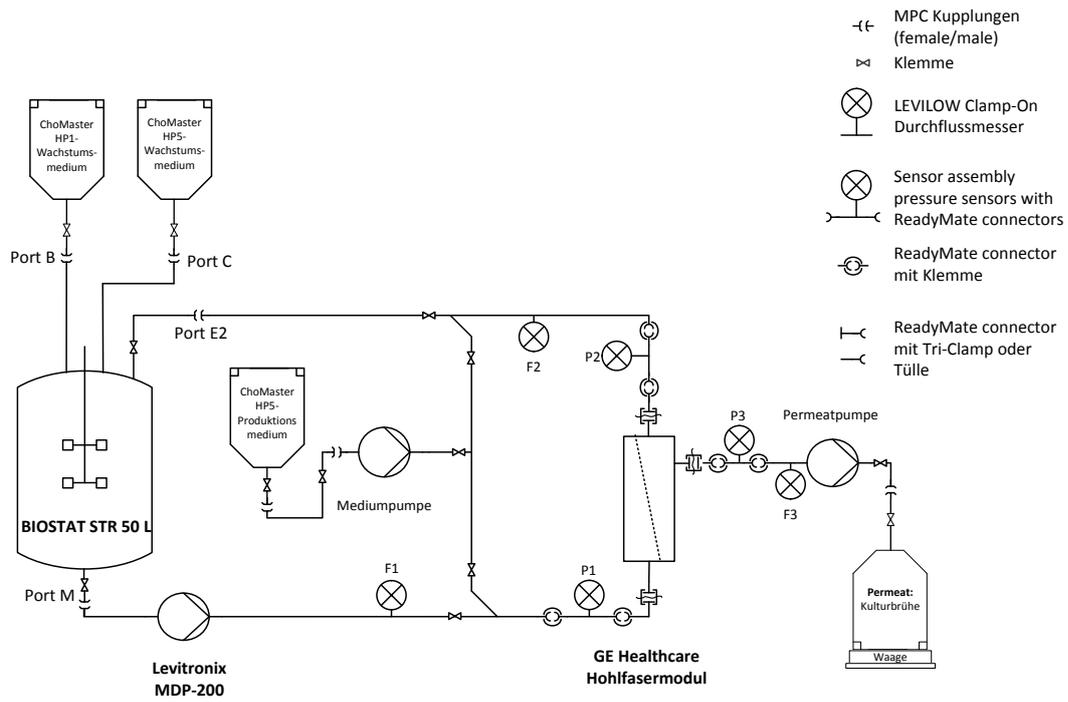
$$\mu = \frac{\ln(c_{x,t}) - \ln(c_{x,0})}{t_{c,x} - t_0}$$

Gleichung 32

Die Induktion der Produktbildung des Modellproteins SEAP (Kapitel 3.4.1) erfolgt im UniVessel® SU und im BIOSTAT® STR 50 L, wobei die Bioreaktoren als Vorlagebehälter für eine *Crossflow*-Filtration dienen (Abbildung 13). Dies hat den Vorteil, dass die sich in den Reaktoren befindenden Zellen keinem Limitationen durch Massen- und Stofftransfer ausgesetzt sind. Die Filtration wird im UniVessel® SU mit einem Sartoflow Slice 200 Benchtop System (Porengröße: 0.65 µm, Filterfläche: 0.1 m²; Sartorius Stedim Biotech) und mit einem Hohlfasermodul (RTPCFP-6-D-4X2MS, Porengröße: 0.65 µm, Filterfläche: 0.01 m²; GE Healthcare) durchgeführt (Abbildung 13; A). Für den Mediumtausch im BIOSTAT® STR 50 L wurde das Hohlfasermodul (CFP-6-D-55A, Porengröße: 0.65 µm, Filterfläche: 0.01 m²; GE Healthcare, Schweiz) verwendet (Abbildung 13; B). Bei den Untersuchungen mit den Hohlfasermodulen wurde das *Crossflow*-System zusätzlich mit single-use Drucksensoren (P1 bis P3; SciLog), Durchflussmessern (F1 bis F3; Levitronix) und mit einer MDP-200 Pumpe (Levitronix), zur Zirkulation der Zellsuspension, ausgestattet [295]. Während der *Crossflow*-Filtration erfolgt ein Aufkonzentrieren (bis zum minimalen Reaktorarbeitsvolumen) und eine Diafiltration der Zellsuspension mit ChoMaster HP-5 Produktionsmedium (Kapitel 3.4.2). Um bei der Diafiltration das HP-5 Wachstumsmedium vollständig zu entfernen, entspricht das Volumen von HP-5 Wachstumsmedium dem dreifachen Volumen der Zellsuspension in den Bioreaktoren. Die *Crossflow*-Filtration erfolgt mit einer Flussrate von 30 L/m²/h sowie einem Transmembrandruck von maximal 0.5 bar [295].



A



B
Abbildung 13: Anschlussschema der Untersuchungen zum Mediumtausch mittels *Crossflow*-Filtration im UniVessel® SU (A) und BIostat® STR 50 L (B).

Tabelle 3: Übersicht der Prozessparameter im UniVessel® SU, S.U.B. 50 L, BIOSTAT® STR 50 und 200 L sowie der Kultivierungsparameter, die als Kriterien für eine Medienzugabe und einen Kultivierungsabbruch verwendet wurden.

			Kultivierungen				Produktion	
			UniVessel® SU	BIOSTAT® STR 50 L	S.U.B. 50 L	BIOSTAT® STR 200L	UniVessel® SU	BIOSTAT® STR 50L
Prozessparameter	Arbeitsvolumen	L	0.6 – 2	23 – 50	25 – 50	50 – 200	2	50
	Temperatur	°C	37	37	37	37	31	31
	Drehzahl	rpm	140 – 180	100 – 180	100 - 195	90 - 150	180	180
	pH-Wert	-	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
	pO ₂ -Wert	%	40	40 - 50	40 - 50	40 – 50	40 - 50	40 – 50
	Begasung Luft*	vvm	0.1 – 0.2	0.1 – 0.2	0.1 – 0.2	0.1 – 0.2	0.1 – 0.2	0.1 – 0.2
	Begasung CO ₂ *	%	5 - 10	5 - 10	5 - 10	5 - 10	5 - 10	5 - 10
	Transmembran druck	bar	-	-	-	-	0.1 – 0.3	0.1 – 0.3
	Filtrationsrate	L/m ² /h	-	-	-	-	30	30
Kultivierungs- parameter	Min. Zelldichte	Zellen/mL	0.5 x 10 ⁶	-	-			
	Startvolumen	L	0.6	23	25	50	2	50
	Vitalität	%	95	95	95	95	< 30	< 30
	pH	-	< 6.5	< 6.5	< 6.5	< 6.5	-	-
	Glukose	g/L	< 1	< 1.5	< 1.5	< 1.5	-	-
	Laktat	g/L	> 2	> 2	> 2	> 2	-	-
	Ammonium	mmol/L	> 2	> 2	> 2	> 2	-	-

*bei manueller pH- und pO₂-Regelung

3.4.4 Analytik

Während der Kultivierung werden die Zellzahlen, Vitalität und Metaboliten-Konzentrationen bestimmt, wofür 2 mL Probenvolumen benötigt werden. Im Produktionsprozess wird zusätzlich die Enzymaktivität von SEAP gemessen, weshalb das Probenvolumen auf 4 mL erhöht wird. Um die Messergebnisse nicht zu verfälschen, wird bei den Bioreaktoren mit Probenahmeschlauch eine Vorprobe von ca. 1 mL genommen und anschließend verworfen.

Die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität erfolgt automatisiert mittels NucleoCounter NC-100 (ChemoMetec). Hierbei wird neben der Gesamt-Zellzahl auch die Konzentration der toten Zellen mittels Fluoreszenzmarkierung der DNA durch Propidiumiodid ermittelt (Probenvolumen je 300 μ L). Die Probenaufarbeitung erfolgt nach Herstellerangaben. Die Differenz aus der Gesamt- und Tot-Zellzahl repräsentiert die Konzentration an lebenden Zellen. Die Vitalität wird durch das Konzentrationsverhältnis von Lebend- zur Gesamtzellzahl berechnet. Zusätzlich wird bei den Kultivierungen der CHO-Zelllinie die Substrat- und Metaboliten-Konzentrationen aufgenommen. Die Konzentrationen von Glukose, Laktat, Glutamin, Glutamat und Ammonium sowie des pH-Wertes werden mit dem Nova BioProfile 100plus (Nova Biomedical Corporation) ermittelt. Dazu wird vorgängig 1 mL Probenvolumen für 2 min bei 5200 g zentrifugiert (Centrifuge 5702; Eppendorf) und der Überstand (600 μ L) zur Analyse genutzt.

Die SEAP-Bestimmung erfolgt nach Abschluss der Kultivierung. Nach jeder Probenahme werden 2 mL für 5 min bei 5200 g zentrifugiert und bei -20 °C gelagert. Das sekretierte Modellprotein SEAP wird indirekt über die enzymatische Reaktion von p-Nitrophenolphosphate zu p-Nitrophenol durch SEAP als U/mL bestimmt. Die endogene Aktivität der Phosphatase wird durch das Erwärmen der Probe auf 65 °C und der Zugabe von L-Homoarginin unterbunden. Die eingefrorenen SEAP-Proben werden aufgetaut, 40 μ L werden in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 100 μ L 2 x SEAP Puffer bei 37 °C für 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 20 μ L p-Nitrophenolphosphate-Lösung beginnt die enzymatische Reaktion. Die Hydrolyse und der resultierende Farbumschlag kann mittels eines Mikrotiterplatten-Readers (Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 405 nm erfasst (aller 60 s über 30 min) und aufgezeichnet werden. Abschließend wird die SEAP-Aktivität über den Anstieg der gemessenen Extinktion gegen die Zeit zuzüglich des Verdünnungsfaktors von 2.4 berechnet [294, 295].

4 Resultate und Diskussion

Die Resultate und Diskussion beschreiben die Prozessentwicklung eines Biopharmazeutikums in single-use Bioreaktoren. Die Grundlage hierfür bildet die verfahrenstechnische Charakterisierung gerührter single-use Bioreaktoren auf Basis experimenteller und numerischer Untersuchungsansätze (Kapitel 4.1 und 4.2). Der Scale-up der single-use Systeme wird ausschließlich mittels der numerischen Strömungsmechanik durchgeführt (Kapitel 4.3). Die erhaltenen Informationen werden abschließend zur Etablierung eines Zellkulturprozesses der CHO XM 111-10 Zelllinie herangezogen (Kapitel 4.4).

4.1 Fallstudie I: Experimentelle Bestimmung verfahrenstechnisch relevanter Parameter von Zellkulturprozessen

Die Charakterisierung der untersuchten single-use Bioreaktoren erfolgt auf Basis der in Kapitel 2.3.1 empfohlenen und in Löffelholz et al, 2013 aufgeführten Methoden [40]. Diese umfassen die Bestimmung der Betriebsbedingungen mit dem Strömungsregime und der Fluidgeschwindigkeit. Die experimentellen Methoden zur Bestimmung des Leistungseintrages, der Mischzeit und des $k_{L,a}$ -Wertes werden in Abhängigkeit der baulichen Gegebenheiten der single-use Bioreaktoren gewählt und für die 2 L bzw. 50 L Maßstäbe untersucht. Im UniVessel® SU, dem BIOSTAT® STR 50 L und dem S.U.B 50 L werden für die Bestimmungen des Leistungseintrages und des volumenbezogenen Sauerstoffübergangs-koeffizienten die Momenten-Methode bzw. die *gassing-out* Methode genutzt. Die Mischzeitbestimmung wird im UniVessel® SU und dem BIOSTAT® STR 50 L über die Entfärbungsreaktionen erfolgen, wohingegen im 50 L S.U.B nur Sondenmethoden eingesetzt werden können.

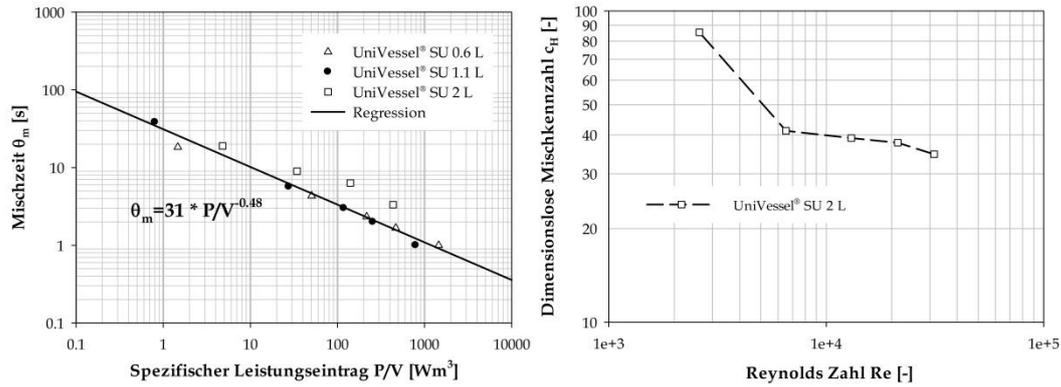
4.1.1 UniVessel® SU

Die Bestimmung des Leistungseintrages im UniVessel® SU erfolgte im Gegensatz zum BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B. 50 L ausschließlich über den numerischen Ansatz, der in dem Kapitel 4.2.1 ausführlich diskutiert wird. Grund hierfür ist, dass der UniVessel® SU nur für Zellkultivierungen zur Verfügung stand und nach Gebrauch direkt verworfen werden musste. Um jedoch den spezifischen Leistungseintrag als Bezugsgröße zu nutzen und eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Bioreaktoren zu gewährleisten, werden die mittels CFD erhaltenen Resultate für die folgende Diskussion der Mischzeit und des $k_{L,a}$ verwendet.

Im UniVessel® SU ist die Bestimmung der Mischzeit über die Entfärbungsmethoden durchführbar, da durch die transparente und rigide Reaktorwand der gesamte Fluidraum betrachtet werden kann. In Abbildung 14; A ist die jodometrisch bestimmte Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages bei drei unterschiedlichen Arbeitsvolumina (0,6, 1,1 und 2 L) aufgeführt. Der spezifische Leistungseintrag basiert auf numerischen Ergebnissen und wird in Kapitel 4.2.1 detaillierter diskutiert. Die Mischzeit für die drei untersuchten Arbeitsvolumina liegt im Bereich zwischen 1 und 38 s und sinkt mit zunehmendem spezifischem Leistungseintrag. Die Abhängigkeit der Mischzeit vom spezifischen Leistungseintrag ist mittels des Exponenten von -0,48 der Regression beschreibbar, der in Anlehnung an Gleichung 29 bei ausgeprägter Turbulenz -0,33 beträgt. Der experimentell erhaltene Exponent weicht zur theoretischen Vorgabe um 30 % ab, liegt jedoch innerhalb der gleichen Größenordnung.

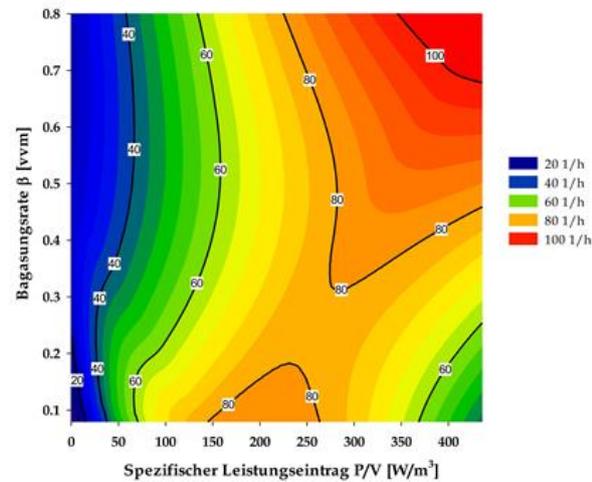
Die Ursache hierfür zeigt die Funktion der Mischkennzahlen in Abhängigkeit der Reynolds Zahl (Abbildung 14; B). Bei vollaussgeprägter Turbulenz, die in konventionellen Bioreaktorsystemen oberhalb einer kritischen Reynolds Zahl von 10^4 auftritt, sind annähernd konstante Mischkennzahlen zu erwarten. Im UniVessel® SU ist im Bereich der Reynolds Zahl zwischen 2'600 und 6'500 (entspricht 0,4 bis 4,8 W/m³) eine exponentielle Abnahme der Mischkennzahl von 80 auf 41 zu beobachten. Oberhalb einer Reynolds Zahl von $1,3 \times 10^4$ (entspricht 34 W/m³) verlaufen die Mischkennzahlen im Bereich von 39 bis 31 quasi-konstant und lassen auf eine vollaussgeprägte turbulente Strömung schließen. Die geringfügige Abnahme der Mischkennzahlen ist zum einen auf die Subjektivität der Messmethode, infolge der visuellen Beurteilung des Farbumschlages, zurückzuführen. Zum anderen zeigt auch die Leistungscharakteristik ($Re = f(Ne)$) in unbewehrten Rührreaktoren eine geringe Abnahme der Newton Zahl, wie in Kapitel 4.1.2 am Beispiel des BIOSTAT® STR 50 L beschrieben ist. Wird die Mischzeit ausschließlich unter vollturbulentem Strömungsverhalten betrachtet, nähert sich der Regressionsexponent mit -0,38 jedoch dem theoretischen Wert (-0,33) an (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung des volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten k_{La} mittels *gassing-out* Methode wurden die Begasungsrate und die in den Bioreaktor eingetragene, spezifische Leistung variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14; C für den UniVessel® SU mit 2 L Arbeitsvolumen aufgeführt. Die experimentellen Ergebnisse ergeben k_{La} -Werte zwischen 6 und ca. 100 1/h, welche vor allem durch die Erhöhung des spezifischen Leistungseintrages beeinflusst werden. Während sich bei einem konstanten Leistungseintrag und bei gleichzeitiger Erhöhung der Begasungsrate der k_{La} nur geringfügig ändert ($P/V = 150 \text{ W/m}^3$; $60 \text{ 1/h} < k_{La} < 65 \text{ 1/h}$), steigt im umgekehrten Fall der k_{La} um ein Vielfaches an ($\beta = 0,4 \text{ vvm}$; $10 \text{ 1/h} < k_{La} < 70 \text{ 1/h}$). Im Vergleich mit dem konventionellen Glasbioreaktor, dem UniVessel 2 L, wurden annähernd identische k_{La} -Werte ermittelt. Zusätzlich zeigen photographische Aufnahmen der dispersen Phase am Sparger-Auslass, kugelförmige Gasblasen mit einem Durchmesser von 1 mm [15], deren Einfluss durch Gleichung 27 gegeben ist und für die numerische k_{La} -Bestimmung essentiell ist.



A

B



C

Abbildung 14: Experimentelle Bestimmung der Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für den UniVessel® SU mit den Arbeitsvolumen 0,6, 1,1 und 2 L (A). Zusätzlich sind die Mischkennzahlen in Abhängigkeit der Reynolds Zahl für das Arbeitsvolumen von 2 L aufgeführt (B). In Abbildung (C) ist der volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient k_La in Abhängigkeit der Begasungsrate und dem spezifischen Leistungseintrag bei einem Arbeitsvolumen von 2 L dargestellt, der auf einem statistischen Modell basiert. Der spezifische Leistungseintrag wurde ausschliesslich numerisch bestimmt.

In zellkulturbasierenden Prozessen wird vorwiegend mit geringen Begasungsraten ($\beta < 0.1$ vvm) und mittleren spezifischen Leistungseinträgen bis maximal $240 W/m^3$ gearbeitet [142, 163]. Die für diesen Leistungseintrag erhaltenen k_La -Werte im UniVessel® SU sind in einem Bereich zwischen 6 bis 65 1/h und liegen somit deutlich über den in der Literatur aufgeführten Werten von 5 bis 15 1/h [296]. Aufgrund dieser Daten ist ein Einsatz des UniVessel® SU bei maximalem spezifischem Leistungseintrag für mikrobielle Fermentationen durchaus möglich.

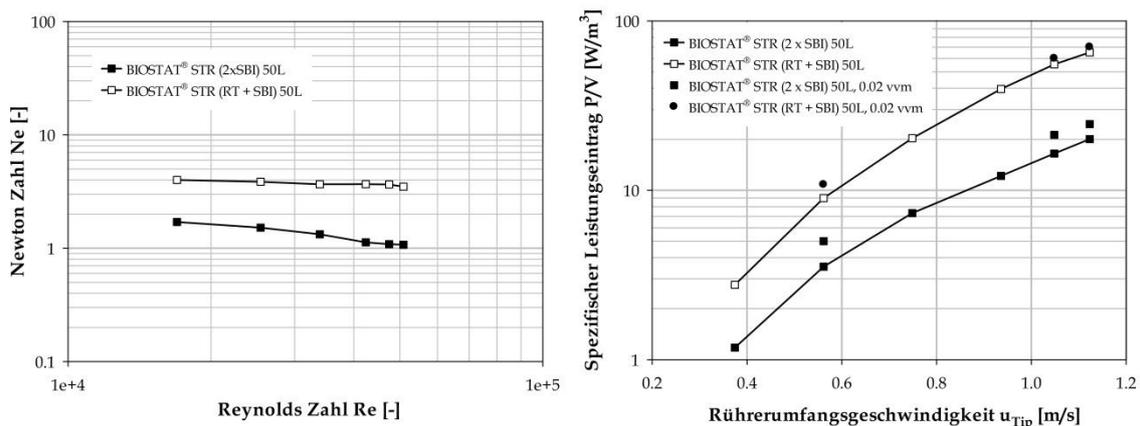
4.1.2 BIOSTAT® STR 50 L

Der Leistungseintrag im BIOSTAT® STR 50 L für die beiden Rührerkonfigurationen (2 x SBI; RT + SBI) werden oberhalb einer Reynolds Zahl von 1×10^4 annähernd konstante, wodurch Newton Zahlen von 3.3 (RT + SBI) und 1.2 (2 x SBI) erhalten werden (Abbildung 15; A). Die sehr geringe Abnahme der Newton Zahl über den Bereich von $10^4 - 10^5$ (Abbildung 15; A) ist auf die fehlende Bewehrung in Form von Stromstörern zurückzuführen [145]. Für beide

Rührerkonfigurationen des BIOSTAT® STR 50 L wird deutlich, dass sich oberhalb einer Reynolds Zahl von 10^4 eine turbulente Strömung mit dreidimensionalen Wirbeln einstellt (Abbildung 15; A) und diese der kritischen Reynolds Zahl in konventionellen Bioreaktoren entspricht [17, 145, 146]. Hinsichtlich der Newton Zahlen sind die beiden single-use Rührerkonfigurationen vergleichbar mit axialen und radialen Rührertypen aus Edelstahl. Hier werden Newton Zahlbereiche von 0.3 - 1 für axialfördernde (bspw. Schrägblattrührer) [174, 175] und 3 - 10 für radialfördernde (bspw. Rushton Turbine) Rührer angegeben [145, 174].

Die Bestimmung des spezifischen Leistungseintrages als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit ist in Abbildung 15; B aufgeführt, wobei der Leistungseintrag nur bis zu einer Rührerumfangsgeschwindigkeiten von bis zu 1.12 m/s variiert wurde. Für das Newton'sche Fluid werden spezifische Leistungseinträge im Bereich von 3 bis 65 W/m^3 (RT + SBI) und 1 bis 20 W/m^3 (2 x SBI) ermittelt. Annähernd identische Ergebnisse wurden auch von Noack, 2010 für beide single-use Rührerkonfigurationen angegeben [69]. Die spezifischen Leistungseinträge entsprechen daher den in der Literatur empfohlenen Werten von bis zu 240 W/m^3 für zellkulturbasierende Prozesse [5, 189, 296].

Unter Anwendung einer konstanten Begasungsrate von 0.02 vvm (Abbildung 15; B), welche für Zellkulturprozesse üblich ist, zeigen die erhaltenen Ergebnisse einen identischen Graphenverlauf im Vergleich zu den einphasigen Untersuchungen. Im BIOSTAT® STR mit der Rührerkonfiguration RT + SBI wird ein erhöhter Leistungseintrag von 7 bis 10 % gemessen. Während bei Rührerumfangsgeschwindigkeiten von 0.56 m/s die Rushton Turbine teilweise überflutet wird und eine Erhöhung des spezifischen Leistungseintrages um 10 % hervorruft, wird mit zunehmender Rührergeschwindigkeit das eingetragene Gas dispergiert und strömt den Segmentblatt-Rührer nur noch vereinzelt an. Die Rührerkonfiguration 2 x SBI zeigt im Vergleich zu den einphasigen Messungen eine Erhöhung zwischen 20 und 30 %, die mit zunehmender Rührergeschwindigkeit abnimmt. Die höheren spezifischen Leistungseinträge werden durch die Segmentblatt-Rührer hervorgerufen, die die Gasblasen entgegen ihrer Auftriebsrichtung abwärts fördern und ein erhöhtes Drehmoment an den Rührern verursacht.



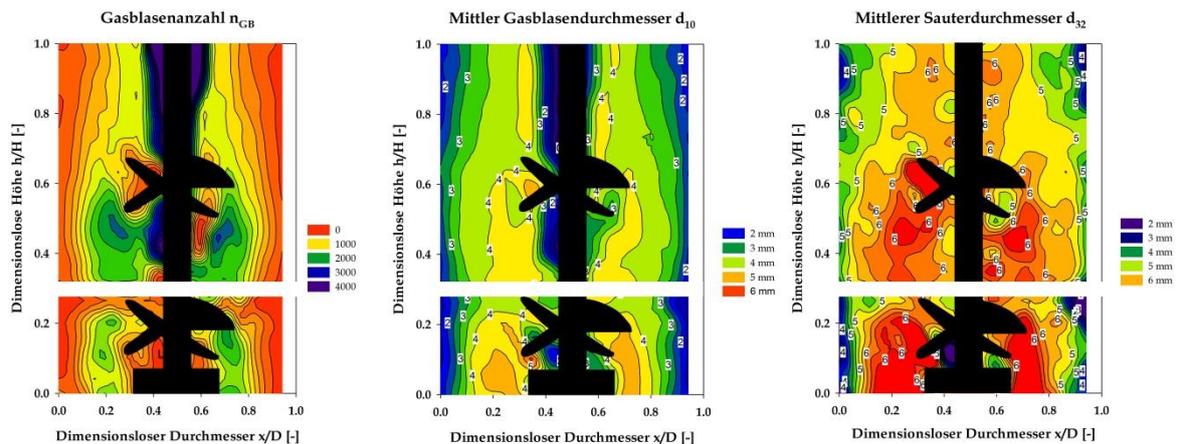
A

B

Abbildung 15: Experimentelle Bestimmung der Leistungscharakteristik im BIOSTAT® STR 50 L mit der Newton Zahl als Funktion der Reynolds Zahl in einer einphasigen, Newton'schen Flüssigkeit (A) und des spezifischen Leistungseintrags als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit für ein einphasiges, wasserähnliches sowie zweiphasiges (Liquid/Gas) Stoffsystem (B).

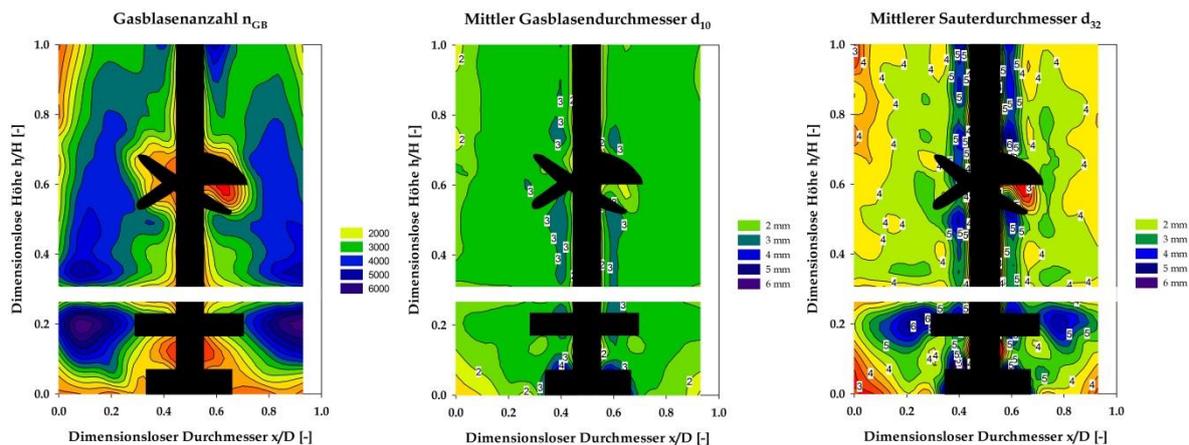
Im BIOSTAT® STR 50 L wird bei maximalem Leistungseintrag ($u_{\text{Tip}} = 1.8 \text{ m/s}$) eine vollständige Durchmischung nach ca. 10 s erreicht (2 x SBI und RT + SBI). Mit abnehmendem Leistungseintrag erhöht sich die Mischzeit durch eine verringerte Ausprägung der turbulenten Wirbel. Dies führt bei den genutzten Methoden zur Bestimmung der Mischzeit (Sonden- und Entfärbungsmethode, Kapitel 3.2.1.2) zu abweichenden Ergebnissen. Während für die Sondenmethode (Leitfähigkeitsmessung) bei 0.8 W/m^3 eine Mischzeit von 40 s erhalten wird, ist mittels jodometrischer Entfärbung eine Homogenität erst nach ca. 60 s erreicht. Trotz der Subjektivität der Entfärbungsmethode können Zonen mit geringer und fehlender Durchmischung ermittelt werden, was bei der punktuellen Leitfähigkeitsmessung nicht möglich ist. Zusätzlich werden in Noack et al, 2011 Mischzeitergebnisse zwischen 11 bis 24 s (bei 2.2 bis 71 W/m^3) im BIOSTAT® STR 200 L aufgeführt [70]. Aufgrund der Messmethodik mittels Leitfähigkeit ist bei einer örtlichen und zeitlichen Betrachtung (bspw. mittels CFD) eine unwesentlich höhere Mischzeit zu erwarten.

Für den BIOSTAT® STR sind sowohl Ring- als auch Mikrosparger verfügbar, die sich nicht nur in der Blasengröße sondern auch im Sauerstoffeintrag unterscheiden. Im 50 L Maßstab werden in Abhängigkeit des Leistungseintrages von 4 bis 90 W/m^3 (entspricht Rührerkonfiguration 2 x SBI) durch den Ringsparger $k_{\text{L,a}}$ -Werte von 4 bis 14 1/h und mit dem Mikrosparger 18 bis 27 1/h erreicht [69]. Deutlich höhere $k_{\text{L,a}}$ -Werte konnten im BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L nachgewiesen werden. Hier betragen die $k_{\text{L,a}}$ -Werte mit Ringsparger 6 bis 27 1/h und mit Mikrosparger 16 bis 47 1/h bei einem Leistungseintrag von 9 bis 260 W/m^3 [69]. Die Untersuchungen zeigen $k_{\text{L,a}}$ -Bereiche auf, die für zellkulturbasierende Prozesse mit einem $k_{\text{L,a}}$ -Wert von bis zu 15 1/h [165] einen ausreichenden Sauerstofftransfer in das Medium gewährleisten. Lediglich die Rührervariante 2 x SBI in Verbindung mit einem Ringsparger ergibt geringere $k_{\text{L,a}}$ -Werte. Letztlich kann in Zellkulturprozessen mit einer hohen spezifischen Sauerstoffaufnahme ($q_{\text{O}_2} > 5 \times 10^{-13} \text{ Mol/Zelle/h}$) zu Limitationen des Sauerstoffes führen. Grund für den geringen Sauerstoffeintrag der 2 x SBI Konfiguration mit Ringsparger ist die Verteilung der Gasblasenanzahl, der mittlere Gasblasen- und Sauterdurchmesser bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm und ein spezifischer Leistungseintrag von 20 W/m^3 ($u_{\text{Tip}} = 1.05 \text{ m/s}$) (Abbildung 16). Die Verteilung der Gasblasenanzahl (Abbildung 16; A) zeigt über den Messzeitraum von 500 Bildern eine erhöhte Anzahl der Gasblasen zwischen 1000 und 3000 in unmittelbarer Rührer- und Wellennähe. Mit zunehmendem Reaktordurchmesser sinkt jedoch die Gasblasenanzahl bis auf ein Minimum ab. In Bezug auf den mittleren Gasblasendurchmesser (Abbildung 16; B) wird eine Gasblaseneinlassgröße am Sparger von ca. 2 mm erhalten, der sich unterhalb des tiefer gelegenen Rührers befindet. Durch den unteren Rührer werden die Gasblasen zwar im Raum verteilt, jedoch ist ein Koaleszenzverhalten durch den ansteigenden mittleren Durchmesser auf 4 mm festzustellen. Zusätzlich steigt ein geringfügiger Teil der Gasblasen an der Welle auf und wird vom oberen Rührer erfasst und im Raum verteilt. Durch die beiden Rührer werden die initialen Gasblasen mit einer Größe von 2 mm in die Randbereiche ($0 < d/D < 0.1$ und $0.9 < d/D < 1$) des BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L befördert, die unter Berücksichtigung der Gasblasenanzahl jedoch sehr gering ausfallen. In Bezug zum mittleren Sauterdurchmesser liegt dieser im überwiegenden Teil der Abbildung 16; C in einem Bereich zwischen 4.5 und 6 mm.



A **B** **C**
Abbildung 16: Verteilung Gasblasenanzahl (A), des Gasblasendurchmessers d_{10} (B) und des Sauterdurchmessers d_{32} (C) im BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L mit Wasser bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm und einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s ($P/V = 20 \text{ W/m}^3$). Durch die schwarzen Bereiche sind die Rührer, die Welle und der Ringsparger sowie den weißen Bereich die Schweißnaht des Plexiglasbehälters angedeutet.

Im Gegensatz zum BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L zeigt die Rührerkonfiguration RT + SBI eine deutlich homogenere Verteilung der Gasblasenanzahl (Abbildung 17; A). Die durch den Ringsparger eingetragenen Gasblasen werden von der Rushton Turbine erfasst und über den gesamten Reaktordurchmesser verteilt. Im Bereich von $0 < d/D < 0.3$ und $0.7 < d/D < 1$ ist eine Verteilung von 3000 bis 6000 Gasblasen auszumachen, wohingegen in Wellen- und Bodennähe ($0.4 < d/D < 0.6$ bzw. $0 < h/H < 0.75$) die Anzahl an Blasen auf 2000 sinkt. Bezüglich des mittleren Gasblasendurchmessers (Abbildung 17; B) werden diese über den Sparger mit einem Eingangsblasengröße von 2 mm in den Bioreaktor eingebracht, der sich unterhalb des tiefer gelegenen Rührers befindet. Im gesamten Bioreaktorbereich ($0 < d/D < 1$ bzw. $0 < h/H < 1$) ist nur ein geringfügiges Koaleszenz- oder Bruchverhalten auszumachen, was zu einem annähernd homogenen Gasblasendurchmesser zwischen 2 und 2.5 mm im BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L führt. In Wellennähe und zwischen den beiden Rührern ($0.4 < d/D < 0.6$ bzw. $0.3 < h/H < 0.5$) ist ein Koaleszenzverhalten durch einen zunehmenden Durchmesser bis auf 3 mm erkennbar. Das lässt jedoch auf eine geringfügige Überflutung der Rushton Turbine schließen. Der mittlere Sauterdurchmesser mit 4 bis 6 mm weist zusätzlich auf eine homogene Verteilung und das gute Dispergierverhalten der Rushton Turbine hin.



A **B** **C**
Abbildung 17: Verteilung der Gasblasenzahl (A), des Gasblasendurchmessers d_{10} (B) und des Sauterdurchmessers d_{32} (C) im BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L mit Wasser bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm und einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s ($P/V = 48 \text{ W/m}^3$). Durch die schwarzen Bereiche sind die Rührer, die Welle und der Ringsparger sowie durch den weißen Bereich die Schweißnaht des Plexiglasbehälters angedeutet.

Werden die Untersuchungen zur Gasblasenverteilung in Bezug zu den k_{La} -Werte der beiden Rührerkonfigurationen im BIOSTAT® STR 50 L gesetzt, zeigt die Variante mit Rushton Turbine eine homogene Gasblasenverteilung und ein minimales Koaleszenzverhalten der eingetragenen Gasblasen mit relativ geringem Durchmesser von 2 mm. Das führt zu einem begünstigten Sauerstofftransfer aus der Gas- in die Flüssigphase, wodurch k_{La} -Werte bis 27 1/h resultieren. Die Rührervariante 2 x SBI hingegen weist eine weniger homogene Gasblasenverteilung und ein deutliches Koaleszenzverhalten mit Durchmessern bis maximal 6 mm auf. Der geminderte Sauerstofftransfer führt folglich zu geringeren k_{La} -Werten von bis zu 14 1/h, die nichtsdestotrotz für zellkulturbasierende Prozesse ausreichend sind [165].

4.1.3 S.U.B.

Die Bestimmung der Leistungscharakteristik im S.U.B. 50 L erfolgt mittels Drehmomentmessung in der um 19.6° exzentrisch eingebauten Rührerwelle (Abbildung 18; A). Im Messbereich zwischen $10^4 < Re < 10^5$ wird eine quasi-konstante Newton Zahl von 2.2 erhalten. Die auftretende Abweichung basiert auf einer stark ausgeprägten und nicht gleichmäßigen Eigenbewegung des Rührers im Fluid in alle Raumrichtungen. Die Bewegung wird aufgrund fehlender und herstellerseitiger Einbringung von Lagerungen unterhalb des Rührerantriebes hervorgerufen. Wie bei konventionellen Rührern stellt sich auch im S.U.B. 50 L oberhalb einer Reynolds Zahl von 10^4 eine turbulente Strömung ein, die durch eine konstante Newton Zahl beschrieben wird. Zusätzlich tritt keine Abnahme der Newton Zahl über die Zunahme im Reynolds-Bereich durch die Exzentrizität des Rührers auf, wie es im BIOSTAT® STR 50 L beobachtet werden konnte (Kapitel 4.1.2).

Der erhaltene spezifische Leistungseintrag in Abhängigkeit der Rührerumfangsgeschwindigkeit ist in Abbildung 18; B für den S.U.B. 50 L mit dem Stoffsystem Wasser und Wasser/Luft ($\beta = 0.02 \text{ vvm}$) dargestellt. Mit der Erhöhung der Rührerumfangsgeschwindigkeit (von 0.38 bis

1.05 m/s) erfolgt ein Anstieg des spezifischen Leistungseintrages von 1 auf 23 W/m³, der vergleichbar mit dem BIOSTAT® STR (2 x SBI) ist. Im Gegensatz zu dem single-use Bioreaktor von Sartorius Stedim Biotech nimmt der spezifische Leistungseintrag im S.U.B. bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm nur geringfügig um ca. 6 % (entspricht ca. 25 W/m³) zu.

Hinsichtlich der Homogenität im S.U.B. 50 L wird die Mischzeit bei unterschiedlichen Arbeitsvolumen (25, 35 und 50 L) sowie spezifischen Leistungseinträgen mittels konduktiver Sondenmethode bestimmt (Abbildung 18; C), da der optische Zugang zum Fluid nicht gewährleistet ist. Bei maximaler Leistung wird eine Mischgüte von 95 % bereits nach 10 s erhalten, die unabhängig vom Arbeitsvolumen ist. Sinkt der spezifische Leistungseintrag im 50 L Maßstab auf 1 W/m³ erhöht sich die Mischzeit auf maximal 80 s. Die Regressionsgerade mit dem Exponent -0.44 weist zudem eine große Abweichung zu dem theoretisch vorgegebenen Wert von -0.33 hin, was auf die punktuelle Messmethodik zurückzuführen ist (Gleichung 29). Verglichen mit dem BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L System, dessen Mischzeit mit der Sondenmethode bei 40 s ermittelt wurde, benötigt der S.U.B. 50 L die doppelte Zeit, um die gleiche Mischgüte zu erzielen. Zusätzlich ist anzunehmen, dass unter Berücksichtigung des gesamten Reaktors mit einer weiteren Erhöhung der Mischzeit gerechnet werden muss.

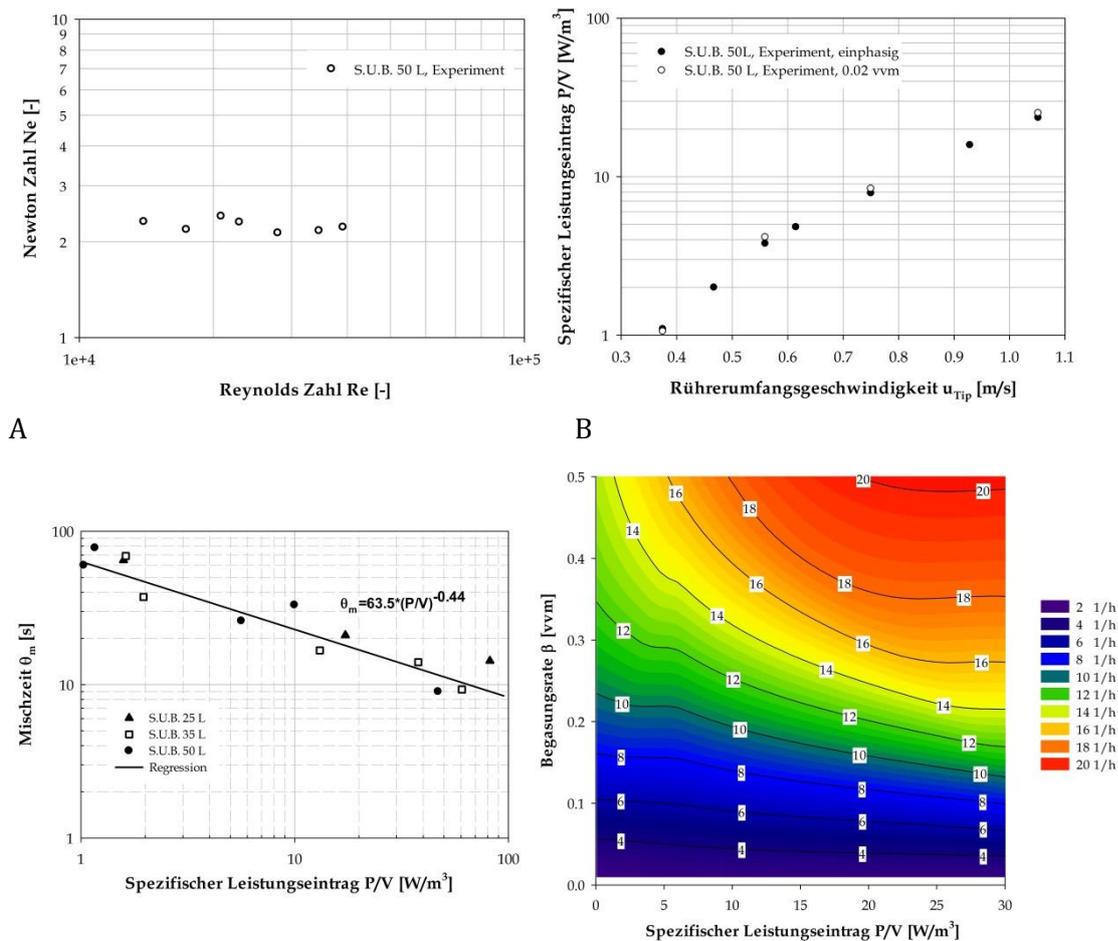
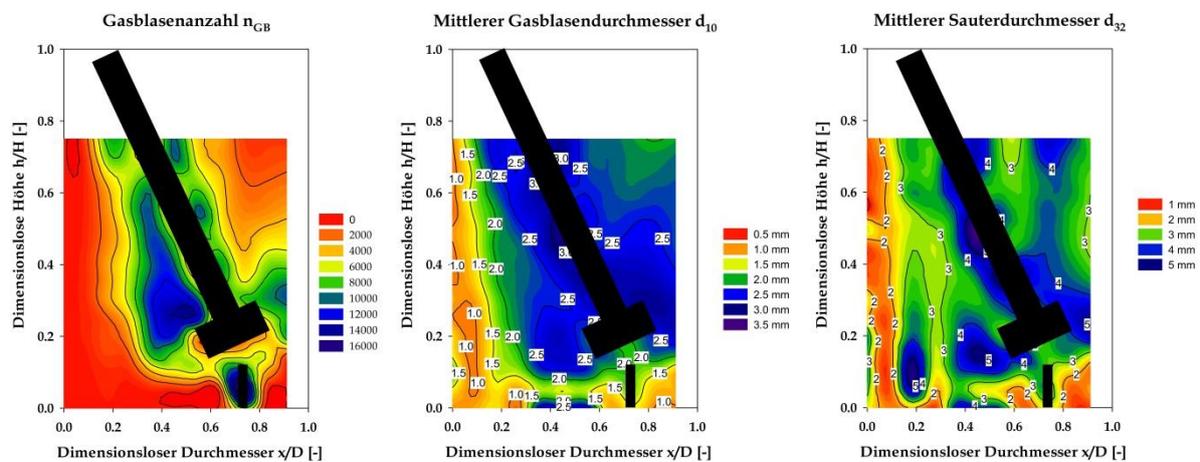


Abbildung 18: Bestimmung der Leistungscharakteristik (A) und des spezifischen Leistungseintrages als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit (B) im S.U.B. 50 L. Zusätzlich ist die experimentelle Bestimmung der Mischzeit (95 % - Mischgüte) als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für den S.U.B. 50 L mit den Arbeitsvolumen 25, 35 und 50 L (C) sowie der volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten k_{La} in Abhängigkeit der Begasungsrate und des spezifischen Leistungseintrages im 50 L Maßstab dargestellt (D).

Der Sauerstoffeintrag im S.U.B. 50 L ist in Abhängigkeit der Begasungsrate (0.01 bis 0.5 vvm) und des spezifischen Leistungseintrages dargestellt (Abbildung 18; D). Die erhaltenen k_{LA} -Werte liegen trotz des verwendeten Mikrospargers im wässrigen Stoffsystem zwischen 2 und 20 1/h, die im Vergleich zum UniVessel® SU und zum BIOSTAT® STR 50 L deutlich geringer ausfallen. Bei typischen Begasungsraten in Zellkulturprozessen von bis zu 0.1 vvm kann daher nur mit einem k_{LA} von maximal 8 1/h gerechnet werden.

Grund für den verminderten Sauerstofftransfer ist die inhomogene Verteilung der eingetragenen Gasblasen (Abbildung 19; A) im S.U.B. 50 L, die lediglich im Bereich um den Rührer und der Welle mit bis zu 14'000 Gasblasen erfolgt und bereits eine Überflutung des Rührers bei 0.02 vvm nach sich zieht. Im übrigen Reaktorraum sinkt die Gasblasenzahl bis auf ein Minimum zwischen 0 und 2000 Gasblasen, wobei seitlich des Mikrospargers und in unmittelbarer Nähe der Fluidoberfläche keine Blasen gemessen werden (Abbildung 19; A). Zusätzlich erfolgt mit zunehmender Höhe ein Anstieg der Gasblasengröße bis auf 2.5 bzw. 3 mm. Der Mikrosparger weist bei einem mittleren Eingangsblasendurchmesser von ca. 1.5 mm auf ein Koleszenzverhalten der Gasblasen und auf ein geringes Dispergierverhalten des Schrägblattrührer hin (Abbildung 19; B). Der mittlere Sauterdurchmesser liegt in den begasten Reaktorbereichen zwischen 3 und 5 mm (Abbildung 19; C) und ist vergleichbar mit den beiden Rührervarianten des BIOSTAT® STR 50 L.



A B C
Abbildung 19: Verteilung der Gasblasenzahl n_{GB} (A), des Gasblasendurchmessers d_{10} (B) und des Sauterdurchmessers d_{32} (C) im S.U.B. 50 L mit Wasser bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm und einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s ($P/V = 20 \text{ W/m}^3$). Durch die schwarzen Bereiche sind der Rührer, die Welle und der Mikrosparger angedeutet.

4.1.4 Grundlegende, verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren

Die Nutzung von single-use Bioreaktoren für zellkulturbasierende Prozesse setzt grundlegende Kenntnisse des verwendeten Bioreaktorsystems und dessen verfahrenstechnischen Kenngrößen voraus. Die zu bestimmenden verfahrenstechnischen Kenngrößen sollten sowohl die Betriebsparameter einschließlich des Strömungsregimes, der Fluidgeschwindigkeit, der Gasleerrohrgeschwindigkeit/Begasungsrate beinhalten, als auch die experimentelle Bestimmung des Leistungseintrages, der Mischzeit und des $k_{L,a}$ umfassen. In Anbetracht des Vergleiches von single-use Bioreaktoren untereinander werden die verfahrenstechnischen Methoden und die baulichen Gegebenheiten von single-use Bioreaktoren für eine Charakterisierung berücksichtigt (Tabelle 4). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Bestimmung der verfahrenstechnischen Kenngrößen in den originalen Kultivierungssystemen mit der vorhandenen Instrumentierung durchgeführt wird und keine Manipulation am Reaktorsystem oder die Nutzung eines Reaktor-Ersatzmodells erfolgt.

Im Falle der rigiden Kultivierungssysteme ist die empfohlene Bestimmung des Strömungsregimes, der Fluidgeschwindigkeiten und der Gasleerrohrgeschwindigkeit möglich (Tabelle 4). Der Leistungseintrag ist sowohl im mL als auch L-Maßstab über die Drehmomenten-Methode bestimmbar, da beispielsweise auch bei orbital geschüttelten single-use Systemen eine rotierende Achse im Motorantrieb verbaut ist. Zusätzlich demonstrieren Untersuchungen die mögliche Nutzung der Temperatur-Methode [167, 172]. Der Vergleich beider Ansätze weist übereinstimmende Messresultate auf, weshalb diese Methode auch optional für orbital geschüttelte single-use Bioreaktoren genutzt werden kann. Die Mischzeit ist vorzugsweise mittels Farbumschlag zu bestimmen, wo eine optische Zugänglichkeit gegeben ist und somit die Ausbildung von Tot- oder Ruhezonen erfasst werden kann. Die Bestimmung des $k_{L,a}$ erfolgt in Abhängigkeit der Instrumentierung. Da in single-use Bioreaktoren, sowohl im mL- als auch im L-Maßstab, optische Sensoren zur Bestimmung des gelösten Sauerstoffes bzw. des $k_{L,a}$ vorhanden sind, wird für diese die *gassing-out* Methode empfohlen. Die Sulfit-Methode sollte, aufgrund diverser Einflussgrößen auf die Messung und der umweltschädlichen Wirkung von schwermetallhaltigen Lösungen, nur bei Bioreaktorsystemen ohne Instrumentierung erfolgen.

In flexiblen single-use Bag-Bioreaktoren ist eine Ermittlung der Betriebsparameter (Strömungsregime, Fluidgeschwindigkeit und Gasleerrohrgeschwindigkeit) nur eingeschränkt möglich (Tabelle 4). In wellendurchmischten und orbital geschüttelten Systemen ist die Ermittlung der Gasleerrohrgeschwindigkeit im ursprünglichen Sinne nicht möglich, da keine durchströmte Fläche definiert werden kann. Wird jedoch die Fläche zwischen der Luft und dem Medium als eigentliche Austauschfläche veranschlagt, ist die Ermittlung einer modifizierten Gasleerrohrgeschwindigkeit möglich. Zusätzlich ist die Angabe der (volumenbezogenen) Begasungsrate sinnvoll. Aufgrund der optischen Zugänglichkeit des Fluids ist eine Bestimmung der Mischzeit in wellendurchmischten Bioreaktoren, mit taumelnden Rührern ausgestatteten Bioreaktoren, *air wheels* und dem BIOSTAT® STR (bis zu einem Arbeitsvolumen von 200 L) durch den Farbumschlag zu bestimmen. In allen übrigen single-use Bag-Bioreaktoren muss auf die punktuelle Messung der Sensormethoden zurückgegriffen werden, wobei hier die Bestimmung der Säure/Base Konzentration mittels pH-Sonde zu favorisieren ist [297]. Da die Instrumentierung der flexiblen Bags die Messung des gelösten Sauerstoffes vorsieht, ist die

Bestimmung des k_{La} über die *gassing-out* Methode zu empfehlen. Lediglich für wellendurchmischte und orbital geschüttelte single-use Bag-Bioreaktoren kann die Sulfit-Methode optional durchgeführt werden. Im Gegensatz zum mL-Maßstab in rigiden Behältern, gewinnt der Aspekt der umweltschädlichen Nutzung von schwermetallhaltigen Lösungen sowie die Entsorgung der anfallenden Lösungen mit zunehmendem Bioreaktormaßstab an Bedeutung, weshalb der Einsatz der Sulfit-Methode auch hier nicht zu empfehlen ist. Im Fall der kontinuierlichen Betriebsweise ist zusätzlich die Verweilzeit zu bestimmen [40].

Die in Tabelle 4 aufgeführten Methoden zur grundlegenden, verfahrenstechnischen Charakterisierung von single-use Bioreaktoren bildet die Grundlage für einen Vergleich der Reaktoren untereinander. Der Vergleich zu konventionellen Systemen aus Glas oder Edelstahl ist zusätzlich gegeben, da konventionelle Reaktorsysteme als rotierende Rührer in der Tabelle 4 eingestuft werden können. In Abhängigkeit ihrer konstruktiven Gegebenheiten (Glas oder Edelstahl) sind hierfür auch die Methoden zur Bestimmung der Mischzeit (Entfärbung oder pH-Sondenmethode) in Tabelle 4 definiert. Sind die Parameter der grundlegenden, verfahrenstechnischen Charakterisierung erfasst, ist ein Prozesstransfer von konventionellen hin zu single-use Bioreaktoren daher durchaus realisierbar.

Trotz der Möglichkeit des Prozesstransfers beschreiben die in Tabelle 4 aufgeführten verfahrenstechnischen Parameter lediglich globale oder volumenbezogene Werte. Eine detaillierte Betrachtung der Bioreaktoreigenschaften ist daher nur durch eine erweiterte, verfahrenstechnische Charakterisierung gegeben. Diese sollte für single-use Bioreaktoren die experimentelle Bestimmung der mechanischen Beanspruchung, das Strömungsverhalten oder die Nutzung der CFD umfassen (Kapitel 4.2ff). Die drei Verfahren erlauben hochaufgelöste, zeitliche und örtliche Betrachtung der Fluidströmung. Mittels der CFD wird zusätzlich die Möglichkeit erhalten, die physikalischen Eigenschaften der Strömungen in den jeweiligen single-use Systemen (vom mL bis hin zum m^3 Maßstab) zu betrachten, und für ein Scale-up sowie eine Prozessauslegung heranzuziehen.

Tabelle 4: Methoden zur Bestimmung von grundlegenden, verfahrenstechnischen Kenngrößen in single-use Bioreaktoren (Empfehlung = x).

		Methoden	Rigide Behälter		Flexible Bags				
			mL-scale	L – scale	Wellendurchmischte / orbital geschüttelt	taumelnde Rührer	Rotierende Rührer / oszillierende Bewegung (rotatorisch und vibrierend)	<i>Air wheel</i>	
Grundlegende, verfahrenstechnische Charakterisierung	Betriebsbedingungen	Strömungsregime	x	x	x	x	x	x	
		Fluidgeschwindigkeiten	x	x	x	x	x	x	
		Gasleerrohrgeschwindigkeit	x	x		x	x	x	
	Experimentelle Methoden	Leistungseintrag	Drehmomenten-Methode	x	x	x	x	x	x
			Temperatur-Methode		x ³				
		Mischzeit	Entfärbungs-Methode	x	x	x	x	x ¹	x
			Sondenmethode					x ²	
k _L a	<i>Gassing-out</i> Methode	x ⁴	x	x	x	x	x		
	Sulfit-Methode	x ³	x ³	x ³					

¹ für single-use Bioreaktoren mit optischen Zugänglichkeit zum Fluid, ² für single-use Bioreaktoren mit optischen Zugänglichkeit zum Fluid, ³ optional für orbital geschüttelt und wellendurchmischte, ⁴ wenn optische Sensoren vorhanden

4.2 Fallstudie II: Numerische Charakterisierung und Validierung

In der folgenden Fallstudie wird eine erweiterte, verfahrenstechnische Charakterisierung der bisher experimentell untersuchten single-use Bioreaktoren durchgeführt. Hierbei werden anhand der CFD die grundlegenden und erweiterten verfahrenstechnischen Kenngrößen (Kapitel 2.3) ermittelt. Auf Basis von numerisch und experimentell gemessenen Strömungsprofilen und Geschwindigkeitsverteilungen erfolgt eine Beurteilung der verwendeten CFD-Modelle für den UniVessel® SU, den BIOSTAT® STR 50 L und den S.U.B. 50 L. Zusätzlich werden die experimentellen Kenngrößen mit den numerisch erhaltenen Werten verglichen.

4.2.1 UniVessel® SU und BIOSTAT® STR 50 L

Im BIOSTAT® STR erfolgt die Ausprägung des Strömungsfeldes durch eine abwärtsfördernde Rührerbewegung. Diese wird für beide Rührerkonfigurationen (2 x SBI und RT + SBI) unter nicht begasten Bedingungen numerisch bestimmt und mittels experimentellen Untersuchungen durch die PIV bewertet (Abbildung 20). Unter turbulenten Strömungsbedingungen erfolgt bei einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s der Vergleich der beiden Untersuchungsansätze im 50 L Maßstab (Kapitel 4.1.2). Basierend auf der 2D-PIV werden nur die Geschwindigkeiten in u_x und u_y Richtungen berücksichtigt (Abbildung 20).

Unabhängig von der Messmethode wird im BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L eine maximale relative Geschwindigkeit von $0.45 u_{Tip}$ an den äußeren Rührerblattkanten beider Rührer gemessen (Abbildung 20; A und B). Die zu u_{Tip} abweichende, maximale relative Geschwindigkeit ($1 u_{Tip}$) ist auf u_z als Hauptkomponente der Strömung mit einem Anteil von ca. 55 % zurückzuführen. Entlang des Rührernachlaufs sinkt die relative Geschwindigkeit auf bis zu $0.3 u_{Tip}$ und ein sich axial ausgeprägter Strömungswirbel ist bei beiden Untersuchungsansätzen ersichtlich. Resultierend zirkuliert das Fluid vom Rührernachlauf zur Bioreaktorwand in Richtung der Fluidoberfläche und anschließend an der Rührerwelle entlang zum Rührer zurück. Die in der Fluidzirkulation vorliegenden relativen Geschwindigkeiten liegen in einem Bereich zwischen 0.03 und $0.15 u_{Tip}$. Durch die dominierenden axialen Strömungswirbel, die sich durch die Rührernachläufe der Segmentblatt-Rührer einstellen, wird für die CFD und PIV Untersuchungen ein axiales Strömungsverhalten mit annähernd identischer Geschwindigkeitsverteilung aufgezeigt. Eine Validierung des verwendeten CFD Modells im BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L erfolgt in Anlehnung an [236, 298, 299] aufgrund der visuellen Übereinstimmungen der numerisch und experimentell erhaltenen Resultate. Zusätzlich zeigt das Fluidverhalten eine gute Übereinstimmung für Segmentblatt-Rührer aus Edelstahl. Das CFD Modell des BIOSTAT® STR (2 x SBI) kann folglich für weitere Untersuchungen zum Scale-up genutzt werden.

Im Falle der Rührerkonfiguration mit Rushton Turbine und Segmentblatt-Rührer (Abbildung 20; C und D) zeigt der SBI ein deutlich zu erkennendes axiales Strömungsprofil bei abwärtsfördernder Rührerdrehrichtung. Für die Rushton Turbine ist eine radial gerichtete Strömung hin zur Behälterwand auffallend. Mittels CFD wird eine maximale relative Geschwindigkeit von $0.45 u_{Tip}$ im BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L gemessen, wohingegen für den RT eine maximale relative Geschwindigkeit von $0.51 u_{Tip}$ in direkter Rührernähe erhalten wird.

Die Geschwindigkeitsverteilung im BIOSTAT® STR (RT + SBI) wird demnach durch die RT bestimmt. Laut der numerisch ermittelten Ergebnisse der RT wird das radiale Strömungsverhalten durch den gering abwärtsneigenden Rührerausstrom bestimmt (Abbildung 20; C). Sowohl in experimentellen [300, 301] als auch numerischen Untersuchungen [302] konnte ein abwärts geneigter Rührerausstrom in bewehrten und unbewehrten Behältern unter vollturbulenten Strömungsbedingungen beobachtet werden. Zusätzlich ist nach Liepe *et al.*, 1998 sowie Varley und Birch, 1999 der Einfluss von mehrstufigen Rührern aufeinander vernachlässigbar, wenn das Verhältnis von Rührerabstand zu Rührerdurchmesser (c/d) grösser 1.25 ist [145, 168]. Das Fluid (Abbildung 20; C) wird durch den Rührerausstrom an der Reaktorwand in eine überwiegend aufwärtsgerichtete Strömung umgelenkt und in Richtung Fluidoberfläche gefördert. Die Ausprägung eines Strömungswirbels entlang des Reaktorbodens, wie es bei radialfördernden Rührern der Fall ist, ist nur ansatzweise ersichtlich. Die experimentellen Untersuchungen ergebenen für die RT eine radiale Fluidströmung (Abbildung 20; D), die sich an der Reaktorwand aufteilt und eine abwärts- sowie aufwärtsgerichtete Umlaufströmung ausbildet.

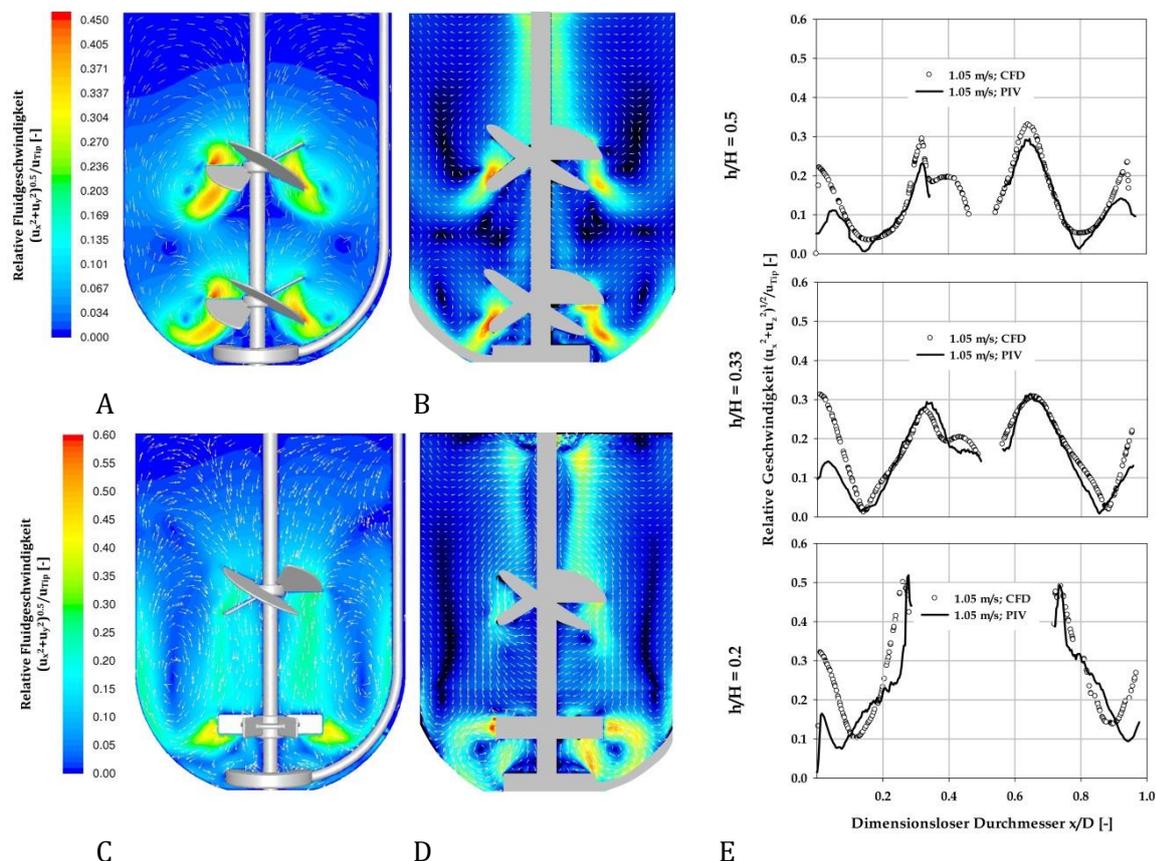


Abbildung 20: Numerische und experimentelle Beurteilung des Strömungsverhaltens und der Geschwindigkeitsverteilung im BIOSTAT® STR 50 L mit den beiden Rührerkonfigurationen 2 x SBI (A und B) und RT + SBI (C und D). Zusätzlich erfolgt für die RT + SBI Konfiguration eine quantitative Betrachtung der relativen Geschwindigkeiten als Funktion des dimensionslosen Durchmessers bei unterschiedlichen dimensionslosen Höhen (E).

Aufgrund der experimentell und numerisch unterschiedlich ermittelten Strömungsprofile im BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L erfolgt zusätzlich eine quantitative Beurteilung der Strömung auf radialen Profilen bei unterschiedlichen Höhen (Abbildung 20; E). Auf den dimensionslosen

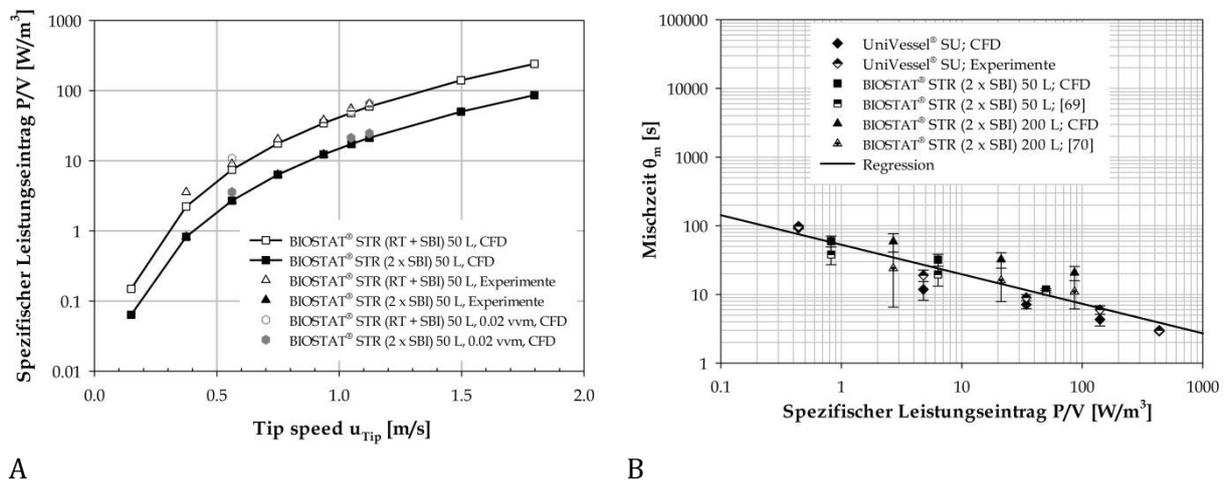
Höhen (h/H) von 0.2 (mittlere Ebene der RT), 0.33 (mittlere Ebene des Rührerabstandes) und 0.5 (mittlere Ebene des SBI's) sind die numerisch und experimentell erhaltenen relativen Geschwindigkeiten als Funktion des dimensionslosen Durchmessers (x/D) aufgeführt. Die Graphen der beiden Ansätze zeigen einen annähernd übereinstimmenden Verlauf der Geschwindigkeiten bei h/H von 0.33 und 0.5. In Anlehnung an die Kontur- und Vektordarstellungen (Abbildung 20; C-D) ist jedoch eine Abweichung der relativen Geschwindigkeiten von bis zu 60 % bei den x/D Verhältnissen von 0 - 0.1 und 0.9 - 1 im experimentellen Ansatz zu beobachten. Über den weiteren Profilverlauf sind die Abweichungen beider Versuchsansätze mit bis zu 10 % relativ gering und geben das Geschwindigkeitsprofil gut wieder. Lediglich bei h/H von 0.5 und x/D von 0.35 ist der Verlauf der beiden Graphen abweichend, was auf die experimentelle Messtechnik zurückzuführen ist. In diesem Fall ist der optische Zugang zum Fluid durch den SBI verdeckt und kann daher nicht ermittelt werden. In dem Geschwindigkeitsprofil $h/H = 0.2$ sind die zuvor beschriebenen abweichenden Umlaufströmungen ersichtlich. Ausgehend von der maximalen relativen Geschwindigkeit $0.51 u_{\text{Tip}}$ nehmen die Geschwindigkeiten im Rührerausstrom hin zur Kesselwand annähernd gleich ab ($0.1 < x/D < 0.3$ und $0.7 < x/D < 0.9$). Gegenüber den experimentellen Untersuchungen zeigen die CFD-Simulationen einen um $0.05 x/D$ verkürzten Nachlauf, der durch die abwärts gerichtete Strömung verursacht wird. Zusätzlich weichen die Geschwindigkeiten in Wandnähe um bis zu 45 % voneinander ab. Um eine abschließende Aussage zur Validierung zu erhalten, sollten zusätzliche experimentelle Untersuchungen zum spezifischen Leistungseintrag und zur Mischzeit erfolgen.

Zur Bestimmung des spezifischen Leistungseintrages in den gerührten Bioreaktoren wird dieser bis zu einer maximalen Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.8 m/s variiert und das Drehmoment experimentell (BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B. 50 L) sowie numerisch (UniVessel® SU, BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B. 50 L) erfasst. Der Wert von 1.8 m/s wird zumeist als maximal tolerierbare Geschwindigkeit für tierische Zellen in der Literatur angegeben [30, 155], da tierische Zellen keine Zellwand besitzen und gegenüber mechanischen Beanspruchungen sensibler als Mikroorganismen sind. Anhand der Bestimmung des vorliegenden Strömungsregimes (Gleichung 1 und Gleichung 6) wird im BIOSTAT® STR 50 L oberhalb einer kritischen Reynolds Zahl (Re_{krit}) von 10^4 eine turbulente Strömung ausgebildet. Die unter turbulenten Bedingungen vorliegenden Newton Zahlen von 3.3 (RT + SBI) und 1.2 (2 x SBI) weichen nur geringfügig (maximal 3 %) von den experimentellen Ergebnissen ab (Kapitel 4.1.2 und 4.3.1.1). Sowohl die kritischen Reynolds Zahlen als auch die erhaltenen Newton Zahlen sind zu herkömmlichen Rührern aus Edelstahl vergleichbar [17, 145, 146].

Mit zunehmender Rührerumfangsgeschwindigkeit steigt die eingetragene Leistung auf maximale Werte, die bei einem Arbeitsvolumen von 50 L für den 2 x SBI ca. 86 W/m^3 und für den RT + SBI ca. 240 W/m^3 betragen (Abbildung 21; A). Der Vergleich der numerisch und experimentell [69] ermittelten Leistungseinträge zeigen übereinstimmende Verläufe der Graphen sowie annähernd identische Leistungseinträge mit maximalen Abweichungen unterhalb von 15 % auf. Die ermittelten maximalen spezifischen Leistungseinträge liegen nach Nienow, 2006 mit 250 W/m^3 innerhalb eines akzeptablen Bereichs, der für mögliche Schädigungen von Säugerzellen angegeben wird [142].

Eine weitere Betrachtung des spezifischen Leistungseintrages erfolgt unter begasten Bedingungen mittels Ringsparger. Im Vergleich zu mikrobiellen Fermentationen ist zwar der Anteil an der durch die Begasung eingetragene Leistung an der gesamten spezifischen Leistung relativ gering, jedoch wird diese hauptsächlich für einen Vergleich oder eine

Maßstabsübertragung genutzt [142, 189, 192]. Die bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm numerisch ermittelten spezifischen Leistungen sind durchschnittlich um ca. 15 % erhöht (Abbildung 21; A), zeigen allerdings einen kongruenten Graphenverlauf zum einphasigen Stoffsystem auf.



A B
Abbildung 21: Vergleich der numerischen und experimentellen Untersuchungen zum spezifischen Leistungseintrag als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit im BIOSTAT® STR 50 L unter unbegasteten und begasteten Bedingungen (A). Zusätzlich ist die Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für den UniVessel® SU und den BIOSTAT® STR 50 L sowie 200 L für die beiden Versuchsansätze dargestellt (B).

Abbildung 21; B zeigt die experimentell und numerisch erhaltenen Mischzeiten für den UniVessel® SU, BIOSTAT® STR 50 L und 200 L als Funktion des spezifischen Leistungseintrages. Mit zunehmendem spezifischem Leistungseintrag steigt nach Kraume, 2003 die Turbulenz im Reaktor in gleichem Maße an [17], wodurch eine direkte Verringerung der Mischzeit eintritt. Im UniVessel® SU wird mit der Entfärbungsmethode eine Mischzeit von 100 s bei maximalem Arbeitsvolumen und minimalem Leistungseintrag beobachtet (Abbildung 21; B). Hingegen sinkt die Mischzeit auf ein Minimum von 3 s wenn bei konstantem Arbeitsvolumen der spezifische Leistungseintrag bis zum Maximum ($435 W/m^3$) erhöht wird. Ein Vergleich der numerischen und experimentellen Mischzeiten im UniVessel® SU zeigt eine maximale Abweichung beider Ansätze von weniger als 4 %. Diese Beobachtung ist auf die verwendete Entfärbungsmethode zurückzuführen, die eine Betrachtung des gesamten Fluides im Reaktor zulässt und somit vergleichbar zur numerischen Betrachtungsweise ist. Im BIOSTAT® STR (2 x SBI) werden in Abhängigkeit des Leistungseintrages experimentelle Mischzeiten von 10 bis 60 s für den 50 L Maßstab und von 20 bis 60 s für den 200 L Maßstab erhalten [69, 70]. Im Gegensatz zum UniVessel® SU wird bei den Untersuchungen zur Mischzeit im BIOSTAT® STR (2 x SBI) eine maximale Abweichung von 18 % erhalten. Die relativ großen Abweichungen resultieren aus dem verwendeten Messansatz der Sondenmethode (Leitfähigkeitsmethode, 95 % Kriterium) für den 50 L und 200 L Maßstab, die aufgrund der lokal bestimmten Mischzeiten entstehen. Der Exponent der Regressionsfunktion beträgt -0.43 und liegt somit im Bereich des theoretischen Wertes von -0.33 (Gleichung 29). Hierbei zeigt sich jedoch, dass bei der Verwendung von Sondenmethoden, mit ihrer punktuellen Bestimmung der Mischzeit gegenüber der gesamten Betrachtung des Raumes mittels CFD, mit relativ großen Abweichungen von bis zu 20 % gerechnet werden muss. Zusammenfassend zeigt der Vergleich der Mischzeiten eine gute

Übereinstimmung der beiden Untersuchungsansätze auf, wobei jedoch die genutzten Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen berücksichtigt werden müssen.

Im UniVessel® SU werden die zweiphasigen Simulationen für eine Bestimmung des volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten genutzt und diese als Funktion des spezifischen Leistungseintrages ($0.4 \text{ W/m}^3 < P/V < 435 \text{ W/m}^3$) ermittelt (Abbildung 22). Hierfür werden für die numerischen Untersuchungen die Gasleerrohrgeschwindigkeiten von 2.8×10^{-4} und $5.7 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ (entspricht 0.1 und 0.2 vvm) sowie eine Eingangsgasblasengröße von 1 mm veranschlagt [15]. Bei den verwendeten Gasgeschwindigkeiten ist nach Zhu, 2009 kein signifikanter Einfluss auf das Strömungsprofil zu erwarten und zusätzlich ist von kugelförmigen Gasblasen auszugehen [171, 247]. In Abhängigkeit der Gasleerrohrgeschwindigkeit liegen die ermittelten $k_{L,a}$ -Werte (Gleichung 27) im Bereich zwischen 10 - 60 1/h (0.01 vvm; $2.8 \times 10^{-4} \text{ m/s}$) und 20 - 100 1/h (0.02 vvm; $5.7 \times 10^{-4} \text{ m/s}$). Verglichen mit den experimentellen Ergebnissen werden geringfügig abweichende $k_{L,a}$ -Werte erhalten, die in der gleichen Größenordnung liegen [179]. Trotz der Abweichungen beider Ansätze kann bei der Verwendung des UniVessel® SU von relativ großen $k_{L,a}$ -Werten ausgegangen werden, was dessen Einsatz für die Fermentation von Mikroorganismen denkbar macht. Im Vergleich mit den experimentellen Untersuchungen sind Abweichungen zwischen 5 und 40 % zu beobachten (Abbildung 22). Die maximalen Abweichungen treten bei hohen spezifischen Leistungseinträgen und bei einer Begasungsrate von 0.2 vvm auf, welche durch den DoE-Ansatz der experimentellen Untersuchungen und dem Interpolieren in diesem Bereich hervorgerufen wird.

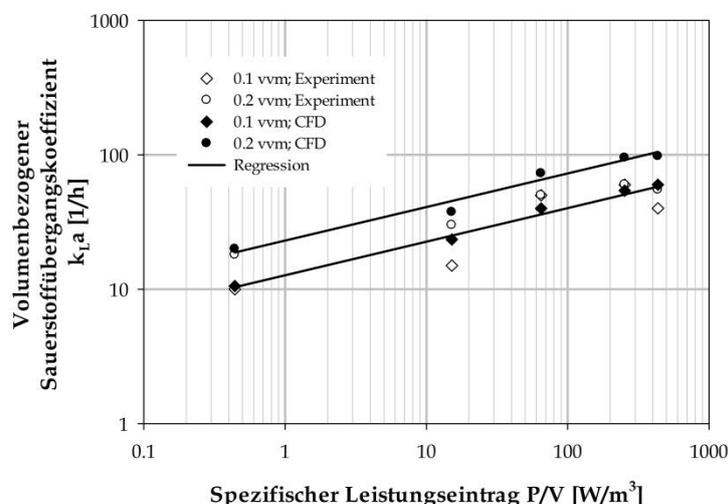


Abbildung 22. Numerisch ermittelter Sauerstoffübergangskoeffizient als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für die Begasungsrate von 0.1 und 0.2 vvm im UniVessel® SU.

Unter Verwendung der Korrelation von van't Riet, die den $k_{L,a}$ als Funktion des spezifischen Leistungseintrages und der Gasleerrohrgeschwindigkeit beschreibt, können für die Koeffizienten $B_{k_{L,a}}$, α und β die Werte 0.4, 0.25 bzw. 0.78 ermittelt werden (Gleichung 33). Aus Gleichung 33 wird deutlich, dass die Gasleerrohrgeschwindigkeit einen wesentlich größeren Einfluss auf den $k_{L,a}$ hat als der spezifische Leistungseintrag. Aufgrund dessen ist bei den verwendeten, geringen Gasleerrohrgeschwindigkeiten von einem verminderten Dispergierverhalten des Rührers auszugehen, was bei weiteren single-use Bioreaktoren wie dem Mobius CellReady 3 L Bioreactor und dem Prototyp des UniVessel® SU (Rührerkonfiguration: RT + SBI) beobachtet werden konnte [15, 39].

$$k_L a = 0.4 * (P/V)^{0.25} * u_G^{0.78}$$

Gleichung 33

Beide Ansätze liefern $k_L a$ -Werte, die innerhalb der gleichen Größenordnung liegen. Unter Berücksichtigung der van't Riet'schen Korrelation (Gleichung 34) ist auch für die experimentellen $k_L a$ -Untersuchungen ein deutlicher Einfluss der Gasleerrohrgeschwindigkeit und ein weniger ausgeprägter Einfluss des spezifischen Leistungseintrages festzustellen.

$$k_L a = 0.007 * (P/V)^{0.27} * u_G^{0.63}$$

Gleichung 34

4.2.2 S.U.B. 50 L

Das abwärts gerichtete Strömungsprofil und die Fluidgeschwindigkeiten des S.U.B 50 L bei einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s (entspricht einer relativen Rührerumfangsgeschwindigkeit = $1 u_{Tip}$) wird durch numerische (Abbildung 23; A) und experimentelle Untersuchungen (Abbildung 23; B und C) evaluiert. Die dargestellten Konturen der Untersuchungsansätze sind auf die Betrachtungsebene normiert und berücksichtigen ausschließlich die relativen Geschwindigkeiten in x- und y-Richtung (entspricht $1 u_{Tip}$).

Die Abbildung 23; A und B weist eine maximale Geschwindigkeiten von $0.56 u_{Tip}$ für die CFD- und PIV-Untersuchungen unmittelbar an der äußeren Rührerblattkante auf. Die zu u_{Tip} abweichende, maximale Geschwindigkeit lässt sich auf u_z als Hauptkomponente mit einem Anteil von ca. 53 % schließen und auf die fehlenden Strombrecher zurückführen. Die abwärts gerichtete Fluidströmung zeigt im Rührernachlauf die Ausprägung von axial gerichteten Wirbeln (Abbildung 23; A und C) mit einer Abnahme der Geschwindigkeiten bis zu $0.14 u_{Tip}$ (Abbildung 23; A und B). Nachfolgend strömt das Fluid mit einer Geschwindigkeit von maximal $0.08 u_{Tip}$ entlang der Reaktorwand in Richtung Fluidoberfläche. An der Rührerwelle zirkuliert das Fluid mit ca. $0.1 u_{Tip}$ zum Rührer zurück. Unterhalb des Schrägblattrührers kommt es durch den exzentrischen Einbau zur Ausbildung von kleineren Wirbeln mit Geschwindigkeiten von bis zu $0.2 u_{Tip}$. Jedoch entstehen unterschiedliche Geschwindigkeitskonturen (Abbildung 23; A und B), die auf eine Berücksichtigung des Spargers in der Betrachtungsebene bei den numerischen Untersuchungen zurückzuführen sind. Durch die im Rührernachlauf entstehenden Wirbel wird im S.U.B. eine axiale Strömung induziert. Während sich bei zentrisch eingebauten Axialrührern zwei gleich große, axiale Fluidzirkulationen links und rechts der Welle einstellen, wird das Fluidverhalten des S.U.B. vom unteren axialen Wirbel dominiert [53, 77].

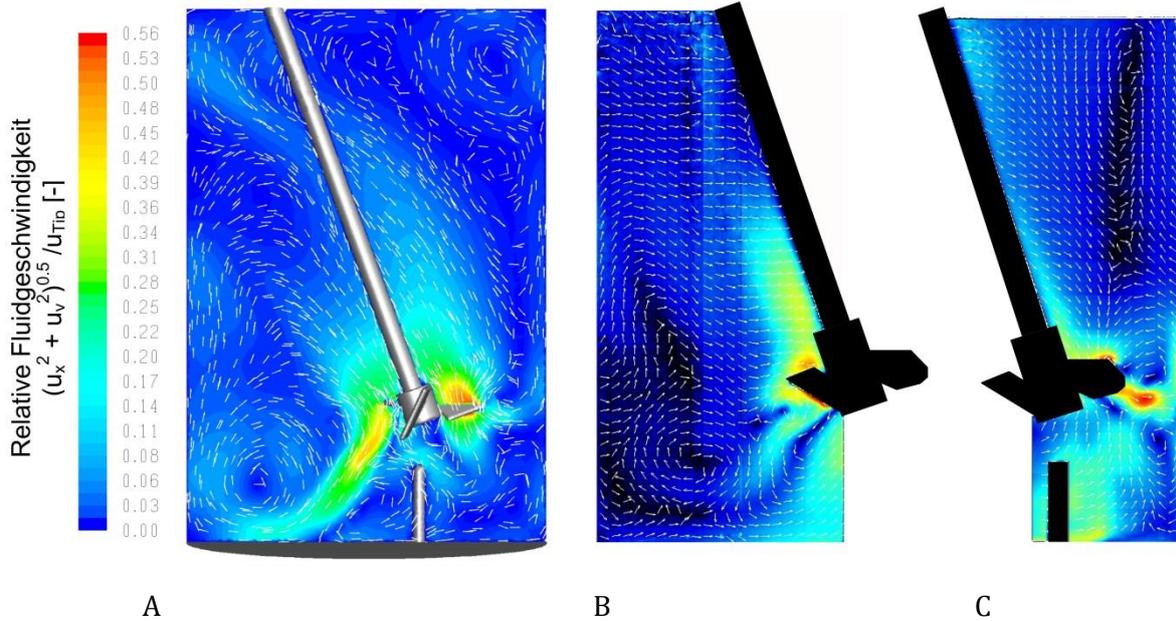


Abbildung 23: Gegenüberstellung der normierten Fluidgeschwindigkeiten und des Strömungsprofils des S.U.B. 50 L mit u_{Tip} von 1.05 m/s der numerischen (A) und experimentellen (B und C) Ergebnisse.

Eine quantitativ detailliertere Betrachtung wird auf radialen Profilen vorgenommen, die unterhalb des Rührers auf den dimensionslosen Höhen (h/H) von 0.15 und 0.2 gewählt werden (Abbildung 24; A). Die Auswertung erfolgte durch die dimensionslose Geschwindigkeit der betrachteten Ebene $((u_x^2 + u_y^2)^{1/2}/u_{\text{Tip}})$ als Funktion des dimensionslosen Durchmessers (x/D).

In den radialen Profilen $h/H = 0.15$ und 0.20 (Abbildung 24; B und C) sind bis zu einem x/D Verhältnis von 0.45 relativ geringe Geschwindigkeiten zwischen 0.08 und $0.1 u_{\text{Tip}}$ festzustellen, wobei die numerischen Untersuchungen auf eine Überbewertung der Geschwindigkeit hinweisen. Bei $h/H = 0.15$ zeigen die Graphen einen annähernd identischen Verlauf mit einer maximalen Abweichung der dimensionslosen Geschwindigkeit von 10% . Für das Profil $h/H = 0.2$ hingegen ist ein übereinstimmender Verlauf auszumachen. Ab $x/D = 0.45$ kommt es zu einem Anstieg der numerisch ermittelten Geschwindigkeit auf ca. $0.38 u_{\text{Tip}}$, was dem abwärts geförderten Fluid des Rührernachlaufes entspricht. Durch die experimentellen Ergebnisse ist ebenfalls der Anstieg der dimensionslosen Geschwindigkeit des Rührernachlaufes auszumachen. Die radialen Profile zeigen eine maximale Geschwindigkeit von $0.34 u_{\text{Tip}}$ für $h/H = 0.15$ und $0.38 u_{\text{Tip}}$ für $h/H = 0.2$, was einer Abweichung der beiden Untersuchungsergebnisse von 15% bzw. 28% entspricht. Mit zunehmendem x/D bis 0.55 sinkt die Geschwindigkeit im unteren Profil bis auf $0.07 u_{\text{Tip}}$ und schwankt im weiteren Verlauf (bis $x/D = 1$) zwischen 0.05 und $0.19 u_{\text{Tip}}$. Die Ergebnisse zeigen eine geringe Unterbewertung der numerisch ermittelten Geschwindigkeit mit Abweichungen von max. 15% . Aufgrund des in Rührernähe deutlich breiteren Nachlaufes nehmen im oberen Profil ($h/H = 0.2$) die Geschwindigkeiten der experimentellen bzw. numerischen Ergebnisse erst bei einem x/D von 0.7 ab. Hier weisen die Graphen bis zur minimalen Geschwindigkeit von $0.01 u_{\text{Tip}}$ eine deutliche Abweichung voneinander auf. Im weiteren Verlauf ($x/D > 0.78$) steigen die Geschwindigkeiten beider Untersuchungsmethoden auf $0.21 u_{\text{Tip}}$ und sinken gegen $x/D = 1$ auf $0.05 u_{\text{Tip}}$ ab.

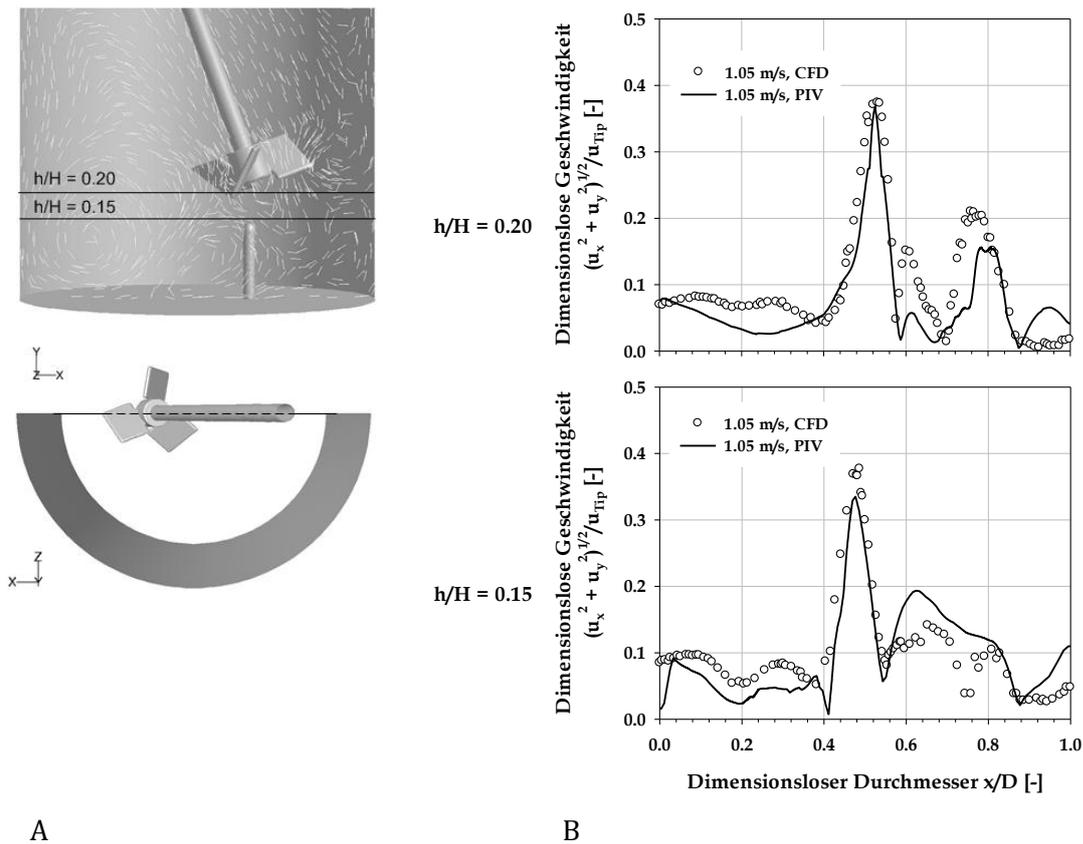


Abbildung 24: Die Evaluierung im S.U.B. 50 L ($u_{Tip} = 1.05$ m/s) erfolgte auf den radialen Höhenprofilen (h/H) von 0.15 und 0.2 (A). Hierfür wird die dimensionslose Geschwindigkeit $((u_x^2 + u_y^2)^{1/2} / u_{Tip})$ als Funktion des dimensionslosen Durchmessers (x/D) genutzt (B).

Die Evaluierung der numerischen Simulationen auf dem radialen Höhenprofil $h/H = 0.2$ zeigt eine geringe Abweichung der beiden Graphen von ca. 15 % (x/D zwischen 0.4 und 0.6). Wird ein x/D zwischen 0.6 und 0.8 betrachtet, so treten deutliche Abweichungen auf, die einen übereinstimmenden Verlauf ausschließen. Die Ursache hierfür ist die permanente Eigenbewegung der Hartplastik-Welle. Aufgrund des direkt unterhalb des Rührers verlaufenden Höhenprofils und der Eigenschwingung des Rührers ist ein einheitliches Strömungsprofil zwischen $x/D = 0$ und 0.7 nicht gewährleistet. Auch die Erhöhung der Anzahl an Doppelbildern auf 2000 Stück pro Position im Rührerbereich führt zu keiner Verbesserung der Strömungsprofile bei $h/H = 0.2$. Hingegen ist auf dem radialen Höhenprofil $h/H = 0.15$ von einer annähernd identischen Übereinstimmung der dimensionslosen Geschwindigkeiten auszugehen, bei dem der Einfluss der Eigenbewegung der Hartplastik-Welle vernachlässigt werden kann. Unter Berücksichtigung der aufgeführten Gegebenheiten ist von einer relativ guten Übereinstimmung der numerischen und experimentellen Ansätze auszugehen. Das CFD-Modell des S.U.B. 50 L wird daher für weitere numerische Untersuchungen verwendet.

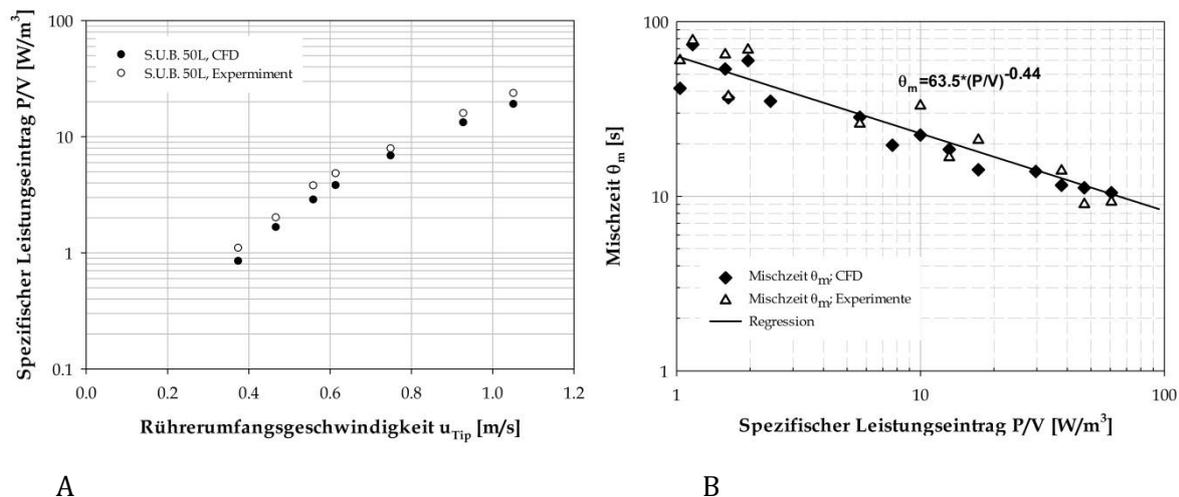


Abbildung 25: Vergleich der numerisch und experimentell ermittelten spezifischen Leistungseinträge als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit (A) sowie der Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages (B) für den S.U.B. mit den Arbeitsvolumen von 25, 35 und 50 L.

Der spezifische Leistungseintrag P/V ist als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit ($0.38 \text{ m/s} < u_{Tip} < 1.05 \text{ m/s}$) in Abbildung 25; A dargestellt und wird häufig als Kriterium für die Maßstabsübertragung verwendet [263]. Mit zunehmender Rührerumfangsgeschwindigkeit steigt der numerisch ermittelte, spezifische Leistungseintrag auf einen maximalen Wert, der für das maximale Arbeitsvolumen bei ca. 24 W/m^3 liegt und einer Newton Zahl von 2.2 entspricht (Kapitel 4.1.3). Im Gegensatz dazu wird bei den experimentellen Ergebnissen ein identischer Kurvenverlauf mit Leistungseinträgen zwischen 0.8 bis 19 W/m^3 mit einer konstanten Newton Zahl von 1.9 erhalten. Die resultierende Abweichung des Leistungseintrages und der Newton Zahl von jeweils ca. 20 % sind auf die Eigenbewegung des Rührers und der Welle sowie fehlende herstellerseitige Lagerungen (Kapitel 4.1.3) zurückzuführen. Diese Eigenbewegung des Rührers wird beim CFD nicht berücksichtigt und stellt somit einen simulierten, „ideal gelagerten Rührer“ dar. Aufgrund der aufwendigen und stark fehlerbehafteten experimentellen Leistungsmessung sollten nur die numerischen Ergebnisse (für P/V , Ne , etc.) in Betracht gezogen werden.

Die Charakterisierung des Mischverhaltens im S.U.B. 50 L erfolgte in Abhängigkeit der Rührerumfangsgeschwindigkeit und des Arbeitsvolumens. Hierfür wurden die Konzentrationsverteilungen eines Tracers mit identischen Fluideigenschaften in transienten Simulationen ermittelt. Zur Validierung der Simulationen wurden im Bag des S.U.B. 50 L experimentelle Mischzeitbestimmungen mittels Leitfähigkeitsmethode durchgeführt (Kapitel 3.2.1 Mischzeitbestimmung; [183]). In Abbildung 25; B ist die experimentell und numerisch bestimmte Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für die Arbeitsvolumen 25, 35 und 50 L aufgeführt. Mit zunehmendem spezifischem Leistungseintrag nimmt ebenfalls die Turbulenzintensität zu, wodurch es zu einer Abnahme der Mischzeit kommt [17]. Während für das maximale Arbeitsvolumen mit dem geringsten Leistungseintrag eine Homogenität erst nach maximal 60 s erreicht ist, reduziert sich diese mit steigendem P/V auf ein Minimum von ca. 10 s. Die Abweichung zwischen den experimentellen und numerischen Mischzeiten beträgt damit maximal 18 % und ist annähernd identisch zu den Abweichungen für den BIOSTAT® STR (2 x SBI). Auch hier sind die Fehler auf die experimentellen Bestimmungsansätze, aber auch auf das Turbulenzmodell und die numerischen Algorithmen, zurückzuführen. Schlussfolgernd zeigt der Vergleich beider Ansätze eine gute Übereinstimmung. Zudem liegt der Exponent der

Regressionsgleichung von -0.44 (Abbildung 25; B) und der theoretische Exponent der Gleichung 29 in der gleichen Größenordnung.

4.2.3 Zeitlich und örtlich aufgelöste, verfahrenstechnische Charakterisierung von single-use Bioreaktoren

In der vorangegangenen Fallstudie (Kapitel 4.2) wird die CFD zur Charakterisierung von unterschiedlichen, gerührten single-use Bioreaktoren herangezogen. Im Vergleich mit den experimentell bestimmten Kennzahlen, die überwiegend in vorhandenen Laborbioreaktoren durchgeführt wurden (UniVessel® SU, BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B. 50 L), zeigen die numerisch erhaltenen Ergebnisse nur geringfügige Abweichungen. Die am Beispiel des UniVessel® SU diskutierten Mischzeituntersuchungen weichen nur geringfügig voneinander ab, was auf den methodischen Ansatz der experimentellen Untersuchungen zurückzuführen ist (Abbildung 21; Kapitel 4.2.1). Trotz der subjektiven Beurteilung der jodometrischen Entfärbemethode ist eine genaue Mischzeitbestimmung gegeben, die durch die CFD bestätigt wird. Im Gegensatz dazu, geben die im BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B. 50 L angewandten Sondenmethoden nur punktuell richtige Mischzeiten wieder. Eine detaillierte und volumenbezogene Betrachtung ist durch die konstruktiven Gegebenheiten der single-use Systeme nicht möglich. Das Beispiel der Mischzeit verdeutlicht, dass auch experimentelle Untersuchungsansätze potenzielle Fehlerquellen aufweisen, die jedoch durch die örtliche und zeitliche Betrachtungsweise der CFD nicht berücksichtigt werden. Weiter zeigt die experimentelle Bestimmung des Leistungseintrages im S.U.B. 50 L unerwartete Schwierigkeiten auf, die infolge der aus Hartplastik bestehenden Welle eine Eigenbewegung des Rührers hervorruft. Die erhaltenen experimentellen Ergebnisse werden dadurch negativ beeinflusst und sind nur durch großen Aufwand reproduzierbar. Die CFD gibt eine „ideale“ Geometrie wieder, bei deren Auswertung keine baulichen Gegebenheiten oder messtechnische Hindernisse die potenziellen Fehlerquellen erhöhen. Somit muss bei einem Vergleich von experimentellen und numerischen Untersuchungen auch immer eine detaillierte Diskussion der verwendeten Methodik erfolgen. Sind jedoch die numerischen Modelle auf Basis des Strömungsverhaltens, der Fluidgeschwindigkeiten und/oder grundlegender, verfahrenstechnischer Parameter validiert, können die genutzten Modelle für die Bioreaktor herangezogen werden (Tabelle 5).

Die Grenzen der CFD sind vorwiegend bei transienten Simulationen zu finden. Im Gegensatz zu stationären Simulationen, wie sie in Rührreaktoren vielfach genutzt werden, sind für Vielzahl von single-use Bioreaktoren nur transiente Berechnungsansätze aufgrund der Bewegungsform der Systeme möglich. Für die Ermittlung der transienten Fluidströmung, in wellendurchmischten, orbital geschüttelten, rotatorisch oszillierenden oder durch vibrierende Scheiben angetriebenen single-use Bioreaktoren, ist ein wesentlich größerer zeitlicher Aufwand notwendig. Während bei stationären Rechnungen von Stunden ausgegangen werden kann, dauern transiente Rechnungen über mehrere Tage bis Wochen an [303]. Hier steht der zeitliche Aufwand zum Erhalt grundlegender verfahrenstechnischer Parameter nicht in Relation zu den experimentellen Untersuchungen, weshalb für eine grundlegende, verfahrenstechnische Charakterisierung ein experimenteller Ansatz vorzuziehen ist. Des Weiteren wird der zeitliche Aufwand durch die Betrachtung eines mehrphasigen Stoffsystems, deren Interaktionen und Auswirkungen (bspw. Koaleszenz oder Gasblasenbruch) gesteigert, die in aeroben Zellkulturprozessen durch die Medium- und Gasphase auftreten. In der Literatur sind diese

numerischen Ansätze überwiegende für Blasensäulen [244, 304-306] aber auch Rührreaktoren [248] beschrieben. In Bezug auf die untersuchten single-use Bioreaktoren werden bei mehrphasigen, numerischen Simulationen im 50 L Maßstab weitere Einschränkungen der CFD deutlich. Die hier erhaltenen Ergebnisse zu den $k_{L,a}$ -Werten und zur Gasblasengrößenverteilung sind nicht ansatzweise mit den experimentell ermittelten Größen vergleichbar. Zurückzuführen ist dies auf die mathematischen Modelle zur Beschreibung der Koaleszenz und des Gasblasenbruches sowie die Abhängigkeit zur Gitteranzahl. Im UniVessel® SU (Arbeitsvolumen 2 L) zeigt sich, dass stabile mehrphasige Simulationen erst ab einer Anzahl von ca. 4 Mio. Gitterzellen durchführbar sind und der $k_{L,a}$ bestimmt werden kann. Für die Betrachtung im Scale-up war es daher nicht möglich, bei stabilen laufenden Simulationen mit zeitlichem und rechentechnisch vertretbarem Aufwand die übrigen $k_{L,a}$ -Werte numerisch zu bestimmen. Neben dem numerischen Aufwand transienter Simulationen ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass ausschließlich bei den flexiblen Bags eine Faltenbildung auftritt, die in Abhängigkeit des Füllvolumens, des Überdrucks oder der Bag-Montage unterschiedlich schwerwiegend ausfällt. Zumeist wird eine Faltenbildung für die Konstruktion der computerbasierten Geometrie vernachlässigt, wohingegen erste Untersuchungen in wellendurchmischten Bags diese berücksichtigen [119].

Mit der Nutzung numerischer Ansätze zur Beschreibung der Strömung in single-use Bioreaktoren wird eine Vielzahl an Informationen zugänglich, die örtlich und zeitlich aufgelöst sind. In Abhängigkeit der Anzahl an Gitterzellen liegen dies zusätzlich in hochaufgelösten Form vor. Hierbei beschränken sich die erhaltenen Daten nicht nur auf Fluidgeschwindigkeiten und die vorherrschende Strömung, sondern können auch die Verteilungen der Drücke, der Temperaturen oder der Konzentrationen umfassen. In der biopharmazeutischen Industrie sind die aufgeführten Parameter zwar zu berücksichtigen, jedoch richtet sich der Fokus auf die Minimierung der mechanischen Beanspruchung. Grund hierfür sind die eingesetzten Zelllinien, die im Vergleich zu Mikroorganismen sensitiver auf die vom Rührer hervorgerufenen mechanischen Belastungen reagieren. Das eingeschränkte Zellwachstum führt zu einer verminderten Produktbildung und somit zu einer geringeren Wirtschaftlichkeit. Daher werden zur Beschreibung der mechanischen Beanspruchung vor allem die Ansätze der lokalen Turbulenz, in Form des Kolmogorov'schen Längenmaßstabes oder turbulenten kinetischen Energie, und der Geschwindigkeitsgradienten, durch Scherung und Dehnung, umfangreich betrachtet [11, 15, 77, 78, 153, 159, 222, 307]. Experimentell ist eine Ermittlung messtechnisch äußerst aufwendig und langwierig, wohingegen bei jeder Strömungsberechnung die lokalen Informationen erhalten werden. Die Turbulenzgrößen sind entweder nur theoretischer Natur (Kolmogorov 'scher Maßstab) oder von der Gitteranzahl abhängig (turbulente kinetische Energie). Aufgrund dessen, sollte für eine Betrachtung der mechanischen Beanspruchung (Tabelle 5) mindestens die Schergradienten berücksichtigt werden, deren Einfluss in single-use und konventionellen Zellkulturbioreaktoren überwiegt [159].

Wie Kapitel 4.2 zeigt, werden in Abhängigkeit der beiden Maßstäbe und der single-use Bioreaktortypen (UniVessel® SU, BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B. 50 L) verfahrenstechnische Parameter erhalten und evaluiert. Die numerischen Modelle für die gerührten single-use Bioreaktoren werden daher für eine weitere, detailliertere Betrachtung und eine Maßstabsübertragung bis zu einem Arbeitsvolumen von 2000 L verwendet (Kapitel 4.3). Der hier virtuell durchgeführte Scale-up hat den Vorteil, dass nicht alle Bioreaktoren, mit ihren Größen und Konfigurationen, für eine Charakterisierung kommerziell erworben werden müssen. Andererseits liegen somit die verfahrenstechnischen Informationen vor, die für einen

Vergleich der single-use Systeme zu konventionellen Bioreaktoren aus Glas oder Edelstahl erforderlich sind.

Tabelle 5: Methoden zur Bestimmung von grundlegenden und erweiterten, verfahrenstechnischen Kenngrößen in single-use Bioreaktoren (Empfehlung = x).

	Methoden	Rigide Behälter		Flexible Bags					
		mL-scale	L – scale	Wellendurchmischte / orbital geschüttelte	taumelnde Rührer	Rotierende Rührer / oszillierende Bewegung (rotatorisch und vibrierend)	<i>Air wheel</i>		
Grundlegende, verfahrenstechnische Charakterisierung	Betriebsbedingungen	Strömungsregime	x	x	x	x	x	x	
		Fluidgeschwindigkeiten	x	x	x	x	x	x	
		Gasleerrohrgeschwindigkeit	x	x		x	x	x	
	Experimentelle Methoden	Leistungseintrag	Drehmomenten-Methode	x	x	x	x	x	x
			Temperatur-Methode		x ³				
		Mischzeit	Entfärbungsmethode	x	x	x	x	x ¹	x
			Sondenmethode					x ²	
k _L a	<i>Gassing-out</i> Methode	x ⁴	x	x	x	x	x		
	Sulfit-Methode	x ³	x ³	x ³					
Erweiterte, verfahrenstechnische Charakterisierung	Strömungsverhalten	PIV, LDA oder HWA		x	x ⁵	x ⁵	x ⁵	x ⁵	
	Mechanische Beanspruchung	FBRM-Sonde			x	x	x	x	
	CFD	Finite-Volumen Methode	x	x	x	x	x	x	

¹ für single-use Bioreaktoren mit optischen Zugänglichkeit zum Fluid, ² für single-use Bioreaktoren mit optischen Zugänglichkeit zum Fluid, ³ optional für orbital geschüttelt und wellendurchmischte, ⁴ wenn optische Sensoren vorhanden, ⁵ gegebenenfalls Ersatzbehälter aus (Acryl-) Glas notwendig

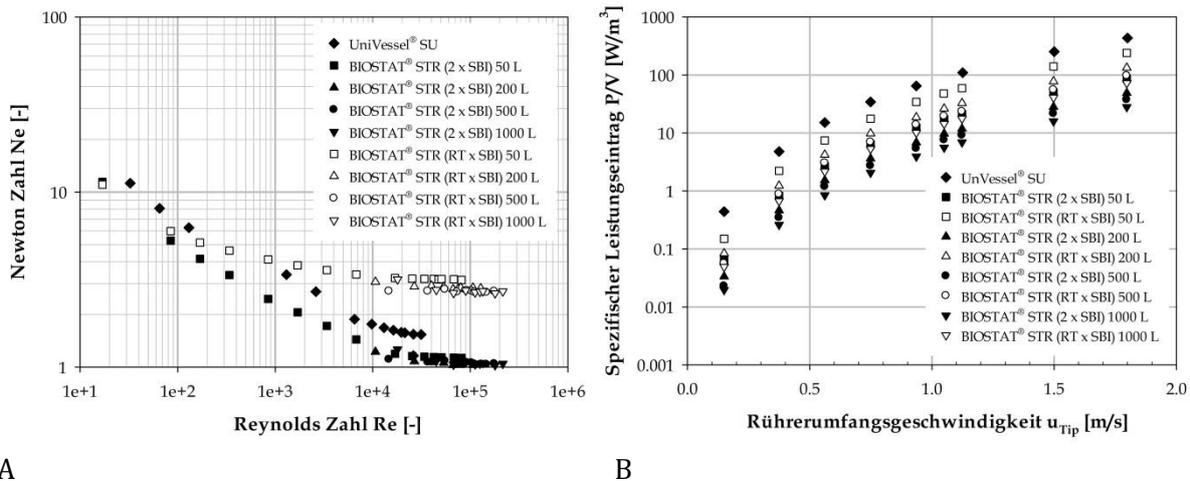
4.3 Fallstudie III: Maßstabsübertragung

Im Kapitel numerische Maßstabsübertragung werden auf Grundlage der vorhergehend evaluierten CFD-Modelle die numerischen Ansätze für eine verfahrenstechnische Charakterisierung der single-use Bioreaktoren bis hin zu den jeweiligen maximalen Arbeitsvolumina verwendet. Die Ergebnisse werden bezüglich ihrer Relevanz in zellkulturbasierten Prozessen beurteilt, so dass erste Aussagen für eine Auslegung von Zellkulturprozessen getroffen werden können.

4.3.1 BIOSTAT® STR Reihe

4.3.1.1 Leistungseintrag

Der Leistungseintrag wird zumeist als Kriterium für eine Maßstabsübertragung verwendet [263]; Kapitel 3.2.1; Bestimmung des Leistungseintrages) und wird daher für eine verfahrenstechnische Beschreibung des UniVessel® SU und der BIOSTAT® STR Linie vorrangig numerisch bestimmt. Mit Hilfe der CFD wird die Leistung durch das an den Mischorganen anliegende Drehmoment ermittelt (Kapitel 3.2.2; Gleichung 5) und lässt zusätzlich eine Bestimmung des vorliegenden Strömungsregimes (Gleichung 1 und Gleichung 6) zu. Anhand der in Abbildung 26;A aufgezeigten, numerisch ermittelten Leistungscharakteristik wird im UniVessel® SU und den BIOSTAT® STR (unabhängig von der Rührerkonfigurationen und dem Maßstab) oberhalb einer kritischen Reynolds Zahl (Re_{krit}) von 10^4 eine turbulente Strömung ausgebildet. Die sich in Abhängigkeit der Rührer-Konfigurationen einstellende quasi-konstante Newton Zahl von 1.1 (BIOSTAT® STR 2 x SBI) und 3.2 (BIOSTAT® STR RT + SBI) zeigt die Vergleichbarkeit zu herkömmlichen Bioreaktoren aus Glas oder Edelstahl mit den entsprechenden Rührern auf [145, 174, 175]. Zusätzlich wird für die beiden Rührervarianten eine Verringerung der Newton Zahl bei steigendem Volumen beobachtet, die für den 2 x SBI minimal 1.0 und für den RT + SBI 2.7 betragen und experimentell von Noack, 2010 aufgenommen wurden [69]. Grund hierfür sind geringe Unterschiede der dimensionslosen Verhältnisse der Reaktor- und Rührergeometrien zwischen den einzelnen Maßstäben. Bei beiden Rührervarianten des BIOSTAT® STR ist zudem oberhalb einer Reynolds Zahl von 10^4 eine geringfügige Abnahme der Newton Zahl zu erkennen, welche durch die fehlende Bewehrung des Bioreaktors hervorgerufen wird [40, 145]. Im UniVessel® SU weicht der Übergang zwischen transientem und turbulentem Strömungsbereich geringfügig von der in der Literatur kritischen Reynolds Zahl ab und liegt zwischen $10^4 < Re < 16^4$. Die Newton Zahl im UniVessel® SU beträgt 1.5 und weist ebenso wie die BIOSTAT® STR Reihe auf eine geringfügige Abnahme der Newton Zahl im turbulenten Strömungsbereich hin, die durch die fehlende Bewehrung hervorgerufen wird.



A **B**
Abbildung 26: Gegenüberstellung der Leistungscharakteristik (Newton Zahl als Funktion der Reynolds Zahl); A) und der spezifische Leistungseintrag als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit (B) für die untersuchten Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech.

Die Betrachtung des spezifischen Leistungseintrages wird für den UniVessel® SU und die BIOSTAT® STR 50 L, 200 L, 500 L und 1000 L für beide Rührer-Konfigurationen durchgeführt und ist als Funktion gleicher Rührerumfangsgeschwindigkeiten in Abbildung 26; B dargestellt. Unter Verwendung von Rührerumfangsgeschwindigkeiten als Scale-up/ Scale-down Kriterium erhöht sich der spezifische Leistungseintrag signifikant für kleinere Maßstäbe und nimmt in größeren Volumina ab (Gleichung 28). Daraus resultiert im UniVessel® SU ein maximaler spezifischer Leistungseintrag von ca. $435 W/m^3$, der für zellkulturbasierte Prozesse sehr hoch ist, aber für mikrobielle Fermentationen einen adäquaten Leistungseintrag darstellt. Für mittlere Rührerumfangsgeschwindigkeiten ($0.5 - 1.25 m/s$) werden bis zu $150 W/m^3$ realisiert.

Ausgehend vom BIOSTAT® STR 50 L Maßstab mit $86 W/m^3$ (2 x SBI) und $240 W/m^3$ (RT + SBI) werden im 200 L Maßstab nur noch $48 W/m^3$ (2 x SBI) und $133 W/m^3$ (RT + SBI) sowie im 1000 L Maßstab lediglich noch $28 W/m^3$ (2 x SBI) und $73 W/m^3$ (RT + SBI) in das Fluid eingetragen. Die Unterschiede der spezifischen Leistungseinträge bei gleichem Maßstab und variierender Rührerkombination basiert auf der eingebauten Rushton Turbine, die durch ihr radiales Strömungsprofil und ihrer höhen Newton Zahl ($Ne \approx 2.7$) den überwiegenden Teil der Leistung in das Fluid einträgt. Zwar werden in der BIOSTAT® STR Reihe nicht die spezifischen Leistungseinträge für Fermentationen von Mikroorganismen erreicht, jedoch ermöglicht der aufgezeigte Bereich Säugerzell-basierende Mittel- und Hochzelldichte-Kultivierungen.

Im Hinblick auf zellkulturbasierende Prozesse zeigt sich sowohl beim UniVessel® SU als auch bei der BIOSTAT® STR Reihe mit den beiden Rührerkonfigurationen eine große Anwendungsvielfalt aufgrund des beträchtlichen Leistungseintragsbereiches. Neben Kultivierungen von tierischen Zellen mit spezifischen Leistungseinträgen von bis zu $250 W/m^3$ [142] sind auch Kultivierungen humaner Stammzellen auf Microcarriern denkbar. Diese werden überwiegend in einem moderat-turbulenten Bereich ($10^3 < Re < 10^4$) durchgeführt [265], für den im UniVessel® SU und der BIOSTAT® STR Reihe sowohl eine akzeptable Durchmischung (siehe Kapitel 4.3.1.3) als auch eine geringe mechanische Beanspruchung (siehe Kapitel 4.3.1.2) gewährleistet werden können. Im Gegensatz dazu erfolgt während der Kultivierung der pflanzlichen Zellkultur *Nicotiana*

tabacum BY-2 ein Anstieg der Viskosität bei strukturviskosen Fluiden. Für die Aufrechterhaltung des Massen- und Stofftransfers muss eine Anpassung des Leistungseintrages erfolgen, der in den Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech gegeben ist. Eine Fermentation von Mikroorganismen ist bei maximalen Leistungseinträgen bis 240 W/m^3 für die BIOSTAT® STR Reihe auszuschließen. Hierfür steht dem Anwender jedoch eine Mikroorganismenversion (BIOSTAT® STR MO) zur Verfügung, die die nötigen Leistungseinträge realisieren kann [66].

4.3.1.2 Mechanische Beanspruchung

Die räumliche und örtliche Betrachtung durch die CFD kann zusätzlich genutzt werden, um Aussagen über eventuelle Schädigungen von Zellen zu treffen. Hierfür werden in der Literatur zum einen die Turbulenz mit ihrer Wirbelausprägung [69, 227, 229], aber auch die Geschwindigkeitsgradienten beschrieben [155, 232].

Aufgrund der direkten Proportionalität von mechanischer Beanspruchung und spezifischem Leistungseintrag (Gleichung 28) werden nachfolgend die Untersuchungen zur mechanischen Beanspruchung am Beispiel des UniVessel® SU diskutiert. Dieser weist im Vergleich zu den übrigen Reaktor-Systemen den größten spezifischen Leistungseintrag auf. Anschließend erfolgt eine Betrachtung der BIOSTAT® STR Reihe für beide Rührerkonfigurationen.

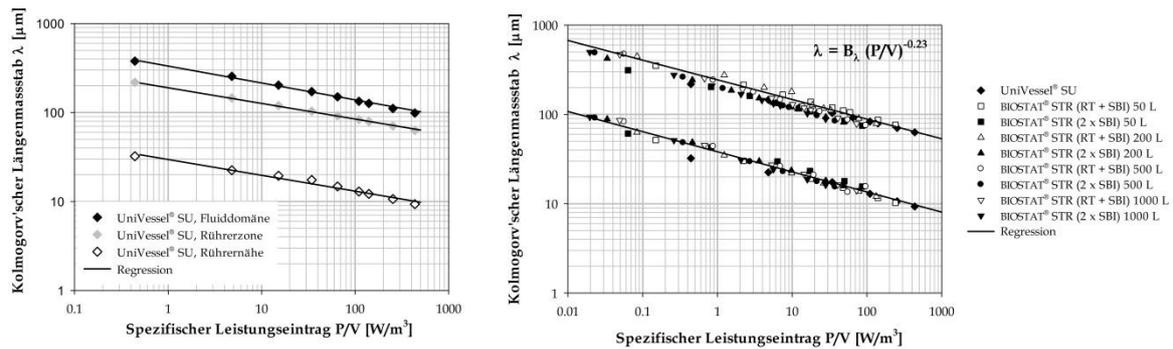
Kolmogorov'scher Längenmaßstab

Ausgehend von der Theorie, dass Zellen eine Schädigung durch Wirbel mit identischer Größe erfahren, ist unter Voraussetzung lokaler isotropischer Turbulenz die Größe der kleinsten Wirbel (Gleichung 20) im Reaktorraum zu betrachten. Kleinere Wirbel besitzen eine zur geringen Energie für eine Zellbeanspruchung und größeren Wirbeln folgen die Zellen konvektiv. Aufgrund der örtlichen Betrachtung der CFD wird für jedes Kontrollvolumen ein Längenmaßstab erhalten. Die Betrachtung der unmittelbaren Rührernähe, der Rotationszone des Rührers und der Fluiddomäne (Kapitel 3.2.2) erlaubt eine detaillierte Evaluierung der Längenmaßstäbe, die in Abbildung 27; A für den UniVessel® SU dargestellt sind.

Anhand unterschiedlicher spezifischer Leistungseinträge ($0.4 \text{ W/m}^3 < P/V < 435 \text{ W/m}^3$) zeigt die Betrachtung des mittleren Kolmogorov'schen Längenmaßstabes Wirbelgrößen zwischen 100 und $400 \mu\text{m}$ für die Fluiddomäne und 50 bis $220 \mu\text{m}$ für die Rührerzone (Abbildung 27; A). Die minimalen Kolmogorov'schen Wirbelgrößen, die direkt an den beiden Rührern vorliegen, werden zwischen 32 und $9 \mu\text{m}$ numerisch ermittelt. Die drei erhaltenen Regressionen verlaufen zueinander kongruent und können durch eine Potenzgleichung beschrieben werden. Unter der zusätzlichen Berücksichtigung der BIOSTAT® STR Reihe (Abbildung 27; B) wird ersichtlich, dass die Längenmaßstäbe unabhängig vom Reaktorvolumen und der Rührerkonfiguration sind. In Abbildung 27; B wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit die Zone des gesamten Bioreaktors nicht berücksichtigt. Der Korrelationskoeffizient B_λ in Gleichung 35 beschreibt dabei das jeweilige Gebiet im Bioreaktor und beträgt in unmittelbarer Rührernähe 38 , in der Rührerzone 216 und im übrigen Reaktorraum 353 .

$$\lambda = B_\lambda \times (P/V)^{-0.23}$$

Gleichung 35



A

B

Abbildung 27: Kolmogorov' scher Längenmaßstab als Funktion des spezifischen Leistungseintrages im UniVessel® SU (A) für die Fluidomäne (oberer Graph), die Rührerzone (mittlerer Graph) und die direkte Rührernähe (unterer Graph). Zusätzlich ist der Längenmaßstab im BICSTAT® STR für die Rührerzone (oberer Graph) und die direkte Rührernähe (unterer Graph) abgebildet (B).

Werden die numerisch erhaltenen Kolmogorov'schen Längenmaßstäbe in Bezug zu Kultivierungsprozessen gesetzt, müssen die Durchmesser des jeweilig genutzten biologischen Systems bekannt sein. Für die Fermentation von Mikroorganismen (maximaler Durchmesser ca. 10 μm) ist von keiner Schädigung der Organismen für die drei Bereiche auszugehen. Unter Berücksichtigung des Durchmessers von tierischen Zellen, wie beispielsweise den in der pharmazeutischen Industrie meist genutzten CHO Zellen ($10 \mu\text{m} < d < 20 \mu\text{m}$), ist keine Schädigung der Zellen in der Fluidomäne und Rührerzone zu erwarten. Die Zellen folgen hier der Umlaufströmung und den Wirbeln konvektiv. Hingegen ist unmittelbar in Rührernähe und oberhalb eines spezifischen Leistungseintrages von 10 W/m^3 mit einer Schädigung der Zellen durch den sinkenden minimalen Kolmogorov'schen Längenmaßstab bis in die Größenbereiche von CHO Zellen zu rechnen.

In Bezug auf die Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen in gerührten Bioreaktoren dienen Microcarrier als Proliferationsfläche der Zellen, bei denen sowohl die Durchmesser der Microcarrier als auch die der Zellen berücksichtigt werden müssen. Beispielsweise besitzen die sensitiven hMSC einen Durchmesser von 20 bis 23 μm , so dass es auch bei diesen Zellen nur in unmittelbarer Rührernähe zu Zellschädigungen durch die minimalen Wirbel kommt. Jedoch werden für Microcarrier (beispielsweise Cytodex-3) mittlere Durchmesser von 175 μm veranschlagt, die durch die angreifenden, gleichgroßen Wirbel geschädigt oder zerstört werden können. Zusätzlich konnte von Croghan *et al.*, 1987 eine signifikante Zunahme der Microcarrierzerstörung bei einem Längenmaßstab von zwei Drittel der Microcarriergröße beobachten werden [308]. Resultierend wird davon ausgegangen, dass die Microcarrier durch das vorherrschende Strömungsprofil in den Sartorius-Systemen zwischen Rührerzone und Fluidomäne wechseln. Daraus lässt sich schließen, dass unterhalb eines spezifischen Leistungseintrages von 3 W/m^3 keine Schädigung durch die Kolmogorov'schen Längenmaßstäbe eintritt.

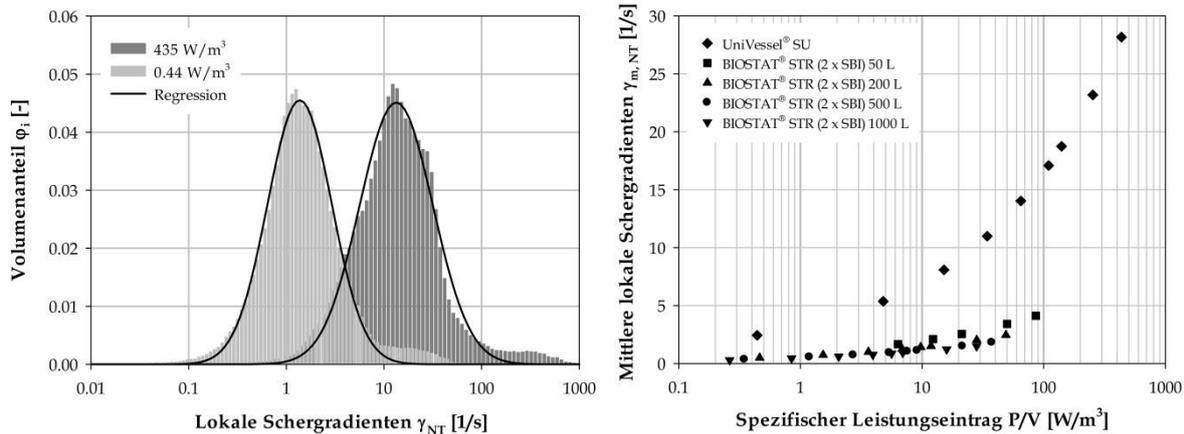
Geschwindigkeitsgradienten

In den meisten CFD-Untersuchungen wird neben den Wirbelgrößen, die mechanische Beanspruchung beurteilt, die sich aus den Scher- und Normalgradienten zusammensetzt. Beide Gradienten beeinträchtigen die Zellen unterschiedlich [232], weshalb eine separate Quantifizierung erfolgen muss. In Anlehnung an Wollny, 2010 und Kaiser *et al.*, 2011 treten allerdings vorrangig lokale Schergradienten auf [15, 159], die mutmaßlich für eine Zellschädigung verantwortlich sind [232].

Werden die anteiligen Volumen als Funktion der lokalen Schergradienten aufgetragen, ist die Verteilung durch eine logarithmierte Normalfunktion beschreibbar (Kapitel 3.2.2). Diese Funktion zeigt einen maximalen Volumenanteil von ca. 4.7 %, der unabhängig vom spezifischen Leistungseintrag im UniVessel® SU ist (Abbildung 28; A). Die bei maximalem Volumenanteil erhaltenen, lokalen Schergradienten steigen mit zunehmendem P/V von 2.4 auf 28 1/s. Der Anstieg der mittleren lokalen Schergradienten (Abbildung 28; B) ist dabei proportional zu der eingetragenen spezifischen Leistung und kann durch Gleichung 36 beschrieben werden.

$$\gamma_{NT,m} \propto (P/V)$$

Gleichung 36



A

B

Abbildung 28: Häufigkeitsverteilung des Volumenanteils als Funktion der lokalen Schergradienten im UniVessel® SU für die spezifischen Leistungseinträge von 0.44 und 435 W/m³ (A). Zum Vergleich werden die mittleren lokalen Schergradienten als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für den BIOSTAT® STR (2 x SBI) aufgeführt (B).

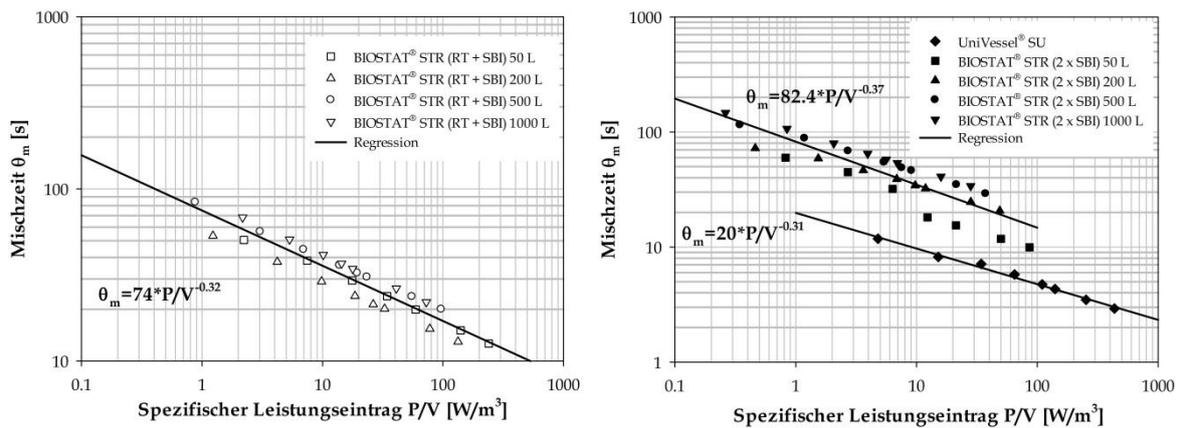
Zudem wird ein maximaler lokaler Schergradient von ca. 1'000 1/s bei maximalen P/V ($\approx 435 \text{ W/m}^3$) ermittelt. Ausgehend von Yim und Shamlou, 2000, die einen Bereich der lokalen Schergradienten zwischen 500 und 5000 1/s für physiologische Effekte veranschlagen [235], kann im UniVessel eine Beeinträchtigung von tierischen Zellen bei maximalen P/V nicht ausgeschlossen werden. Jedoch liegen die numerisch erhaltenen maximalen, mittleren Schergradienten weit unterhalb der kritischen Werte von $1 - 3 \times 10^5 \text{ 1/s}$, die eine dauerhafte Zellschädigung hervorrufen [155].

4.3.1.3 Mischzeit

Da die Sensorpositionierung und das Probevolumen einen wesentlichen Einfluss auf die Mischzeit haben [17, 177] wird für die numerische Berechnung die Position in Anlehnung an die experimentellen Untersuchungen gesetzt. Zusätzlich beträgt das Probevolumen 0.1 % vom Arbeitsvolumen, wonach der Einfluss des Probevolumens auf das Gesamtvolumen vernachlässigbar ist.

Nach Gleichung 9, nimmt mit zunehmendem spezifischen Leistungseintrag die Mischzeit ab, wobei nur geringe Unterschiede der Mischzeit für die einzelnen Maßstäbe des BIOSTAT® STR (RT + SBI) beobachtet werden (Abbildung 29; A). Während in den Arbeitsvolumina von 50 L und 200 L Mischzeiten zwischen ca. 13 und ca. 50 s erhalten werden, stellt sich in den Maßstäben 500 L und 1000 L bei maximalem Leistungseintrag eine homogene Durchmischung nach ca. 20 s ein. Werden die numerisch ermittelten Homogenisier-Zahlen betrachtet, die die Anzahl an Umdrehungen bis zur gewünschten Homogenität angeben, ist in allen Maßstäben des BIOSTAT® STR (RT + SBI) mit einer Durchmischung nach 29 ± 7 Rührerumdrehungen zu rechnen. Abbildung 29; A zeigt die Regression über alle Maßstäbe. Der experimentell ermittelte Exponent der Regressionsgleichung von -0.32 ist annähernd identisch zu dem theoretisch aufgeführten Exponenten von -0.33 (Gleichung 29) [18]. Im Fall einer Integration des BIOSTAT® STR (RT + SBI) in einen Zellkulturprozess, bei dem definierte Anforderungen an die Mischzeit gestellt werden, kann in erster Näherung die in Abbildung 29; A aufgeführte Regressionsgleichung verwendet werden, da hier nur geringfügige Mischzeitunterschiede über die Maßstäbe (Bestimmtheitsmaß der Regression von 96 %) auftreten. Anschließend sollten jedoch die einzelnen Maßstäbe im Detail betrachtet werden.

Im BIOSTAT® STR (2 x SBI) werden für alle Maßstäbe durchschnittlich 30 % höhere Mischzeiten ($10 < \theta_m < 150$ s) ermittelt, die auf den geringeren spezifischen Leistungseintrag ($0.5 < P/V < 435$ W/m³) zurückzuführen sind (Abbildung 29; B). Dieser Einfluss zeigt sich auch bei der ermittelten Homogenisier-Zahl, da erst bei einer Rührerumdrehung von 34 ± 1 eine homogene Durchmischung erfolgt. Im Gegensatz dazu, werden im UniVessel® SU Mischzeiten zwischen 3 und 12 s ermittelt (bei $0.5 < P/V < 85$ W/m³). Aufgrund der in Abbildung 29; B aufgeführten Regressionen (BIOSTAT® STR 2 x SBI und UniVessel® SU) wird der Einfluss des Arbeitsvolumens deutlich. Während für den UniVessel® SU der Regressionsexponent mit -0.31 geringfügig von dem theoretischen Wert abweicht, zeigt für die BIOSTAT® STR (2 x SBI) der Exponent mit -0.37 und dem Bestimmtheitsmaß von 80 % eine ausgeprägter Abhängigkeit der Mischzeit vom Maßstab. Verglichen mit dem BIOSTAT® STR (RT + SBI) ist hier keine erste Näherung über die Regressionsgleichung für die Maßstäbe ab 50 L zu empfehlen. Die Berücksichtigung des Volumens auf die Mischzeit wird in Kapitel 4.4 für beide Rührerkonfigurationen des BIOSTAT® STR detailliert diskutiert.



A **B**
Abbildung 29: Die Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für die Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech mit den Rührervarianten RT + SBI (A) und 2 x SBI (B).

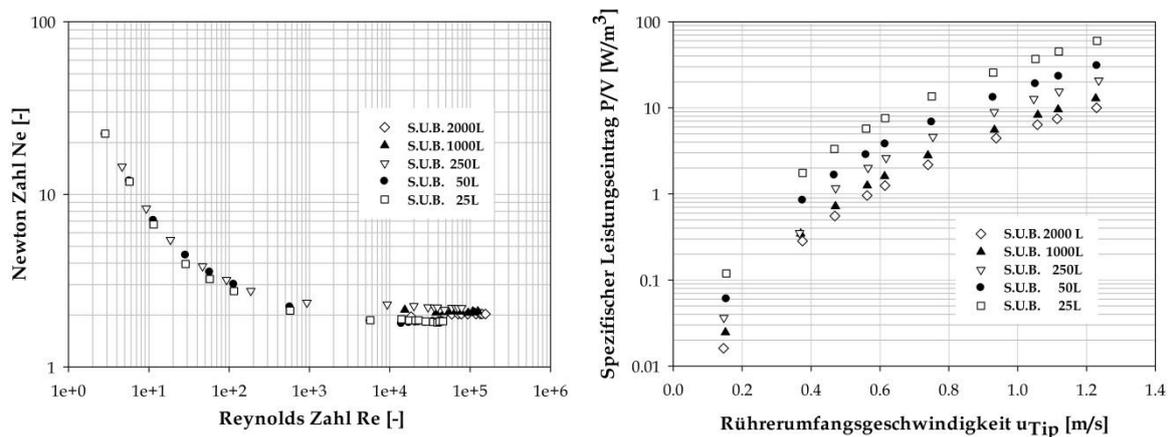
Einen entscheidenden Einfluss auf die Prozessqualität haben örtlich auftretende Konzentrationsgradienten, wie beispielsweise die pH-, Temperatur-, die Edukt- und Produkt- oder die Sauerstoffkonzentration [309]. Deren Auswirkungen gehen zumeist mit Vitalitätsabnahmen oder Produktivitätsminderungen einher [309]. Ein einfaches Beispiel ist die pH-Regulierung in einem Standardprozess über die Zugabe von Säure/Base oder CO₂, wie sie vorwiegend bei Kultivierungen von CHO Zellen durchgeführt wird. Die punktuelle Zugabe der Substanzen führt zwangsläufig zur Ausbildung extremer Gradienten, die nur durch eine effektive Durchmischung des Mediums abgebaut werden. Für die hMSC-Kultivierung wird zusätzlich die Wichtigkeit des Massen- und Stofftransfer verdeutlicht, bei der lediglich eine minimale Leistung einzutragen ist. Ausgehend von einem maximalen spezifischen Leistungseintrag von 3 W/m³ im UniVessel® SU und der BIOSTAT® STR Reihe (siehe Kapitel 4.3.1.2) ist mit Mischzeiten zwischen 30 und 80 s (RT + SBI) bzw. 40 und 150 s (2 x SBI) zu rechnen. Aufgrund der anhaltenden Inhomogenitäten sind Limitationen nicht auszuschließen, obwohl in Anlehnung an Lara *et al.*, 2006 für Zellkulturbioreaktoren von einer mehrminütigen Mischzeit ausgegangen wird, die selbst bei einem maximal Arbeitsvolumen von 1000 L eingehalten wird [309].

4.3.2 S.U.B.

4.3.2.1 Leistungscharakteristik

Mit Hilfe der CFD wird die Bestimmung des Leistungseintrages im S.U.B. für die Arbeitsvolumina von 25 bis 2000 L in Anlehnung an die Untersuchungen im UniVessel® SU und im BIOSTAT® STR durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.1.1). Die Methodik dazu ist detailliert in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben.

In Abbildung 30; A sind die Newton Zahlen (Ne) in Abhängigkeit der Reynolds Zahlen aufgeführt, in denen die drei Zustände der Fluidströmung für Zellkulturbioreaktoren ersichtlich werden. Ein laminares Strömungsprofil, bei dem die Newton Zahl mit zunehmender Reynolds Zahl linear abnimmt, ist bis $Re < 10^2$ erkennbar. Der transiente Bereich für die aufgeführten Arbeitsvolumen liegt zwischen $Re 10^2$ und ca. 10^4 . Oberhalb einer kritischen Reynolds Zahl (Re_{krit}) von ca. 10^4 tritt eine vollturbulente Fluidströmung für die Maßstäbe 25 und 2000 L auf. Die ermittelte, kritische Reynolds Zahl ist sowohl typisch für herkömmliche, gerührte Zellkulturbioreaktoren aus Glas und Edelstahl [146] als auch vergleichbar mit gerührten Einweg-Zellkulturbioreaktoren, wie den BIOSTAT® STR (Kapitel 4.3.1.1). Die im vollturbulenten Bereich erhaltenen Newton Zahlen von 1.9 für die Arbeitsvolumina 25 und 50 L und 2.2 für die Arbeitsvolumen von 250, 1000 und 2000 L stimmen mit den Herstellerangaben überein [78] und sind typisch für standardmäßige Axialrührer [145]. Der geringfügige Unterschied der Newton Zahlen ist auf minimal unterschiedliche Geometrieverhältnisse innerhalb der S.U.B.-Reihe zurückzuführen.



A **B**
Abbildung 30: Bestimmung der Leistungscharakteristik bei unterschiedlichen Reynolds Zahlen (A) und des spezifischen Leistungseintrages bei gleicher Rührerumfangsgeschwindigkeit für die Arbeitsvolumen von 25 bis 2000 L (B).

Der spezifische Leistungseintrag P/V ist als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit in Abbildung 30; B dargestellt. Mit zunehmendem u_{Tip} steigt der spezifische Leistungseintrag auf einen maximalen Wert, der für ein Volumen von 25 L ca. $60 W m^3$ und für ein Arbeitsvolumen

von 50 L ca. 30 W m^3 beträgt. Mit zunehmendem Arbeitsvolumen sinkt der spezifische Leistungseintrag weiter und erreicht bei einem Maßstab von 2000 L nur noch 10 W/m^3 . Die ermittelten maximalen spezifischen Leistungseinträge liegen nach Nienow, 2006 mit 250 W/m^3 in einem unteren akzeptablen Bereich [142, 189], der im Hinblick auf mögliche Schädigungen von Säugerzellen angegeben wird. Im Vergleich zu den BIOSTAT® STR 50 L Systemen ist jedoch ein geringerer maximaler Leistungseintrag zu beobachten, der im Hinblick auf die Kultivierungen von tierischen Zellen durchaus ausreicht, jedoch bei pflanzlichen Zellen nachteilig sein kann [27].

4.3.2.2 Mechanische Beanspruchung

In Anlehnung an die in Kapitel 4.3.1.2 vorgestellten Ergebnisse werden diese nachfolgend auch für die S.U.B.-Reihe aufgeführt, die die Schergradienten und den Kolmogorov'schen Längenmaßstab berücksichtigen. Die Bestimmung beider Parameter ist identisch zu den Untersuchungen im BIOSTAT® STR und ist im Kapitel 3.2.2 handelt.

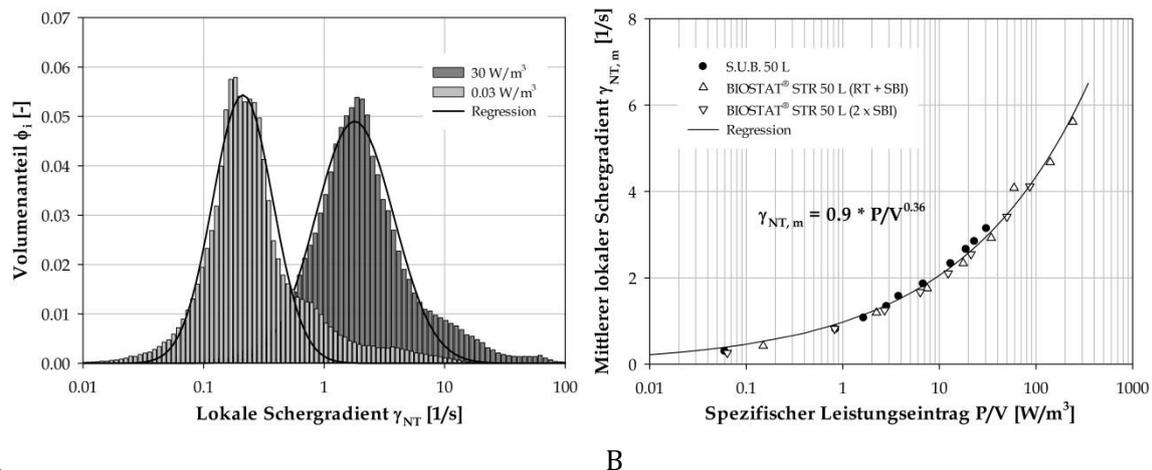
Geschwindigkeitsgradienten

Die graphische Darstellung der logarithmierten Normalverteilung zeigt einen maximalen Volumenanteil von ca. 5.5 %, der unabhängig vom spezifischen Leistungseintrag des S.U.B. 50 L ist. Die bei maximalem Volumenanteil erhaltenen mittleren, lokalen Schergradienten (γ_{NT} am Median) steigen mit zunehmendem P/V von 0.3 auf 3.1 1/s (Abbildung 31; A). Zudem wird ein maximaler lokaler Schergradient von ca. 100 1/s bei dem größten spezifischen Leistungseintrag im 50 L S.U.B. ermittelt. Die mittleren lokalen Schergradienten ($\gamma_{NT,m}$) werden als Funktion des spezifischen Leistungseintrags aufgetragen und vergleichend mit den CFD-Ergebnissen für den BIOSTAT® STR 50L betrachtet (Abbildung 31; B). Die mittleren lokalen Schergradienten der beiden Bioreaktoren mit den drei unterschiedlichen Rührorganen induzieren nach Yim und Shamlou, 2000 keine physiologische Zellschädigung [235]. Der übereinstimmende Verlauf der mittleren lokalen Schergradienten nach Gleichung 37

$$\gamma_{NT,m} = 0.9 * \left(\frac{P}{V}\right)^{0.33}$$

Gleichung 37

zeigt eine Unabhängigkeit der Bioreaktorgeometrie, Rührerart und -anzahl für den 50 L S.U.B. und den BIOSTAT® STR 50 L.



A **B**
Abbildung 31: Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der lokalen Schergradienten nach der Koordinatentransformation gegen den Volumenanteil im S.U.B. 50 L bei einem P/V von 0.03 und 30 W/m³ (A). Zudem werden die mittleren lokalen Schergradienten des S.U.B. 50 L und des BICOSTAT® STR mit den Rührerkonfigurationen (RT + SBI) sowie (2 x SBI) verglichen (B).

Kolmogorov'scher Längenmaßstab

Aufgrund der örtlichen Betrachtung der CFD wird für jedes Kontrollvolumen ein Längenmaßstab erhalten. Nach Gleichung 20 treten die kleinsten Kolmogorov'schen Längenmaßstäbe ausschließlich am Mischorgan auf, deren graphische Darstellung in Abbildung 32 aufgeführt ist. Die ermittelten minimalen Kolmogorov'schen Wirbelgrößen in unmittelbarer Rührernähe liegen in einem Bereich zwischen 34 und 14 µm (bei $0.7/W\ m^3 < P/V < 60\ W/m^3$). In der Rotationszone werden Wirbellängen bis 55 µm erhalten. In Anlehnung an Gleichung 35 belaufen sich die Korrelationskoeffizienten auf 148 (Rotationszone) und 34.5 (Rührerzone; Gleichung 38). Aufgrund der geringen Abweichung von λ zur Regressionsgleichung und unter Berücksichtigung der konstanten Gitteranzahl bei steigendem Arbeitsvolumen, ist für die in Abbildung 32 aufgeführten Ergebnisse eine Maßstabs- und Gitterunabhängigkeit nachweisbar.

$$\lambda = 34.5 * \left(\frac{P}{V}\right)^{-0.22}$$

Gleichung 38

Unter Berücksichtigung des Durchmessers von CHO-Zellen tritt daher keine Zellschädigung unterhalb von ca. $10\ W/m^3$ auf. Mit zunehmendem P/V auf bis zu $60\ W/m^3$ ist mit einer Schädigung der Zellen durch den minimalen Kolmogorov'schen Längenmaßstab in Rührernähe zu rechnen.

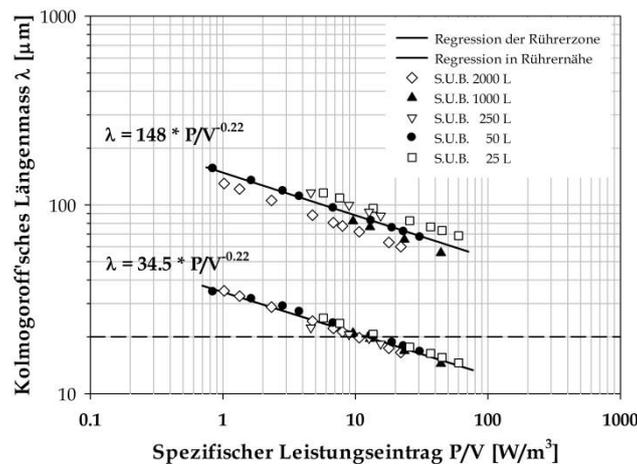


Abbildung 32: Vergleich der Kolmogorov'schen Längenmaßstäbe für den S.U.B. bis zu einem Arbeitsvolumen von 2000 L als Funktion des spezifischen Leistungseintrages in unmittelbarer Rührernähe (unterer Graph) und in der Rotationszone (oberer Graph).

4.3.2.3 Mischzeit

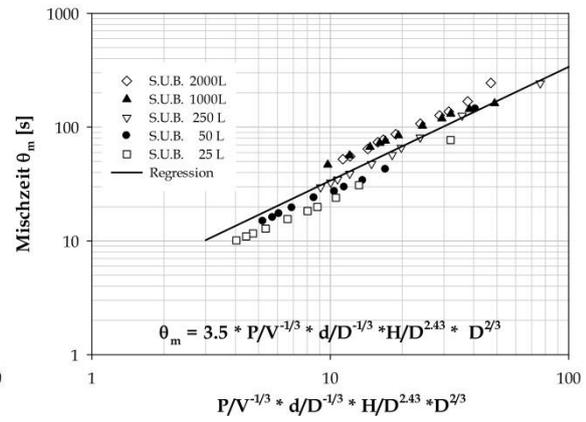
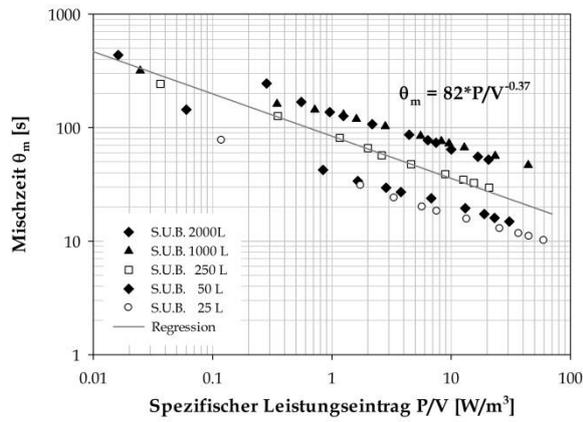
Werden nur die numerischen Resultate hinsichtlich der Durchmischung betrachtet, erhöht sich die Mischzeit mit steigendem Volumen bei konstantem spezifischen Leistungseintrag (Abbildung 33, A). Wie zuvor in Kapitel 4.2.2 diskutiert, erhöht sich mit steigendem spezifischem Leistungseintrag der Grad der Turbulenz. Hieraus resultiert eine Abnahme der Mischzeit von ca. 400 s auf 10 s (0.015 W/m^3 ; 2000 L auf 50 W/m^3 ; 25 L). Unter Berücksichtigung eines zellkulturtypischen Leistungseintrages oberhalb von 10 W/m^3 ist mit minimalen Mischzeiten von 80 s zu rechnen. Der über alle Werte ermittelte Exponent der Regressionsgleichung aus Abbildung 33, A beläuft sich auf -0.37 und weicht nur noch geringfügig vom theoretischen Wert von -0.33 ab. Im Vergleich zu den BIostat® Systemen fallen die ermittelten Mischzeiten deutlich höher aus, was bei einer Prozessauslegung beachtet werden muss.

Für eine reaktorunabhängige Betrachtung wird nach Nienow, 2006 und Nienow, 2010 der spezifische Leistungseintrag mit der Reaktorgeometrie in Bezug zur Mischzeit gesetzt und ist in Gleichung 39 beschrieben [142, 189]:

$$\theta_m = 3.5 \left(\frac{P}{V}\right)^{-1/3} * \left(\frac{d}{D}\right)^{-1/3} * \left(\frac{H}{d}\right)^{2.43} * D^{2/3}$$

Gleichung 39

In Abbildung 33; B wird beim Auftragen der Mischzeit als Funktion der Gleichung 39 für alle Maßstäbe des S.U.B. ein Graph erhalten, dessen Punkte auf einer Geraden liegen. Anhand der Regression wird ein Faktor von 3.4 ermittelt, der in der gleichen Größenordnung zu dem in der Literatur veranschlagten Wert von 5.9 liegt (Gleichung 39).



A

B

Abbildung 33: Vergleich der numerisch ermittelten Mischzeiten für die S.U.B. Maßstäbe bis 2000 L als Funktion des spezifischen Leistungseintrages (A) und in Abhängigkeit der Bioreaktorkonfigurationen nach Gleichung 39 (B).

4.3.3 Maßstabsunabhängige Betrachtung der single-use Bioreaktoren hinsichtlich ihrer verfahrenstechnischen Parameter

Die in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 numerisch ermittelten verfahrenstechnischen Kennzahlen zeigen, dass innerhalb von geometrisch ähnlichen Reaktorkonstruktionen eine Maßstabsübertragung möglich ist. Werden die Bioreaktoren beider Hersteller direkt miteinander verglichen, ist durch die Betrachtung der Mischzeit mit Gleichung 30 eine lineare Korrelation erkennbar (Abbildung 34) [142, 188, 189]. Durch den erhaltenen Korrelationskoeffizient von 3.5 sind die Mischzeiten unabhängig vom Rührer, der Geometrie und der Gitteranzahl berechenbar (Gleichung 40) und mit Abweichungen von bis zu 15 % innerhalb eines akzeptablen Rahmens.

$$\theta_m = 3.5 \left(\frac{P}{V}\right)^{-1/3} * \left(\frac{d}{D}\right)^{-1/3} * \left(\frac{H}{D}\right)^{2.43} * D^{2/3}$$

Gleichung 40

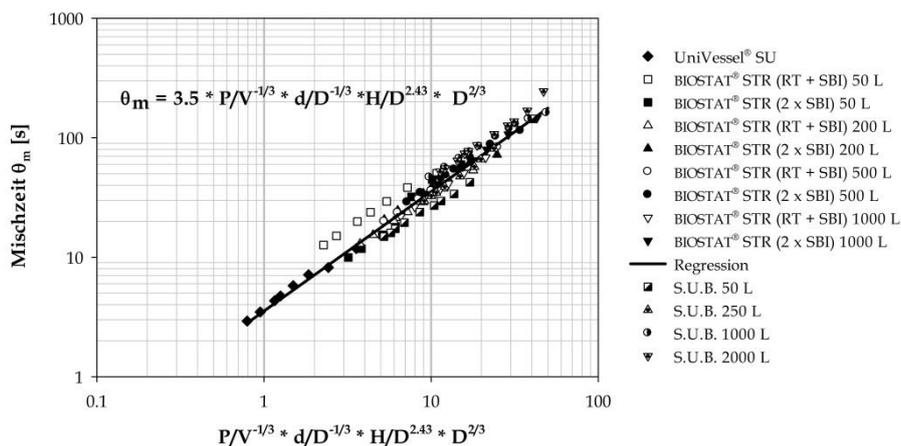


Abbildung 34. Vergleich der numerisch erhaltenen Mischzeiten als Funktion der Gleichung 30 für alle untersuchten single-use Bioreaktoren.

Wird neben der Mischzeit die mechanische Beanspruchung anhand der auftretenden mittleren Schergradienten betrachtet, ist deren Abhängigkeit ähnlich dem Ansatz von Nienow, 2006 und Nienow, 2010 erkennbar [142, 189]. Unter Berücksichtigung des spezifischen Leistungseintrages ($\gamma_{NT,m} \propto V^{0.33}$), des Volumens ($\gamma_{NT,m} \propto V^{-0.16}$) und des Verhältnisses von Rührer- zu Reaktordurchmesser ($\gamma_{NT,m} \propto d/D^{-2.7}$) wird die Gleichung 41 zur Beschreibung der mittleren Schergradienten etabliert. Die Abbildung 35 zeigt einen linearen Verlauf mit einem Korrelationsfaktor von 0.05 für die untersuchten, gerührten single-use Bioreaktoren UniVessel® SU, BIOSTAT® STR und S.U.B. Reihe auf.

$$\gamma_{NT,m} = B * (P/V)^{1/3} * V^{-0.16} * (d/D)^{-2.7}$$

Gleichung 41

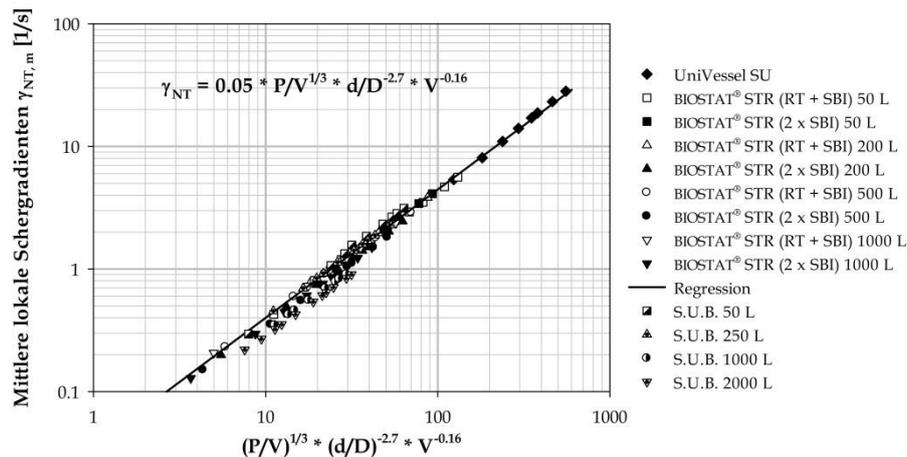


Abbildung 35. Vergleich der mittleren lokalen Schergradienten in Abhängigkeit der Gleichung 41 für alle untersuchten single-use Bioreaktoren.

Neben den beiden mathematischen Ansätzen zur Bestimmung der Mischzeit und der mittleren Schergradienten zeigen die erhaltenen Resultate der single-use Bioreaktoren, im Vergleich mit konventionellen Bioreaktoren, identische Gegebenheiten bei einer Maßstabsübertragung. Wird der in der Literatur vorherrschende Ansatz gewählt, den Schlüsselparameter der Kultivierung konstant zu halten, werden alle weiteren Parameter abgeändert (Kapitel 2.4). Die Rührerumfangsgeschwindigkeit wird vorwiegend in der pharmazeutischen Industrie zur Maßstabsübertragung verwendet [15], wobei mit zunehmendem Volumen eine Verringerung des spezifischen Leistungseintrages auftritt und in der Regel ein inakzeptables Zellwachstum resultiert (Tabelle 6). In Anlehnung an Nienow, 2006 und Kraume, 2003 ist die Rührerumfangsgeschwindigkeit als Maßstabsübertragungskriterium daher auszuschließen [17, 142]. Der spezifische Leistungseintrag hat einen bedeutenden Einfluss auf den Massentransfer [266]. Er beschreibt durch das Büche-Theorem einen Kompromiss für die angewandte Übertragung von Prozessen in Bioreaktoren [17] für die Fermentation von Mikroorganismen und die Kultivierung von tierischen Zellen [47]. Bei konstantem spezifischem Leistungseintrag bleibt auch der Längenmaßstab der Wirbel konstant (Gleichung 7). Jedoch resultiert hieraus eine Verringerung der Schergradienten und der Rührerdrehzahl bzw. eine Erhöhung der Mischzeit, Reynolds Zahl und der Rührerumfangsgeschwindigkeit (Tabelle 6). In Tabelle 6 sind zusätzlich die Einflüsse bei konstanter Mischzeit und konstanten Schergradienten aufgeführt, deren jeweilige Änderungen überwiegend mit vermindertem Zellwachstum und Produktbildung einhergehen kann.

Tabelle 6: Betrachtung der verfahrenstechnischen Parameter bei einem konstanten Scale-up Faktor (unterstrichene Parameter) für den UniVessel® SU und den BIOSTAT® STR (2 x SBI) 1000 L.

Scale-up Faktor konstant	2 L Maßstab				1000 L Maßstab			
	u_{Tip} [m/s]	P/V [W/m ³]	Mischzeit [s]	Schergradienten [1/s]	u_{Tip} [m/s]	P/V [W/m ³]	Mischzeit [s]	Schergradienten [1/s]
u_{Tip} 1.1 m/s	<u>1.1</u>	110	4	17	<u>1.1</u>	7	54	0.95
P/V 28 W/m ³	0.68	<u>28</u>	7	10.3	1.8	<u>28</u>	34	1.5
θ_m 40 s	0.22	0.95	<u>40</u>	3	1.5	16	<u>40</u>	1.2
$\gamma_{m,NT}$ 0.75 1/s	ca. 0.001	ca. 0.02	ca. 1000	<u>0.75</u>	0.95	4	65	<u>0.75</u>

Aus der Tabelle 6 wird deutlich, dass ein strikt konstanter, spezifischer Leistungseintrag über die Maßstäbe hinweg eine annähernd gleichbleibende Zelldichte und Produktqualität sowie – quantität nicht gewährleisten kann, da sich die Mischzeit und die Schergradienten in Abhängigkeit des Volumens verhalten. Aufgrund dessen ist für eine akzeptable Prozessführung hinsichtlich der Zellkultivierung ein ausgewogenes Mittelmaß zwischen mechanischer Beanspruchung und Durchmischung anzustreben, die im Kapitel 4.4 diskutiert wird.

Die zusätzlich in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 aufgeführten Kultivierungsbeispiele von hMSC, CHO- oder *Nicotiana tabacum* BY-2 Zellen verdeutlichen, dass in Zellkulturprozessen überwiegend die Abhängigkeit der mechanischen Beanspruchung und der effektiven Durchmischung zum spezifischen Leistungseintrag für einen akzeptablen zellkulturbasierende Prozess ausschlaggebend ist. Für die Kultivierung der adhärent wachsenden hMSC sind aufgrund ihrer geringen mechanischen Beanspruchung und den relativ geringen Mischzeiten im unteren spezifischen Leistungseintragsbereich die Reaktorsysteme UniVessel® SU und BIOSTAT® STR-Reihe denkbar. Zu abschließenden Aussagen sollten jedoch zusätzlich die in Kaiser *et al.* 2013 aufgeführten Suspendier-Kriterien berücksichtigt werden [222]. Vergleichend mit dem BIOSTAT® STR, weist die S.U.B.-Reihe wesentlich geringere Leistungseinträge und somit eine geringe mechanische Beanspruchung auf. Aufgrund der ermittelten höheren Mischzeiten ist jedoch eine akzeptable hMSC-Kultivierung nur bedingt gegeben. Zusätzlich ist durch den Rührer mit einer verminderten Suspendierleistung zu rechnen, weshalb für die Microcarrier-Kultivierungen, unter Berücksichtigung der Suspendier-Kriterien, eine wesentlich höhere Leistung eingetragen werden müsste, die mit einer erhöhten mechanischen Beanspruchung einhergeht. Hingegen ist bei der Kultivierung von *Nicotiana tabacum* BY-2 Zellen ein hoher Leistungseintrag notwendig, um den Massen- und Stofftransfer in der hochviskosen Kulturbrühe zu gewährleisten. Die Untersuchungen im S.U.B. 50 L weisen annähernd vergleichbare Wachstumsraten der *Nicotiana tabacum* BY-2 Zellen zu weiteren single-use Systemen auf, die infolge der geringen Rührergeschwindigkeit eine Zellakkumulation um die Welle und eine starke Schaumbildung durch den Mikrosparger hervorrufen [27]. Eine Möglichkeit bietet hierfür der Einsatz des BIOSTAT® STR (RT + SBI), dessen hoher Leistungseintrag und das ausgeprägte Dispergierverhalten des Rührers mit dem verfügbaren Ringsparger eine Zellakkumulation bzw. Schaumbildung vermindern sollte. Der Einsatz beider Systeme für die Kultivierungen animaler Zellen wird im Kapitel 4.4 diskutiert.

4.4 Fallstudie IV: Prozessauslegung und -entwicklung

Im Gegensatz zu chemischen Prozessen, deren Durchmischung überwiegend im unteren Sekundenbereich erfolgen sollte und deren Batch-Abfolge weniger als ein paar Stunden andauert, ist die Kultivierung und Produktion mit CHO-Zellen ein vergleichsweise langwieriger Prozess. Während einer Zellexpansion sind Prozesszeiten von bis zu 170 h keine Seltenheit [55], wobei für die Produktionsphase durchschnittlich mit bis zu 14 Tagen gerechnet werden muss. Allerdings sind Zellexpansion und Produktbildung vom eingesetzten Medium, der Zelllinie, dem Produktionsmechanismus und der Kultivierungsstrategie abhängig. In den nachfolgenden Kapiteln werden Kultivierungsprozesse in unterschiedlichen Maßstäben mit der Zelllinie CHO XM 111-10, die das Modellprotein SEAP (sekretierte alkalische Phosphatase [288-294, 310, 311]) exprimiert, unter Berücksichtigung verfahrenstechnischer Ergebnisse entwickelt. Zusätzlich werden Resultate zur Zellexpansion und Produktbildung in chemisch definierten Minimalmedien aufgezeigt.

4.4.1 Prozessauslegung

Die Prozessauslegung erfolgt im S.U.B. 50 L mit der Zelllinie CHO XM 111-10, die nachweislich bei anhaltender mechanischer Beanspruchung einen Verlust der Vitalität aufzeigt [233, 307]. Im folgenden Kapitel werden lediglich die Parametereinstellungen der Kultivierungsversuche diskutiert, die ein adäquates Zellwachstum und Produktbildung gewährleisten. Dabei kann keine Abnahme der Zellvitalität aufgrund mechanischer Beanspruchung oder erhöhtem Laktat beobachtet werden.

Die Parametereinstellungen der Kultivierung (Abbildung 36; A und B) basieren auf der Maßstabsübertragung des Laborrührreaktors BIOSTAT® MD 2 L in Anlehnung an das Büche-Theorem. Zu Beginn der Kultivierung ($0 < t < 38$ h) wurde eine spezifische Leistung im Bereich von 6 bis maximal 8 W/m^3 eingetragen (Abbildung 36; A). Die Lebendzellichte im S.U.B. 50 L stieg bis 20 h nach der Inokulation von 1×10^6 auf 1.5×10^6 Zellen/mL (Vitalität ca. 90 %), was einer spezifischen Wachstumsrate (μ) von 0.020 1/h entspricht. Aufgrund auftretender Zellsedimentation in den unteren Bag-Falten des S.U.B. und der Zugabe von Medium wurde der spezifische Leistungseintrag durch Steigerung der Rührerdrehzahl auf einen maximalen Wert von 18 W/m^3 erhöht. Hierbei konnte trotz der zuvor auftretenden Zellsedimentation und des Verlustes der Vitalität noch eine maximale Lebendzellzahl von 1.3×10^6 Zellen/mL erreicht werden ($40 < t < 62$ h). Bis zum Ende der Kultivierung ($62 < t < 100$ h) sank die Vitalität bei konstantem spezifischen Leistungseintrag kontinuierlich bis auf 70 % ab. Eine Substratlimitation durch Glukose bzw. eine Wachstumsinhibierung durch Laktat und Ammonium kann dabei ausgeschlossen werden, da die Konzentration von Glukose bei jeder Probenahme oberhalb von 1 g/L bzw. für Laktat unterhalb von 2 g/L gehalten wurde (Abbildung 36; B; [78]).

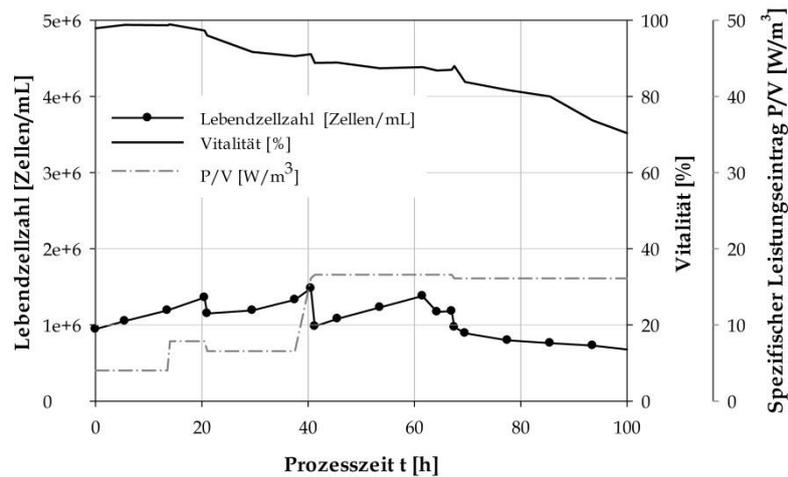
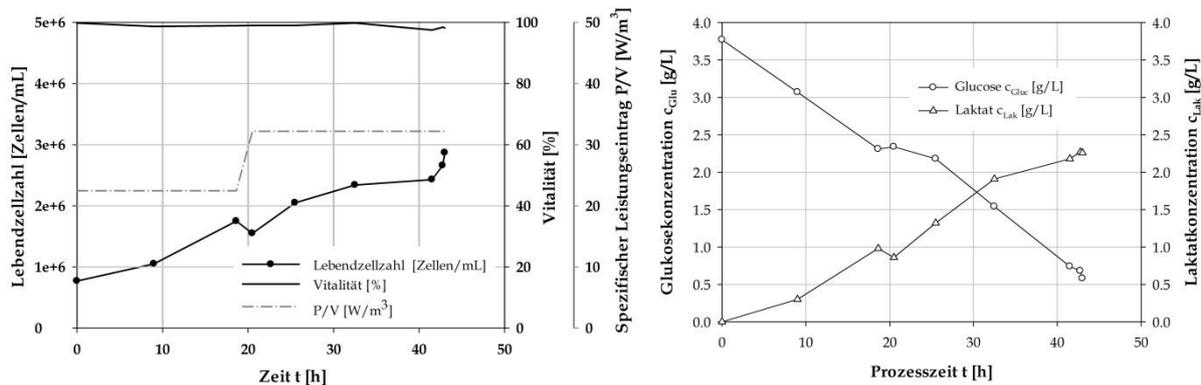


Abbildung 36: Lebendzellzahl und Vitalität als Funktionen der Prozesszeit im S.U.B. 50 L mit CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definierten Minimalmedien. Als Scale-up Kriterium wurde der spezifische Leistungseintrag eines BIOSTAT® MD 2 L Laborbioreaktors verwendet.

Auf Grundlage der vorgestellten Kultivierungsergebnisse (Abbildung 36) ist die Maßstabsübertragung basierend auf einem konstanten, spezifischen Leistungseintrag von geometrisch ähnlichen Bioreaktoren nicht durchführbar. Die veranschlagten 6 bis 8 W/m³ zeigen zu Kultivierungsbeginn eine deutliche Sedimentation der Zellen, was durch die geringen Lebendzellzahlen und den Vitalitätsverlust bestätigt wird. Die Erhöhung des spezifischen Leistungseintrages auf 18 W/m³ bewirkt eine Unterbindung der Sedimentation, was den wiederholten Anstieg der Lebendzellichte und eine verminderte Laktatbildung erklärt. Unter Berücksichtigung der mittleren, lokalen Schergradienten unterhalb von 2 1/s ist im S.U.B. von einer Sedimentation der Zellen auszugehen. Oberhalb von ca. 2.6 1/s wird eine homogene Zellsuspension erhalten, wobei von keiner Zellschädigung infolge einer mechanischen Beanspruchung auszugehen ist.

In einem zweiten Ansatz werden die Parameter für die weitere Kultivierung im S.U.B. 50 L unter Berücksichtigung des numerisch ermittelten Schergradienten und der Mischzeiten optimiert (Abbildung 37; A). Zu Kultivierungsbeginn ($0 < t < 18$ h) wurde im S.U.B. 50 L ein spezifischer Leistungseintrag von 23 W/m³ eingestellt und nach 18 h eine Zelldichte von 1.8×10^6 lebenden Zellen/mL mit einer Vitalität von 99 % gemessen ($\mu = 0.038$ 1/h, Inokulumkonzentration: 0.9×10^6 Zellen/mL). Infolge der Medienzugabe wurde der spezifische Leistungseintrag auf 32 W/m³ durch Anpassung der Drehzahl erhöht und eine maximale Lebendzellichte von ca. 3×10^6 Zellen/mL nach 42 h gemessen (Vitalität: 98 %; μ : 0.025 1/h). Die erhaltene Verdopplungszeit von 28 h ist analog zu herkömmlichen Rührreaktoren und Einweg-Reaktoren im Labormaßstab [58]. Jedoch ist vergleichend zum ersten S.U.B.-Ansatz eine Erhöhung der maximale Lebendzellichte um 100 % während der Zellexpansion festzustellen. Auch während der zweiten Kultivierung im S.U.B. 50 L findet Substratlimitierung statt (Abbildung 36; B) [77].



A

B

Abbildung 37: Lebendzellzahl und Vitalität (A) sowie Glukose- und Laktatkonzentration (B) als Funktionen der Prozesszeit im S.U.B. 50 L mit chemisch definiertem Minimalmedium und optimierten Prozessparametern basierend auf den numerisch ermittelten Ergebnissen.

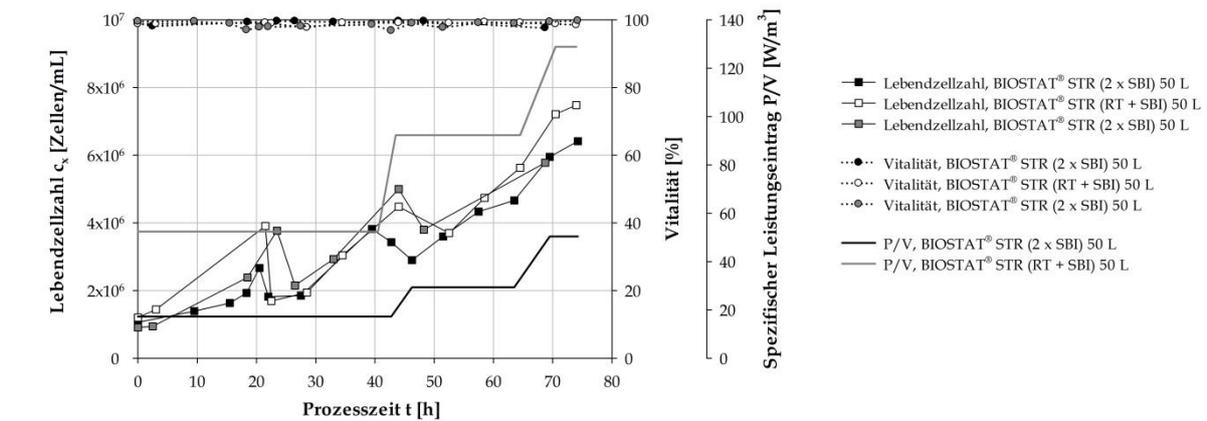
Basierend auf den Kultivierungsergebnissen im S.U.B. 50 L (Abbildung 36 und Abbildung 37) kann eine limitationsfreie Kultivierung von CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definiertem Minimalmedium gewährleistet werden. Daraus resultierend wird für die Kultivierungen im BIOSTAT® STR 50 L der Leistungseintrag so gewählt, dass während der Prozessführung die Mischzeit zwischen 15 und 30 s sowie mittlere, lokale Schergradienten oberhalb von 3 1/h gewährleistet werden können.

4.4.2 Prozessentwicklung

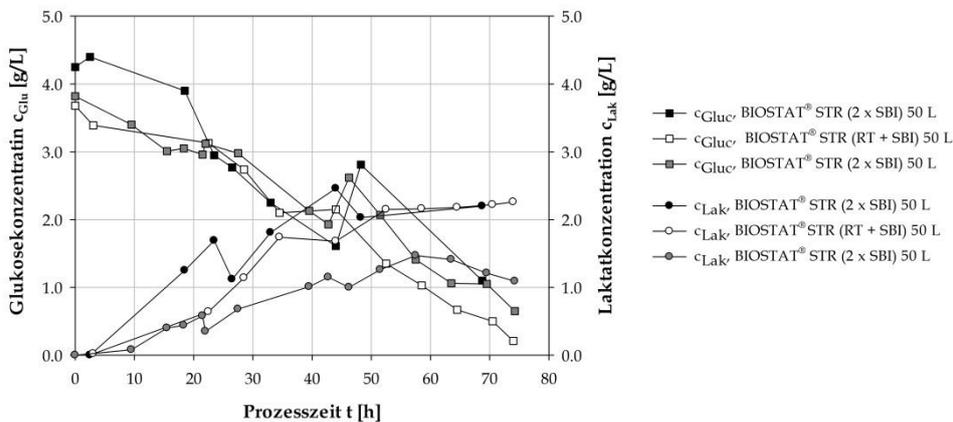
Basierend auf den zuvor definierten Bereichen für die mittleren, lokalen Schergradienten und Mischzeiten erfolgt ein Prozesstransfer vom S.U.B. 50 L auf den BIOSTAT® STR 50 L mit den beiden Rührerkonfigurationen. Aufgrund der unterschiedlichen verfahrenstechnischen Eigenschaften beider Rührerkonfigurationen in Bezug auf den Leistungseintrag wird für die Rührervariante 2 x SBI der Bereich zwischen 10 und 50 W/m³ sowie für die Rührervariante RT + SBI ein Bereich zwischen 17 und 140 W/m³ veranschlagt.

Der Kultivierung der CHO XM 111-10 Zellen erfolgt im BIOSTAT® STR 50 L mit einer initialen Zelldichte von ca. 1 x 10⁶ lebenden Zellen/mL (Abbildung 38; A). Zu Beginn des Prozessverlaufes (0 < t < 22 h) wird eine maximale Lebendzellzahl von 3 bis 4 x 10⁶ Zellen/mL bei einem Leistungseintrag von 17 W/m³ (2 x SBI) bzw. 38 W/m³ (RT + SBI) erhalten ($\mu = 0.057$ 1/h; ± 0.007). Infolge der Mediumzugabe wird die Zellkonzentration verdünnt, bei der nach weiteren ca. 22 h eine Zelldichte zwischen 5 und 6 x 10⁶ Lebendzellen/mL gemessen werden konnte ($\mu = 0.021$ 1/h; ± 0.002). Über die Prozesszeit (22 < t < 44 h) wurde die Rührerdrehzahl an einen konstanten spezifischen Leistungseintrag angepasst (Abbildung 38; A). Aufgrund der letztmaligen Mediumzugabe nach 40 bzw. 44 h wurde der spezifische Leistungseintrag auf 32 W/m³ und nachfolgend auf 50 W/m³ (2 x SBI) bzw. 92 W/m³ (RT + SBI) und 140 W/m³ erhöht, um auch im Mittelzellendichtebereich (5 < c_x < 8 x 10⁶ Zellen/mL) eine Sedimentation zu unterbinden (Abbildung 38; A). Das Prozessende erfolgte nach ca. 70 bis 75 h mit maximalen Lebendzellzahlen zwischen 6 und 7,5 x 10⁶ Zellen/mL, die vergleichend zu den Untersuchungen im S.U.B. 50 L um das Zweifache und mit weiteren single-use Bioreaktoren im

Labormaßstab um das Siebenfache größer sind [58]. Grund für die geringer ausfallende Zelldichte des dritten Ansatzes (nach 70 h) ist der anschließend vorgenommene Mediumtausch zur Initialisierung der Produktbildungsphase, der nachfolgend diskutiert wird. Ein weiterer Anstieg der Lebendzellzahl bis auf $> 8 \times 10^6$ Zellen/mL ist aufgrund der relativ geringen Substratkonzentration des chemisch definierten Minimalmediums nicht möglich. Zusätzlich zeigen alle drei Kultivierungsansätze im BIOSTAT® STR 50 L einen kontinuierlichen Verlauf der Vitalität von über 98 % bis zum Prozessende auf. Unter Berücksichtigung der annähernd ideal verlaufenden Glukose- und Laktatkonzentrationen (Abbildung 38; B) ist daher nicht von einer Zellschädigung durch mechanische Beanspruchung und anhaltende Konzentrationsgradienten durch ineffektives Mischen auszugehen.



A



B

Abbildung 38: Gegenüberstellung der Kultivierungsergebnisse im BIOSTAT® STR 50 L mit CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definierten Minimalmedien anhand der Lebendzellzahl, Vitalität und des spezifischen Leistungseintrages (A) sowie der Glukose- und Laktatkonzentrationen (B) als Funktion der Prozesszeit.

Unter Berücksichtigung, dass ein exponentielles Zellwachstum auch während der Mediumzugabe vorliegt, beträgt die spezifische Wachstumsrate über den gesamten Prozess der Zellexpansion $0.026 \text{ 1/h} \pm 0.001$ für die drei Kultivierungen (Abbildung 38; A). Diese spezifische Wachstumsrate wird im Folgenden für die Scale-down und Scale-up Untersuchungen genutzt, um die Prozesse mit ihren unterschiedlichen Feeding-Strategien und Kultivierungsvolumen zu vergleichen. Aufgrund der Kultivierungsergebnisse wird der Parameterbereich der Mischzeit

($15 < \theta_m < 30$ s) und der mittleren, lokalen Schergradienten ($\gamma_{m,NT} > 3$ 1/s) für einen Scale-down in den UniVessel® SU und eine Maßstabsvergrößerung in den BIOSTAT® STR 200 L genutzt. Hierfür ist im UniVessel® SU ein spezifischer Leistungseintrag bis zu 20 W/m³ und im BIOSTAT® STR (RT + SBI) 200 L bis 70 W/m³ ausreichend. In Abbildung 39 sind die Kultivierungsergebnisse im 50 L Maßstab (mittlere Graphen) zusätzlich aufgeführt, ohne die Schritte der Medienzugabe zu berücksichtigen.

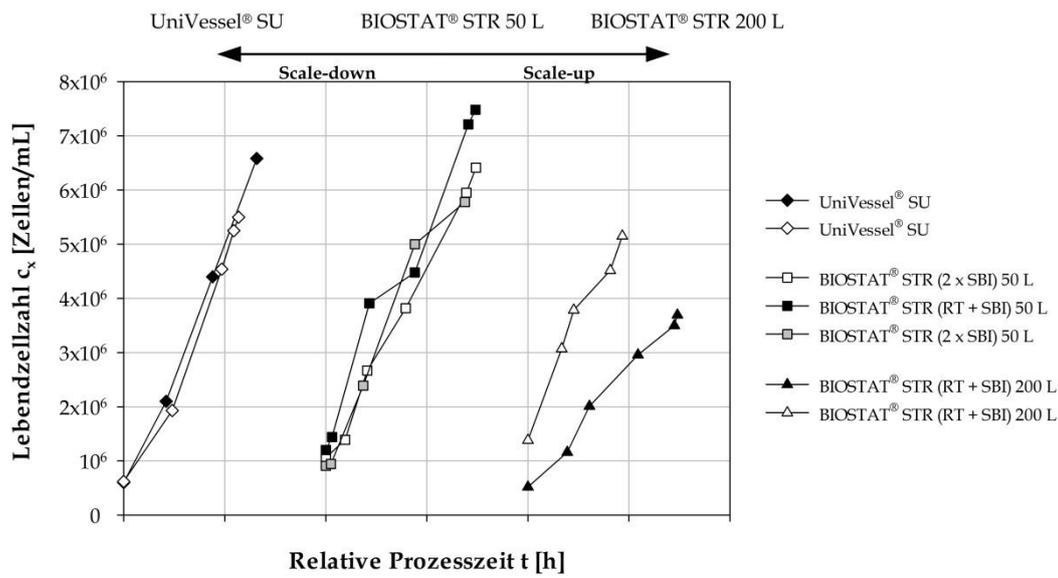
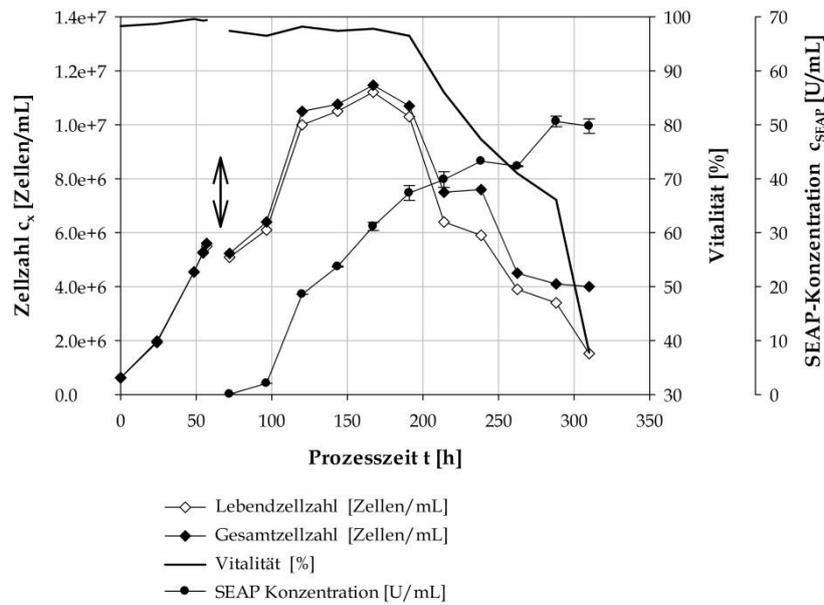


Abbildung 39: Vergleich der Scale-down/Scale-up Kultivierungsergebnisse ausgehend vom BIOSTAT® STR 50 L (Mitte) hin zum UniVessel® SU 2L (links) und zum BIOSTAT® STR (RT + SBI) 200 L (rechts). Die Kultivierungen der CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definiertem Minimalmedium wurden nicht nacheinander durchgeführt, sondern sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nach aufsteigendem Volumen von links nach rechts aufgeführt. Daher wird die Lebendzellzahl als Funktion der relativen Prozesszeit aufgeführt und der Verlauf der Graphen keine Feeding-Schritte berücksichtigt.

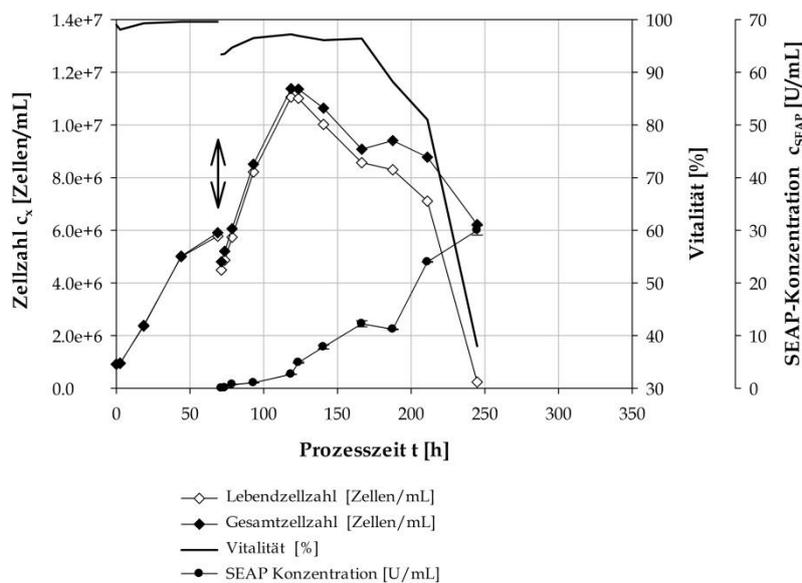
Der Scale-down in den UniVessel® SU erfolgt bei einem konstanten spezifischen Leistungseintrag von 15 W/m³ über den Prozessverlauf mit der CHO XM 111-10 Zelllinie in chemisch definiertem Minimalmedium. Die Kultivierungsergebnisse für zwei UniVessel® SU Ansätze (Abbildung 39; linke Graphen) sind aus Gründen der Übersichtlichkeit ebenso ohne die Feeding-Schritte aufgeführt. Beide Versuche zeigen bei einer Inokulumkonzentration von 0.6×10^6 lebenden Zellen/mL einen annähernd identischen Verlauf der Lebendzellkonzentration. Die maximal erreichten Lebendzellzahlen belaufen sich auf 6.6×10^6 Zellen/mL (nach einer Prozesszeit von 65 h) und 5.5×10^6 Zellen/mL (nach einer Prozesszeit von 57 h). Während im ersten Ansatz eine Wachstumskurve aufgenommen wurde (stationäre und Absterbephase nicht gezeigt), wird im zweiten Ansatz die Bildung des Produktes SEAP verfolgt. Hierfür müssen sich die Zellen in der (spät) exponentiellen Phase befinden, um bei der Biomasse-gekoppelten Produktbildung möglichst hohe Produkttiter zu erhalten (Abbildung 39; linke Graphen). Während der Zellexpansionen wird eine konstante Vitalität von über 98 % gemessen. Verglichen mit dem gerührten, single-use Mobius CellReady® Bioreactor wird eine mehr als fünffach höhere Lebendzellzahl erreicht [58]. Im BIOSTAT® STR 50 L sind sowohl die maximalen Lebendzellkonzentrationen als auch die Wachstumsraten von 0.038 1/h \pm 0.001 annähernd identisch.

Neben dem Scale-down wird zusätzlich ein Scale-up vom BIOSTAT® STR 50 L auf den BIOSTAT® STR (RT +SBI) 200 L durchgeführt. Für die beiden Kultivierungen (Abbildung 39; rechte Graphen) wird ein konstanter spezifischer Leistungseintrag von 60 W/m^3 während der fed-batch-Kultivierungen der CHO XM 111-10 Zellen realisiert. Im ersten Kultivierungsansatz im BIOSTAT® STR 200 L mit einer Inokulumkonzentration von 0.5×10^6 lebenden Zellen/mL werden nach 74 stündiger Zellexpansion eine maximale Zelldichte von 3.8×10^6 Zellen/mL ($\mu = 0.027 \text{ 1/h}$; $t_d = 25 \text{ h}$) erreicht. Minimale Abweichungen der eingestellten Rührerdrehzahl und des somit geringen spezifischen Leistungseintrages von 55 W/m^3 führte zur Sedimentation sowie dem Verlust der Zellen zu Prozessbeginn ($0 < t < 30 \text{ h}$). Im zweiten Ansatz konnte ein konstanter spezifischer Leistungseintrag von 60 W/m^3 gewährleistet werden. Die nach 50 h erhaltene maximale Lebendzellzahl von 5.3×10^6 Zellen/mL zeigt trotz erhöhter Inokulumkonzentration (1.4×10^6 lebenden Zellen/mL) eine mit den übrigen Kultivierungen vergleichbare Wachstumsrate von 0.027 1/h ($t_d = 25 \text{ h}$) auf. Grund für die vergleichbar geringen, maximalen Zellzahlen war die weitere Nutzung der Suspension, weshalb die Kultur nicht vollständig durchwuchs und ein Vergleich zu den übrigen Maßstäben nur über die Wachstumsrate gegeben ist.

Die Initialisierung der Produktbildung durch einen Mediumwechsel wird mittels einer Aufkonzentrierung der Zellsuspension mit einer kontinuierlichen Diafiltration realisiert (Kapitel 3.4). Während der Diafiltration erfolgte ein dreifacher Austausch des Mediums, um wachstumshemmende Produkte, wie Laktat oder Ammonium, auszuwaschen. Der Prozess wurde mit einer *Cross-flow* Filtrationsanlage von Sartorius Stedim Biotech innerhalb von ca. 60 min realisiert. Im Gegensatz zu der herkömmlich genutzten Zellsedimentation konnte hier die Prozesszeit um mindestens 70 % verringert werden. Zusätzlich konnte der für die Zellen essentielle Massen- und Stofftransfer während des Mediumwechsels gewährleistet werden, der bei einer Sedimentation nur eingeschränkt möglich ist. Nach dem Mediumwechsel wurde eine Zellzahl von 5.1×10^6 Zellen/mL gemessen (Abbildung 40; A). Dies entspricht einer Zellrückführungsrate von 93 % und ist vergleichbar mit Werten aus der Literatur [312]. Aufgrund des nährstoffreichen Mediums und des Auswaschens inhibierender Endprodukte sowie dem zur Verfügung gestellten Substrat tritt eine weitere Zellexpansion bis 11×10^6 Lebendzellen/mL auf (Vitalität $> 97 \%$; $72 < t < 167 \text{ h}$). Durch die Anreicherung von inhibierenden Endprodukten bzw. dem Abbau wachstumsfördernder Substrate sinken nachfolgend die Lebendzellzahl sowie die Vitalität. Über den Verlauf der Produktionsphase ($72 < t < 310 \text{ h}$) ist ein Anstieg der SEAP-Konzentration von 0 U/mL bis auf 50 U/mL zu beobachten, die in einem zweiten Ansatz bestätigt wurden (Daten nicht gezeigt). Im UniVessel® SU ist vergleichend zum Mobius CellReady® Bioreactor eine zehnfach bzw. zum CellBag® Bioreactor eine zweifach höhere SEAP-Konzentrationen bei annähernd ähnlichen Zellkonzentrationen zu beobachten [58, 294, 312].



A



B

Abbildung 40: Vergleich des Kultivierungsverlaufes während der Produktbildung im UniVessel® SU (A) und dem BIOSTAT® STR 50L (B).

Im BIOSTAT® STR 50 L erfolgte der Medienwechsel mit einem Hohlfasermodule von GE Healthcare innerhalb von 1,5 h bei einer Zellrückführungsrate von 80 % (Abbildung 40; B). Während der sich anschließenden Produktionsphase ($71 < t < 244$ h) wurde im BIOSTAT® STR 50 L vergleichbare maximale Zelldichten wie im UniVessel® SU von 11×10^6 Zellen/mL erreicht. Im Gegensatz zu dem Produktionsversuch im UniVessel® SU werden im BIOSTAT® STR 50 L aber geringere SEAP-Konzentrationen von 30 U/mL bestimmt. Der Grund hierfür ist im Verlauf der beiden Produktionsphasen unter Berücksichtigung der Zellkonzentrationen zu erkennen. Während sich im UniVessel SU eine Lebendzellzahl von oberhalb 10×10^6 Zellen/mL über 80 h einstellt ($120 < t < 200$ h), wird dieses im BIOSTAT® STR 50 L nur über 36 h ($106 < t < 140$ h) beobachtet. Der kürzere Produktionszeitraum führt im BIOSTAT® STR 50 L zu einer geringeren

SEAP-Konzentration, die jedoch im Vergleich mit den von Rothe *et al.*, 2012 diskutierten Werten von 18 U/mL deutlich höher (60 %) sind [312].

Werden die erhaltenen Ergebnisse im UniVessel® SU und im BIOSTAT® STR mit neueren Untersuchungen im S.U.B. 50 L gegenübergestellt, liegt die maximal erhaltene Lebendzelldichte von 5.2×10^6 Zellen/mL innerhalb eines vergleichbaren Bereiches [313]. Ein Mediumwechsel und eine Bestimmung der SEAP-Konzentration wurde allerdings im S.U.B. nicht durchgeführt.

4.4.3 CFD zur Prozessentwicklung und Bioreaktoroptimierung

Auf Grundlage der numerisch ermittelten, verfahrenstechnischen Kenngrößen erfolgt eine Prozessentwicklung in unterschiedlichen single-use Bioreaktorsystemen vom Labor- zum Pilotmaßstab. Dabei werden Prozessparameter durch Anpassung des spezifischen Leistungseintrages bei gleichbleibenden Mischzeiten und Schergradienten gewählt. Die durchgeführten Zellexpansionen weisen vergleichend zur Literatur deutlich höhere Lebendzellzahlen und Wachstumsraten auf. Für einen akzeptablen Prozess stehen jedoch nicht nur die maximalen Lebendzellichten sondern auch die Produkttiter und Produktqualität im Vordergrund. Wie im Kapitel 4.4 dargestellt wird, ist für die Auslegung eines Kultivierungsprozesses mit CHO XM 111-10 Zellen neben der Mischzeit auch die Schergradienten zu berücksichtigen. Der volumenbezogene Sauerstoffübergangskoeffizient stellt hingegen ein untergeordnetes Übertragungskriterium dar. Die numerisch ermittelten, verfahrenstechnischen Kenngrößen (grundlegende und erweiterte Größen; Tabelle 4 und Tabelle 5) bestätigen die hohe Zellzahlen, Vitalität und Produkttiter der Scale-up und Scale-down Untersuchungen, weshalb hier durchaus von einer CFD-basierten Prozessauslegung gesprochen werden kann.

Ein wichtigster Vorteil der numerischen Strömungsmechanik bildet jedoch deren Anwendung in sogenannten virtuellen Prototypstudien zur Optimierung von Bioreaktoren oder der Auslegung neuartiger Systeme. Letzteres geht von grundlegend unterschiedlichen single-use Bioreaktorkonzepten aus, die sowohl im Reaktordesign als auch in der Umsetzung des Stoff- und Massentransfers (durch neuartige Formen des Leistungseintrages) nicht mit bestehenden Bioreaktorsystemen vergleichbar sind. Dieses Prinzip wurde beispielsweise am PBS Bioreactor durchgeführt [53], bei dem das konzeptionelle Design des *air-wheel*, die Anzahl und Anordnung der Segel auf dem numerisch Ansatz basiert. In nachfolgenden Kultivierungsuntersuchungen wurde zudem die Vergleichbarkeit von Zellkonzentration und Produkttiter nachgewiesen [129]. Im Fall des Travelling Wave Bioreactor [303] steht bisher noch die numerische, verfahrenstechnische Charakterisierung im Vordergrund, um einen adäquaten Stofftransfer für Zellkulturen zu gewährleisten. Auch bei peripheren Elementen eines Kultivierungsprozesses werden numerische Ansätze für die Entwicklung genutzt. Als Beispiele sind vor allem diverse Pumpen zu nennen [307]. Andererseits kann der numerische Ansatz für bestehende Bioreaktorsysteme genutzt werden, um auf Basis der verfahrenstechnischen Kenngrößen eine Optimierung der Sparger-, Rührer- und/oder Reaktorgeometrie vorzunehmen. Diese Notwendigkeit gründet sich auf den erweiterten Einsatzgebieten der single-use Komponenten und Bioreaktoren (Kapitel 2.2.2). Die ursprünglich für die Kultivierung von tierischen Zellen (vorwiegend CHO-Zellen) konzipierten Systeme werden mittlerweile für die Kultivierung von adhären-wachsenden tierischen, humanen oder pflanzlichen Zellkulturen sowie zur

Fermentation von Mikroorganismen eingesetzt (Kapitel 2.1). Da die unterschiedlichen Einsatzgebiete auch spezielle Anforderungen an den Kultivierungsprozess und die auftretende Strömung mit sich bringen, erweist sich die CFD als eine begründete Alternative zur konventionellen Charakterisierung, Optimierung und Entwicklung von single-use Bioreaktoren und deren Prozessen. Die CFD ist hauptsächlich bei Scale-up / Scale-down Untersuchungen von Interesse, bei denen unterschiedliche Bioreaktorgrößen und Betriebszustände erfasst werden müssen. Obwohl für den numerischen Ansatz jeweils eine Modellvalidierung erfolgen muss, bleibt abschließend festzuhalten, dass der mit der CFD einhergehende Aufwand nicht nur für die Forschung und Entwicklung sondern auch der industrielle Anwendung von single-use Bioreaktoren überschaubar und kalkulierbar ist. Anfallende (zeitintensive) experimentelle Untersuchungen, die Beschaffung von kostenintensiven Messtechniken oder die Anfertigung von variierenden Prototypen können auf ein Minimum reduziert werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Parallelisierung der Simulationen in Cluster-Systemen oder auf Hochleistungsrechnern, wodurch ein Vielfaches an Zeit und Kosten eingespart werden kann.

5 Zusammenfassung

Die gerührten single-use Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech und Thermo Scientific werden hinsichtlich ihrer verfahrenstechnischen Eigenschaften zur Anwendung in modernen Zellkulturprozessen charakterisiert. Neben etablierten, experimentellen Methoden wird für die verfahrenstechnische Charakterisierung die CFD genutzt, die zusätzliche Aussagen, wie beispielsweise die mechanische Beanspruchung, zulässt. Zellkulturrelevante Parameter umfassen das Strömungsverhalten, die Fluidgeschwindigkeiten, den spezifischen Leistungseintrag, die Mischzeit und den k_La und werden im Labor- sowie Pilotmaßstab zur Validierung der numerischen Modelle eingesetzt. Darauf aufbauend werden die Modelle für eine numerische Charakterisierung bis zum Produktionsmaßstab herangezogen. Auf Basis der numerischen ermittelten Kriterien - Mischzeiten und Schergradienten - erfolgt in den gerührten, single-use Bioreaktoren ein Scale-up / Scale-down für einen biopharmazeutischen Prozess. Die gesteigerte Zellzahl und Produktivität in den durchgeführten Kultivierungen zeigen die Eignung der numerischen Übertragungskriterien für die Auslegung eines biopharmazeutischen Prozesses und belegen den Nutzen der CFD.

In den vergangenen Jahren konnten sich single-use Bioreaktoren mit modernen Arten des Leistungseintrages und Begasungsstrategien in der biopharmazeutischen Industrie etablieren. Single-use Bioreaktoren mit gerührten, wellendurchmischten, orbital geschüttelten, rotatorisch oszillierenden oder von vibrierenden Scheiben angetriebenen Arbeitsprinzipien werden heutzutage nicht nur für die Kultivierung humaner und tierischer Zelllinien genutzt, sondern eignen sich auch für die Kultivierung von Mikroorganismen, pflanzlichen Zellen oder humanen Stammzellen. Jedoch wird der Vergleich der single-use Systeme untereinander und zu konventionellen gerührten Bioreaktoren durch die neuartigen Leistungseintragsarten und deren konstruktiven Gegebenheiten erschwert. Die hierfür notwendige verfahrenstechnische Charakterisierung wird erstmalig für kommerziell erhältliche single-use Bioreaktoren diskutiert und unter Berücksichtigung der Art des Leistungseintrages, der Konfiguration des Kultivierungsbehälters, des Maßstabes und der Instrumentierung kategorisiert. Die hier abgeleiteten und empfohlenen Methoden (parametrische und experimentelle Methoden) umfassen die grundlegenden, verfahrenstechnischen Parameter für zellkulturbasierende Prozesse und gewährleisten einen Vergleich der Bioreaktorsysteme untereinander. Die erweiterten, verfahrenstechnischen Parameter (experimentelle und numerische Methoden) eignen sich vorrangig für die detaillierte Betrachtung der Strömung und sind zur Auslegung von zellkulturbasierenden Prozessen heranzuziehen.

Die vier untersuchten, gerührten single-use Bioreaktoren weisen im Vergleich zu konventionellen Rührreaktoren keine wesentlichen, verfahrenstechnischen Unterschiede in Bezug auf den Leistungseintrag, die Mischzeit oder den k_La auf (Tabelle 7). Im Hinblick auf die Nutzung in zellkulturbasierenden Prozessen können Anwender grundsätzlich zwischen den vier Reaktortypen wählen. Jedoch wird am Beispiel des S.U.B. deutlich, dass der eingesetzte Rührer sowohl in der eingetragenen Leistung als auch beim Stofftransfer in Form der Durchmischung und der k_La -Werte nicht an die Charakterisierungswerte der single-use Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech heran kommt. Dies liegt zum einen an dem geringeren Durchmesser Verhältnis von Rührer zu Reaktor, der Rühreranzahl und der maximal einstellbaren Rührerumfangsgeschwindigkeit von ca. 1.05 m/s, woraus ein wesentlich geringerer spezifischer Leistungseintrag von maximal 30 W/m³ resultiert.

Tabelle 7: Übersicht der experimentell bestimmten, verfahrenstechnischen Kenngrößen für den UniVessel® SU, BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B. 50 L.

Verfahrenstechnische Parameter	UniVessel® SU	BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L	BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L	S.U.B. 50 L
Newton Zahl	-	3.3	1.2	2.2
Kritische Reynolds Zahl	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
Maximale ermittelte Rührerumfangsgeschwindigkeit	1.8 m/s	1.12 m/s	1.12 m/s	1.05 m/s
Spez. Leistungseintrag (bei max. u _{tip})	-	bis 25 W/m ³	bis 65 W/m ³	bis 23 W/m ³
Mischzeit	3 – 12 s	10 - 40 s [69]	10 - 40 s [69]	26 – 80 s
Mischkennzahl	32±1	34±1	26±5	66±27
Volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient (bei 0.1 vvm)	20 - 60 1/h	4 - 14 1/h ¹ 18 - 27 1/h ² [69]	6 - 27 1/h ¹ 16 - 47 1/h ² [69]	2 - 8 1/h
Gasblasenverteilung	Rührer dispergiert Blasen [15]	Rührer dispergiert Gasblasen	Rührer dispergiert Gasblasen	Rührer überflutet
Eingangsgasblasengröße*	1 mm [15]	2 mm	2 mm	1.5 mm
Mittlere Gasblasengröße*	-	2 – 4 mm	2 – 3 mm	1.5 – 2 mm
Mittlerer Sauterdurchmesser*	-	1 – 6 mm	1 – 6 mm	2 – 5 mm

* in Relation zur Anzahlverteilung der Gasblasen; ¹ Ringsparger; ² Mikrosparger

Im Maßstab von 2 bzw. 50 L werden die für Zellkulturprozesse relevanten verfahrenstechnischen Parameter (Rührerumfangsgeschwindigkeit, Strömungsregime, Leistungseintrag, Mischzeit und k_{LA}) durch die Methoden der parametrischen und experimentellen Ansätze ermittelt (Kapitel 4.1). Hierzu werden parallel numerische Untersuchungen durchgeführt, die zum einen mit den Ergebnissen der kleinsten Maßstäbe verglichen werden. Zum anderen wird für eine Charakterisierung der übrigen Maßstäbe bis 2000 L die numerische Strömungsmechanik (CFD) herangezogen, da eine Bereitstellung aller single-use Bioreaktorgrößen und -konfigurationen nicht möglich ist. In Abhängigkeit der Rührer wird im UniVessel® SU, S.U.B. 50 L und im BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L eine axiale sowie im BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L eine radial/axiale Strömung ermittelt, die oberhalb der üblichen kritischen Reynolds Zahl (Re_{krit}) von 10⁴ eine vollausgeprägte, turbulente Strömung aufzeigen (Tabelle 8). Im UniVessel® SU wird Re_{krit} mit 1.3×10^4 ermittelt. Die zu konventionellen Rührern übereinstimmende Vergleich wird auch bei der ermittelten Leistungscharakteristiken deutlich, bei denen Newton Zahlen von 1.5 (UniVessel® SU), 1.8 (S.U.B. 50 L), 1.2 (BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L) und 3.3 (BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L) erhalten worden (Tabelle 8). Ausgehend von den in der Literatur angegebenen kritischen Werten für Zellkulturbioreaktoren von oberhalb 80 bzw. 250 W/m³ [142, 189], beträgt die eintragende Leistung im S.U.B maximal ca. 30 W/m³. Wesentlich höhere spezifische Leistungseinträge werden im BIOSTAT® STR 50 L mit bis zu 86 W/m³ (2 x SBI) und 240 W/m³ (RT + SBI) erzielt. Mit einem maximalen spezifischen Leistungseintrag von 435 W/m³ ist im UniVessel® SU zusätzlich die Möglichkeit einer Mikroorganismenkultivierung gegeben (Tabelle 8). Hinsichtlich der Homogenität liegen die

Mischkennzahlen im Bereich zwischen 30 und 40 (Sartorius Stedim Biotech) sowie 66 (Thermo Scientific). Alle betrachteten Bioreaktortypen erreichen den, für die zellkulturtechnische Anwendung, in der Literatur beschriebenen k_{La} -Bereich von 5 bis 15 $1/h$ [165]. Im Vergleich zu den übrigen Systemen wird jedoch im S.U.B. 50 L ein wesentlich geringerer k_{La} von maximal 8 $1/h$ experimentell ermittelt (Tabelle 8), was auf das aufgezeigte verminderte Dispergierverhalten des Rührers (trotz Microsparger) zurückzuführen ist. In Bezug auf den k_{La} liefert lediglich der numerische Ansatz für den 2 L Maßstab zusätzliche übereinstimmende Ergebnisse, weshalb hier von einer Validierung auszugehen ist.

Für die Validierung der verwendeten CFD-Modelle für den BIOSTAT® STR 50 L und den S.U.B. 50 L wird die PIV genutzt. Für die axialfördernden Rührer (BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L und S.U.B. 50 L) erfolgt die Validierung der CFD-Modelle auf Basis eines vergleichenden Strömungsverhaltens und einer Geschwindigkeitsverteilung. Bei der Rührerkombination der radial/axialfördernden Rührer (BIOSTAT® STR (RT+SBI) 50 L) sind Abweichungen der Fluidströmung im Rührerausstrom zu erkennen. Diese werden bei den experimentellen Untersuchungen durch eine Bewegung der Rührerwelle in der Fixierung hervorgerufen. Jedoch zeigen radiale Profile ein übereinstimmendes Verhalten der Strömung, der Verteilung der Fluidgeschwindigkeiten und der Geschwindigkeitsverläufe. Unter Berücksichtigung der weiteren verfahrenstechnischen Parameter (Newton Zahl, Leistungseintrag, Mischzeit, etc.) ist jedoch eine abschließende Validierung vertretbar (Tabelle 8). Die untersuchten single-use Bioreaktoren weisen im Vergleich zu herkömmlichen Bioreaktorsystemen, die für den Einsatz von zellkulturbasierenden Prozessen ausgelegt werden, übereinstimmende verfahrenstechnische Eigenschaften auf. Unterschiedliche verfahrenstechnische Merkmale sind aufgrund der verwendeten Bioreaktormaterialien nicht festzustellen, was einen direkten Vergleich zum bekannten gerührten Bioreaktorsystem unterstreicht.

Um eine Maßstabsübertragung innerhalb der single-use Systeme von Thermo Scientific und Sartorius Stedim Biotech durchzuführen, werden alle Reaktorkonfigurationen auf Basis des numerischen Ansatzes verfahrenstechnisch charakterisiert (Kapitel 4.3). Hierfür werden die grundlegenden und erweiterten Parameter herangezogen und im Hinblick auf einen zellkulturbasierenden Prozess diskutiert. Die erhaltenen Ergebnisse liegen innerhalb der in der Literatur aufgeführten und vorgegebenen Bereiche, was beweist, dass auch gerührte single-use Bioreaktoren vergleichbar zu herkömmlichen Rührreaktoren sind und deren mathematische Beschreibung genutzt werden kann. Der von Nienow, 2006 aufgeführte Ansatz zur Mischzeitbestimmung ist für die unterschiedlichen Bioreaktorsysteme anwendbar und zeigt eine Korrelation zwischen der Mischzeit in Abhängigkeit des spezifischen Leistungseintrags und der Reaktorgeometrien [142, 189]. Anhand des Korrelationsfaktor von 3.5 und der Gleichung 40 kann die Mischzeit in den untersuchten single-use Bioreaktoren ermittelt werden. Weiter wird eine Abhängigkeit der mechanischen Beanspruchung in Form der überwiegend auftretenden Schergradienten festgestellt. Anhand des spezifischen Leistungseintrages, des Maßstabes und der Reaktorgeometrien können mittlere, lokale Schergradienten bestimmt werden (Gleichung 41). Die Bestimmung der mechanischen Beanspruchung spielt vor allem bei der Kultivierung scherempfindlicher Zellen in der biopharmazeutischen Industrie eine wesentliche Rolle, da hohe Schergradienten das Zellwachstum und schlussfolgernd auch die einhergehende Produktbildung (z. B. Produktivität) negativ beeinflussen können [155, 232, 235].

Tabelle 8: Übersicht der experimentellen und numerischen Ergebnisse sowie die resultierende Validierung des UniVessel® SU, der BIOSTAT® STR 50 L und des S.U.B. 50 L.

Kenngrößen	UniVessel® SU		BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L		BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L		S.U.B. 50 L	
	Exp.	CFD	Exp.	CFD	Exp.	CFD	Exp.	CFD
Newton Zahl	-	1.5	3.3	3.2	1.2	1.2	2.2	1.8 - 2.2
Kritische Reynolds Zahl	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴	> 10 ⁴
Maximale ermittelte u_{Tip}	1.8 m/s	1.8 m/s	1.12 m/s	1.8 m/s	1.12 m/s	1.8 m/s	1.05 m/s	1.2 m/s
P/V (bei max. u_{Tip})	-	bis 435 W/m ³	bis 25 W/m ³	bis 86 W/m ³	bis 65 W/m ³	bis 240 W/m ³	bis 23 W/m ³	bis 28 W/m ³
Mischzeit	3 - 12 s	3 - 10 s	10 - 40 s	10 - 60 s	10 - 40 s	10 - 60 s	26 - 80 s	26 - 60 s
Mischkennzahl	32±1	34±2	34±1	33±2	26±5	36±2	66±27	66±6
$k_{L,a}$ (bei 0.1 vvm)	20 - 60* 1/h	10 - 60* 1/h	4 - 14** bzw. 18 - 27 1/h	112- 36** 1/h	6 - 27** bzw. 16 - 47 1/h	31- 278** 1/h	2 - 8 1/h	3- 29 1/h
Basis der Validierung	Mischzeit, Mischkennzahl, $k_{L,a}$		Strömungsverhalten, Geschwindigkeits- verteilung		spezifischer Leistungseintrag, Newton Zahl, Mischzeit, Mischkennzahl		Strömungsverhalten, Geschwindigkeits- verteilung	
Modellvalidierung	ja		ja		ja		ja	

*L-Sparger; **Ringsparger; übrigen Untersuchungen mit Mikrosparger

Diese beiden Parameter werden zusätzlich für eine Prozessentwicklung mit einem biologischen System genutzt, um ein Scale-up bzw. Scale-down ausgehend vom 50 L Maßstab hin zu einem Arbeitsvolumen von 2 bzw. 200 L durchzuführen (Kapitel 4.4). Eine anfängliche Prozessauslegung im S.U.B. 50 L auf Grundlage des spezifischen Leistungseintrages als Scale-up Kriterium resultierte in einem inakzeptablen Kultivierungsverlauf. Da sowohl die mechanische Beanspruchung als auch der Massen- und Stofftransfer ausschlaggebend für die Qualität und Quantität der Kultivierung von CHO XM 111-10 Zellen sind, wurden auf Basis der numerisch erhaltenen mittleren, lokalen Geschwindigkeitsgradienten ($\gamma_{m,NT} > 3$ 1/h) und Mischzeiten ($15 < \theta_m < 30$ s) Kultivierungsparameter für die weiteren Zellexpansionen definiert. Beide Größen werden während der Scale-down (50 L auf 2 L) und Scale-up Versuche (50 L auf 200 L) durch Anpassung des spezifischen Leistungseintrages annähernd konstant gehalten (Tabelle 9). Um Substratlimitationen durch Glukose bzw. Wachstumsinhibierungen durch Laktat und Ammonium während der Kultivierungen ausschließen zu können, wurden durch Mediumzugabe die Konzentrationen von Glukose oberhalb von 1 - 1.5 g/L bzw. für Laktat unterhalb von 2 g/L gehalten. Zum Vergleich der Kultivierungen in den verschiedenen Bioreaktoren wird die absolute Wachstumsrate herangezogen, da die Zellexpansionen mit unterschiedlichen Inokulum-Konzentrationen, Strategien der Mediumzugabe und Endvolumina durchgeführt wurden. Die maximale Lebendzellzahlen liegen innerhalb eines Bereiches von $5.2 < c_x < 7.5 \times 10^6$ Zellen/mL (Tabelle 9) mit einer Vitalität oberhalb von 98 %, die im Vergleich mit Eibl *et al.*, 2010 und Rothe *et al.*, 2012 bis zu fünffach höhere Zellkonzentrationen aufzeigt [58, 312].

Tabelle 9: Zusammenfassung der Kultivierungsuntersuchungen und -parameter für den UniVessel® SU, BIOSTAT® STR 50 L, S.U.B. 50 L und BIOSTAT® STR 200 L mit CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definiertem Minimalmedium (n.b.: nicht bestimmt).

	2L UniVessel® SU	BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L	50L BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L	S.U.B. 50 L [313]	200 L BIOSTAT® STR (RT + SBI) 200 L	
Betriebsparameter	Reaktorvolumen [L]	0.6 - 2	21 - 50	21 - 50	25 - 50	50 - 160
	Spezifischer Leistungseintrag [W/m ³]	15	20 - 50	60 - 130	bis 32	60
	Mischzeit [s]	15 - 20	15 - 25	15 - 25	15 - 25	15 - 25
	Mittlere lokale Schergradienten [1/s]	8	3 - 4	3.5 - 5	bis 3	3
Kultivierungsparameter	Inokulumkonzentration [10 ⁶ Zellen/mL]	0.6	1.0	1.0	0.8	1.4
	Maximale Zellzahl [10 ⁶ Zellen/mL]	6.6	6.5	7.5	5.2	5.1
	Prozesszeit [h]	65	75	75	137	47
	Absolut spezifische Wachstumsraten [1/h] (über den Prozessverlauf)	0.037	0.025	0.027	0.014	0.027
	Verdopplungszeiten [h] (auf Basis der abs. spez. Wachstumsrate)	19	28	26	63	26
	Glukoseverbrauchsrate [g/L/h]	0.049±0.004	0.076±0.012	0.064	0.063	0.064±0.01
	Laktatbildungsrate [g/L/h]	0.039±0.007	0.036±0.004	0.032	0.029	0.044±0.012
Produktparameter	Maximale SEAP-Konzentration [U/mL]	bis 60	bis 30	n. b.	n. b.	n. b.
	SEAP-Bildungsrate [U/mL/h]	0.23	0.18	n. b.	n. b.	n. b.

Hinsichtlich der absolut spezifischen Wachstumsraten ist jedoch ersichtlich, dass in den single-use Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech deutlich höhere und annähernd identische, absolut spezifische Wachstumsraten ($\mu = 0.027 \text{ 1/h} \pm 0.002$) und Verdopplungszeiten ($t_d \approx 26 \text{ h}$) erhalten werden. Dies korreliert mit den Charakterisierungsergebnissen, bei denen die BIOSTAT® STR-Reihe einen effektiveren Massen- und Stofftransfer sowie eine homogenere mechanische Beanspruchungen erhalten werden. Des Weiteren zeigen die gemittelten Verbrauchs- bzw. Bildungsraten für Glukose ($0.047 \text{ g/L/h} \pm 0.002$) bzw. Laktat ($0.063 \text{ g/L/h} \pm 0.005$) für die Kultivierungen in der Prozessauslegung annähernd identische Werte im Vergleich zur Prozessentwicklung auf. Um auch die Produktivität der CHO-Zellen zu erfassen, wird für den Mediaaustausch die *Crossflow*-Filtration für die Bioreaktoren im 2 und 50 L Maßstab etabliert. Anhand der zusätzlich durchgeführten Untersuchungen zum Modellprodukt im UniVessel® SU und im BIOSTAT® STR 50 L auf Basis eines entwickelten Mediaaustausch-Prozesses werden SEAP-Konzentrationen zwischen 30 und 60 U/mL erhalten. Die Proteinkonzentration ist vergleichend zu Untersuchungen in weiteren gerührten und wellendurchmischten single-use Bioreaktoren um das Zwei- bis Zehnfache höher [58, 294, 312]. Resultierend konnte am Beispiel der CHO XM 111-10 Zellen und aufgrund der numerisch erhaltenen Ergebnisse ein Scale-up vom 2 L bis zum 200 L Maßstab realisiert werden, das vergleichend zur Literatur gesteigerte Lebendzellzahlen und Produkttiter aufweist.

Die Kombination der numerisch ermittelten Mischzeiten und Schergradienten sind für eine Prozessauslegung mit der CHO XM 111-10 Zelllinie die entscheidenden Übertragungskriterien. Unter Berücksichtigung der Mischzeit konnten sowohl Prozessbedingungen für pflanzliche Zellen (transgene Reis-Zellen) [269] als auch für Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus*) erfolgreich etabliert werden [314]. Eine zusätzliche Betrachtung der Schergradienten als Maßstabsübertragungskriterium wurde bisher nicht für die Kultivierung von Zellen oder Mikroorganismen herangezogen. Der vielfach zur Maßstabsübertragung verwendete $k_L a$ hingegen kann als Kriterium für die CHO XM 111-10 Zelllinie ausgeschlossen werden, da trotz der Hochzellichten im UniVessel® SU und BIOSTAT® STR keine Sauerstofflimitationen aufgetreten sind. Daher zeigt sich die Nutzung der numerischen Strömungsmechanik nicht nur für primär verfahrenstechnische Anwendungen sondern kann auch zur Auslegung zellkulturbasierter Prozesse mit CHO Zelllinien eingesetzt werden.

In dieser Arbeit wurde die CFD eingesetzt, um moderne Zellkulturbioreaktoren verfahrenstechnisch zu charakterisieren, was erstmalig für die single-use Bioreaktoren UniVessel® SU, BIOSTAT® STR und S.U.B. dargestellt werden konnte. Darüber hinaus belegen die Untersuchungen den vorteilhaften Einsatz der CFD zur Auslegung von Prozessen und zur Prozessoptimierung. Dieses kommt vor allem zum Tragen, wenn sehr teure Kultivierungsmedien verwendet werden und das Handling zur Kultivierung der Zellen sehr aufwendig ist. Dies gilt nicht nur für Kultivierungen von CHO-Zellen sondern trifft insbesondere auch für die Expansion von hMSC zu. Daher wird erstmalig die CFD zu einem Instrument in der biopharmazeutischen Industrie, durch welches die Zeit bei der Entwicklung und Markteinführung von biopharmazeutischen Produkten eingespart, aber vor allem auch eine Kostenreduktion während der Entwicklung und Produktion von neuen biopharmazeutischen Produkten erricht wird.

6 Literaturverzeichnis

- [1] BioPlan Associates I (2012) *9th Annual report and survey of biopharmaceutical manufacturing capacity and production: a study of biotherapeutic developers and contract manufacturing organizations* BioPlan Associates, Inc. Rockville.
- [2] Jayapal K, Wlaschin K, Hu W-S et al. (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *CHO Consortium: SBE Special Edition*, 40-47. doi: citeulike-article-id:8686760.
- [3] Eibl R, Werner S, Eibl D (2010) Bag bioreactor based on wave-induced motion: characteristics and applications. in *Disposable bioreactors*. (Eds: Eibl R, Eibl D). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [4] Eibl D, Peuker T, Eibl R (2010) Single-use equipment in biopharmaceutical manufacture: a brief introduction. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [5] Eibl R, Eibl D (2009) Disposable bioreactors in cell culture-based upstream processing. *BioProcess Int* 7 (Suppl. 1), 18-23.
- [6] Vanhamel S, Masy C (2011) Production of disposable bags: a manufacturer's report. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [7] Dechema (2011) Statuspapier des temporären Arbeitskreises: Single-use-Technologie in der biopharmazeutischen Produktion. http://www.dechema.de/biotech_media/Downloads/StatPap_SingleUse_2011.pdf (11.06.2013).
- [8] Brod H, Vester A, Kauling J (2012) Möglichkeiten und Grenzen von Disposable-Technologien in biopharmazeutischen Verfahren. *Chem Ing Tech* 84 (5), 633-645.
- [9] Maigetter R Z, Piombino T, Wood C et al. (2010) Single-use (SU) systems. in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. (Ed: Flickinger M C). John Wiley & Sons, Inc.
- [10] Pietrzykowski M, Flanagan W, Pizzi V et al. (2011) An environmental life cycle assessment comparing single-use and conventional process technology. *BioPharm Int* 24 (Suppl. 11), 30-38.
- [11] Löffelholz C, Kaiser S C, Kraume M et al. (2013) Dynamic single-use bioreactors used in modern liter- and m3- scale biotechnological processes: engineering characteristics and scaling up. in *Disposable Bioreactors II*. (Eds: Eibl R, Eibl D). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [12] De Jesus M, Wurm F M (2011) Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharm Biopharm* 78 (2), 184-188. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.01.005.
- [13] Whitford W G (2012) Single-use systems in animal cell-based bioproduction. in *Antibody-Mediated Drug Delivery Systems: Concepts, Technology, and Applications* (Eds: Pathak Y, Benita S). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [14] Merseburger T (2010) An introduction to the validation and qualification of disposables used in biomanufacture—a user's perspective. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [15] Kaiser S C, Löffelholz C, Werner S et al. (2011) CFD for characterizing standard and single-use stirred cell culture bioreactors. in *Computational Fluid Dynamics Technologies and Applications*. (Eds: Minin I V, Minin O V). doi: 10.5772/23496.
- [16] Hutchinson J (2011) Single-use advancements and cell culture applications. in *Proceedings of the Single-Use Technology Seminar* Thermo Fischer Scientific. Kopenhagen, Dänemark.

- [17] Kraume M (2003) *Mischen und Rühren: Grundlagen und moderne Verfahren*. Wiley-VCH Weinheim.
- [18] Storhas W (1994) *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen ein Leitfaden für die Hochschulausbildung, für Hersteller und Anwender*. Vieweg Braunschweig/Wiesbaden.
- [19] Rader R A (2005) What is a biopharmaceutical? part I: (bio)technology-based definitions. *BioExecutive International* 4, 60-65.
- [20] Rader R A (2005) What is a biopharmaceutical? part II: company and industry definitions. *BioExecutive International* 5, 42-49.
- [21] Junker B (2006) Process validation for biopharmaceuticals. in *Handbook of Pharmaceutical Biotechnology*. John Wiley & Sons, Inc.
- [22] Anicetti V (2009) Biopharmaceutical processes: a glance into the 21st century. *Bioproc J* 7 (Suppl. 1), 4-11.
- [23] Rader R A (2008) Expression systems for process and product improvement - a perspective on opportunities for innovator and follow-on product developers. *BioProcess Int* 6 (Suppl. 1), 4-9.
- [24] Birch J R, Racher A J (2006) Antibody production. *Adv Drug Delivery Rev* 58 (5-6), 671-685. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2005.12.006>.
- [25] Ries C, John C, Eibl R (2010) A new scale-down approach for the rapid development of Sf21/BEVS-based processes—a case study. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [26] Werner S, Egger D, Olownia J et al. (2012) 2D orbitally shaken single-use bags: engineering characterization and cell culture application examples. in *Proceedings of the ACHEMA*. Frankfurt, Germany.
- [27] Raven N, Schillberg S, Kirchhoff J et al. (2010) Growth of BY-2 suspension cells and plantibody production in single-use bioreactors. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [28] Imseng N, Schillberg S, Schürch C et al. (2013) Suspension Culture of Plant Cells under Heterotrophic Conditions. in *Industrial Scale Suspension Culture*. (Ed: Schmidhalter H-P M u D).
- [29] Galliher P M, Hodge G, Guertin P et al. (2010) Single-use bioreactor platform for microbial fermentation. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [30] Pörtner R (2009) Characteristics of mammalian cells and requirements for cultivation. in *Cell and Tissue Reaction Engineering*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [31] Hewitt C J, Lee K, Nienow A W et al. (2011) Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnol Lett* 33 (11), 2325-35. doi: 10.1007/s10529-011-0695-4.
- [32] Kaiser S, Jossen V, Schirmaier C et al. (2013) Fluid Flow and Cell Proliferation of Mesenchymal Adipose-Derived Stem Cells in Small-Scale, Stirred, Single-Use Bioreactors. *Chemie Ingenieur Technik* 85 (1-2), 95-102. doi: 10.1002/cite.201200180.
- [33] Ott K D (2011) Are single-use technologies changing the game? *BioProcess Int* 9 (Suppl. 2), 48-51.
- [34] Laukel M, Rogge P, G D (2011) Disposable downstream processing for clinical manufacturing. *BioProcess Int* 9 (2), 14-21.
- [35] Vogt R, Paust T (2009) Disposable factory or Tailor made integration of single-use systems? *Bioproc J* 7 (Suppl. 1), 72-77.
- [36] Jenke D R, Story J, Lalani R (2006) Extractables/leachables from plastic tubing used in product manufacturing. *Int J Pharm* 315 (1-2), 75-92. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.02.011.
- [37] Peuker T (2013) New challenges in project management for biopharmaceutical production. *Chem Ing Tech* 85 (1-2), 32-33. doi: 10.1002/cite.201200233.
- [38] Peuker T, Eibl D (2010) Biopharmaceutical manufacturing facilities integrating single-use systems. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.

- [39] Kaiser S C, Eibl R, Eibl D (2011) Engineering characteristics of a single-use stirred bioreactor at bench-scale: the Mobius CellReady 3L bioreactor as a case study. *Eng Life Sci* 11 (4), 359-368. doi: 10.1002/elsc.201000171.
- [40] Löffelholz C, Husemann U, Greller G et al. (2013) Bioengineering parameters for single-use bioreactors: overview and evaluation of suitable methods. *Chem Ing Tech* 85, 40-56. doi: 10.1002/cite.201200125.
- [41] Werner S, Eibl R, Lettenbauer C et al. (2010) Innovative, non-stirred bioreactors in scales from milliliters up to 1000 liters for suspension cultures of cells using disposable bags and containers a swiss contribution. *Chimia (Aarau)* 64 (11), 819-823. doi: 10.2533/chimia.2010.819.
- [42] Kauling J, Brod H, Jenne M et al. (2012) Entwicklung der Single-use BaySHAKE-Bioreaktortechnologie für die Kultivierung tierischer Zellen in *Proceedings of the 14. Köthener Rührer-Kolloquium 2011*. (Eds: Sperling R, Heiser M), Hochschule Anhalt. Köthen/Anhalt.
- [43] Kauling J, Brod H, Jenne M et al. (2013) Novel, rotary oscillated, scalable single-use bioreactor technology for the cultivation of animal cells. *Chem Ing Tech* 85 (1-2), 127-135. doi: 10.1002/cite.201200155.
- [44] Kehoe D, Schnitzler A, Simler J et al. (2012) Scale-up of human mesenchymal stem cells on microcarriers in suspension in a single-use bioreactor. *BioPharm Int* 25 (3), 28-38.
- [45] Klöckner W, Tissot S, Wurm F et al. (2012) Power input correlation to characterize the hydrodynamics of cylindrical orbitally shaken bioreactors. *Biochem Eng J* 65, 63-69. doi: 10.1016/j.bej.2012.04.007.
- [46] Palomares L A, Rammrez O T (2010) Encyclopedia of Industrial Biotechnology. (Ed: Flickinger M C). John Wiley and Sons
- [47] Xing Z, Kenty B M, Li Z J et al. (2009) Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 103 (4), 733-746. doi: 10.1002/bit.22287.
- [48] Löffelholz C (2009) Strömungscharakterisierung am Vibromix-Bioreaktor mittels Particle Image Velocimetry (PIV). *Masterarbeit*. Züricher Hochschule für Angewandte Wissenschaften. Wädenswil, Schweiz.
- [49] Schultz J B, Giroux D (2011) 3-L to 2,500-L single-use bioreactors. *BioProcess Int* 9 (7), 120.
- [50] Auton K, Bick J, Taylor I (2007) Application note: strategies for the culture of CHO-S cells. *Genet Eng News* 27 (16).
- [51] Auton K A (2006) Single use bioreactors: making the transition. *Innovations in Pharmaceutical Technology* 20, 54-59.
- [52] Auton K A (2010) Single use bioreactors: expressing protein in mammalian cell suspension cells and culture. in *Proceedings of the ESACT Dresden*
- [53] Löffelholz C, Kaiser S C, Werner S et al. (2011) CFD as a tool to characterize single-use bioreactors. in *Single-use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [54] Agrawal V, Bal M (2012) Strategies for rapid production of therapeutic proteins in mammalian cells. *BioPharm Int* 10 (4), 32-48.
- [55] Zijlstra G, Noack U, Weisshaar S et al. (2011) High cell density XD cultivation of cho cells in BIOSTAT CultuBag STR 50 L single-use bioreactor with novel microsparger and single-use exhaust cooler. http://microsite.sartorius.com/fileadmin/Image_Archive/microsite/biostat_cultibag_str/pdf/11-06-21/DSM_ESCAT_Sartorius.pdf (15.03.2013).
- [56] Schirmer E B, Kuczewski M, Golden K et al. (2010) Primary clarification of very high-density cell culture harvests by enhanced cell settling. *BioProcess Int* 8 (1), 32-39.
- [57] Hummel A (2012) Verfahrenstechnische Charakterisierung eines neuartigen single-use Bioreaktors. *Semesterarbeit*. Hochschule Anhalt. Köthen, Germany.
- [58] Eibl R, Kaiser S C, Lombriser R et al. (2010) Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 86 (1), 41-49. doi: 10.1007/s00253-009-2422-9.
- [59] DeKarski J (2010) Mobius® CellReady Single-Use 3-L Bioreactor. *BioProcess Int* 8 (7), 124-126

- [60] Gossain V, Mirro R (2012) Linear scale-up of cell cultures. *BioProcess Int* 8 (11), 56-62.
- [61] DASbox single-use bioreactor, DASGIP, Jülich, http://www.dasgip.com/media/content/pages/downloads/DASGIP_E-Flyer_Products_DASbox_SU_en.pdf (15.06.2013).
- [62] Mobius CellReady 50L und 200L Bioreactor Systems, Merck Millipore, Darmstadt, [http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/d0900236c9256f7d85257949007050fc/\\$FILE/DS3377EN00_MM.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/d0900236c9256f7d85257949007050fc/$FILE/DS3377EN00_MM.pdf) (11.06.2013).
- [63] Kittredge A, Gowda S, Ring J et al. (2011) Characterization and performance of the Mobius® CellReady 200 L Bioreactor system: the next generation of single-use bioreactors. *BioProcess Int* [http://www.bioprocessintl.com/posters/Engineering and Facility Design/Characterization-and-Performance-of-the-Mobius-CellReady-200-L-Bioreactor-System-The-next-Generation-of-Single-Use-Bioreactors-abstract-323670](http://www.bioprocessintl.com/posters/Engineering_and_Facility_Design/Characterization-and-Performance-of-the-Mobius-CellReady-200-L-Bioreactor-System-The-next-Generation-of-Single-Use-Bioreactors-abstract-323670) (11.06.2013).
- [64] XDR Single-Use Bioreactors, Xcellerex Inc., Marlborough, MA. <http://www.xcellerex.com/platform-xdr-single-use-bioreactors.htm> (15.06.2013).
- [65] Ullah M, Burns T, Bhalla A et al. (2008) Disposable bioreactors for cells and microbes. *BioPharm Int* 11 (Suppl. 1), <http://www.biopharminternational.com/biopharm/Disposables+Articles/Disposable-Bioreactors-for-Cells-and-Microbes/ArticleStandard/Article/detail/566012> (15.03.2013).
- [66] Dreher T, Husemann U, Zahnow C et al. (2013) High cell density *Escherichia coli* cultivation in different single-use bioreactor systems. *Chem Ing Tech* 85 (1-2), 162-171. doi: 10.1002/cite.201200122.
- [67] Hähnel A, Pütz B, Iding K et al. (2011) Evaluation of a disposable stirred tank bioreactor for cultivation of mammalian cells. *BMC Proc* 5 (8), 54.
- [68] Hundt B, Mölle N, Stefaniak S et al. (2011) Large pilot scale cultivation process study of adherent MDBK cells for porcine Influenza A virus propagation using a novel disposable stirred-tank bioreactor. *BMC Proc* 5 (8), 128.
- [69] Noack U (2010) *Scale-up*. in *Proceedings of the Sartorius Stedim Biotech (vertraulich)*. Göttingen, Deutschland.
- [70] Noack U, Wilde D D, Verhoeve F et al. (2011) Single-use stirred tank reactor BIOSAT CultiBag STR: characterisation and applications. in *Single-use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [71] Galliher P (2008) Achieving high-efficiency production with microbial technology in a single-use bioreactor platform. *BioPharm Int* 6 (11), 60-65.
- [72] Mardirosian D, Guertin P, Corwell J et al. (2009) Scaling up a CHO-produced hormone-protein fusion product. *BioPharm Int* 7 (Suppl. 4), 30-35.
- [73] Luitjens A, Pralong A (2010) Going fully disposable-current possibilities: a case study from Crucell. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [74] Minow B, Rogge P, Thompson K (2012) Implementing a fully disposable MAb manufacturing facility. *BioProcess Int* 10 (6), 48-57.
- [75] Drugmand J-C, Dubois S, Dohogne Y et al. (2010) Viral entities production at manufacturing scale using the integrity™ iCELLis™ disposable fixed-bed reactor. in *Proceedings of the* [http://www.atmi.com/assets/pdfs/bioreactors/icellis/Integrity iCELLis Poster ESACT Digital A4.pdf](http://www.atmi.com/assets/pdfs/bioreactors/icellis/Integrity_iCELLis_Poster_ESACT_Digital_A4.pdf) (11.06.2013).
- [76] Drugmand J-C, Havelange N, Collignon F et al. (2012) 4 g/L.day: monoclonal antibody volumetric productivity in the iCELLis™ disposable fixed-bed bioreactor. (Eds: Jenkins N, Barron N, Alves P). Springer Netherlands
- [77] Löffelholz C, Eibl D (2011) Characterization and scalability of the S.U.B. systems. in *Proceedings of the Practical and Theoretical Implementation of Single-Use Bioreactor Technology*. Thermo Fisher Scientific. Webinar.
- [78] Löffelholz C, Kaiser S C, Werner S et al. (2012) Beitrag zur Charakterisierung und zum Einsatz des 50 L Single-Use Bioreactor (S.U.B.) in der biopharmazeutischen Industrie. in

- Proceedings of the 14. Köthener Rührer-Kolloquium 2011.* (Eds: Sperling R, Heiser M), Hochschule Anhalt. Köthen/Anhalt.
- [79] George M, Farooq M, Dang T et al. (2010) Production of cell culture (MDCK) derived live attenuated influenza vaccine (LAIV) in a fully disposable platform process. *Biotechnol Bioeng* 106 (6), 906-917. doi: 10.1002/bit.22753.
- [80] Valasek C, Coke J, Hensel F et al. (2011) Production and purification of a PER.C6-expressed IgM antibody therapeutic. *BioPharm Int* 9 (11), 28-37.
- [81] Nucleo Bioreactor, ATMI Life Sciences, Danbury, CT, <http://www.atmi.com/lifesciences/products/bioreactors/nucleo.html> (15.06.2013).
- [82] Goedde A, Reiser S, Russ K et al. (2009) Characterisation of two single-use bioreactors for mammalian cell culture processes. http://rentschler.de/fileadmin/Downloads/Poster/Rentschler-Poster-ESACT-2009_8.pdf (15.03.2013).
- [83] Calvosa E (2009) Large scale disposable bioreactor for vaccines manufacturing - applications to anchorage dependent cell line. IBC's 6th International Single use Applications for Biopharmaceutical Manufacturing. http://www.refinetech.com/media/downloads/Largescale-disposable-bioreactor-for-vaccines-manufacturing-with-ATFSystem%20V2_3.pdf (15.03.2013).
- [84] Rodriguez R, Castillo J, Giraud S (2010) Demonstrated performance of a disposable bioreactor with an anchorage-dependent cell line. *BioProcess Int* 8 (8), 74-78.
- [85] SmartBag, Finesse Solution, Inc., San Jose, CA, <http://www.finesse.com/pr-3-15-11> (11.06.2013).
- [86] Adams T, Noack U, Frick T et al. (2011) Increasing efficiency in protein and cell production by combining single-use bioreactor technology and perfusion. *BioPharm Int* 24 (5), 4-11.
- [87] Bentebibel S, Moyano E, Palazón J et al. (2005) Effects of immobilization by entrapment in alginate and scale-up on paclitaxel and baccatin III production in cell suspension cultures of *Taxus baccata*. *Biotechnol Bioeng* 89 (6), 647-655. doi: 10.1002/bit.20321.
- [88] Eibl R, Eibl D (2006) Design and use of the Wave bioreactor for plant cell culture. in *Plant Tissue Culture Engineering*. (Eds: Dutta Gupta S, Ibaraki Y). Springer Netherlands
- [89] Hundt B, Best C, Schlawin N et al. (2007) Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and Wave bioreactor microcarrier culture in 1-10L scale. *Vaccine*. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.061.
- [90] Ries C, Wasem V, Karrer D et al. (2012) A new approach for rapid development of Spodoptera frugiperda/BEVS-based processes. in *Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009*. (Eds: Jenkins N, Barron N, Alves P). Springer Netherlands
- [91] Weber W, Weber E, Geisse S et al. (2002) Optimisation of protein expression and establishment of the Wave Bioreactor for Baculovirus/insect cell culture. *Cytotechnology* 38 (1-3), 77-85. doi: 10.1023/a:1021102015070.
- [92] Lehmann N, Rischer H, Eibl D et al. (2013) Wave-mixed and orbitally shaken single-use photobioreactors for diatom algae propagation. *Chem Ing Tech* 85 (1-2), 197-201. doi: 10.1002/cite.201200137.
- [93] Bögli N C, Ries C, Bauer I et al. (2011) Bag-based rapid and safe seed-train expansion method for *Trichoplusia ni* suspension cells. *BMC Proc* 5 (S8), 124. doi: 10.1186/1753-6561-5-S8-P124.
- [94] Glazyrina J, Materne E M, Dreher T et al. (2010) High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor. *Microb Cell Fact* 9, 42. doi: 10.1186/1475-2859-9-42.
- [95] Singh V (1999) Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology* 30 (1), 149-158. doi: 10.1023/a:1008025016272.
- [96] Clincke M F, Molleryd C, Zhang Y et al. (2011) Study of a recombinant CHO cell line producing a monoclonal antibody by ATF or TFF external filter perfusion in a WAVE Bioreactor. *BMC Proc* 5 (Suppl. 8), 105. doi: 10.1186/1753-6561-5-s8-p105.

- [97] Haldankar R, Li D, Saremi Z et al. (2006) Serum-free suspensin large-scale transient transfection of CHO cells in Wave bioreactors. *Mol Biotechnol* 34 (2), 191-199. doi: 10.1385/mb:34:2:191.
- [98] Sadeghi A, Pauler L, Annerén C et al. (2011) Large-scale bioreactor expansion of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunoll Methods* 364 (1-2), 94-100. doi: 10.1016/j.jim.2010.11.007.
- [99] Sellhorn G, Caldwell Z, Mineart C et al. (2009) Improving the expression of recombinant soluble HIV envelope glycoproteins using pseudo-stable transient transfection. *Vaccine* 28 (2), 430-436. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.028.
- [100] Tao Y, Yusuf-Makagiansar H, Shih J et al. (2012) Novel cholesterol feeding strategy enables a high-density cultivation of cholesterol-dependent NS0 cells in linear low-density polyethylene-based disposable bioreactors. *Biotechnol Lett* 34 (8), 1453-8. doi: 10.1007/s10529-012-0915-6.
- [101] Wang L, Hu H, Yang J et al. (2012) High yield of human monoclonal antibody produced by stably transfected drosophila schneider 2 cells in perfusion culture using Wave bioreactor. *Mol Biotechnol* 52 (2), 170-179. doi: 10.1007/s12033-011-9484-5.
- [102] Brändli J, Müller M, Imseng N et al. (2012) Antikörperproduktion in Pflanzenzellen: Prozessentwicklung und -übertragung vom 50 mL auf den 10L Massstab. *Biospektrum* 2, 2-3.
- [103] Müller M (2010) Realisierung eines zweistufigen Prozesses zur Plantibody-Produktion mit BY-2-Suspensionszellen im AppliFlex®-Bioreaktor. *Bachelorarbeit*. Hochschule Anhalt, Köthen, Germany.
- [104] Thomassen Y E, van der Welle J E, van Eikenhorst G et al. (2012) Transfer of an adherent Vero cell culture method between two different rocking motion type bioreactors with respect to cell growth and metabolic rates. *Process Biochem* 47 (2), 288-296. doi: 10.1016/j.procbio.2011.11.006.
- [105] Bout B (2012) High level protein production by CHOBC cells in CELL-tainer single-use bioreactors in *Proceedings of the Single Use Technologies: Part of the Stem Cells & Bioprocessing Europe*. London, England.
- [106] Junne S, Solymosi T, Oosterhuis N et al. (2013) Cultivation of cells and microorganisms in wave-mixed disposable bag bioreactors at different scales. *Chem Ing Tech* 85 (1-2), 57-66. doi: 10.1002/cite.201200149.
- [107] Oosterhuis N M G, Tromper A, van Biezen N A (2010) The new age in bioprocessing: single-use bioreactors for microbial applications. <http://www.celltainer.com/pdf/Literature/The-new-age-in-bioprocessing.pdf> (15.03.2013).
- [108] Oosterhuis N M G, van den Berg H J (2011) How multipurpose is a disposable bioreactor? *BioPharm Int* 24 (3), 51-56.
- [109] Oosterhuis N M G, van der Heiden P (2010) Mass transfer in the CELL-tainer® disposable bioreactor. in *Cells and Culture*. (Ed: Noll T). Springer Netherlands
- [110] Zijlstra G M, Oosterhuis N (2010) Cultivation of PER.C6® cells in the novel CELL-Tainer™ high-performance disposable bioreactor. in *Cells and Culture*. (Ed: Noll T). Springer Netherlands
- [111] XRS Bioreactor System, PALL Life Sciences, Port Washington, NY, <http://www.pall.com/main/biopharmaceuticals/product.page?lid=hdf24174> (15.06.2013).
- [112] Löffelholz C, Werner S, Ay P et al. (2010) Untersuchungen zum Strömungsverhalten des Einweg-Vibromix-Bioreaktors. in *Proceedings of the 18. GALA-Fachtagung "Lasermethoden in der Strömungsmesstechnik"*. (Eds: Egbers C, Ruck B, Leder A, et al.), Cottbus, Germany.
- [113] Werner S, Nägeli M (2007) Good Vibrations: Charakterisierung eines neuen Einwegbioreaktorsystems (bio-t® bag). <http://www.analytica-world.com/de/whitepaper/65305/good-vibrations.html> (15.03.2013).
- [114] Eibl R, Löffelholz C, Eibl D (2010) Single-use bioreactors: an overview. in *Single-Use-Technologie in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.

- [115] Eibl R, Brandli J, Eibl D (2012) Plant cell bioreactors. in *Biotechnology*. (Eds: Doelle H W, Rokem S, Berovic M). UNESCO Publishing-Eolss Publishers Oxford, UK.
- [116] Meyer J (2011) Untersuchungen zum Einfluss von Blasenbegasung auf Stofftransport, Partikelbeanspruchung und Mischverhalten im oszillierenden BaySHAKE Einwegbioreaktorsystem. *Diplomarbeit*. Hochschule für Technik und Wirtschaft Berlin, Germany.
- [117] SENSOLUX Erlenmeyer-Flask, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, http://www.sartorius.com/fileadmin/fm-dam/sartorius_media/Biotechnology/Lab_Technologies/Lab_Cell_Culture/Instruments/Data_Sheets/Data_Sensolux_SL-2058-e.pdf (11.06.2013).
- [118] TubeSpin Bioreactor, TPP, Trasadingen, http://www.tpp.ch/page/produkte/05_tubespin.php?lang=EN (15.06.2013).
- [119] Werner S, Olowia J, Egger D et al. (2013) An approach for scale-up of geometrically dissimilar orbitally shaken single-use bioreactors. *Chem Ing Tech* 85, 118-126. doi: 10.1002/cite.201200153.
- [120] Biolector, m2p-labs GmbH, Baesweiler, <http://www.m2p-labs.com/products/instruments> (11.06.2013).
- [121] Jia Q, Li H, Hui M et al. (2008) A bioreactor system based on a novel oxygen transfer method. *BioProcess Int* 6 (6), 2-5.
- [122] Li L, Shi M, Song Y et al. (2009) A single-use, scalable perfusion bioreactor system. *BioProcess Int* 7 (6), 46-54.
- [123] Sun B, Yu X, Kong W et al. (2012) Production of influenza H1N1 vaccine from MDCK cells using a novel disposable packed-bed bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1-8. doi: 10.1007/s00253-012-4375-7.
- [124] Klöckner W, Büchs J (2012) Advances in shaking technologies. *Trends Biotechnol* 30 (6), 307-314. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.03.001.
- [125] Anderlei T, Cesana C, De Jesus M et al. (2009) Shaken bioreactors provide culture alternative. *Genet Eng News* 29 (19).
- [126] Potera C (2011) Orbital shake bioreactors take on scale-up - ExcellGene's platform includes no moving parts, low shear force, and high gas transfer. *Genet Eng News* 31 (9).
- [127] Tissot S, Farhat M, Hacker D L et al. (2010) Determination of a scale-up factor from mixing time studies in orbitally shaken bioreactors. *Biochem Eng J* 52 (2-3), 181-186. doi: 10.1016/j.bej.2010.08.005.
- [128] Tissot S (2011) OrbShake Bioreactors for mammalian cell cultures: engineering and scale-up. *PhD thesis*. Eidgenössische Technische Hochschule Lausanne. Switzerland.
- [129] Lee B, Fang D, Croughan M et al. (2011) Characterization of novel pneumatic mixing for single-use bioreactor application. *BMC Proc* 5 (8), 1-2. doi: 10.1186/1753-6561-5-s8-o12.
- [130] Hami L, Chana H, Yuan V et al. (2003) Comparison of a static process and a bioreactor-based process for the GMP manufacture of autologous Xcellerated T cells for clinical trials. *Bioproc J* 2 (3), 1-10.
- [131] Hami L S, Green C, Leshinsky N et al. (2004) GMP production and testing of Xcellerated T cells for the treatment of patients with CLL. *Cytotherapy* 6 (6), 554-62. doi: 10.1080/14653240410005348.
- [132] Timmins N E, Kiel M, Günther M et al. (2012) Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng* 109 (7), 1817-1826. doi: 10.1002/bit.24425.
- [133] Schmid D, Schürch C, Blum P et al. (2008) Plant stem cell extract for longevity of skin and hair. *SöFW* 5, 29-35.
- [134] Sederma (2012) <http://www.sederma.fr/home.aspx?s=111&r=127&p=3346> (15.03.2013).
- [135] Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S et al. (2007) Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J* 5 (5), 579-590. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00263.x.

- [136] Imseng N (2012) Biomass and terpenoid production of *Nicotiana tabacum* hairy roots in single-use bioreactors. *Masterarbeit*. Züricher Hochschule für Angewandte Wissenschaften. Wädenswil, Schweiz.
- [137] Dreher T, Walcarius B, Husemann U et al. (2013) Microbial High Cell Density Fermentations in a Stirred Single-Use Bioreactor. in *Disposable Bioreactors II*. (Eds: Eibl R, Eibl D). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [138] Hitchcock T (2009) Production of recombinant protein whole-cell vaccines with disposable manufacturing systems. *BioProcess Int* 5, 36-46.
- [139] Hambor J E (2012) Bioreactor design and bioprocess controls for industrialized cell processing. *BioProcess Int* 10 (6), 22-33
- [140] Prieels J-P, Stragier P, Lesage F et al. (2012) Mastering industrialization of cell therapy products. *BioProcess Int* 10 (Suppl. 3), 12-15.
- [141] Schirmaier C, Jossen V, Kaiser S C et al. (2013) Scale-up of human mesenchymal stem cells in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. in *Proceedings of the BioTech 2013*. (Eds: Eibl D, Eibl R), Wädenswil, Switzerland.
- [142] Nienow A W (2006) Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology* 50, 9-33. doi: 10.1023/A:1008008021481.
- [143] Eibl D, Eibl R (2009) Bioreactors for mammalian cells: general overview. in *Cell and Tissue Reaktion Engineering*. (Eds: Eibl R, Eibl D, Pörtner R, et al.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [144] Chmiel H (2011) *Bioprozesstechnik*. 3 ed. Spektrum Akademischer Verlag
- [145] Liepe F, Sperling R, Jembere S (1998) *Rührwerke - Theoretische Grundlagen, Auslegung und Bewertung*. Eigenverlag Fachhochschule Anhalt/Köthen
- [146] Zlokarnik M (1999) *Rührtechnik - Theorie und Praxis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [147] Wollny S, Sperling R (2007) Partikelbeanspruchung in gerührten Behältern. *Chem Ing Tech* 79 (3), 199-208. doi: 10.1002/cite.200600129.
- [148] Büchs J (2001) Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochem Eng J* 7 (2), 91-98. doi: 10.1016/s1369-703x(00)00106-6.
- [149] Büchs J, Maier U, Milbradt C et al. (2000) Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng* 68 (6), 594-601. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000620)68:6<594::AID-BIT2>3.0.CO;2-U.
- [150] Büchs J, Maier U, Milbradt C et al. (2000) Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng* 68 (6), 589-593. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(20000620)68:6<589::aid-bit1>3.0.co;2-j.
- [151] Raval K (2008) Characterization and application of large disposable shaking bioreactors. *Dissertation*. Rheinisch-Westfaelische Technische Hochschule Aachen. Germany.
- [152] Raval K, Liu C-M, Büchs J (2006) Large-scale disposable shaking bioreactors. *BioProcess Int* 4 (1), 46-49.
- [153] Werner S (2012) An approach for characterisation and optimisation single-use bioreactors for cell cultures by using Computational Fluid Dynamics (CFD). in *Proceedings of the Protein and Peptid Conference*. Beijing, China.
- [154] Tan R-K, Eberhard W, Büchs J (2011) Measurement and characterization of mixing time in shake flasks *Chem Eng Sci* 66 440-447. doi: 10.1016/j.ces.2010.11.001.
- [155] Chisti Y (2001) Hydrodynamic damage to animal cells. *Crit Rev Biotechnol* 21 (2), 67-110. doi: 10.1080/20013891081692.
- [156] Eibl R, Eibl D (2009) Application of disposable bag bioreactors in tissue engineering and for the production of therapeutic agents. in *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. (Eds: Kasper C, Griensven M, Pörtner R). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [157] Perez J A S, Porcel E M R, Lopez J L C et al. (2006) Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chem Eng J* 124 (1-3), 1-5. doi: 10.1016/j.cej.2006.07.002.
- [158] Stoots C M, Calabrese R V (1995) Mean velocity field relative to a Rushton turbine blade. *AIChE Journal* 41 (1), 1-11. doi: 10.1002/aic.690410102.

- [159] Wollny S (2010) Experimentelle und numerische Untersuchungen zur Partikelbeanspruchung in gerührten (Bio-)Reaktoren. *Dissertation*. Technische Universität. Berlin, Germany.
- [160] Liepe F (1988) *Verfahrenstechnische Berechnungsmethoden Teil 4: Stoffvereinigen in fluiden Phasen — Ausrüstungen und ihre Berechnung von einem Autorenkollektiv unter Federführung von F. Liepe* VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie
- [161] van't Riet K (1979) Review of measuring methods and results in mass transfer in stirred vessels. *Ind Eng Chem Process Des Dev* 18 (3), 357-364. doi: 10.1021/i260071a001.
- [162] Henzler H J, Kauling D J (1993) Oxygenation of cell cultures. *Bioprocess Biosyst Eng* 9, 61-75. doi: 10.1007/BF00369033.
- [163] Czermak P, Pörtner R, Brix A (2009) Special engineering aspects. in *Cell and Tissue Reaktion Engineering*. (Eds: Eibl R, Eibl D, Pörtner R, et al.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [164] Bliem R, Konopitzky K, Katinger H (1991) Industrial animal cell reactor systems: aspects of selection and evaluation. in *Bioreactor Systems and Effects*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [165] Henzler H J (2005) Rührprobleme in der Biotechnologie. in *Mischen und Rühren: Grundlagen und moderne Verfahren*. (Ed: Kraume M). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim, Deutschland.
- [166] Paglianti A, Takenaka K, Bujalski W (2001) Simple model for power consumption in aerated vessels stirred by Rushton disc turbines. *AIChE Journal* 47, 2673-2683. doi: 10.1002/aic.690471207.
- [167] Raval K, Kato Y, Buechs J (2007) Comparison of torque method and temperature method for determination of power consumption in disposable shaken bioreactors. *Biochem Eng J* 34 (3), 224-227. doi: 10.1016/j.bej.2006.12.017.
- [168] Varley J, Birch J (1999) Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnology* 29 (3), 177-205. doi: 10.1023/a:1008008021481.
- [169] Ascanio G, Castro B, Galindo E (2004) Measurement of power consumption in stirred vessels - a review. *Chem Eng Res Des* 82 (A9), 1282-1290. doi: 10.1205/cerd.82.9.1282.44164.
- [170] Cheng D, Cheng J, Li X et al. (2012) Experimental study on gas-liquid-liquid macro-mixing in a stirred tank. *Chem Eng Sci* 75, 256-266. doi: 10.1016/j.ces.2012.03.035.
- [171] Zhu H, Nienow A W, Bujalski W et al. (2009) Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping Elephant Ear agitator: power, hold-up and aerated flow field measurements. *Chem Eng Res Des* 87, 307-317. doi: 10.1016/j.cherd.2008.08.013.
- [172] Kato Y, Peter C P, Akgün A et al. (2004) Power consumption and heat transfer resistance in large rotary shaking vessels. *Biochem Eng J* 21 (1), 83-91. doi: 10.1016/j.bej.2004.04.011.
- [173] Sumino Y, Akiyama S I, Fukuda H (1972) Performance of the shaking flask. *J Ferment Technol* 50 (3), 203-208.
- [174] Müller W (2008) *Mechanische Grundoperationen und ihre Gesetzmäßigkeiten*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH
- [175] Werner F C (1997) *Über die Turbulenz in gerührten newtonschen und nicht-newtonschen Fluiden*. Herbert Utz Verlag München, Germany.
- [176] Oniscu C, Galaction A I, Cascaval D et al. (2002) Modeling of mixing in stirred bioreactors: 2. mixing time for non-aerated broths. *Biochem Eng J* 12 (1), 61-69. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00042-6.
- [177] Werner S, Kraume M, Eibl D (2010) Bag mixing systems for single-use. in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (Eds: Eibl R, Eibl D). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- [178] Pneumatic Bioreactor System, PBSBiotech, Inc., Camarillo, CA, <http://pbsbiotech.com/products-technology/> (15.06.2013).
- [179] Löffelholz C, Werner S, Kaiser S C et al. (2012) *Comparative studies of single-use stirred bioreactors by means of traditional methods, CFD and cultivation experiments*. in *Proceedings of the ACHEMA*. Frankfurt, Germany.

- [180] Godoy-Silva R, Berdugo C, Chalmers J J (2010) Aeration, mixing, and hydrodynamics, animal cell bioreactors. in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. (Ed: Flickinger M C). John Wiley and Sons
- [181] Hiraoka S, Kato Y, Tada Y et al. (2001) Power consumption and mixing time in an agitated vessel with double impeller. *Chem Eng Res Des* 79 (8), 805-810. doi: 10.1205/02638760152721613.
- [182] Werner S (2010) *Single-use bioreactors for cell cultures: An approach for characterization and optimization by using Computational Fluid Dynamics (CFD)*. in *Proceedings of the BioProcess Asia Pacific* Singapur.
- [183] Ries C (2008) Untersuchungen zum Einsatz von Einwegbioreaktoren für die auf Insektenzellen basierte Produktion von internen und externen Proteinen. *Diplomarbeit*. Züricher Hochschule für Angewandte Wissenschaften. Wädenswil, Schweiz.
- [184] Guillard F, C. T, Fuchs L (2000) A study of turbulent mixing in a turbine-agitated tank using a fluorescence technique. *Exp Fl* 28 (3), 225-235. doi: 10.1007/s003480050382.
- [185] Kling K, Mewes D (2003) Quantitative measurements of micro- and macromixing in a stirred vessel using planar laser-induced fluorescence. *J Visualization* 6 (2), 165-173. doi: 10.1007/BF03181621.
- [186] Reungoat D, Rivihre N, Fauri J P (2007) PIV and PLIF measurement in turbulent mixing round jet impingement. *J Visualization* 10 (1), 99-110. doi: 10.1007/BF03181809.
- [187] Zadghaffari R, Moghaddas J S, Revstedt J (2009) A mixing study in a double-Rushton stirred tank. *Comput Chem Eng* 33, 1240-1246. doi: 10.1016/j.compchemeng.2009.01.017.
- [188] Nienow A W (1997) On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime. *Chem Eng Sci* 52 (15), 2557-2565. doi: 10.1016/s0009-2509(97)00072-9.
- [189] Nienow A W (2010) Impeller selection for animal cell culture. in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. (Ed: Flickinger M C). John Wiley and Sons, Inc.
- [190] Langheinrich C, Nienow A W (1999) Control of pH in large-scale, free suspension animal cell bioreactors: alkali addition and pH excursions. *Biotechnol Bioeng* 66 (3), 171-179. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(1999)66:3<171::aid-bit5>3.0.co;2-t.
- [191] Garcia-Ochoa F, Gomez E (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv* 27 (2), 153-176. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006|10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.
- [192] Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos V E et al. (2010) Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. *Biochem Eng J* 49 (3), 289-307. doi: 10.1016/j.bej.2010.01.011.
- [193] Ruffieux P-A, von Stockar U, Marison I W (1998) Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO₂) oxygen uptake rates in animal cell cultures. *J Biotechnol* 63 (2), 85-95. doi: 10.1016/s0168-1656(98)00046-7.
- [194] Xiu Z-L, Deckwer W-D, Zeng A-P (1999) Estimation of rates of oxygen uptake and carbon dioxide evolution of animal cell culture using material and energy balances. *Cytotechnology* 29 (3), 159-166. doi: 10.1023/a:1008004618163.
- [195] Linek V, Sinkule J, Bener P (1991) Critical assessment of gassing-in methods for measuring kLa in fermentors. *Biotechnol Bioeng* 38 323-330 doi: 10.1002/bit.260380402.
- [196] Mobius CellReady 3L Bioreactor Systems, Merck Millipore, [http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/228eeedd2285ebe1852575de00570375/\\$FILE/DS26770000.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/228eeedd2285ebe1852575de00570375/$FILE/DS26770000.pdf) (15.06.2013).
- [197] Garcia-Ochoa F, Gomez E (2004) Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chem Eng Sci* 59 (12), 2489-2501. doi: 10.1016/j.ces.2004.02.009|10.1016/j.ces.2004.02.009.
- [198] Kawase Y, Harald B, Mooyoung M (1992) Liquid-phase mass transfer coefficients in bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 39 (11), 1133-1140. doi: 10.1002/bit.260391109.
- [199] Kawase Y, Moo-Young M (1987) Influence of very small bubbles on kLa measurement in viscous microbiological cultures. *Biotechnol Bioeng* 30 (3), 345-347. doi: 10.1002/bit.260300303.
- [200] Kawase Y, Moo-Young M (1988) Volumetric mass transfer coefficients in aerated stirred tank reactors with Newton and non-Newtonian media. *Chem Eng Res Des* 66, 284-288.

- [201] Mahlig J, Backoff T (2011) Untersuchungen zum Mischverhalten, Sauerstofftransfer und zur Sauerstoffaufnahme von tierischen Zellen, pflanzlichen Zellen und Insektenzellen in orbitalgeschüttelten Einwegbioreaktoren. *Masterarbeit*. Hochschule Anhalt. Köthen, Germany.
- [202] Dreher T (2011) *Characterisation of a rocking motion type bioreactor*. in *Proceedings of the Sartorius Stedim Biotech (vertraulich)*. Göttingen, Deutschland.
- [203] Hermann R, Walther N, Maier U et al. (2001) Optical method for the determination of the oxygen-transfer capacity of small bioreactors based on sulfite oxidation. *Biotechnol Bioeng* 74 (5), 355-363. doi: 10.1002/bit.1126.
- [204] Puskeiler R (2004) Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung. *Dissertation*. Technischen Universität München. Germany.
- [205] Hermann R, Lehmann M, Büchs J (2003) Characterization of gas-liquid mass transfer phenomena in microtiter plates. *Biotechnol Bioeng* 81 (2), 178-186. doi: 10.1002/bit.10456.
- [206] Backoff T, Malig J, Werner S et al. (2012) Where does the oxygen go? kLa measurement in bioreactors. *G.I.T. Laboratory Journal* 9 (10), 21-22.
- [207] Maier U, Büchs J (2001) Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem Eng J* 7 (2), 99-106. doi: 10.1016/s1369-703x(00)00107-8.
- [208] Funke M (2010) Microfluidic bioprocess control in baffled microtiter plates *Dissertation*. Rheinisch-Westfaelische Technische Hochschule Aachen. Germany.
- [209] Doig S D, Pickering S C R, Lye G J et al. (2005) Modelling surface aeration rates in shaken microtitre plates using dimensionless groups. *Chem Eng Sci* 60 (10), 2741-2750. doi: 10.1016/j.ces.2004.12.025.
- [210] Booger F C, Bos P, Kuenen J G et al. (1990) Oxygen and carbon dioxide mass transfer and the aerobic, autotrophic cultivation of moderate and extreme thermophiles: a case study related to the microbial desulfurization of coal. *Biotechnol Bioeng* 35 (11), 1111-1119. doi: 10.1002/bit.260351106.
- [211] Linek V, Moucha T, Sinkule J (1996) Gas-liquid mass transfer in vessels stirred with multiple impellers-I. gas-liquid mass transfer characteristics in individual stages. *Chem Eng Sci* 51 (12), 3203-3212. doi: 10.1016/0009-2509(95)00395-9.
- [212] Linek V, Vacek V, Benes P (1987) A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids. *Biochem Eng J* 34 (1), 11-34. doi: 10.1016/0300-9467(87)85003-7.
- [213] Millward H R, Bellhouse B J, Sobey I J (1996) The vortex wave membrane bioreactor: hydrodynamics and mass transfer. *Chem Eng J* 62 (3), 175-181. doi: 10.1016/0923-0467(96)03087-4.
- [214] Launder B E, Spalding D B (1974) The numerical computation of turbulent flows. *Comput Meth Appl Mech Eng* 3 (2), 269-289.
- [215] Menter F R (1994) Two-equation eddy-viscosity turbulence models for engineering applications. *AIAA Journal* 32, 1598-1605.
- [216] Schwarze R (2012) *CFD-Modellierung: Grundlagen und Anwendungen bei Strömungsprozessen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [217] Batchelor G K (2000) *An introduction to fluid dynamics*. Cambridge University Press Cambridge.
- [218] Blazek J (2001) *Computational fluid dynamics: principles and applications*. Elsevier Amsterdam.
- [219] Lomax H, Pulliam T, Zingg D (2001) *Fundamentals of computational fluid dynamics*. Springer-Verlag Berlin.
- [220] Paschedag A R (2004) *CFD in der Verfahrenstechnik - Allgemeine Grundlagen und mehrphasige Anwendungen*. Wiley-VCH Weinheim.
- [221] Wesseling P (2001) *Principles of computational fluid dynamics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- [222] Kaiser S C, Jossen V, Schirmaier C et al. (2013) Investigations of fluid flow and cell proliferation of mesenchymal adipose-derived stem cells in small-scale, stirred, single-use bioreactors. *Chem Ing Tech* 85, 95-102. doi: 10.1002/cite.201200180.
- [223] Öncül A A (2010) Simulation of interacting populations in inhomogeneous flows using reduced models. *Dissertation*. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Germany.
- [224] Zhang H, Williams-Dalson W, Keshavarz-Moore E et al. (2005) Computational fluid dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biotechnol Appl Biochem* 41 (1), 1-8. doi: 10.1042/ba20040082.
- [225] Zhang H, Lamping S R, Pickering S C R et al. (2008) Engineering characterisation of a single well from 24-well and 96-well microtitre plates. *Biochem Eng J* 40 (1), 138-149. doi: 10.1016/j.bej.2007.12.005.
- [226] Croughan M S, Sayre E S, Wang D I C (1989) Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture. *Biotechnol Bioeng* 33 (7), 862-872. doi: 10.1002/bit.260330710.
- [227] Jaworski Z, Nienow A W, Koutsakos E et al. (1991) An LDA study of turbulent flow in a baffled vessel agitated by a pitched blade turbine. *Chem Eng Res Des* 69 (A4), 313-320.
- [228] Kunas K T, Papoutsakis E T, Eleftherios Terry Papoutsakis I b (2009) Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. *Biotechnol Bioeng* 102 (4), 977-987. doi: 10.1002/bit.22263.
- [229] Ranade V V, Joshi J B (1989) Flow generated by pitched blade turbines I: measurements using laser Doppler anemometer. *Chem Eng Commun* 81 (1), 197-224. doi: 10.1080/00986448908940539.
- [230] O'Connor K C, Papoutsakis E T (1992) Agitation effects on microcarrier and suspension CHO cells. *Biotechnol Tech* 6 (4), 323-328. doi: 10.1007/bf02439320.
- [231] Barrett T A, Wu A, Zhang H et al. (2010) Microwell engineering characterization for mammalian cell culture process development. *Biotechnol Bioeng* 105 (2), 260-275. doi: 10.1002/bit.22531.
- [232] Langer G, Deppe A (2000) Zum Verständnis der hydrodynamischen Beanspruchung von Partikeln in turbulenten Rührerströmungen. *Chem Ing Tech* 72 (1-2), 31-41. doi: 10.1002/1522-2640(200001)72:1/2<31::AID-CITE31>3.0.CO;2-O.
- [233] Kaiser S C, Löffelholz C, Imseng N et al. (2012) Investigations on mechanical stress caused to CHO suspension cells by standard and single-use pumps. in *Proceedings of the ACHEMA*. Frankfurt, Germany.
- [234] Dittler I (2012) Evaluierung der mechanischen Beanspruchung von Pumpen auf tierische Zellkulturen mittels nicht-biologischer Modellsysteme. *Masterarbeit*. Hochschule Anhalt, Köthen, Germany.
- [235] Yim S, Shamlou P (2000) The engineering effects of fluids flow on freely suspended biological macro-materials and macromolecules. in *Influence of Stress on Cell Growth and Product Formation*. (Eds: Schügerl K, Kretzmer G, Henzler H, et al.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [236] Bujalski J M, Yang W, Nikolov J et al. (2006) Measurement and CFD simulation of single-phase flow in solvent extraction pulsed column. *Chem Eng Sci* 61 (9), 2930-2938. doi: 10.1016/j.ces.2005.10.057.
- [237] Jaworski Z, Bujalski W, Otomo N et al. (2000) CFD study of homogenization with dual Rushton turbines—comparison with experimental results: part I: initial studies. *Chem Eng Res Des* 78 (3), 327-333. doi: 10.1205/026387600527437.
- [238] Sieblist C, Kunz M, Jenzsch M et al. (2012) Fehler- und Risikominimierung bei der Massstabsübertragung industrieller Zellkulturprozesse. in *Proceedings of the 14. Köthener Rührer-Kolloquium 2011*. (Eds: Sperling R, Heiser M), Hochschule Anhalt, Köthen/Anhalt, Deutschland.
- [239] Stoker E B (2011) Comparative studies on scale-up methods of single-use bioreactors. *All Graduate Theses and Dissertations*. Utah State University Logan, Utah, USA.
- [240] Jahoda M, Moštěk M, Kukuková A et al. (2007) CFD modelling of liquid homogenization in stirred tanks with one and two impellers using large eddy simulation. *Chem Eng Res Des* 85 (5), 616-625. doi: 10.1205/cherd06183.

- [241] Min J, Gao Z (2006) Large eddy simulations of mixing time in a stirred tank. *Chin J Chem Eng* 14 (1), 1-7. doi: 10.1016/s1004-9541(06)60030-x.
- [242] Fletcher C A J (1988) *Computational techniques for fluid dynamics: specific techniques for different flow categories*. 2nd ed. Computational Physics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- [243] Versteeg H K, Malalasekera W (1995) *An introduction to computational fluid dynamics : the finite volume method*. Longman Scientific & Technical Harlow.
- [244] Dhanasekharan K M, Sanyal J, Jain A et al. (2005) A generalized approach to model oxygen transfer in bioreactors using population balances and computational fluid dynamics. *Chem Eng Sci* 60 (1), 213-218. doi: 10.1016/j.ces.2004.07.118.
- [245] Ekambara K, Nandakumar K, Joshi J B (2008) CFD simulation of bubble column reactor using population balance. *Ind Eng Chem Res* 47 (21), 8505-8516. doi: 10.1021/ie071393e.
- [246] Kerdouss F, Bannari A, Proulx P et al. (2008) Two-phase mass transfer coefficient prediction in stirred vessel with a CFD model. *Comput Chem Eng* 32 (8), 1943-1955. doi: 10.1016/j.compchemeng.2007.10.010.
- [247] Gimbun J, Nagy Z, Rielly C (2008) CFD and population balance modelling of gas-liquid flow via QMOM with moment correction function. in *Proceedings of the Sixth International Symposium on Mixing in Industrial Process Industries- ISMIP VI*. Niagara on the Lake, Niagara Falls, Ontario, Canada.
- [248] Venneker B C H, Derksen J J, Van den Akker H E A (2002) Population balance modeling of aerated stirred vessels based on CFD. *AIChE Journal* 48 (4), 673-685. doi: 10.1002/aic.690480404.
- [249] Kerdouss F, Bannari A, Proulx P (2006) CFD modeling of gas dispersion and bubble size in a double turbine stirred tank. *Chem Eng Sci* 61 (10), 3313-3322. doi: 10.1016/j.ces.2005.11.061.
- [250] Laakkonen M, Alopaeus V, Aittamaa J (2006) Validation of bubble breakage, coalescence and mass transfer models for gas-liquid dispersion in agitated vessel. *Chem Eng Sci* 61 (1), 218-228. doi: 10.1016/j.ces.2004.11.066.
- [251] Laakkonen M, Moilanen P, Alopaeus V et al. (2007) Modelling local bubble size distributions in agitated vessels. *Chem Eng Sci* 62 (3), 721-740. doi: 10.1016/j.ces.2006.10.006.
- [252] Mignard D, Amin L, Ni X-W (2003) Population balance modelling of droplets in an oscillatory baffled reactor—using direct measurements of breakage rate constants. *J Chem Tech Biotech* 78 (2-3), 364-369. doi: 10.1002/jctb.787.
- [253] Gimbun J, Rielly C D, Nagy Z K (2009) Modelling of mass transfer in gas-liquid stirred tanks agitated by Rushton turbine and CD-6 impeller: A scale-up study. *Chem Eng Res Des* 87 (4), 437-451. doi: 10.1016/j.cherd.2008.12.017.
- [254] Lane G L, Schwarz M P, Evans G M (2005) Numerical modelling of gas-liquid flow in stirred tanks. *Chem Eng Sci* 60 (8-9), 2203-2214. doi: 10.1016/j.ces.2004.11.046.
- [255] Alvarez M M, Guzmán A, Elías M (2005) Experimental visualization of mixing pathologies in laminar stirred tank bioreactors. *Chem Eng Sci* 60 (8-9), 2449-2457. doi: 10.1016/j.ces.2004.11.049.
- [256] Collignon M L, Droissart L, Delafosse A et al. (2010) Study of hydrodynamics inside a single use parallelepiped stirred bioreactor equipped with an elliptic motion paddle. in *Proceedings of the 19th Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA)* Prag, Tschechien.
- [257] Öncül A A, Lalmbach A, Genzel Y et al. (2010) Characterisation of flow conditions in 2 L and 20 L wave bioreactor using computational fluid dynamics. *Biotechnol Prog* 26, 101-110. doi: 10.1002/btpr.312.
- [258] Ben Amara S, Laguerre O, Charrier-Mojtabi M C et al. (2008) PIV measurement of the flow field in a domestic refrigerator model: comparison with 3D simulations. *Int J Refrig* 31 (8), 1328-1340. doi: 10.1016/j.ijrefrig.2008.04.005.
- [259] Dahikar S K, Sathe M J, Joshi J B (2010) Investigation of flow and temperature patterns in direct contact condensation using PIV, PLIF and CFD. *Chem Eng Sci* 65 (16), 4606-4620. doi: 10.1016/j.ces.2010.05.004.

- [260] Hernández-Jiménez F, Sánchez-Delgado S, Gómez-García A et al. (2011) Comparison between two-fluid model simulations and particle image analysis velocimetry (PIV) results for a two-dimensional gas–solid fluidized bed. *Chem Eng Sci* 66 (17), 3753-3772. doi: 10.1016/j.ces.2011.04.026.
- [261] Su B, Chua L P, Wang X (2012) Validation of an axial flow blood pump: computational fluid dynamics results using particle image velocimetry. *Artif Organs* 36 (4), 359-367. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01362.x.
- [262] Vorlop J, Lehmann J (1988) Scale-up of bioreactors for fermentation of mammalian cell cultures, with special reference to oxygen supply and microcarrier mixing. *Chem Eng Technol* 11 171-178.
- [263] Zlokarnik M (2006) *Scale-up in chemical engineering*. Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim.
- [264] Ju L K, Chase G G (1992) Improved scale-up strategies of bioreactors. *Bioprocess Eng* 8 (1-2), 49-53. doi: 10.1007/bf00369263.
- [265] Venkat R V, Chalmers J J (1996) Characterization of agitation environments in 250 ml spinner vessel, 3 L, and 20 L reactor vessels used for animal cell microcarrier culture. *Cytotechnology* 22 (1), 95-102. doi: 10.1007/bf00353928.
- [266] Euzen J-P, Wauquier J-P (1993) *Scale-up methodology for chemical processes*. Gulf Pub Co.
- [267] Osman J J, Birch J, Varley J (2001) The response of GS-NS0 myeloma cells to pH shifts and pH perturbations. *Biotechnol Bioeng* 75 (1), 63-73. doi: 10.1002/bit.1165.
- [268] Osman J J, Birch J, Varley J (2002) The response of GS-NS0 myeloma cells to single and multiple pH perturbations. *Biotechnol Bioeng* 79 (4), 398-407. doi: 10.1002/bit.10198.
- [269] Kwon J-Y, Yang Y-S, Cheon S-H et al. (2013) Bioreactor engineering using disposable technology for enhanced production of hCTLA4Ig in transgenic rice cell cultures. *Biotechnol Bioeng* eingereicht.
- [270] Junker B H (2004) Scale-up methodologies for Escherichia coli and yeast fermentation processes. *J Biosci Bioeng* 97 (6), 347-364. doi: 10.1016/s1389-1723(04)70218-2.
- [271] Ozturk S S (1996) Engineering challenges in high density cell culture systems. *Cytotechnology* 22 (1), 3-16. doi: 10.1007/bf00353919.
- [272] Handa A, Emery A N, Spier R E (1987) On the evaluation of gas-liquid interfacial effects on hybridoma viability in bubble column bioreactors. *Dev Biol Stand* 66, 241-253.
- [273] Oh S K W, Nienow A W, Al-Rubeai M et al. (1992) Further studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. *J Biotechnol* 22 (3), 245-270. doi: 10.1016/0168-1656(92)90144-x.
- [274] Jöbses I, Martens D, Tramper J (1991) Lethal events during gas sparging in animal cell culture. *Biotechnol Bioeng* 37 (5), 484-490. doi: 10.1002/bit.260370510.
- [275] Boulton-Stone J M, Blake J R (1993) Gas bubbles bursting at a free surface. *J Fluid Mech* 254, 437-466. doi: 10.1017/S0022112093002216.
- [276] Chisti Y (1993) Animal cell culture in stirred bioreactors: observations on scale-up. *Process Biochem* 28 (8), 511-517. doi: 10.1016/0032-9592(93)85012-5.
- [277] Chalmers J (1994) Cells and bubbles in sparged bioreactors. *Cytotechnology* 15 (1-3), 311-320. doi: 10.1007/bf00762406.
- [278] Ma N, Chalmers J J, Mollet M (2006) Aeration, mixing and hydrodynamics in bioreactors. in *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. (Eds: Ozturk S S, Hu W-S). CRC Press
- [279] Zhang Q, Yong Y, Mao Z-S et al. (2009) Experimental determination and numerical simulation of mixing time in a gas–liquid stirred tank. *Chem Eng Sci* 64 (12), 2926-2933. doi: 10.1016/j.ces.2009.03.030.
- [280] Zhang X, Stettler M, Sanctis D et al. (2010) Use of orbital shaken disposable bioreactors for mammalian cell cultures from the milliliter-scale to the 1,000-liter scale. in *Disposable Bioreactors*. (Eds: Eibl R, Eibl D). Springer Berlin Heidelberg
- [281] Letellier B, Xuereb C, Swaels P et al. (2002) Scale-up in laminar and transient regimes of a multi-stage stirrer, a CFD approach. *Chem Eng Sci* 57 (21), 4617-4632. doi: 10.1016/s0009-2509(02)00371-8.

- [282] Weyand B, Israelowitz M, Schroeder H P et al. (2009) Fluid dynamics in bioreactor design: considerations for the theoretical and practical approach. in *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. (Eds: Kasper C, Griensven M, Pörtner R). Springer Berlin Heidelberg
- [283] Meneses-Acosta A, Mendonça R Z, Merchant H et al. (2001) Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng* 72 (4), 441-457. doi: 10.1002/1097-0290(20000220)72:4<441::aid-bit1006>3.0.co;2-3.
- [284] Krampe B, Al-Rubeai M (2010) Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology* 62 (3), 175-188. doi: 10.1007/s10616-010-9274-0.
- [285] Gabriele A, Nienow A W, Simmons M J H (2009) Use of angle resolved PIV to estimate local specific energy dissipation rates for up- and down-pumping pitched blade agitators in a stirred tank. *Chem Eng Sci* 64 (1), 126-143. doi: 10.1016/j.ces.2008.09.018.
- [286] Menzel P, Jensch M, Kapulla R et al. (2010) Quantitative comparison of LDA- and PIV measurement. in *Proceedings of the 18. GALA-Fachtagung "Lasermethoden in der Strömungsmesstechnik"*. (Eds: Egbers C, Ruck B, Leder A, et al.), Cottbus, Germany.
- [287] Jossen V (2012) Bestimmung der Blasengrößenverteilung in einem modernen Zellkulturbioreaktor mittels PIV/ Shadowgraphy. *Semesterarbeit*. Züricher Hochschule für Angewandte Wissenschaften. Wädenswil, Schweiz.
- [288] Fussenegger M, Mazur X, Bailey J E (1997) A novel cytostatic process enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 55 (6), 927-939. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(19970920)55:6<927::aid-bit10>3.0.co;2-4.
- [289] Fussenegger M, Moser S, Mazur X et al. (1997) Autoregulated multicistronic expression vectors provide one-step cloning of regulated product gene expression in mammalian cells. *Biotechnology Progress* 13 (6), 733-740. doi: 10.1021/bp970108r.
- [290] Fussenegger M, Schlatter S, Datwyler D et al. (1998) Controlled proliferation by multigene metabolic engineering enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Nat Biotech* 16 (5), 468-472.
- [291] Mazur X, Fussenegger M, Renner W A et al. (1998) Higher productivity of growth-arrested Chinese hamster ovary cells expressing the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Biotechnol Progress* 14 (5), 705-713. doi: 10.1021/bp980062h.
- [292] Kaufmann H, Mazur X, Fussenegger M et al. (1999) Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 63 (5), 573-582. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(19990605)63:5<573::aid-bit7>3.0.co;2-y.
- [293] Kaufmann H, Mazur X, Marone R et al. (2001) Comparative analysis of two controlled proliferation strategies regarding product quality, influence on tetracycline-regulated gene expression, and productivity. *Biotechnol Bioeng* 72 (6), 592-602. doi: 10.1002/1097-0290(20010320)72:6<592::aid-bit1024>3.0.co;2-j.
- [294] Eibl R, Eibl D (2007) Disposable bioreactors for inoculum production and protein expression. in *Animal Cell Biotechnology - Methods in Biotechnology*. (Ed: Pörtner R). Humana Press
- [295] Eibl R, Löffelholz C, Eibl D (2013) Disposable bioreactors for inoculum production and protein expression. in *Animal Cell Biotechnology - Methods in Biotechnology*. 2nd ed. (Ed: Pörtner R). Humana Press (im Druck).
- [296] Henzler H J (2000) Particle stress in bioreactors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 67, 35-82. doi: 10.1007/3-540-47865-5_2.
- [297] Heer D (2013) Verfahrenstechnische Charakterisierung eines 2 Liter Laborbioreaktors unter Berücksichtigung diverser Einflussgrößen. *Semesterarbeit*. Züricher Hochschule für Angewandte Wissenschaften. Wädenswil, Schweiz.
- [298] Najafpour G D (2007) *Biochemical engineering and biotechnology*. Elsevier
- [299] Torrè J-P, Fletcher D F, Lasuye T et al. (2007) Single and multiphase CFD approaches for modelling partially baffled stirred vessels: comparison of experimental data with numerical predictions. *Chem Eng Sci* 62 (22), 6246-6262. doi: 10.1016/j.ces.2007.06.044.
- [300] Alcamo R, Micale G, Grisafi F et al. (2005) Large-eddy simulation of turbulent flow in an unbaffled stirred tank driven by a Rushton turbine. *Chem Eng Sci* 60 (8-9), 2303-2316. doi: 10.1016/j.ces.2004.11.017.

- [301] Montante G, Lee K C, Brucato A et al. (2001) Numerical simulations of the dependency of flow pattern on impeller clearance in stirred vessels. *Chem Eng Sci* 56 (12), 3751-3770. doi: 10.1016/S0009-2509(01)00089-6.
- [302] Yianneskis M, Popiolek Z, Whitelaw J H (1987) An experimental study of the steady and unsteady flow characteristics of stirred reactors. *J Fluid Mech* 175, 537-555. doi: 10.1017/S002211208700051X
- [303] Kaiser S C, Kraume M, Eibl D (2013) Development of the Travelling Wave Bioreactor – a concept study. *Chem Ing Tech* 85 (1-2), 136-143. doi: 10.1002/cite.201200127.
- [304] Bannari R, Kerdouss F, Selma B et al. (2008) Three-dimensional mathematical modeling of dispersed two-phase flow using class method of population balance in bubble columns. *Comput Chem Eng* 32 (12), 3224-3237. doi: 10.1016/j.compchemeng.2008.05.016.
- [305] Sanyal J, Marchisio D L, Fox R O et al. (2004) On the comparison between population balance models for CFD simulation of bubble columns. *Ind Eng Chem Res* 44 (14), 5063-5072. doi: 10.1021/ie049555j.
- [306] Bhole M R, Joshi J B, Ramkrishna D (2008) CFD simulation of bubble columns incorporating population balance modeling. *Chem Eng Sci* 63 (8), 2267-2282. doi: 10.1016/j.ces.2008.01.013.
- [307] Blaschczok K, Kaiser S C, Löffelholz C et al. (2013) Investigations on mechanical stress caused to cho suspension cells by standard and single-use pumps. *Chem Ing Tech* 85, 144-152. doi: 10.1002/cite.201200135.
- [308] Croughan M S, Hamel J-F, Wang D I C (1987) Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnol Bioeng* 29 (1), 130-141. doi: 10.1002/bit.260290117.
- [309] Lara A R, Galindo E, Rammrez O T et al. (2006) Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells. *Mol Biotechnol* 34 (3), 355-381.
- [310] Fussenegger M, Mazur X, Bailey J E (1998) pTRIDENT, a novel vector family for tricistronic gene expression in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 57 (1), 1-10. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(19980105)57:1<1::aid-bit1>3.0.co;2-m.
- [311] Mazur X, Eppenberger H M, Bailey J E et al. (1999) A novel autoregulated proliferation-controlled production process using recombinant CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 65 (2), 144-150. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(19991020)65:2<144::aid-bit3>3.0.co;2-q.
- [312] Rothe S, Ries C, Eibl D et al. (2012) Method for preserving cell density and viability in two-phase fed-batch CHO culture. *BioProcess Int* 10 (4), 50-59.
- [313] Fietz F (2012) Messungen des Sauerstofftransfers und -verbrauchs von Zellkulturen in Einwegbioreaktoren. *Masterarbeit*. Hochschule Anhalt. Köthen, Germany.
- [314] Bonvillani P, Ferrari M, Ducros E et al. (2006) Theoretical and experimental study of the effects of scale-up on mixing time for a stirred-tank bioreactor. *Braz J Chem Eng* 23 (1), 1-7. doi: 10.1590/S0104-66322006000100001

7 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Einteilung der kommerziell erhältlichen single-use Bioreaktoren nach der Art des Leistungseintrages [40].</i>	13
<i>Abbildung 2. Potentielle Anwendungsgebiete von single-use Bioreaktoren in Abhängigkeit ihres Maßstabes [11].</i>	15
<i>Abbildung 3: Verfahrenstechnische Kenngrößen von zellkulturbasierenden Bioreaktoren, die über die parametrischen, experimentellen und numerischen Ansätze bestimmt werden [40].</i>	20
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung zur Bestimmung des k_{La}-Wertes mittels gassing-out (A) und respiratory gassing-out Methode (B; modifiziert nach [191]).</i>	31
<i>Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Durchführung von CFD Untersuchungen (modifiziert nach [53]).</i>	33
<i>Abbildung 6: CFD-Darstellung des UniVessel[®] SU, des BIOSTAT[®] STR (RT x SBI) 50 L und des S.U.B. 50 L mit der jeweiligen Symbolik für die Bemaßung (Tabelle 2). Die Reaktorhöhen repräsentieren die Fluidhöhe bei maximalem Arbeitsvolumen.</i>	43
<i>Abbildung 7: Der UniVessel[®] SU ist ein rigider single-use Bioreaktor und ist mit diversen Schläuchen für zellkulturbasierte Prozesse ausgestattet (A und B). Der Leistungseintrag erfolgt über zwei mehrstufige Segmentblatt-Rührer (SBI; C).</i>	45
<i>Abbildung 8: Der Bioprozesseinheit des BIOSTAT[®] STR 50 L besteht aus einer Steuereinheit und einem Edelstahl-Container (A), der aus im zylindrischen Teil aus zwei halbkreisförmige Türen besteht (B). In den Edelstahl-Container wird der separat erhältliche und flexible Bag integriert.</i>	46
<i>Abbildung 9: In die Bioprozesseinheit des 50 L Single-Use Bioreactor (S.U.B.) (A) wird der separat erhältliche und flexible Bag (B) integriert. Der Bag ist mit diversen Anschlüssen, sterilen Filtern, einer Gleitringdichtung sowie dem Rührorgan versehen. Eine sterile Kopplung von herkömmlichen Sonden erfolgt über spezielle Kleenpak-Verbindungen am Bag (C).</i>	47
<i>Abbildung 10.: Schematischer Aufbau der experimentellen Untersuchungen im S.U.B. 50 L mittels Particle-Image-Velocimetry (PIV) als Frontansicht (A) und Draufsicht (B). Zusätzlich ist der schematische Aufbau für den BIOSTAT[®] STR (RT + SBI) 50 L als Iso-Ansicht (C) und als Draufsicht für die beiden Rührertypen dargestellt (D).</i>	51
<i>Abbildung 11: Vereinfachter schematischer Aufbau der Shadowgraphy-Messung (A). Zusätzlich ist das Messprinzip dargestellt (B). Die Blasen (b) werden mittels diffusem Lichts (a und c) angestrahlt, was an den Rändern der Blasen (e) zu einer Reflexion des Lichtstrahles (c) und im mittleren Bereich zur Durchleuchtung (d) führt. Der erhaltene schwarze Bereich mit hellem Mittelpunkt wird für die weitere Auswertung genutzt.</i>	53
<i>Abbildung 12: Übersicht zum Vorgehen der Kultivierungsversuche mit CHO XM 111-10 Zellen. Ausgehend von der Erhaltungskultur wird ein Scale-up bis zu einem Arbeitsvolumen von 200 L durchgeführt. Die induzierte Produktbildung wird im 2 und 50 L Maßstab durchgeführt. Zusätzlich sind die unterschiedlich genutzten Medien aufgeführt.</i>	55
<i>Abbildung 13: Anschlusschema der Untersuchungen zum Mediumtausch mittels Crossflow-Filtration im UniVessel[®] SU (A) und BIOSTAT[®] STR 50 L (B).</i>	58
<i>Abbildung 14: Experimentelle Bestimmung der Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für den UniVessel[®] SU mit den Arbeitsvolumen 0,6, 1,1 und 2 L (A). Zusätzlich sind die Mischkennzahlen in</i>	

- Abhängigkeit der Reynolds Zahl für das Arbeitsvolumen von 2 L aufgeführt (B). In Abbildung (C) ist der volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient k_{La} in Abhängigkeit der Begasungsrate und dem spezifischen Leistungseintrag bei einem Arbeitsvolumen von 2 L dargestellt, der auf einem statistischen Modell basiert. Der spezifische Leistungseintrag wurde ausschliesslich numerisch bestimmt 63
- Abbildung 15: Experimentelle Bestimmung der Leistungscharakteristik im BIOSTAT® STR 50 L mit der Newton Zahl als Funktion der Reynolds Zahl in einer einphasigen, Newton'schen Flüssigkeit (A) und des spezifischen Leistungseintrags als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit für ein einphasiges, wasserähnliches sowie zweiphasiges (Liquid/Gas) Stoffsystem (B). 64
- Abbildung 16: Verteilung Gasblasenanzahl (A), des Gasblasendurchmessers d_{10} (B) und des Sauterdurchmessers d_{32} (C) im BIOSTAT® STR (2 x SBI) 50 L mit Wasser bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm und einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s ($P/V = 20 \text{ W/m}^3$). Durch die schwarzen Bereiche sind die Rührer, die Welle und der Ringsparger sowie den weißen Bereich die Schweißnaht des Plexiglasbehälters angedeutet. 66
- Abbildung 17: Verteilung der Gasblasenanzahl (A), des Gasblasendurchmessers d_{10} (B) und des Sauterdurchmessers d_{32} (C) im BIOSTAT® STR (RT + SBI) 50 L mit Wasser bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm und einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s ($P/V = 48 \text{ W/m}^3$). Durch die schwarzen Bereiche sind die Rührer, die Welle und der Ringsparger sowie durch den weißen Bereich die Schweißnaht des Plexiglasbehälters angedeutet. 67
- Abbildung 18: Bestimmung der Leistungscharakteristik (A) und des spezifischen Leistungseintrages als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit (B) im S.U.B. 50 L. Zusätzlich ist die experimentelle Bestimmung der Mischzeit (95 % - Mischgüte) als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für den S.U.B. 50 L mit den Arbeitsvolumen 25, 35 und 50 L (C) sowie der volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten k_{La} in Abhängigkeit der Begasungsrate und des spezifischen Leistungseintrages im 50 L Maßstab dargestellt (D). 68
- Abbildung 19: Verteilung der Gasblasenanzahl n_{GB} (A), des Gasblasendurchmessers d_{10} (B) und des Sauterdurchmessers d_{32} (C) im S.U.B. 50 L mit Wasser bei einer Begasungsrate von 0.02 vvm und einer Rührerumfangsgeschwindigkeit von 1.05 m/s ($P/V = 20 \text{ W/m}^3$). Durch die schwarzen Bereiche sind der Rührer, die Welle und der Mikrosparger angedeutet. 69
- Abbildung 20: Numerische und experimentelle Beurteilung des Strömungsverhaltens und der Geschwindigkeitsverteilung im BIOSTAT® STR 50 L mit den beiden Rührerkonfigurationen 2 x SBI (A und B) und RT + SBI (C und D). Zusätzlich erfolgt für die RT + SBI Konfiguration eine quantitative Betrachtung der relativen Geschwindigkeiten als Funktion des dimensionslosen Durchmessers bei unterschiedlichen dimensionslosen Höhen (E). 74
- Abbildung 21: Vergleich der numerischen und experimentellen Untersuchungen zum spezifischen Leistungseintrag als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit im BIOSTAT® STR 50 L unter unbegasten und begasten Bedingungen (A). Zusätzlich ist die Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für den UniVessel® SU und den BIOSTAT® STR 50 L sowie 200 L für die beiden Versuchsansätze dargestellt (B). 76
- Abbildung 22. Numerisch ermittelter Sauerstoffübergangskoeffizient als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für die Begasungsrate von 0.1 und 0.2 vvm im UniVessel® SU. 77
- Abbildung 23: Gegenüberstellung der normierten Fluidgeschwindigkeiten und des Strömungsprofils des S.U.B. 50 L mit u_{Tip} von 1.05 m/s der numerischen (A) und experimentellen (B und C) Ergebnisse. 79
- Abbildung 24: Die Evaluierung im S.U.B. 50 L ($u_{Tip} = 1.05 \text{ m/s}$) erfolgte auf den radialen Höhenprofilen (h/H) von 0.15 und 0.2 (A). Hierfür wird die dimensionslose Geschwindigkeit $((u_x^2 + u_y^2)^{1/2} / u_{Tip})$ als Funktion des dimensionslosen Durchmessers (x/D) genutzt (B). 80

<i>Abbildung 25: Vergleich der numerisch und experimentell ermittelten spezifischen Leistungseinträge als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit (A) sowie der Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages (B) für den S.U.B. mit den Arbeitsvolumen von 25, 35 und 50 L.....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 26: Gegenüberstellung der Leistungscharakteristik (Newton Zahl als Funktion der Reynolds Zahl); A) und der spezifische Leistungseintrag als Funktion der Rührerumfangsgeschwindigkeit (B) für die untersuchten Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech.....</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 27: Kolmogorov'scher Längenmaßstab als Funktion des spezifischen Leistungseintrages im UniVessel[®] SU (A) für die Fluiddomäne (oberer Graph), die Rührerzone (mittlerer Graph) und die direkte Rührernähe (unterer Graph). Zusätzlich ist der Längenmaßstab im BIOSTAT[®] STR für die Rührerzone (oberer Graph) und die direkte Rührernähe (unterer Graph) abgebildet (B).</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 28: Häufigkeitsverteilung des Volumenanteils als Funktion der lokalen Schergradienten im UniVessel[®] SU für die spezifischen Leistungseinträge von 0.44 und 435 W/m³ (A). Zum Vergleich werden die mittleren lokalen Schergradienten als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für den BIOSTAT[®] STR (2 x SBI) aufgeführt (B).</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 29: Die Mischzeit als Funktion des spezifischen Leistungseintrages für die Bioreaktoren von Sartorius Stedim Biotech mit den Rührervarianten RT + SBI (A) und 2 x SBI (B).</i>	<i>92</i>
<i>Abbildung 30: Bestimmung der Leistungscharakteristik bei unterschiedlichen Reynolds Zahlen (A) und des spezifischen Leistungseintrages bei gleicher Rührerumfangsgeschwindigkeit für die Arbeitsvolumen von 25 bis 2000 L (B).</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 31: Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der lokalen Schergradienten nach der Koordinatentransformation gegen den Volumenanteil im S.U.B. 50 L bei einem P/V von 0.03 und 30 W/m³ (A). Zudem werden die mittleren lokalen Schergradienten des S.U.B. 50 L und des BIOSTAT[®] STR mit den Rührerkonfigurationen (RT + SBI) sowie (2 x SBI) verglichen (B).</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 32: Vergleich der Kolmogorov'schen Längenmaßstäbe für den S.U.B. bis zu einem Arbeitsvolumen von 2000 L als Funktion des spezifischen Leistungseintrages in unmittelbarer Rührernähe (unterer Graph) und in der Rotationszone (oberer Graph).....</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 33: Vergleich der numerisch ermittelten Mischzeiten für die S.U.B. Maßstäbe bis 2000 L als Funktion des spezifischen Leistungseintrages (A) und in Abhängigkeit der Bioreaktorkonfigurationen nach Gleichung 39 (B).</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 34. Vergleich der numerisch erhaltenen Mischzeiten als Funktion der Gleichung 30 für alle untersuchten single-use Bioreaktoren.....</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 35. Vergleich der mittleren lokalen Schergradienten in Abhängigkeit der Gleichung 41 für alle untersuchten single-use Bioreaktoren.....</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung 36: Lebendzellzahl und Vitalität als Funktionen der Prozesszeit im S.U.B. 50 L mit CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definierten Minimalmedien. Als Scale-up Kriterium wurde der spezifische Leistungseintrag eines BIOSTAT[®] MD 2 L Laborbioreaktors verwendet.....</i>	<i>102</i>
<i>Abbildung 37: Lebendzellzahl und Vitalität (A) sowie Glukose- und Laktatkonzentration (B) als Funktionen der Prozesszeit im S.U.B. 50 L mit chemisch definiertem Minimalmedium und optimierten Prozessparametern basierend auf den numerisch ermittelten Ergebnissen.</i>	<i>103</i>

Abbildung 38: Gegenüberstellung der Kultivierungsergebnisse im BIOSTAT® STR 50 L mit CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definierten Minimalmedien anhand der Lebendzellzahl, Vitalität und des spezifischen Leistungseintrages (A) sowie der Glukose und Laktatkonzentrationen (B) als Funktion der Prozesszeit. 104

Abbildung 39: Vergleich der Scale-down/Scale-up Kultivierungsergebnisse ausgehend vom BIOSTAT® STR 50 L (Mitte) hin zum UniVessel® SU 2L (links) und zum BIOSTAT® STR (RT + SBI) 200 L (rechts). Die Kultivierungen der CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definiertem Minimalmedium wurden nicht nacheinander durchgeführt, sondern sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nach aufsteigendem Volumen von links nach rechts aufgeführt. Daher wird die Lebendzellzahl als Funktion der relativen Prozesszeit aufgeführt und der Verlauf der Graphen keine Feeding-Schritte berücksichtigt. 105

Abbildung 40: Vergleich des Kultivierungsverlaufes während der Produktbildung im UniVessel® SU (A) und dem BIOSTAT® STR 50L (B)..... 107

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht über kommerziell erhältliche single-use Bioreaktoren.</i>	16
<i>Tabelle 2: Übersicht der geometrischen Dimensionen des UniVessel[®] SU, der BIOSTAT[®] STR-Reihe und der S.U.B.-Reihe.....</i>	44
<i>Tabelle 3: Übersicht der Prozessparameter im UniVessel[®] SU, S.U.B. 50 L, BIOSTAT[®] STR 50 und 200 L sowie der Kultivierungsparameter, die als Kriterien für eine Medienzugabe und einen Kultivierungsabbruch verwendet wurden.</i>	59
<i>Tabelle 4: Methoden zur Bestimmung von grundlegenden, verfahrenstechnischen Kenngrößen in single-use Bioreaktoren (Empfehlung = x).</i>	72
<i>Tabelle 5: Methoden zur Bestimmung von grundlegenden und erweiterten, verfahrenstechnischen Kenngrößen in single-use Bioreaktoren (Empfehlung = x).....</i>	85
<i>Tabelle 6: Betrachtung der verfahrenstechnischen Parameter bei einem konstanten Scale-up Faktor (unterstrichene Parameter) für den UniVessel[®] SU und den BIOSTAT[®] STR (2 x SBI) 1000 L.</i>	100
<i>Tabelle 7: Übersicht der experimentell bestimmten, verfahrenstechnischen Kenngrößen für den UniVessel[®] SU, BIOSTAT[®] STR 50 L und S.U.B. 50 L.</i>	112
<i>Tabelle 8: Übersicht der experimentellen und numerischen Ergebnisse sowie die resultierende Validierung des UniVessel[®] SU, der BIOSTAT[®] STR 50 L und des S.U.B. 50 L.....</i>	114
<i>Tabelle 9: Zusammenfassung der Kultivierungsuntersuchungen und –parameter für den UniVessel[®] SU, BIOSTAT[®] STR 50 L, S.U.B. 50 L und BIOSTAT[®] STR 200 L mit CHO XM 111-10 Zellen in chemisch definiertem Minimalmedium (n.b.: nicht bestimmt).</i>	115

9 Anhang

Anhang A: Experimentelle Bestimmung der Mischzeit

Entfärbungsmethode

Die Bestimmung des Feinmischverhaltens erfolgt durch die iodometrische Entfärbungsmethode. Zur intensiven Färbung (blauschwarz) der Modellflüssigkeit wird eine wässrige Iod-Kaliumiodidlösung und eine Stärkelösung zugesetzt. Die Entfärbung erfolgt durch das Zugabe einer Natriumthiosulfat-Lösung, die das Jod reduziert und Thiosulfat zu Tetrathionat oxidiert.

1. Lösungen herstellen:
 - a. Stärkelösung (10 g/L mit 2 g/L Benzoesäure aufkochen)
 - b. Iod-Kaliumiodid-Lösung (250 g/L Kaliumiodid, 128 g/L Iod)
 - c. Natriumthiosulfat-Lösung (248 g/L)
2. Reaktor mit deionisiertem Wasser befüllen und je Liter Wasser 2mL Stärkelösung sowie 0,1mL Iod-Kaliumiodid-Lösung zusetzen (ergibt intensive Blaufärbung).
3. Natriumthiosulfatlösung in 1,05-fachen molaren Überschuss zugeben und Zeit von der Zugabe bis zur totalen Entfärbung mit einer Stoppuhr erfassen. Diese entspricht der Mischzeit
4. Verbleibenden Thiosulfat-Überschuss durch vorsichtiges Zutropfen von Iodlösung oxidieren. Anschließend kann erneute Messung durchgeführt werden.

Leitfähigkeitsmethode

Zur Bestimmung des Feinmischverhaltens wird die Konzentrationsmethode angewendet. Dazu wird bei eingestellten Mischparametern im Mischgefäß eine definierte Menge Kaliumchlorid zu deionisiertem-Wasser hinzugegeben und es wird die Leitfähigkeit gemessen. Bei der Leitfähigkeitsmethode wird die Mischzeit anhand der Konduktivitätsänderung des Behälterinhaltes nach Zugabe einer Kaliumchlorid-Lösung ermittelt. Die Datenerfassung erfolgt rechnergestützt über die Software MFCS oder BORIS (Version 7.1).

1. Kaliumchlorid-Lösung (223,6 g/L) herstellen.
2. PC und Meßsignalumwandler einschalten. Datenaufzeichnungs-Software starten (MFCS / BORIS) und ein Verzeichnis für die Speicherung der Messdaten deklarieren.
3. Reaktor mit deionisiertem Wasser füllen und Rührer bei gewünschter Drehzahl starten.
4. 0,5 mL/L KCl-Lösung mit Pipette zugeben und gleichzeitig Datenerfassung starten. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass der Start der Datenerfassung simultan mit der Salzzugabe erfolgt.
5. Ist eine stabile Anzeige der Leitfähigkeit erreicht, wird die Datenaufzeichnung beendet.
6. Behälter entleeren, mit deionisiertem Wasser ausspülen und anschliessend neu befüllen.
7. Zur Ermittlung der Mischzeit wird die normierte Antwortfunktion gegen die Zeit aufgetragen und die Zeit abgelesen, nach der die Mischgüte (z.B. 95%) erreicht ist (Gleichung A - 1).

7. Zur Ermittlung der Mischzeit wird die normierte Antwortfunktion gegen die Zeit aufgetragen und die Zeit abgelesen, nach der die Mischgüte (z.B. 95%) erreicht ist (Gleichung A - 1).

$$H(t)_{95\%} = \frac{c_{T,0} - c_T(t)}{c_{T,0} - c_{T,\infty}}$$

Gleichung A - 1

- mit $c_T(t)$ - aktuelle Tracerkonzentration (Salzkonzentration),
 $c_{T,0}$ - Tracerkonzentration zum Beginn der Messung
 $c_{T,\infty}$ - Tracerkonzentration am Ende der Messung
 $c_T(t)$ - aktuelle Leitfähigkeit
 $c_{T,0}$ - Leitfähigkeit zum Beginn der Messung

Hinweise: Die Daten sollten sofort nach der Messung in eine separate Excel -Datei kopiert werden, um ein Überschreiben bei einem weiteren Durchlauf zu verhindern. Es ist zu empfehlen, für jeden Versuchspunkt eine Dreifachbestimmung durchzuführen. Der Austausch des Behälterinhaltes ist nicht notwendig, solange ein linearer Zusammenhang zwischen Salzkonzentration und Leitfähigkeit besteht (nur in diesem Bereich ist die obige Gleichung gültig).

Anhang B: Experimentelle Bestimmung des Sauerstofftransfers

Der volumenbezogene Sauerstoffübergangskoeffizient, auch als k_{La} -Wert bezeichnet, ist eine Kennzahl für den Transport von Sauerstoff aus der Gasphase in die Flüssigphase eines Reaktionssystems. Er ist ein Maß für die Effizienz des Sauerstoffeintrags und ist daher von großer Bedeutung für die verfahrenstechnische Auslegung von Bioreaktoren. Für die Bestimmung des k_{La} -Wertes wird die Aufsättigung des Sauerstoffs in der Flüssigkeit mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode verfolgt (*gassing-out* Methode). Die Datenerfassung erfolgt rechnergestützt über die Software MFCS oder BORIS (Version 7.1).

Messprozedur:

1. Behälter mit zu untersuchender Flüssigkeit (1 x PBS-Puffer) füllen.
2. PC und Messsignalumwandler einschalten. Datenaufzeichnungs-Software (MFCS / BORIS) starten und ein Verzeichnis für die Speicherung der Messdaten deklarieren.
3. Für die Ein-Punkt-Kalibrierung der Sonde Drehzahl auf 700 Upm und Volumenstrom auf 2 L/min einstellen und solange belüften, bis Anzeige der Sauerstoffkonzentration einen stabilen Wert erreicht. Dieser entspricht der Sättigungskonzentration.
4. Gewünschte Begasungsrate an der Kontrolleinheit einstellen. Anschliessend die Belüftung ausschalten und eine Stickstoff-Leitung an den Behälter ankoppeln. Den Behälter so lange mit Stickstoff begasen, bis der Sauerstoff vollständig verdrängt wurde.
5. Gewünschte Drehzahl wählen und mindestens eine Minute bei dieser weiterrühren, um ein (quasi-) stationäres Strömungsfeld zu gewährleisten.
6. Luftzufuhr ankoppeln und Datenaufzeichnung starten. Die Messung sollte bis zum Erreichen der Sättigungskonzentration erfolgen. Hierdurch wird gewährleistet, dass die Sonde noch ordnungsgemäß kalibriert ist. Für die Auswertung wird allerdings nur der Bereich von 20% bis 80% Sättigung herangezogen.
7. Für nächsten Versuchspunkt Arbeitsschritte ab dem Punkt 3 wiederholen.

Auswertung:

1. Anfänglich wird der Logarithmus des pO_2 gebildet durch $\ln(100 - pO_2\text{-Wert})$.
2. Minimale und Maximale Werte der Messung notieren.
3. Durch die Gleichung $((pO_2\text{-Wert} - \text{Minimalwert})/(\text{Maximalwert} - \text{Minimalwert})) \cdot 100$ erfolgt bei einer gegebenenfalls verschobenen prozentualen Einteilung des pO_2 eine Skalierung zwischen 0 und 100 %.
4. Der logarithmierte pO_2 -Wert (Punkt 1) wird in Grenzen zwischen 10 – 90 % als Funktion der Zeit aufgetragen.
5. Einfügen einer Trendlinie mit der dazugehörigen Trendliniengleichung.
6. Der Betrag der Steigung in der Gleichung gibt direkt den ermittelten k_{La} -Wert an (roter Wert der Abbildung A - 1).

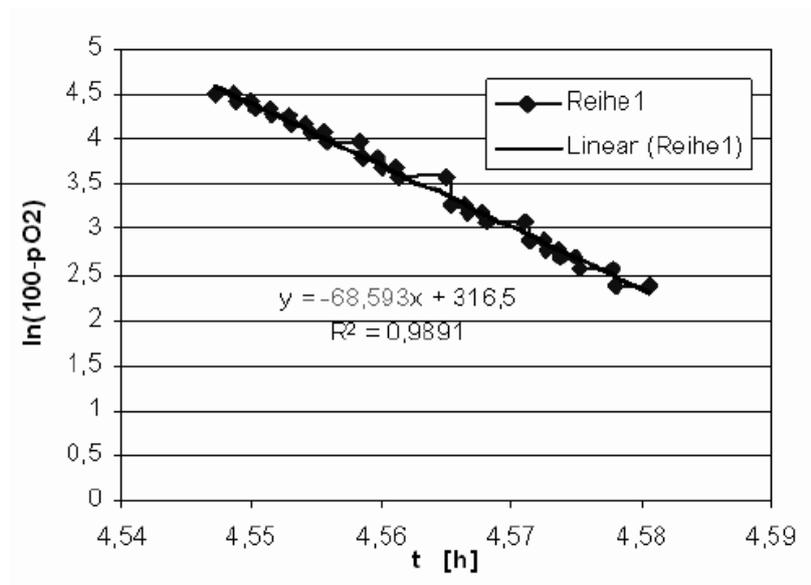


Abbildung A - 1: Grafische Bestimmung des k_{La} -Wertes durch logarithmisches Auftragen der relativen Konzentration gegen die Zeit.

Bestimmung der Zeitkonstanten für die Sauerstoffelektrode:

Die Zeitkonstante kann durch Aufnahme der Sprungantwort der Sauerstoffelektrode ermittelt werden. Dazu wird die Elektrode zunächst in Wasser gehalten, in welchem der Sauerstoff mit Hilfe von Stickstoff vollständig verdrängt wurde. Anschliessend wird die Sonde in sauerstoffgesättigtes Wasser überführt und der Anstieg der Sauerstoffkonzentration aufgezeichnet. Die Zeitkonstante kann dann graphisch aus der Sprungantwort ermittelt werden (Abbildung A - 2). Sie ist definitionsgemäß die Zeit, bei der 63% des Endwertes erreicht sind ($t_{0.63}$).

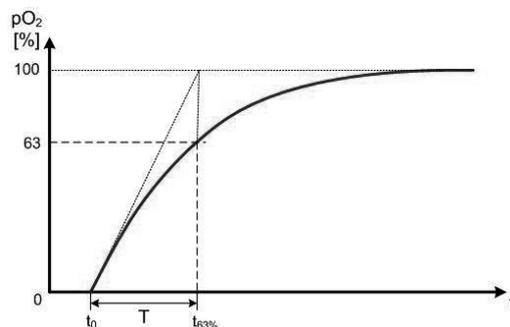


Abbildung A - 2: Prinzipskizze zur Ermittlung der Zeitkonstante.

Anhang C: Messung der Strömung mittels Particle-Image Velocimetry (PIV)

Allgemein

Im Folgenden wird ein allgemeiner Ablauf für die Geschwindigkeitsmessungen mittels PIV erläutert. Bei allen Aktivitäten bei denen der Laser eingeschaltet ist, muss der **Schutzvorhang geschlossen** und die entsprechenden **Schutzbrillen getragen** werden. Zudem muss die rote Warnlampe leuchten.

Die im Folgenden aufgeführten Werte/Zahlen/Optionen sind beispielhaft, ausser bei direktem Verweis.

Bevor mit den Untersuchungen begonnen werden kann, müssen die Geräte für:

- Biostat CultiBag STR Antrieb,
- Steuereinheit des Lasers und der Laserbedienung,
- Steuereinheit der Kamera,
- Steuereinheit der Traversierung,
- PC für die PIV

eingeschalten werden.

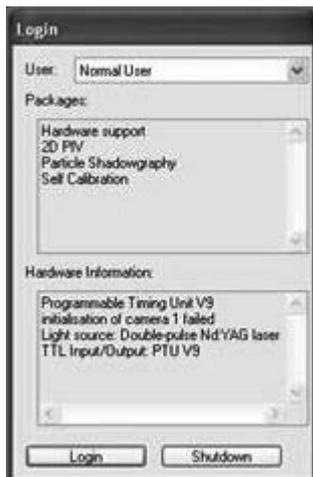
Der Reaktor, sowie der kubische Behälter sind mit dem Untersuchungsmedium zu füllen.

Material

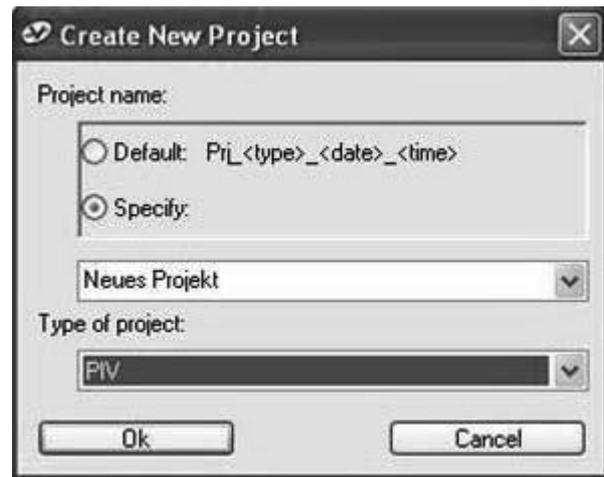
<i>Objekt</i>	<i>Firma</i>
Biostat CultiBag STR 50L	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Software DaVis®	LaVision GmbH (Göttingen, Deutschland)
Version: 7.2.213	
PIV Komponenten	LaVision GmbH (Göttingen, Deutschland)

DaVis®

Der Login erfolgt als normaler Benutzer und wird mit dem Klick auf LOGIN bestätigt (Abbildung A - 3, A). Mit dem Icon „New“ wird ein Projekt erstellt, was für jede Messung neu anzulegen ist. Dabei kann zwischen unterschiedlichen Arten des Projektnamens gewählt werden. Projekttyp ist von Imaging auf PIV zu stellen (Abbildung A - 3, B). Der Nutzer erhält einen neuen Projektmonitor, wobei sich in der oberen Zeile die selbsterklärenden Icons für „Close, Import, New und Calibrate“ befinden. Zudem wird im Projektmonitor der Inhalt Abbildung A - 3, C), beispielsweise von PIV Messungen und der Auswertung, und die dazugehörigen Aufnahmen angezeigt.



A



B



C

Abbildung A - 3: Vorgehen für den Login (A), das Erstellen eines neuen Projektes (B) und der Projektmonitor (C) in DaVis®.

Ausrichtung

Für die Ausrichtung von Laser- und Kamerafeld wird ein fixierbarer Punkt oder fixierbare Fläche benötigt. Das Eintauchen eines Gliedmassstabes auf der zu untersuchenden Ebene im Reaktorbecken kann dabei die nötige Fläche bereitstellen. Das Objektiv ist für die anfänglichen Arbeiten abzudecken.

Weiteres Vorgehen:

- Klicken des Icons „New“
- Im unteren Monitorbild erscheint ein Feld mit „Devices“, worüber alle Funktionen des Lasers, der Kamera und der Traversierung gesteuert werden können. Die „Trigger und Recording rate“ werden unter „Recording“ „Timing“ auf 7.15 Hz (maximale Raten) eingestellt (Abbildung A - 4, Oben). Unter „Devices und Recording“ sind die abgebildeten Einstellungen vorzunehmen und den Laser in den „On“ Zustand zu versetzen (Abbildung A - 4, Unten).
- An der Laserkontrollbedienung sind die Einstellungen „Pump on, Laser on und Shutter on“ vorzunehmen.
- Um den Laser nicht permanent ein- und auszuschalten, empfiehlt es sich, lediglich den „Shutter“ zu öffnen und zu schliessen.
- Durch einen Klick auf „Take“ wird ein doppelter Laserpuls und durch „Grabe“ eine Abfolge von doppelten Laserpulsen erzeugt.

Das erzeugte, vertikal verlaufende Laserfeld wird, da die Position des Gliedmassstabes gegeben ist, über die Traversiereinheit entsprechend verschoben, bis der Gliedmassstab in der Ebene des Lichtfeldes liegt (Abbildung A - 4). Bei dem Arbeiten mit der Traversierung ist äusserste Vorsicht geboten. Ein Anstossen des Lasers oder der Kamera an Bauteilen kann zur Beschädigung führen.

Zoom-Ausrichtung

- „Devices“ „Translation Stage“
- Für die Ausrichtung muss der Zoom-Regler entsprechend verstellt werden bis Laserfeld und Gliedmassstab in einer Ebene liegen.

Nachdem das Laserfeld fixiert ist, wird die Kameraausrichtung, mit dem einstellen der Blende und dem Fokus, vorgenommen. Hierfür wird iterativ jeweils ein doppelter Laserpuls mit einer Einzelaufnahme genutzt und ausgewertet.

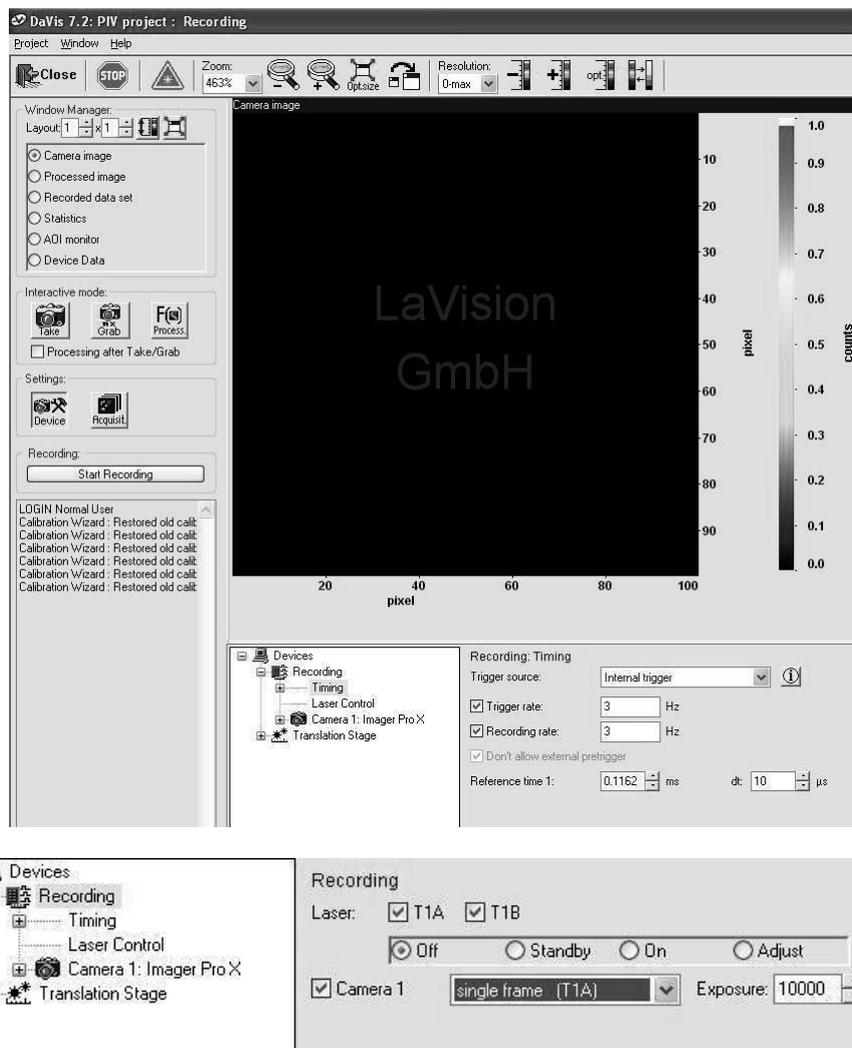


Abbildung A - 4 Übersicht über den Recording-Monitor (Oben) mit den Devices (Unten).

Vertikale und horizontale Ausrichtung

- Blende auf 2.8 stellen und den Kamera/Objektivschutz entfernen.
- Die Belichtungszeit sollte, je nach Helligkeit der Umgebung, angepasst.
- Durch betätigen von „Take“ wird ein Einzelbild erstellt und ist im Monitorbereich „Aufnahme sichtbar“. Bei einer unterbelichteten Aufnahme ist die Blende zu vergrößern



bzw. über die Tasten  die Bildhelligkeit zu prüfen.

- Durch iterative Anpassung der vertikalen und horizontalen Traversierung über die vertikalen und horizontalen Regler (Abbildung A - 5) wird der Gliedermasstab in die Bildmitte der Kamera ausgerichtet. Die Kontrolle erfolgt über eine Einzelbildaufnahme.
- Für die Einstellung des Kamerafokus wird die Taste für die Bildabfolge „Grabe“ betätigt. Während die Aufnahmen auf dem Monitor zu sehen sind, wird das Bild auf den Gliedermasstab durch Drehen des Fokus adaptiert. Bei akzeptabler Fokussierung wird die Millimeterskalierung auf dem Gliedermasstab scharf dargestellt.
- Abschliessend wird der Fokus des Lasers auf den Gliedermasstab angepasst. Hierbei ist drauf zu achten, dass die Breite des Querschnittes des Laserfeldes ein Minimum am Fixpunkt aufweist. (drehen der Fokussierung).

- Eine Überprüfung der Überlagerung beider Laserstrahlen kann durch aus an dieser Stelle vorgenommen werden, wobei die Kamera in den Doppelbildmodus (Abbildung A - 4 unten) gestellt werden muss („Devices“ „Recording“ „double frame“).
- Die Aufnahme über „Take“ ergibt eine Doppelbildaufnahme, bestehend aus zwei Einzelbildern. Ist die Ausleuchtung von Bild B identisch zu Bild A kann nach dieser Anleitung weiter verfahren werden. Bei groben Abweichungen muss der Strahlengang von Laser B mittels Anleitung nach FlowMaster, LaVision (2007) „Justierung der Laserstrahlen im Strahlengang“ nachjustiert werden.
- Über „Close“ zurück in den Projektmonitor.

Kamera und Laser sowie beide Fokusse und die Kamerablende sind jetzt aufeinander ausgerichtet und dürfen für die folgenden Untersuchungen nicht verstellt werden.

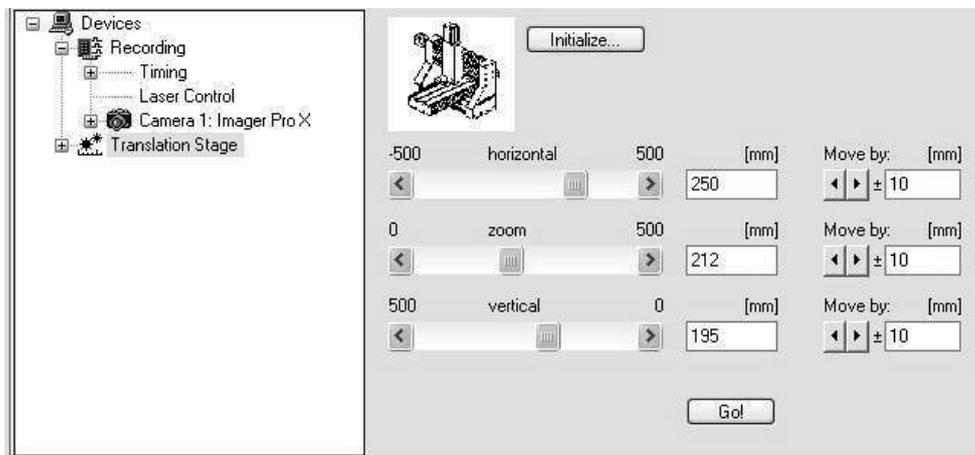


Abbildung A - 5: Steuerungsfläche für die Traversierung.

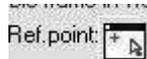
Kalibrierung

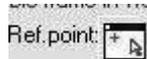
Die Kalibrierung ist notwendig, um den Abbildungsmaßstab und die Ausgangskordinaten für eine spätere Bildauswertung festzulegen. Diese sollte vor jeder Messung respektive nach einer Änderung am zu messenden System erfolgen. Des Weiteren ist eine erste qualitative Beurteilung notwendig.

- Partikel in das Fluid geben.
- Klick auf „Calibrate“
- Schritt 1: Unter „Type of calibration“ die Option „define scale, no image distortion“ auswählen (Abbildung A - 6; A).
- Weiter mit „go to next step“.
- Schritt 2: Erstellen einer Einzelbildaufnahme wie oben beschrieben, in der die Welle oder ein Gegenstand mit bekannter Dimension abgebildet ist (Abbildung A - 6; B)
- Unter der Option „Action: calibrate visible frame in working window“ folgendes Panel



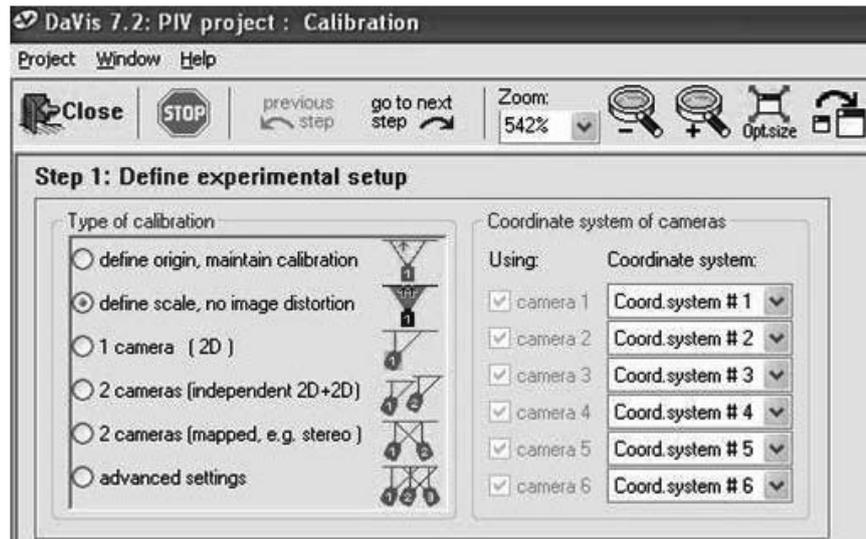
auswählen und die benötigten Referenzpunkte (Achtung: der Abstand muss bekannt sein) setzen. Anschliessend im sich öffnenden Fenster den entsprechenden Modus auswählen und die Distanz beider Punkte eingeben.



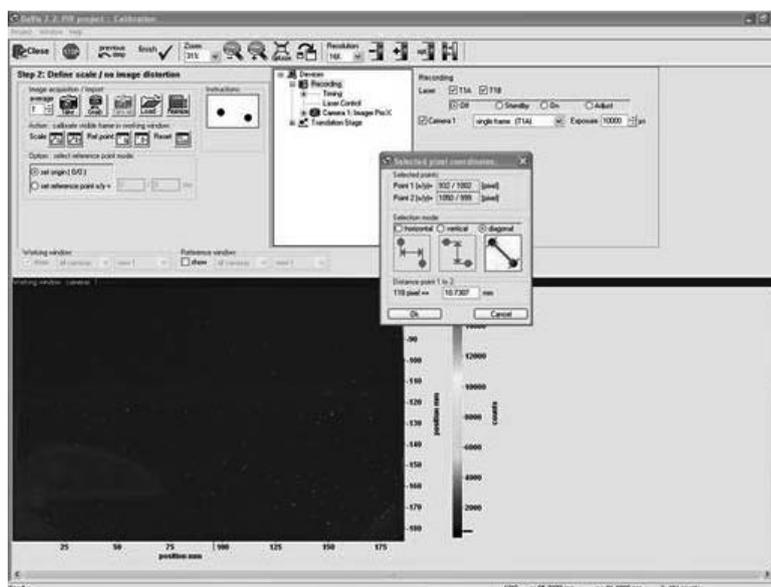
- Der Referenzpunkt wird über  gesetzt. Nachfolgend wird die untere linke Ecke in der Aufnahme angeklickt. Die Raumkoordinaten des Bildes besitzen ihren

Ursprung an dem gewählten Punkt. Diese Durchführung ist insbesondere für Untersuchungen essentiell, wo das zu untersuchende Objekt grösser als die aufgenommene Abbildung ist. Durch das Bewegen der Traversierung und nachfolgender Aufnahme, können die beiden erhaltenen Bilder anhand ihrer Ursprungs koordinaten zusammengefügt werden.

- Mit „Finish“ die Kalibrierung beenden und im erscheinenden Fenster die Option „Overwrite active project with new scales and calibration“ wählen. Ist die Kalibrierung zu verwerfen, Option „Discard new calibration and exit dialog without saving calibration and scales to experiment“ nutzen.



A



B

Abbildung A - 6: Notwendige Optionen für die Kalibrierung.

Qualitative Beurteilung

- Schaltfläche „New“ für eine Aufnahme betätigen.
- Erstellen einer Doppelbildaufnahme, wobei Bild A in der Aufnahmeausgabe zu sehen ist.
- Beim Vergrössern der Aufnahme (drehen der mittleren Maustaste) und bei der Betrachtung der Partikel sollten diese eine Grösse von maximal 12 Pixeln aufweisen und die Ränder nicht „verschwimmen“ (Abbildung A - 7; A). Eine korrekte Partikelgrösse und Fokussierung ist in Abbildung A - 7; B zu sehen.

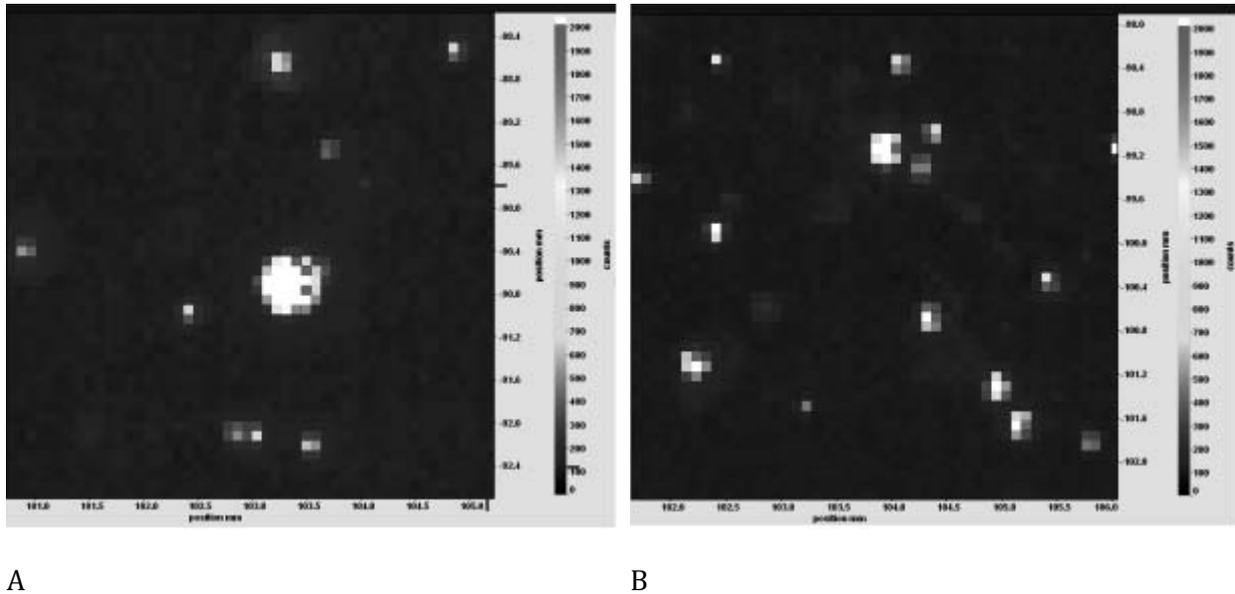
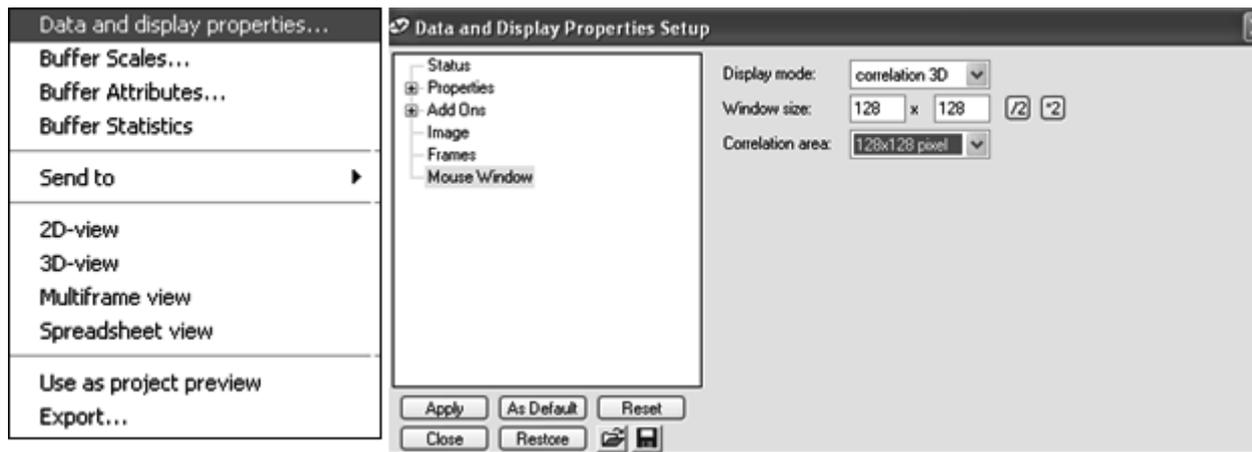


Abbildung A - 7: Darstellung von defokussierten (A) und fokussierten Partikel (B).

Dreidimensionale Kreuzkorrelation

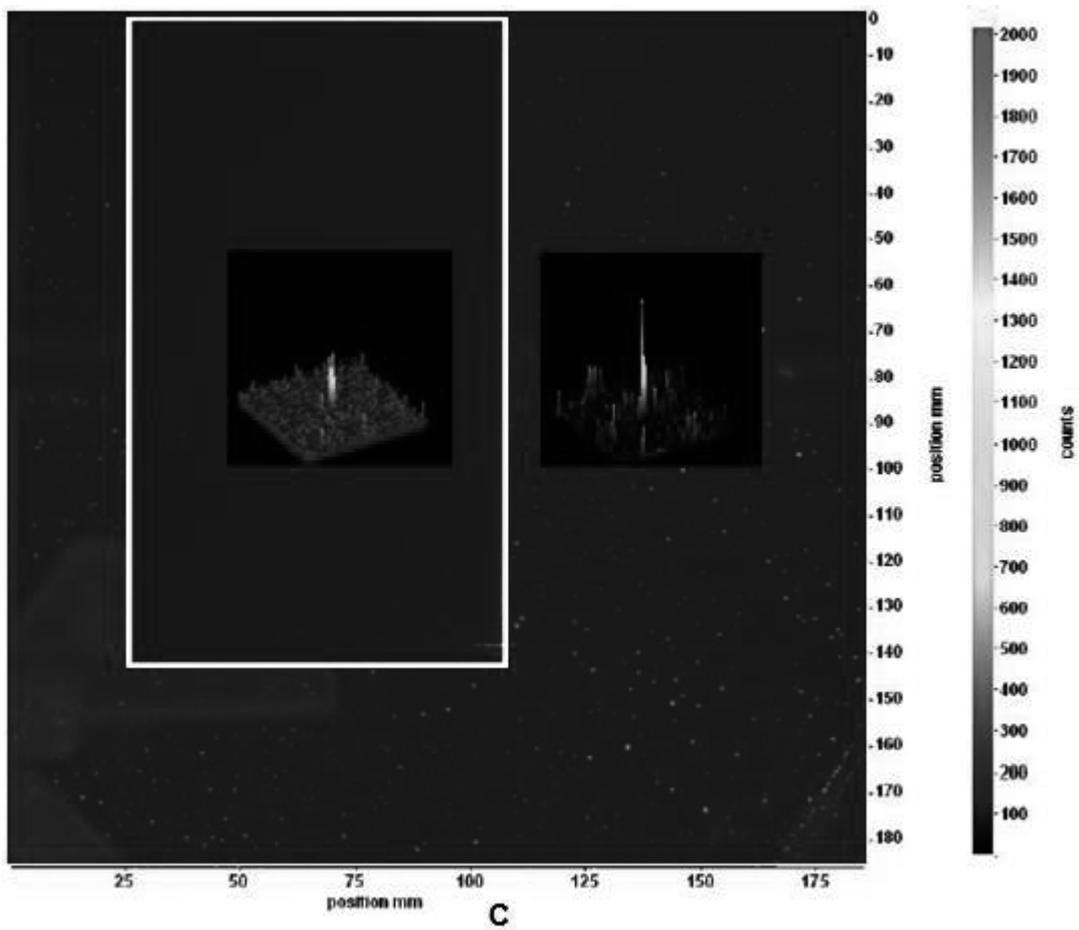
- Rechtsklick in der Aufnahmeausgabe und „Data and display properties...“ auswählen (Abbildung A - 8; A).
- Unter „Mouse Window“ die in Abbildung A - 8; B aufgeführten Optionen aktivieren und mit „Apply“ bestätigen.
- Mauszeiger über den abgebildeten Bereich ziehen.
- Anhand der Peakform der Korrelationsfläche wird der Unterschied zwischen Hintergrund- und Partikelreflektion in Abbildung A - 8; C verdeutlicht. Die Farbskala (Counts) zeigt die Intensität (Photonen auf CCD Sensor).
- Der rote Peak repräsentiert die nicht beleuchtete Messebene, infolge des Schattenwurfes der Welle.
- Des Weiteren ist anhand der Positionsskala zu sehen, dass der Referenzpunkt in der linken oberen Ecke gesetzt ist.
- Nach erfolgter Kontrolle mittels Korrelation die dreidimensionale Korrelation deaktivieren und mit „Apply“ bestätigen.

Nach erfolgreicher Kalibrierung und Überprüfung der Aufnahmequalität können nachfolgend die Untersuchungen anhand von Doppelbildaufnahmen durchgeführt werden.



A

B



C

Abbildung A - 8: Vorgehen für eine dreidimensionale Korrelation einer Doppelbildaufnahme.

Dimensionierung des Reaktors

Bevor mit den eigentlichen Messungen der Geschwindigkeiten begonnen werden kann, muss die Dimensionierung des Reaktors vermessen werden. Dies ist nötig, da der Abbildungsmaßstab der Kamera kleiner als der reale Reaktormassstab ist. Somit wird die globale Dimensionierung des Reaktors (Ist-Zustand der Behältergeometrie) in lokale Raumkoordinaten (Abhängig von Abbildungsmaßstab der Kamera) überführt. Nach dem Vermessen werden diese Parameter für die Untersuchung in Form einer Raster-Messung verwendet.

Horizontale Vermessung

- Die Bildaufnahme wird über die Verschiebung der Traversierung so ausgerichtet, dass der linke Rand des Kamerabildes den linken Behälterrand wiedergibt. Zur Orientierung kann ein Einzelbild erstellt werden.
 - *Notieren der horizontalen Traversierungsordinate aus DaVis®.*
- Nachfolgend wird über die Verschiebung der Traversierung der rechte Behälterrand (Darstellung im rechten Bildrand) gesucht.
 - *Notieren der zweiten horizontalen Traversierungsordinate aus DaVis®.*
- Die Differenz beider Werte entspricht der Reaktorbreite im Abbildungsmaßstab.

Vertikale Vermessung

- Analoges Vorgehen wie bei der horizontalen Vermessung mit den anzufahrenden Punkten: Reaktorboden und Fluidoberfläche

Die Differenzen werden im weiteren Verlauf für die Größe des Rasters benötigt. Wenn weitere Ebenen in der Tiefe (Verschiebung der Traversierung mittels Zoom) aufgenommen werden, sind lediglich die gewählten Positionen zu notieren.

Bestimmung von Triggerrate und Bildversatz (dt)

- „Devices“ „Recording“ „Timing“
- Die „Trigger rate“ gibt die Pulsfrequenz an und ist je nach Messobjekt/Applikation zu wählen. Die „Recording rate“ gibt die Aufnahmefrequenz an und sollte mit der „Trigger rate“ übereinstimmen. Die interne Triggerquelle immer auf der Option „internal Trigger“ belassen.
- Aktivieren der „Trigger und Recording rate“ (Haken setzen).
- Die für die Messung verwendete „Trigger und Recording rate“ wird durch eine externe Lichtschranke (Triggerlaser) über „External Trigger rate“ gesteuert.
- Die Bestimmung von dt erfolgt über die Wizard-Funktion: dt / velocity calculator.
- Für diese Berechnung müssen die Werte für die Größe des Messfeldes, die erwartete Geschwindigkeit und der vermutliche Partikelversatz bekannt und eingegeben werden.
- Nach Berechnung von dt den Wert in das entsprechende Feld eingeben.

Einrichten des Messablaufes

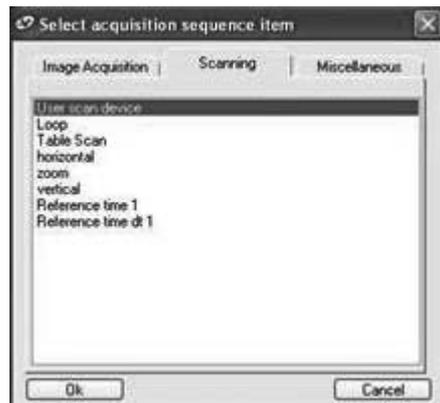
Damit nicht jeder Schritt und jede Ebene von Hand eingestellt werden muss, ist eine Aufnahmesequenz zu empfehlen, in der ALLE Abläufe der gesamten Untersuchung programmiert werden können.



- Im Recording-Monitor die Schaltfläche „Acquisit.“ drücken.
- Die bisherige Fläche mit „Devices“ wird abgeändert und es erscheint die Eingabemöglichkeit „Recording Sequence“ (Abbildung A - 9; A).
- Die vorherigen/automatischen Funktionen können gelöscht werden.
- Klick auf „Select acquisition sequence item“ (zweite von links) und es öffnet sich das dazugehörige Fenster. Die Funktion kann anhand der vorzufindenden Auswahl zusammengesetzt werden.
- Unter dem Reiter „Scanning“ werden die Verschieberichtungen der Traversierung in die Sequenz, durch Anklicken der Richtungen (Abbildung A - 9; B) integriert. Bei einer dreidimensionalen Verschiebung sollte mit der Verschiebungsrichtung Zoom begonnen werden. Die weitere Abfolge für die vertikale und horizontale Messung ist frei wählbar.
- Die Programmierung der Aufnahmesequenz wird mit der Option „Image Acquisition“ unter dem Reiter „Image Acquisition“ beendet und sollte die in Abbildung A - 9; C aufgeführte Reihenfolge aufweisen.
- In die Start- und Endfelder der zoom, horizontalen und vertikalen Richtung werden die zuvor notierten Werte der Vermessung eingetragen (die Koordinaten der linken und unteren Ränder bilden die Startwerte). Die Zwischenschritte („increment“) sind sinnvoll zu wählen (Abbildung A - 9; D).
- Unter „Image Acquisition“ wird die Anzahl an Bildern gewählt (Abbildung A - 9; E).
- Die Programmierung der Aufnahmesequenz ist abgeschlossen.



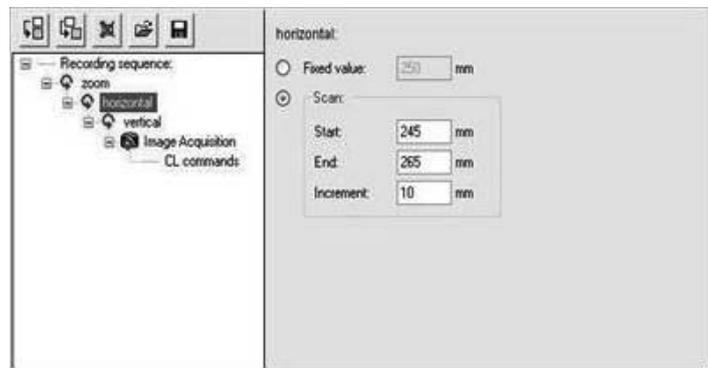
A



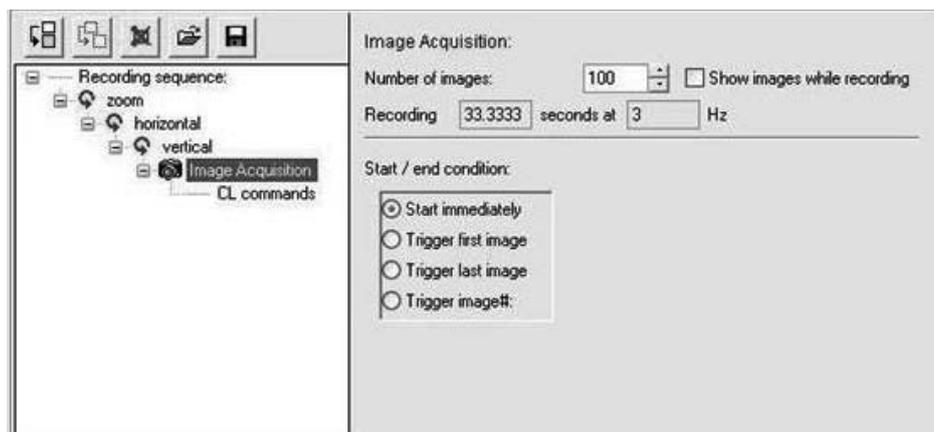
B



C



D



E

Abbildung A - 9: Vorgehen für die Aufnahmesequenz.

Beginn der Untersuchungen

- Klick auf „Devices“
- Der Laser wird gestartet, indem unter „Recording“ der Laser auf on gesetzt wird (Abbildung A - 10).
- An der Laserkontrollbedienung den Laser wie vorgängig beschrieben einschalten.

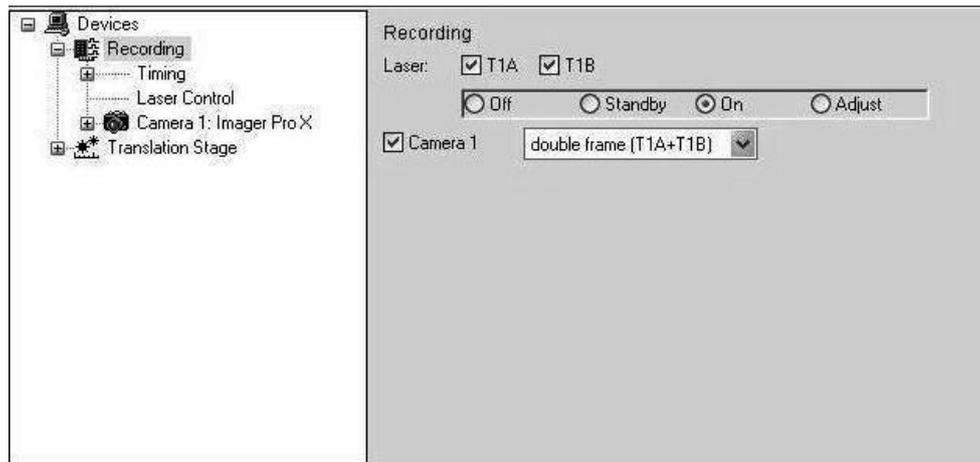


Abbildung A - 10: Starten des Lasers.

- Mit dem Klick auf „Start Recording“ wird mit der Messung begonnen.



Die Messung beginnt mit dem Ausrichten der Traversierung in zoom, horizontaler und vertikaler Raumrichtung (Positionierung auf die Startwerte der Aufnahmesequenz), erst anschliessend wird eine Lichtebene erzeugt sowie der Gegenstand aufgenommen. Während der Messung werden die zuvor eingestellten Positionen abgefahren, wobei die Koordinaten für x, y, z im Namen der gespeicherten Aufnahmen enthalten ist.

Auswertung

Die Auswertung kann im Batch (Einzelauswertung) oder Hyperloop (Gesamtauswertung) Modus erfolgen. Je nach aufgenommenen Bildern ist das jeweilige Vorgehen zu wählen. Das nachfolgende Vorgehen beschreibt die ersten Schritte der Auswertung für eine Hyperloop-Raster-Messung (für einen Zoom), die beim Biostat-Bioreaktor Messung genutzt wurden.

- Im Projektmonitor werden im Inhaltsexplorer die Messungen mit den jeweiligen Koordinaten aufgelistet (Abbildung A - 11).
- Rechtsklick auf den Namen für die Mehrfachmessung auf „Hyperloop“ „All Sets“.
- Rechtsklick auf den Namen und für die Einzelmessung auf „Batch Processing“.
- Das sich öffnende Hyperloop-Fenster listet alle durchgeführten Messungen nach ihrem Entstehungsdatum auf (Abbildung A - 12). Die Nomenklatur des Namens ist essentiell und sollte vorher oder zwischendurch nicht geändert werden.
- Die Messungen werden alle ausgewählt (werden in dem unteren Feld angezeigt) und unter „Operation“ die Option „Batch Processing“ ausgewählt (Abbildung A - 12).
- Zur Eingabe des Auswertungsverlaufes auf „Parameter...“ klicken.

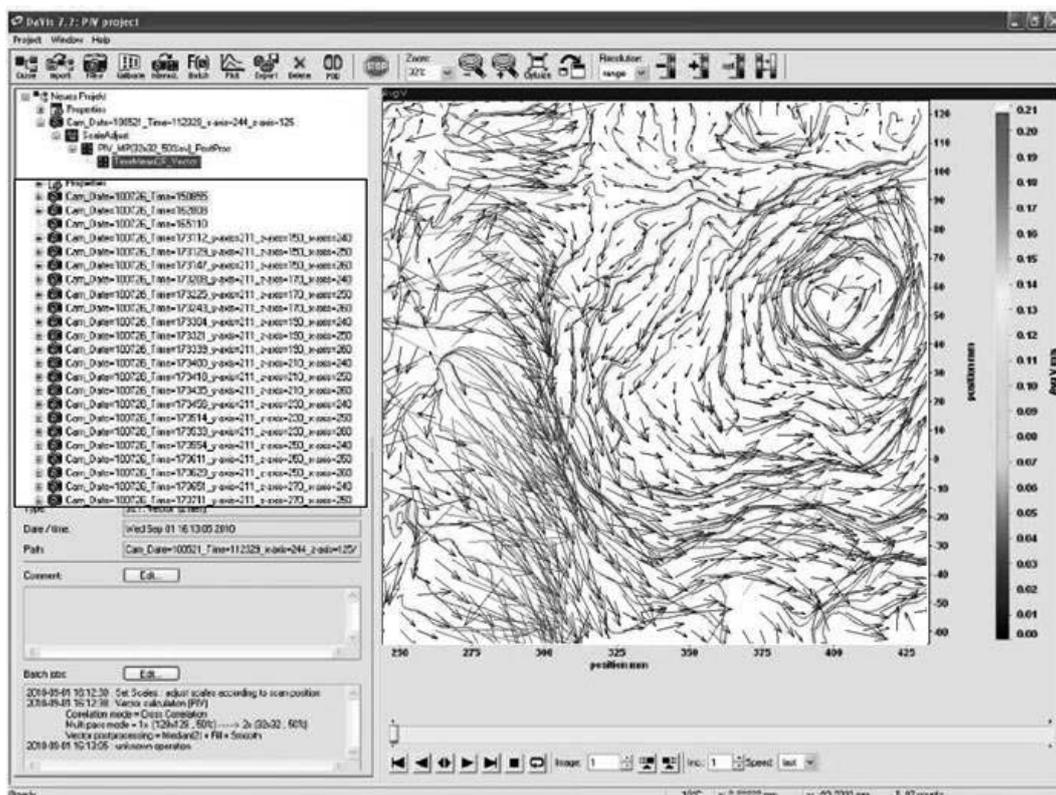


Abbildung A - 11: Auflistung der Koordinaten im Inhaltsexplorer.

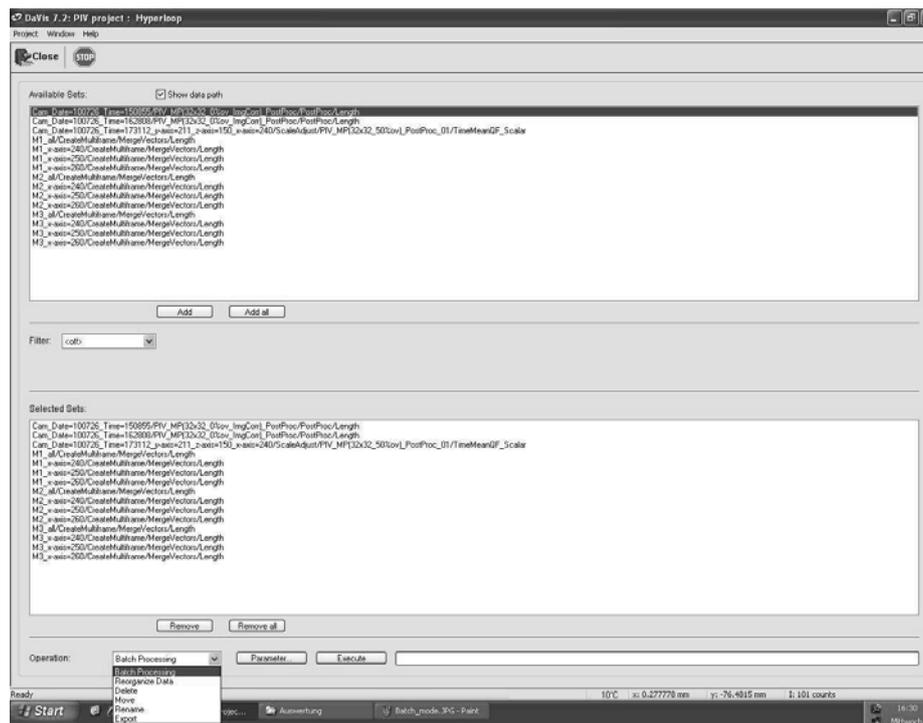


Abbildung A - 12: Darstellung des Hyperloop-Fensters.

- Unter „Operation 1“ werden die folgenden Optionen gewählt (Abbildung A - 13):
 - „Attributes“ „adjust scales according to scan position“.
 - „Vector field computation“ „PIV (particle image velocimetry)“.
 - „Statistics“ „vector statistics: vector field result“.

Der erste Schritt ordnet jeder Aufnahme die lokalen Koordinaten bezogen auf den Referenzpunkt zu. Erfolgt dies nicht, erhält jedes Bild die gleichen Koordinaten. Der zweite Schritt ist die Umrechnung des aufgenommenen Partikelversatzes in eine Vektordarstellung. Letztere Option führt eine Mittelung der für jede einzelne Position erfassten Aufnahmen durch.

- In der „Operation list“ sind die ausgewählten Optionen zu sehen und können bei einem Mausklick auf das Plus angepasst werden.

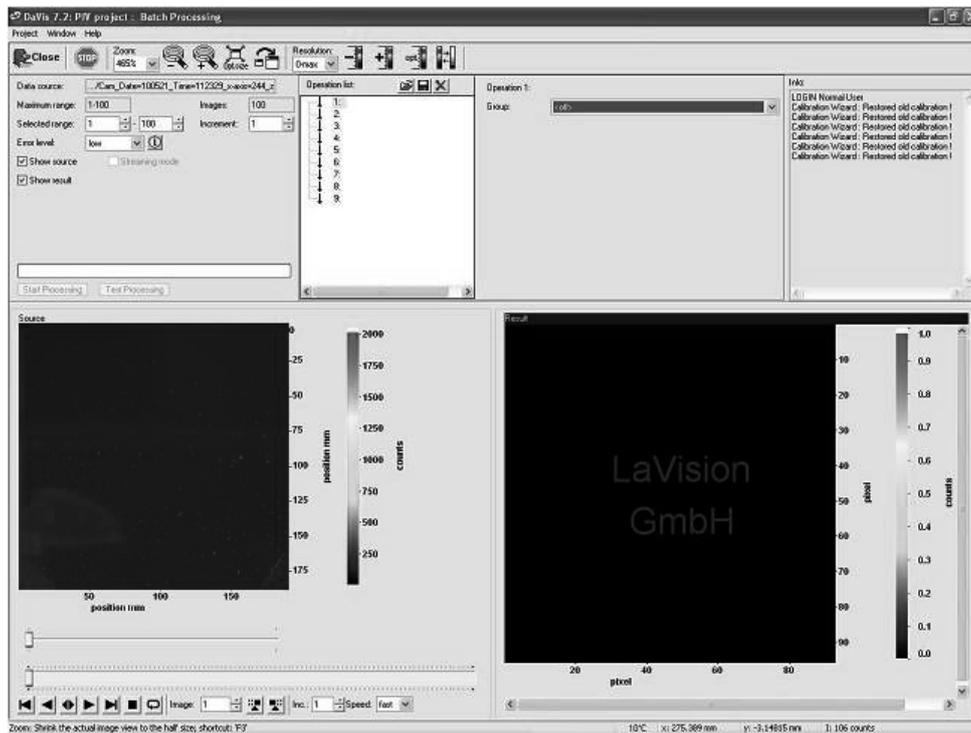


Abbildung A - 13: Darstellung des Batch Processing Monitors.

- Die Operation-Parameter sind nach Abbildung A - 14 und Abbildung A - 15 anzupassen.

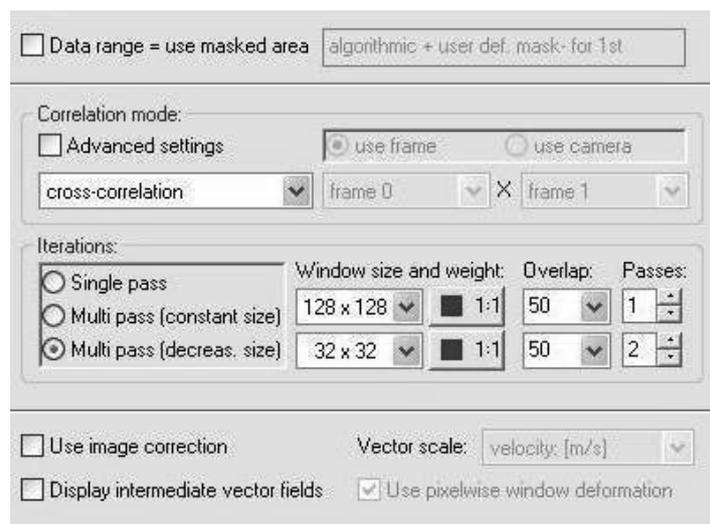


Abbildung A - 14: Vector calculation parameters.

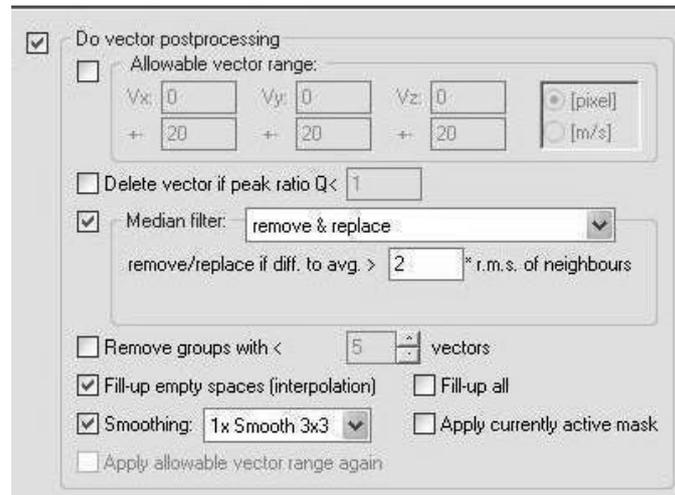


Abbildung A - 15: „Vector postprocessing“.

- Die zu verwendende Auswertung ist programmiert und über „Close“ in den Hyperloop-Monitor zurückkehren.
- Der Start der Auswertung erfolgt über die Schaltfläche „Execute“. Nach Beendigung der Auswertung „Close“ drücken. Zudem werden die jeweiligen Optionen für die einzelnen Messungen im Inhaltsexplorer aufgelistet (Abbildung A - 11).

Zur Übersicht kann nach der Mittelung das Vektorfeld in Konturplot umgewandelt werden (unter „Operation 1“ „extract scalar field: vector component“ „ $|\mathbf{v}|$ vector length“). Von der Verwendung der „Apply current active mask“ wird hier noch abgeraten, da bei unterschiedlichen Zoom-Einstellungen gegebenenfalls Informationen verloren gehen bzw. aufwendig nachberechnet werden müssen.

Auswertung Rastermessung

Für die nachfolgende Betrachtung ist die Nomenklatur genauer zu betrachten. Der Name einer Messung (bei einer lokalen Koordinate bezogenen auf den Referenzpunkt) besteht aus dem Datum (Cam_Date=), der Uhrzeit (Time=), der Zoomebene (y-axis=), der horizontale Ebene (z-axis=) und der vertikale Ebene (x-axis=). Die weitere Betrachtung erfolgt beispielhaft und kann je nach Applikation variiert werden.

- Messung auswählen und das Zeichen Plus klicken, bis die letzte Option erscheint (Bsp.: „TimeMeanQF_Vector“).
- Rechte Maustaste „Hyperloop“ „All sets“.
- Es erscheint wieder der Hyperloop-Monitor, jedoch für die Auswertung der „TimeMeanQF_Vector“. Für eine detailliertere Betrachtung „Show data path“ aktivieren.
- Im Fenster „Available sets“ werden alle Auswertungen markiert, bei denen y (für den zoom) und x (vertikal) im Namen konstant ist. Beispielsweise kann y variieren. „Add“ klicken. Bsp.: y-axis=200; x-axis=180; z-axis= Δz
- Unter „Operations“ „Reorganize Data“ auswählen und „Parameter...“ klicken, um eine Zeitserie zu erstellen.
- Das sich öffnende Fenster ist in Abbildung A - 16 dargestellt.
- Unter „Ignore variable value“ „Time“ auswählen „Ignor“.

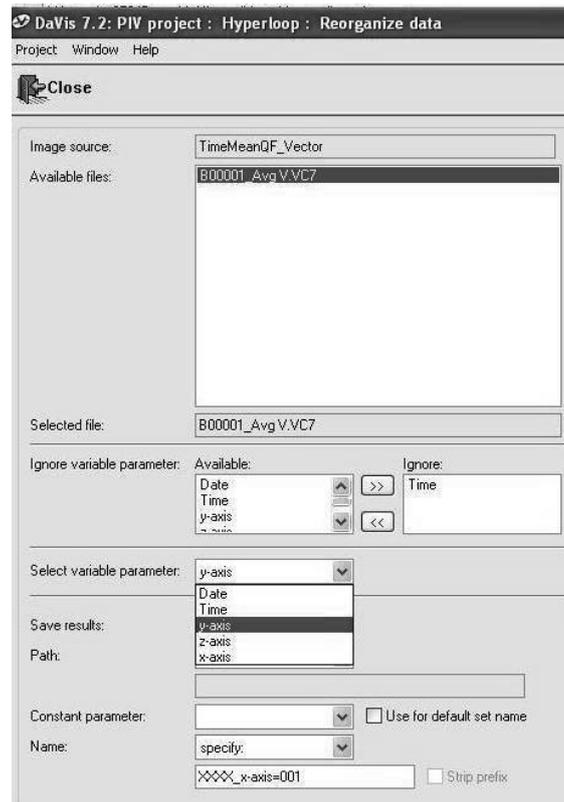


Abbildung A - 16: Darstellung des Hyperloop - Reorganize Data-Monitors.

- Bei „Selected variable parameter:“ die z-axis auswählen.
- Die neue Namensbezeichnung muss jetzt lauten: XXX_x-axis=001.
Da die Rasterauswertung für jede einzelne Ebene durchgeführt wird, muss die Bezeichnung z-axis= nicht zwingend mit in den neuen Namen geschrieben werden.
- Die Parameter über „Close“ verlassen und „Execute“ drücken.
- Nach Beendigung werden Auswertungen aus dem Feld „Selected sets“ mit „Remove all“ entfernt und die neuen Auswertungen eingeladen.
- Im Fenster „Available sets“ werden alle Auswertungen markiert, bei denen y und $x+\Delta s_i$ im Namen konstant ist. Bsp. für ($\Delta s_i=10$): y-axis=200; x-axis=190; z-axis= Δz .
- „Add“ klicken und auf die neue Nomenklatur des Namens achten.
- Dieser MUSS unterschiedlich sein und sollte im Beispiel lauten: XXX_x-axis=002.
- Durchführung wie zuvor wiederholen bis der Endwert für x erreicht ist.
- Nach Beendigung „Close“.
- Im Inhaltsexplorer sind die erstellen Namen mit entsprechend neuer Auswertung zu sehen.
- Diese mit einem rechteckigen Klick markieren und in den Hyperloop Modus gehen. Es dürften jetzt nur die neu erstellten Auswertungen aufgelistet sein
- Alle Auswählen und über Operation die Option „Batch Processing“ „Parameter...“ ausführen.
- Die „Operation list“ muss gelöscht werden für die folgenden Einstellungen:
 - „Copy and Reorganize“ „multiframe buffer from a time series“ (Parameter: „Create 1 image with n frames: 1+2+3+4...“).
 - „Vector mapping“ „Merge Vectors“.
 - „extract scalar field: vector component“ „ $|v|$ vector length“.
- „Close“ und „Execute“
- Die erhaltene Auswertung wird im Inhaltsexplorer aufgeführt.

Es wurden nun Auswertungsbilder von einer Zoomebene und mit unterschiedlichen horizontalen Koordinaten erhalten.

- Abschliessend werden die unterschiedlichen horizontalen Ebenen (x-axis=) zusammengefügt. Diese, im vorgestellten Beispiel XXX_x-axis=001 bis XXX_x-axis=002, mit rechtsklick markieren und die Auswertung der Rastermessung ab der Erstellung der Zeitserie wiederholen. Der unter „Hyperloop: „Reorganize data“ spezifizierte Name der neuen Auswertung kann abschliessend frei gewählt werden.

Nach Beendigung des zuletzt vorgestellten Schrittes sind alle Bilder mit ihren unterschiedlichen Koordinaten in eine Aufnahme integriert, welches den aufgenommenen Gegenstand darstellt (Abbildung A - 17).

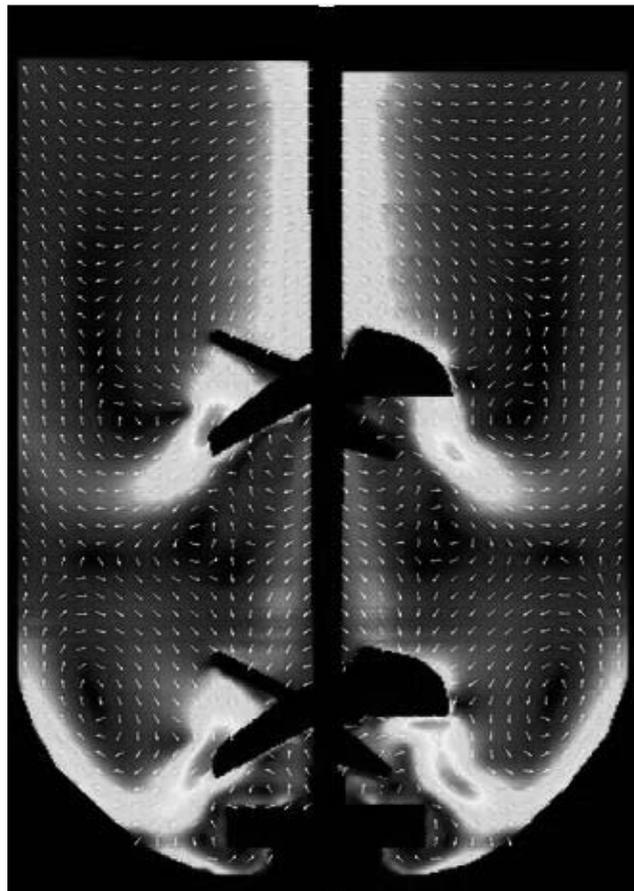


Abbildung A - 17: Darstellung eines, aus mehreren Einzelbildern, vollständig zusammengebauten Biostat CultiBag STR 50L.

Mitgeltende Unterlagen

- Benutzerhandbuch (FlowMaster.) der Firma LaVision GmbH.
- Benutzerhandbuch BIOSTAT CultiBag STR (Sartorius Stedim Biotech)
- Löffelholz, C. 2010. Arbeitsanweisung zur Messung der Strömungscharakteristik am Vibromix-Bioreaktor mittels *Particle Image Velocimetry (PIV)*. ZHAW. Nicht veröffentlicht.
- Andreoli, I. 2012. Untersuchung zum Strömungsprofil und zur Geschwindigkeitsverteilung im BIOSTAT® CultiBag STR 50L. ZHAW. Nicht veröffentlicht.

Anhang D: Messung der Gasblasengrößenverteilung mittels (PIV)/Shadowgraphy

Sicherheitsbestimmungen

Bei den Shadowgraphymessungen wird ein Laserstrahl, welcher durch einen Feststoffkörperlaser (Nd; YAG $\lambda = 532\text{nm}$) erzeugt wird eingesetzt. Da dieser Laserstrahl mittels eines "High Efficiency Diffuser" in diffuses Licht aufgeteilt wird, besteht in der Regel keine Gefahr mehr für eine Schädigung der Augen. Um jedoch das Risiko einer Augenschädigung durch den Laser auszuschließen (z.B. Austreten von Laserstrahlen aus dem Laser ohne Aufteilung über Diffusor), ist das Tragen einer speziellen Sicherheitsbrille während den Messungen im Laserbereich obligatorisch. Des Weiteren muss während den Messungen der Lasersicherheitsvorhang zugezogen werden um den Messbereich vom restlichen Technikumsbereich abzutrennen. Während den Messungen ist zudem eine Warnleuchte (rotes Warnlicht) einzuschalten. Es dürfen nur Personen Messungen mit der Shadowgraphyanlage durchführen, welche eine Einführung durch den Technikumsverantwortlichen erhalten haben.

Material

In der Tabelle A - 1 sind die für die Shadowgraphymessungen benötigten Geräte sowie Software aufgeführt. Es ist zu beachten, dass nur die Standardgeräte aufgeführt werden. Projektspezifische Geräte (Reaktormodell, Rührung, usw.) welche sich von Projekt zu Projekt ändern werden nicht berücksichtigt.

Tabelle A - 1: Standardequipment für die Shadowgraphymessung.

<i>Geräte/ Software</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Produktnummer/ Version</i>
Nd: YAG Doppelpuls Laser	LaVision, Göttingen, Deutschland	LM0720/ 1103069
High Efficiency Diffuser	LaVision, Göttingen, Deutschland	
CCD- Kamera Imager Pro X 4M	LaVision, Göttingen, Deutschland	1103096
QM-1 Long Distance Microscope	LaVision, Göttingen, Deutschland	
Teleobjektiv: AF-S NIKKOR 300mm f/2.8G ED VR II	Nikon	
Traversierung	LaVision, Göttingen, Deutschland	
PC	LaVision, Göttingen, Deutschland	
DaVis®- Software	LaVision, Göttingen, Deutschland	Version: 7.2.2.283

Durchführung einer Größenverteilungsbestimmung

Im Folgenden wird das Vorgehen zur Bestimmung einer Größenverteilung aufgeführt. Dabei wird exemplarisch auf eine Blasengrößenverteilungsbestimmung eingegangen, wobei die wichtigsten zu beachtenden Aspekte erörtert werden. Die Bestimmungen der Größenverteilung von Partikeln können analog dazu durchgeführt werden. Es muss jedoch die Größe der zu messenden Partikeln beachtet werden, damit eine geeignete Optik für die Bildgebung (QM-1 Mikroskop 5- 500 μm ; 300mm Teleobjektiv mit Dioptrielinse > 500 μm ; 300mm AF-S NIKKOR Teleobjektiv > 500 μm) gewählt wird. Auf die Bestimmung der Blasengeschwindigkeiten sowie der Massenströmen, welche zusätzlich mit der Shadowgraphy-Methode bestimmt werden können, wird in dieser Anweisung nicht näher eingegangen.

Vorbereitung und Aufbau

Für die Bestimmung der Blasengrößenverteilungen mittels der Shadowgraphy-Methode wird vom zu untersuchenden Reaktor ein rigides lichtdurchlässiges Kunststoffmodell benötigt, welches die gleichen Abmessungen besitzt wie der originale Reaktor. Dabei ist zu beachten, dass ein Kunststoff verwendet wird, welcher die Messung nicht beeinflusst.

- Das Reaktormodell wird in ein kubisches Gefäßgestellt und mit Wasser befüllt.
- Rollende Unterlage mit dem kubischen Gefäß sowie der darin befindliche Modellreaktor werden zwischen das bestehenden Aluminiumgerüst geschoben (Abbildung A - 18).

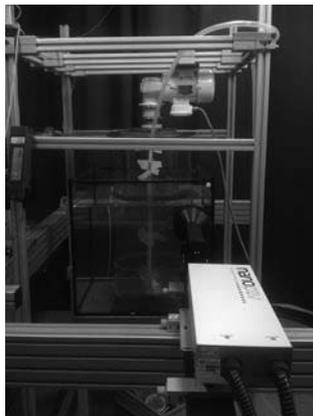


Abbildung A - 18: Aufbau der Shadowgraphyuntersuchungen am Beispiel BIOSTAT® CultiBag STR.

- Parallele Ausrichtung der Laser- bzw. Kameraschiene zum kubischen Gefäß respektive Modellreaktor (Abbildung A - 19). Durch die parallele Ausrichtung wird gewährleistet, dass ein parallel liegender Ausschnitt einer Ebene betrachtet werden kann.

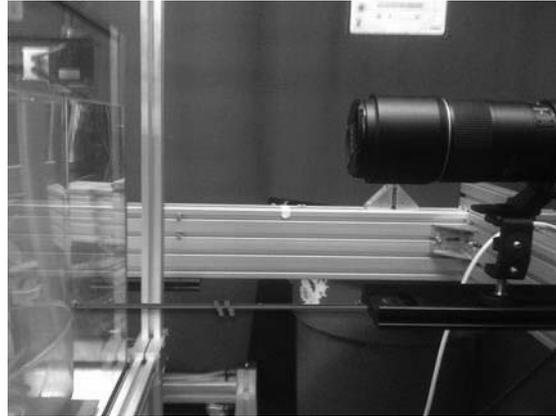


Abbildung A - 19: Parallele Ausrichtung der Kameraschiene zum Modellreaktor.

- Befestigen des Modellreaktors an dem Aluminiumgerüst mittels Aluminiumplatten. Durch das Befestigen des Reaktors wird eine spätere Verschiebung verhindert.
- Das Anbringen von erforderlichen Rührorganen (Motor und Rührwelle) kann über eine externe Halterung oder durch Befestigung am Aluminiumgerüst realisiert werden (projektspezifisch/ optional).
- Je nach Fragestellung der Untersuchungen kann am Aluminiumgerüst ein Triggerlaser befestigt und auf die Rührwelle ausgerichtet werden. Über diesen externen Triggerlaser können Blasengrößenverteilungen bei immer gleichen Rührerpositionen untersucht werden. Dazu wird an der Rührwelle ein Reflexionsstreifen aufgebracht, auf welchen der Triggerlaser ausgerichtet wird.
- Beim Befestigen des Lasers (mit Diffusor) sowie der Kamera an der Traversierung ist darauf zu achten, dass sich diese horizontal (y- Achse) sowie vertikal (z- Achse) in einer Ebene befindet (Abbildung A - 20). Durch diese horizontale sowie vertikale Ausrichtung wird eine optimale Belichtung der Bilder gewährleistet.

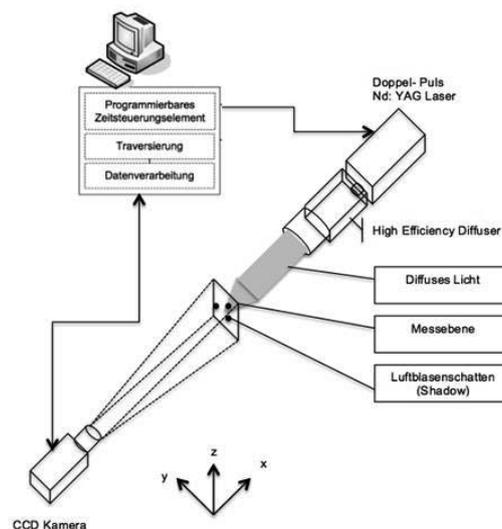


Abbildung A - 20: Schematische Darstellung des Aufbaus sowie des Messprinzips der Shadowgraphymessung.

Messung

Im Nachfolgenden werden die einzelnen Kalibrationen, welche vor jeder Messung durchgeführt werden müssen, sowie das Vorgehen zum Aufzeichnen von Referenz- bzw. Prozessbildern beschrieben. Nachfolgend wird eine Übersicht der wichtigsten Begriffe der Kontrollsoftware (DaVis 7.2) aufgezeigt, auf welche im Folgenden immer wieder verwiesen wird. In der vorliegenden Anweisung werden nur die grundlegenden Aspekte jedes einzelnen Schrittes (Kalibration, Messung, Auswertung, usw.) aufgezeigt. Eine weiterführende Beschreibung der Software (DaVis 7.2) kann den Benutzerhandbüchern entnommen werden.

DaVis 7.2

Damit die Kontrollsoftware DaVis 7.2 gestartet werden kann, muss sich der Benutzer am Prozessrechner (Windows XP) anmelden:

Nach dem Aufstarten der Windowsoberfläche kann die Kontrollsoftware DaVis 7.2 unter „**Expert User**“ ohne Eingabe eines Passwortes geöffnet werden. Nach dem Öffnen von DaVis 7.2 wird das Hauptmenü angezeigt, in dem das neue Projekte angelegt werden kann (siehe Particle Master Shadow). Für die Durchführung der Messungen wird durch Betätigen der Taste „**New**“ das Untermenü, welches in der Abbildung A - 21 aufgezeigt wird geöffnet.

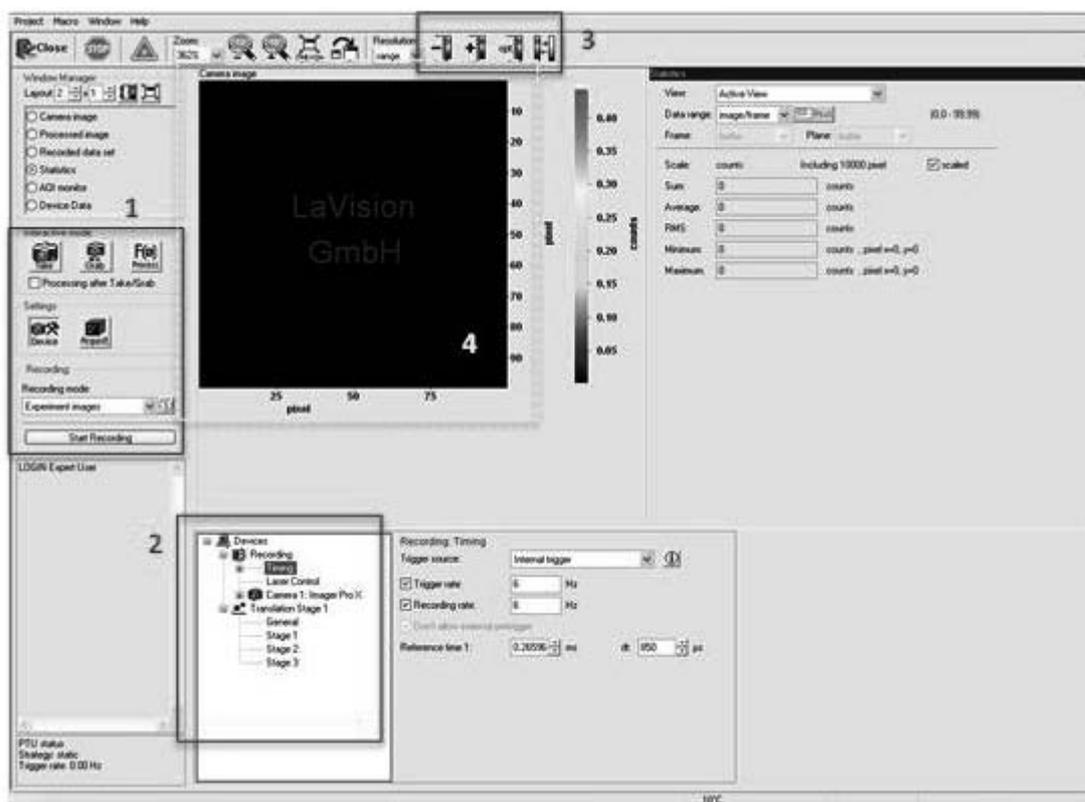


Abbildung A - 21: Untermenü in DaVis 7.2 für die Durchführung der Kalibrationen sowie Messungen.

1. Aufnahmeart und Aufnahmeoptionen

- **Take** : Taste zum Aufzeichnen eines Einzelbildes
- **Grab** : Taste zum Betrachten von live Bildern
- **Device** : Taste zum Öffnen des Untermenüs (Recording und Translation Stage 1)
- **Aquisition** : Öffnen des Untermenüs zum Programmieren von Messesequenzen)
- **Recording mode** : Pop- out Menü zur Wahl der Art der Bilder

2. Device-Optionen

- **Timing** : Triggerwahl, Trigger- Recordingfrequenzwahl, Belichtungs und Versatzzeit
- **Laser Control** : Laser on- off, Standby, Adjust sowie Laserintensitätseinstellungen
- **Translation State 1** : Steuerung der Traversierung (x, y, z- Achse)

3. Kontrast- Toolbar

- Menü zum Erhöhen oder Erniedrigen des Bildkontrastes

4. Bildanzeige

- Anzeigefläche der Aufgezeichneten Bilder

Inbetriebnahme des Lasers

Bei der Inbetriebnahme des Lasers müssen die vorgängig beschriebenen Sicherheitsbestimmungen berücksichtigt werden. Anschliessend kann der Laser wie folgt in Betrieb genommen werden.

- Einschalten des Lasers (Abbildung A - 22; rot) und der Kühlpumpen an der Lasersteuerung (Abbildung A - 22; a) sowie am Laserkontrollpult (Abbildung A - 22; b)

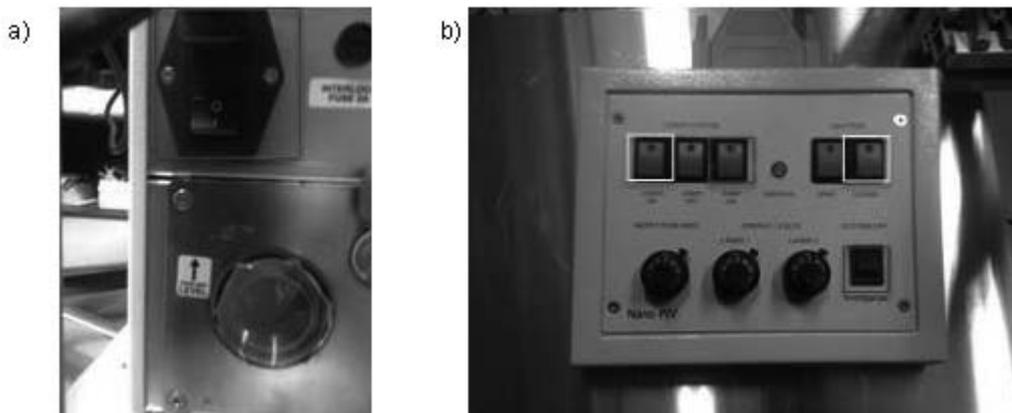


Abbildung A - 22: On/Off Tasten zum Einschalten des Lasers.

- Nach dem Einschalten des Lasers ist dieser direkt betriebsbereit. Jedoch sollte vor Durchführung der Adjustierung der Beleuchtung sowie der Referenz- bzw. Prozessbilder dieser für rund 30min aufgewärmt werden. Für die Durchführung der Kameraausrichtung sowie der Kalibration der Skalierung kann dies vernachlässigt werden.
- Die Umgebungsbeleuchtung wird ausgeschaltet.
- Nach betätigen des Schalters „Laser on“ sowie dem Öffnen des Shutters durch „Shutter open“ wird der Laserkopf geöffnet (Abbildung A - 22; b, gelb).
- Betätigen des Schalters „on“ in DaVis 7.2 (Laser Control).
Laser beginnt nun bezogen auf die eingegebene Triggerfrequenz Lichtimpulse auszusenden.
- Nach Abschluss der Kalibration bzw. Messung kann der Laser durch betätigen des Schalters „off“ in DaVis 7.2 (Laser Control) sowie am Laserkontrollpult auf „Standby“ geschaltet werden. (Shutter wird automatisch geschlossen).
- Falls der Laser nicht mehr gebraucht wird kann dieser durch Betätigen der „off“ Schalter an der Lasersteuerung sowie am Laserkontrollpult ausgeschaltet werden. („off“ Laser + Kühlpumpen)

Ausrichtung der Kamera auf den diffusen Lichtstrahl

Damit eine optimale Belichtung der Referenz- bzw. Prozessbilder gewährleistet werden kann muss die Kamera wie nachfolgend beschrieben auf den diffusen Lichtstrahl ausgerichtet werden. Dazu muss nach folgenden Punkten vorgegangen werden.

- Befestigen der Laserschiene (Lasers mit Diffusor) sowie der Kameraschiene (Kamera mit Objektiv) im gleichen Abstand vom Traversierungsende her betrachtet an die Traversierung (Abbildung A - 23). Für die Befestigung hat sich ein Abstand von 41.5 cm bewährt. Dieser kann jedoch je nach Fragestellung variiert werden.

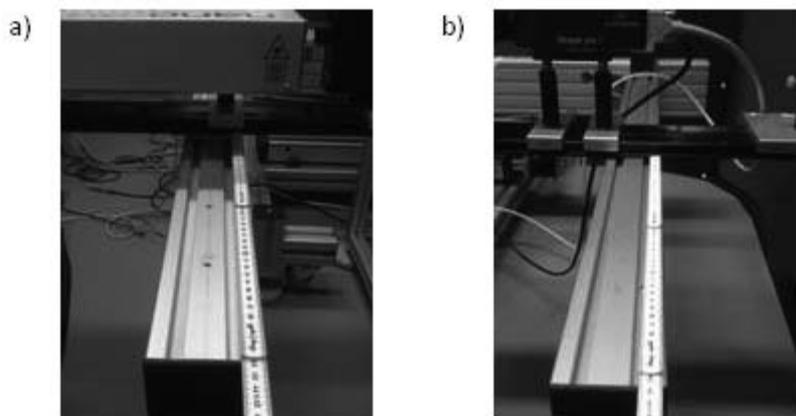


Abbildung A - 23: Befestigung der Laser- sowie Kameraschiene an der Traversierung (y- Achse). Die Laser (a) sowie Kameraschiene (b) werden mit dem gleichen Abstand an der Traversierung befestigt (415 mm).

Durch einhalten des gleichen Abstandes kann eine identische horizontale Ausrichtung (y - Achse) erreicht werden.

- Ausrichtung der Laser (Abbildung A - 24; a) sowie Kameraschiene (Abbildung A - 24; b) im rechten Winkel zur Traversierung (y - Achse). Dies bewirkte eine Ausrichtung des Lasers sowie der Kamera in der gleichen optischen Achse.

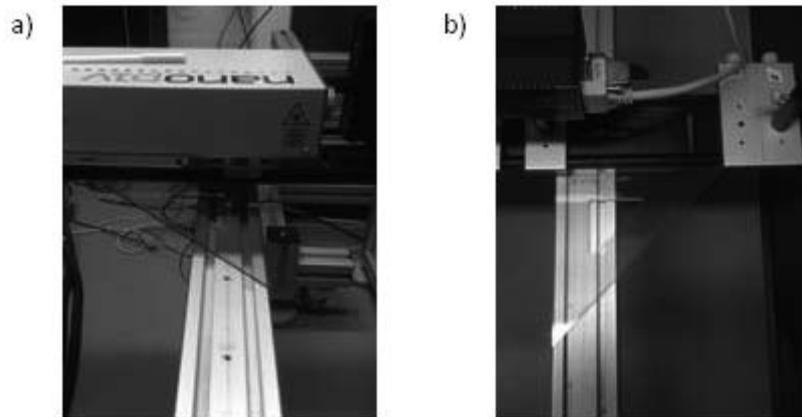


Abbildung A - 24: Ausrichtung der Laser- sowie Kameraschiene im rechten Winkel zur Traversierung.

Eine erste vertikale Ausrichtung (z - Achse) der Kamera auf den diffusen Lichtstrahl wird während des Anlagenaufbaus durchgeführt.

- Messen des Abstandes vom Boden bis zur Oberkante der Diffusorplatte (Abbildung A - 25; a).
- Anschliessendes Übertragen des gemessenen Abstandes auf die Seite der Kamera durch Messen des Abstandes vom Boden bis zur Oberkante des Kameraobjektives (Abbildung A - 25; b).

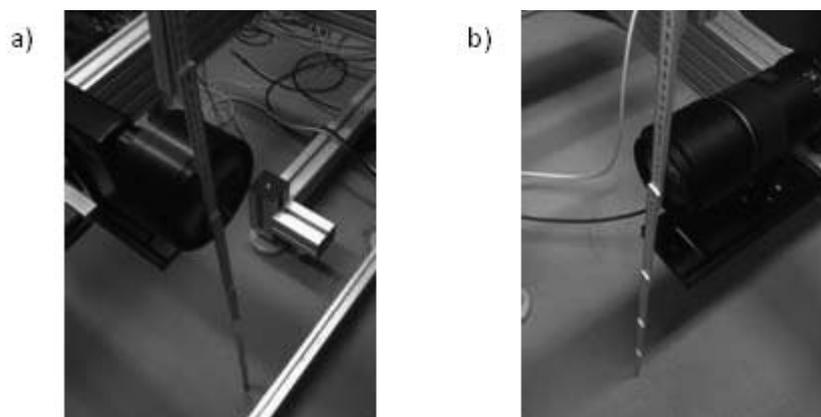


Abbildung A - 25: Erste vertikale Ausrichtung der Kamera auf den diffusen Lichtstrahl.

- Einstellen der gewünschten Blendengrösse am Objektiv durch Drehen des Blendrings (Abbildung A - 26; b).

- Überprüfung der Einstellung M (manuell) sowie FULL am Objektiv (Abbildung A - 26; b).

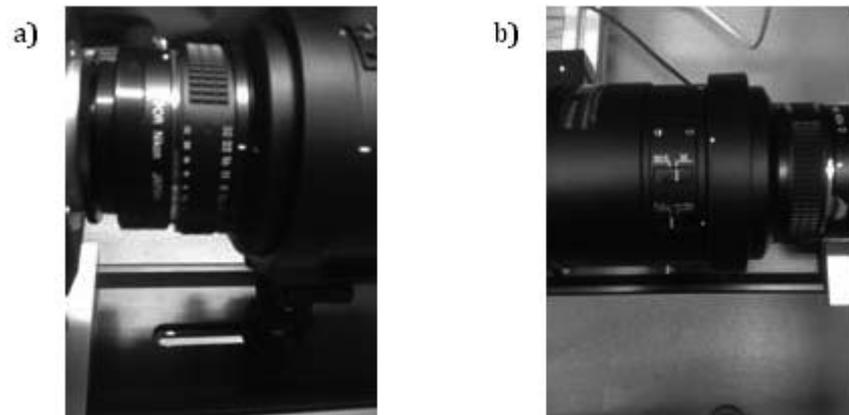


Abbildung A - 26: Blendenwahl sowie benötigte ObjektivEinstellungen.

Nach der ersten groben horizontalen sowie vertikalen Ausrichtung erfolgt anschliessend eine Verfeinerung der Ausrichtung unter Verwendung des diffusen Lichtstrahles. Da diese Ausrichtung bei laufendem Laser durchgeführt wird, müssen die Sicherheitsbestimmungen beachtet werden.

- Wahl des Triggersignales auf „**internal trigger**“ sowie Einstellung 5Hz (Abbildung A - 27).

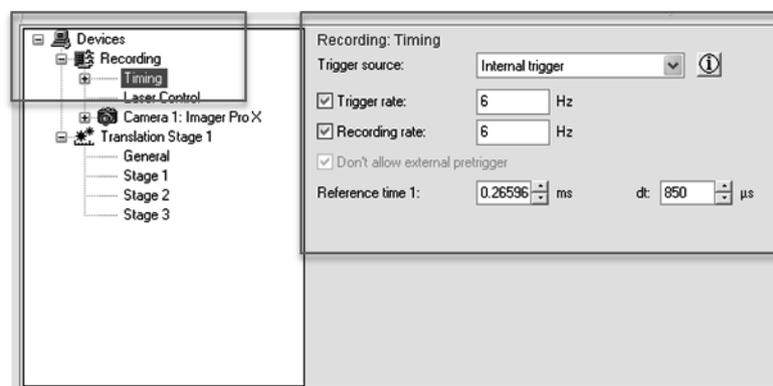


Abbildung A - 27: Triggereinstellungen (DaVis 7.2).

- Verwendung von 10- 15 % Laserintensität (A+B) für die Kameraausrichtung. (Die Laserintensität kann erhöht werden. Es gilt zu beachten, dass bei grösseren Blendenzahlen mit tieferen Laserintensitäten gearbeitet werden muss um eine Beschädigung des CCD- Sensors zu vermeiden).
- Betätigen der Taste „**Grab**“ zum Aufzeichnen von live Bilder sowie Beurteilung der Belichtung der Bilder.
- Falls keine gleichmässige Belichtung der Bilder ersichtlich ist, muss die Kamera Position vertikal (z- Achse) sowie horizontal (y- Achse) variiert werden bis eine gleichmässige Belichtung resultiert.
- Arretierung der Kamera mittels Halterung (Schrauben) an gewünschter Position.
- Der Laser wird auf „**Standby**“ oder auf „**off**“ geschaltet.

Adjustierung der Beleuchtungsoptik

Damit die später aufgezeichneten Referenz- sowie Prozessbilder konstant belichtet werden, wird zuvor eine Adjustierung des Lasers durchgeführt. Dabei wird die Laserintensität schrittweise bis zu einer Sättigung des CCD- Sensors der Kamer erhöht. Der CCD- Sensor gilt als gesättigt, wenn 90% des A/D Konvertermaximums erreicht werden. Da es sich bei der in der Hochschule Wädenswil verwendeten Kamera um eine 4 bit Kamera handelt, sollte eine maximale Sättigung von **1233 counts** nicht überschritten werden. Für die Adjustierung der Beleuchtungsoptik wird wie folgt vorgegangen.

- Inbetriebnahme des Lasers.
- Einstellen der Laserintensität (A + B) auf 0% (Device/ Laser Control).
- Aufzeichnen eines Einzelbildes durch Betätigen der Taste „**Take**“.
- Einblenden der „**Buffer statistics**“ durch betätigen der rechten Maustaste (Abbildung A - 28).

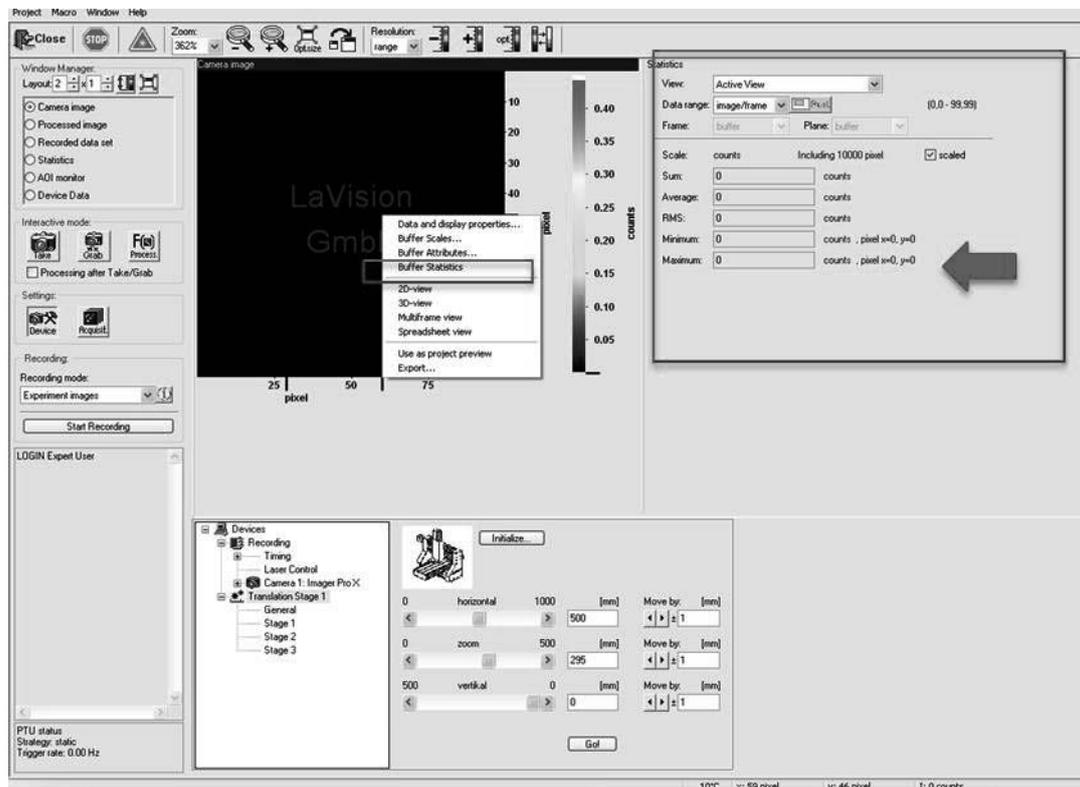


Abbildung A - 28: Vorgehen zum Einblenden und Ablesen der Buffer statistics.

- Ablesen der maximalen counts der Aufnahme unter „**Maximum**“ (Abbildung A - 28, roter Pfeil). Sollte sich im Moment noch auf 0 befinden, da 0% Laserintensität.
- Schrittweise Erhöhung der Laserintensität (A+B) unter „**Laser Control**“ bis zur Sättigung (90% = 1233 counts) (Abbildung A - 29).

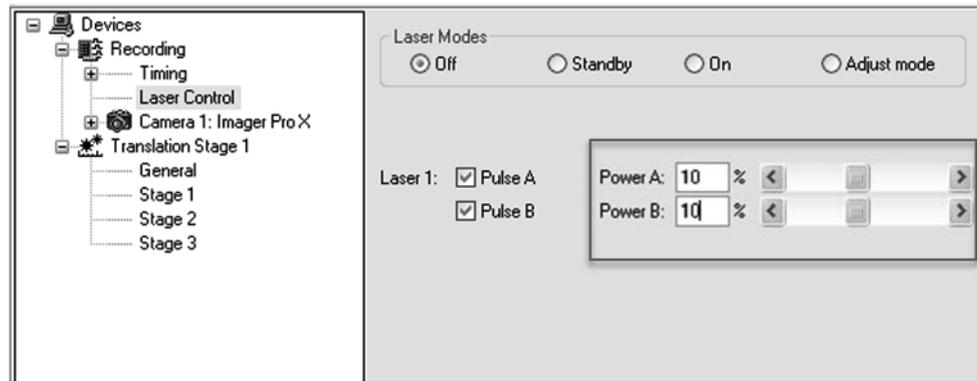


Abbildung A - 29: Erhöhung der Laserintensität (A+B) für die Beleuchtungsadjustierung.

- Die Erhöhung der Sättigung kann mittels den Funktionen „**Take**“ (Einzelbilder) oder „**Grab**“ (Bildserien) durchgeführt werden.

Es gilt zu beachten, dass die Sättigung des Konverters sowie die benötigte Laserintensität abhängig sind von der gewählten Blendengröße. D.h. dass bei grösseren Blendenzahlen tiefere Laserintensitäten ausreichen um eine Sättigung des Konverters zu erhalten. Bei Änderung der Blendengröße muss eine erneute Adjustierung der Beleuchtung durchgeführt werden. Aufgrund dessen sollte zuvor eine Blendengröße gewählt werden, welche während des ganzen Versuches nicht verändert wird.

- Nach Erreichen der Sättigung wird der Laser auf „**Standby**“ oder „**off**“ geschaltet.

Nach Beendigung der Adjustierung kann mit der Kalibration der Skalierung oder einem anderen Punkt fortgefahren werden.

Kalibration der Skalierung

Damit während des „Batch- Processings“ den Blasen aufgrund ihrer Pixelanzahl ein Durchmesser zugewiesen werden kann, muss zuvor eine Kalibrierung der Skalierung durchgeführt werden. Bei der Kalibration der Skalierung wird einer genau definierten Länge eine Anzahl an Pixel zugeordnet. Die Kalibration erfolgt beim QM- 1 Mikroskop durch Einbau einer Skalierungsplatte in den optischen Weg. Eine genauer Beschreibung der Kalibration für das QM- 1 Mikroskop ist dem Benutzerhandbuch (Particle Master Shadow, LaVision) zu entnehmen. Die Kalibration der Skalierung für das 300 mm Teleobjektiv kann mittels eines Gliedermassstabs ohne Einsatz des diffusen Lichtstrahles bei Umgebungsbeleuchtung wie folgt durchgeführt werden.

- Der Gliedermassstab wird etwa in der Fokusebene der Kamera positioniert. (Gliedermassstab sollte vertikal möglichst gerade positioniert werden, so dass der ganze sichtbare Bereich des Gliedermassstabs fokussiert werden kann).
- Ausrichten der Kamera auf den Gliedermassstab durch Bewegen der Traversierung. (Die Steuerung der Traversierung erfolgt mittels Device/ Translation Stage 1 durch Eingabe der Koordinatenwerte oder Verschiebung der Toolbars (Abbildung A - 30).

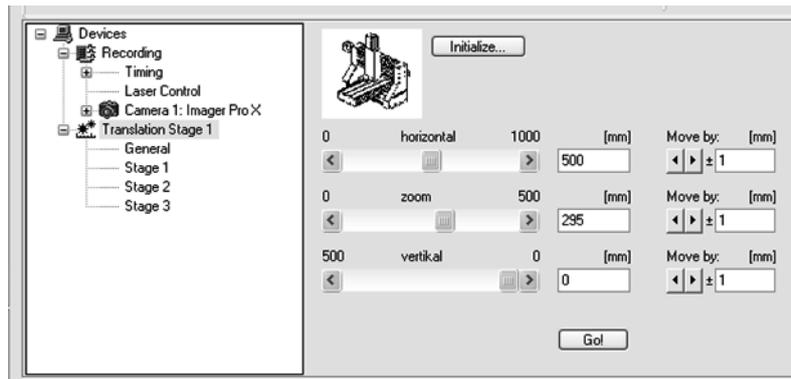


Abbildung A - 30: Verschiebung der Traversierung entlang der x, y, z- Achse.

Beim Bewegen der Traversierung durch den Raum gilt es zu beachten, dass während des Bewegens der Traversierung nicht oder nur bei Gefahr eines Zusammenstoßes mit der Umgebung die Stoptaste gedrückt wird, da ansonsten die Kalibrationsdaten der Traversierung verloren gehen. Nach Verlust der Kalibrationsdaten der Traversierung muss jeder einzelne Nullpunkt (x, y, z- Achse) nochmals einzeln abgefahren werden. Dies kann in gewissen Fällen den Ausbau des Reaktors zur Folge haben.

- Aufzeichnen eines Einzelbildes durch betätigen der Taste „**Take**“.
In dem im Bildbereich erscheinenden Bild sollte nun der Gliedermasstab möglichst scharf erscheinen.
- Falls der Gliedermasstab nicht scharf erscheint wird mittels der Funktion „**Grab**“ (live Bilder) sowie durch Verstellen des Fokus am Objektiv der Gliedermasstab fokussiert. Falls der am Objektiv zur Verfügung stehende Verstellbereich nicht zum Fokussieren des Gliedermasstabs ausreicht, muss die Traversierung in der x- Achse verschoben werden.
- Anschliessend wird der Menüpunkt „**Calibration**“ aufgerufen (Abbildung A - 31).

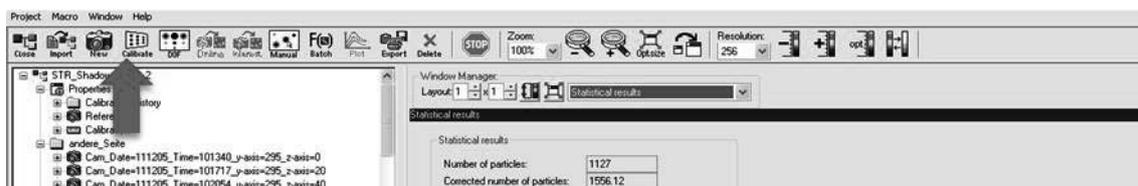


Abbildung A - 31: Taste zum Aufrufen der Skalierungskalibration.

- Im Kalibrierungsmenü wird die Einstellung „**define scale, no image distortion**“ gewählt und durch „**go to next step**“ bestätigt.
- Im nächsten Menüpunkt wird mittels der Funktion „Take“ ein Einzelbild des Gliedermasstabs aufgezeichnet (Abbildung A - 32).

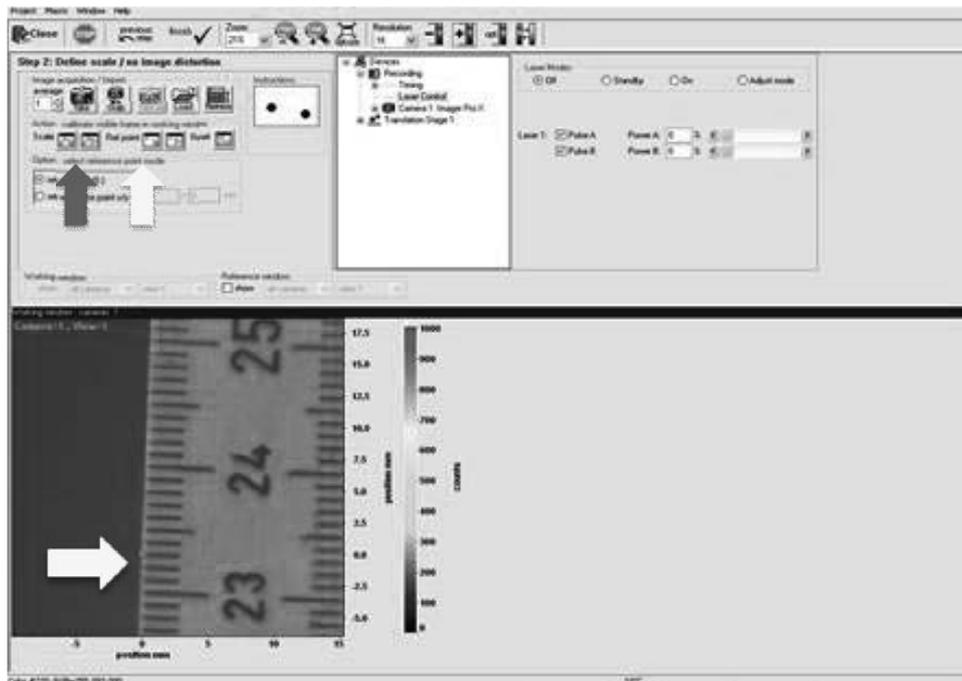


Abbildung A - 32: Kalibrationsmenü der Skalierung.

- Aufrufen des Menüpunktes „**calibration visible fram in workung window**“ (Abbildung A - 32; roter Pfeil)
- Setzen des ersten Nullpunktes an einer Position des Gliedermassstabs. Anschliessend in einem genau definiert Abstand (5mm) einen zweiten Punkt setzen. (z.B bei 24cm und 24.5cm)
- Im anschliessend erscheinenden Dialogfenster dem Pixelabstand zwischen den zwei Punkten den Wert 5 mm zuordnen und durch „**ok**“ bestätigen.
- Aufrufen des Menüpunktes „**Ref. point**“ und setzen des Referenzpunktes an irgend einer Stelle im aufgezeichneten Bild (Abbildung A - 32; gelbe Pfeile).
- Abschliessen und speichern der Kalibration durch betätigen der „**finish**“ Taste.

Aufnahme von Referenzbildern

Das Aufzeichnen von Referenzbildern ist optional und wird nur durchgeführt, wenn die Belichtungsintensitäten während den einzelnen Bildern konstant gehalten werden kann. Falls dies nicht realisiert werden kann, werden die Referenzbilder aus den Prozessbildern berechnet. Die Referenzbilder sollten an den verschiedenen Positionen bei welchen später die Prozessbilder aufgezeichnet werden durchgeführt werden. Dadurch kann garantiert werden, dass jedes Referenzbild unter den gleichen Bedingungen (Reaktorwölbung, Variation der Reaktordicke usw.) aufgezeichnet wird wie später die Prozessbilder. Beim Aufzeichnen der Referenzbilder sollte eine statistisch signifikante Anzahl an Referenzbilder aufgezeichnet werden, welche den Zustand am jeweiligen Messpunkt wiedergibt.

- Der Laser wird in Betrieb genommen.
(Es ist darauf zu achten, dass die Referenzbilder mit der bestimmten Laserintensität aufgezeichnet werden).

- Falls an mehreren Positionen Referenzbilder aufgezeichnet werden, wird die Traversierung unter dem Punkt „**Aquisition**“ dafür programmiert (siehe Benutzerhandbuch).
- Tätigen der Auswahl „**Reference images**“ unter Recoring mode. (Bewirkt, dass die aufgezeichneten Bilder als Referenzbilder erkannt und gespeichert werden).
- Starten der Aufzeichnungen durch betätigen der Taste „Start Recording“.
- Nach beendetem Aufzeichnen der Referenzbilder können diese Prozessiert werden oder es kann mit dem Aufzeichnen der Prozessbilder fortgefahren werden.

Aufnahme von Prozessbilder

Bevor eine Aufzeichnung der Prozessbilder durchgeführt werden kann sollte der Messbereich des Untersuchungsobjektes (Reaktor, Rohrleitung, usw.) festgelegt werden. Aufgrund des Sichtfeldes der gewählten Optik (2.54x2.57 beim 300mm Teleobjektiv) kann anschliessend eine Aufteilung der Untersuchungsfläche durchgeführt werden. Dabei können aufgrund der gewählten Distanzen zwischen den Messpunkten Bildserien mit oder ohne Bildüberlagerung aufgezeichnet werden. Aus der Einteilung der Untersuchungsfläche ergibt sich die Anzahl der Messpunkte. Zum Bestimmen der Untersuchungsfläche sollte diese vorgängig mittels der Traversierung abgefahren werden und die einzelnen Grenzkordinaten (zoom, vertikal) für die Traversierung festgehalten werden. Beim Einteilen der Untersuchungsfläche sollte darauf geachtet werden, dass Einbauten (Rührer, Schläuche, Schweissnähte, usw.) nicht im Bildbereich zu liegen kommen, da diese die Auflösung der Blasengrößenverteilung in diesem Bereich reduzieren bzw. verfälschen.

- Der Laser wird in Betrieb genommen. (Es muss darauf geachtet werden, dass die Aufzeichnungen bei der ermittelten Laserintensität aufgezeichnet werden).
- Unter dem Punkt „**Aquisition**“ wird für die Untersuchungen mehrerer Messpunkte eine Sequenz programmiert. Dazu werden die Start sowie Endkoordinaten der zu untersuchenden Achsen sowie die Schrittgrösse angegeben (Abbildung A - 33). (Siehe Particle Master Shadow)

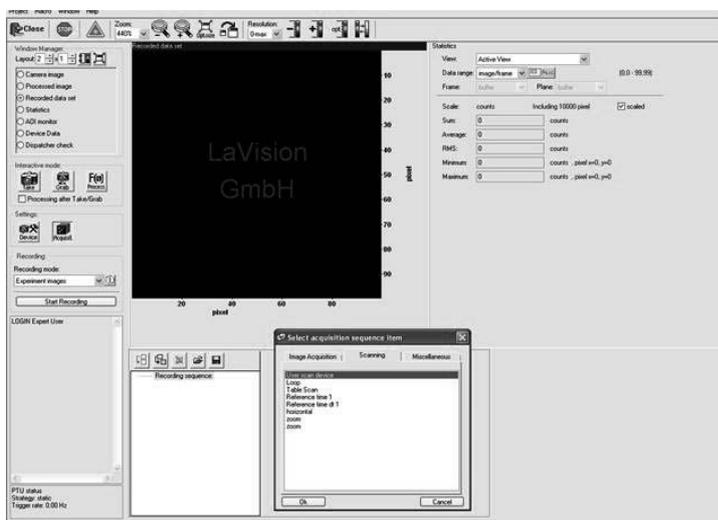


Abbildung A - 33: Programmierung einer Messsequenz unter dem Menüpunkt Aquisition.

- Festlegen der Anzahl der aufzuzeichnenden Bilder sowie deren Belichtungszeit unter „**Aquisition**“. (Damit statistisch signifikante Resultate erhalten werden, wird pro Messpunkt eine Bildserie von 500 Bildern aufgezeichnet).
- Festlegen der Art des Triggersignales unter „**Device/ Timing**“. (Für Untersuchungen bei gleichbleibender Rührerposition wird für das Triggersignal „external random“ ausgewählt. Bei Unterschiedlichen Rührerpositionen wird „internal random“ ausgewählt. Dabei kann die Pulsfrequenz frei gewählt werden).
- Tätigen der Auswahl „**Experimental images**“ unter Recording mode. (Bewirkt, dass die aufgezeichneten Bilder als Prozessbilder erkannt und gespeichert werden).
- Aufwärmen des Lasers für ca. 30 min mittels des „**Adjust**“ mode unter „**Device/ Laser Control**“. Dazu wird das Häkchen bei der „Camera 1“ entfernt sowie die Abdeckung an das Objektiv angebracht. Dies verhindert, dass die Kamera durch den Lichtstrahl beschädigt wird. (Abbildung A - 34)

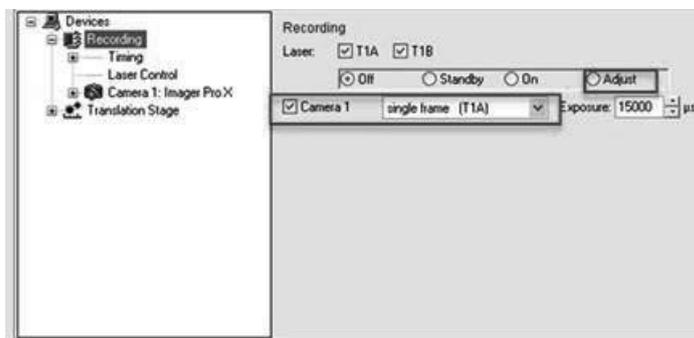


Abbildung A - 34: Adjustmode zum Aufwärmen des Lasers.

- Umstellen des Lasers auf „**Adjust**“.
- Nach dem Warmlaufen des Lasers wird dieser von „**Adjust**“ auf „**on**“ gestellt und das Häkchen der Kamera wieder gesetzt sowie die Objektivabdeckung entfernt.
- Starten der Aufzeichnungen durch betätigen der Taste „**Start Recording**“.
- Nach Beendigung der Messung wird der Laser auf „**Standby** oder „**off**“ geschaltet.

Die Dauer der Messungen kann einige Zeit in Anspruch nehmen und ist Abhängig von der Anzahl der Messpunkte sowie der Prozessbilder und der Triggerung. Nach Beendigung des Aufzeichnens der Prozessbilder können diese wie ausgewertet werden.

Auswertung

Im Nachfolgenden wird die Auswertung der aufgezeichneten Referenz- bzw. Prozessbilder aufgezeigt und beschrieben. Dabei werden die grundlegenden Aspekte der Auswertung der Prozessdaten zum Erhalten der Blasengrößen- bzw. Partikelverteilungen aufgezeigt. Eine genauere Beschreibung der Softwaremöglichkeiten kann den Benutzerhandbüchern (Particle Master Shadow 1105032; DaVis 7.2 Software 1005xxx) entnommen werden.

Auswertung der Referenzbilder

Damit eine Invertierung der Prozessbilder über die aufgezeichneten Referenzbilder durchgeführt werden kann, werden diese zuvor mittels der Software DaVis 7.2 prozessiert.

Dazu wird ein durchschnittlicher Intensitätswert aus allen aufgezeichneten Referenzbildern berechnet. Weitere Auswertungen der Referenzbilder sind in der Regel nicht erforderlich. Je nach Fragestellung können jedoch weitere Auswertungsoptionen getätigt werden. Eine weiterführende Auflistung von Auswertungsmöglichkeiten kann dem Benutzerhandbuch entnommen werden.

- Rechte Maustaste auf die aufgezeichneten Referenzbilder (Ordner Properties/Reference) und Auswahl des Menüpunktes „**Batch- Processing**“ (Abbildung A - 35)

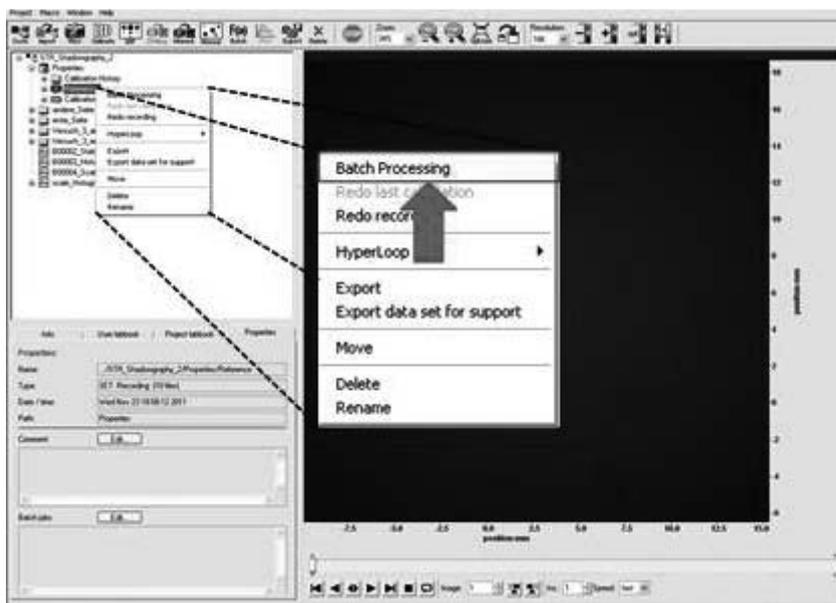


Abbildung A - 35: Batch- Processings für die Referenzbilder.

- Entfernen der vorhandenen „**processing list**“ im neu erscheinenden Fenster
- Tätigen der Einstellungen unter „**Operation 1**“ (statistics; sum average,rms, min, max). (Abbildung A - 36)

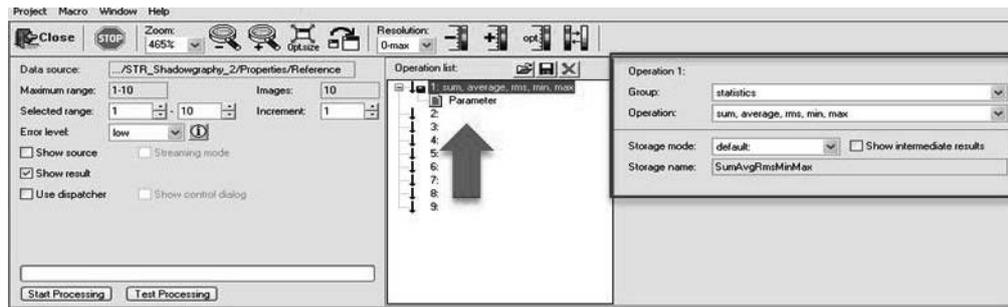


Abbildung A - 36: Processing- Parameter für Referenzbilderauswertung.

- Unter Parameter (Abbildung A - 36; roter Pfeil) werden alle Häkchen bis auf „average“ entfernt.
- Starten des Prozessierens der Referenzbilder durch tätigen der Taste „**Start Processing**“

Die Dauer zum Prozessieren der Referenzbilder kann einige Zeit in Anspruch nehmen und ist dabei abhängig von der Anzahl an Referenzbilder sowie der momentan zur Verfügung stehenden Rechnerleistung. Nach Abschluss des Prozessierens sind die Ergebnisse (gemittelt Referenzbild) im Ordner „**Properties/ Reference**“ ersichtlich. Das berechnete gemittelte Referenzbild kann anschliessend für das Prozessieren der Prozessbilder verwendet werden (optional). Nach Abschluss des Prozessierens der Referenzbilder kann mit der Auswertung der Prozessbilder fortgefahren werden.

Auswertung der Prozessbilder

Damit eine Erkennung über den Segmentationsalgorithmus durchgeführt werden kann, werden die Prozessbilder mittels Subtraktion der Intensitäten vom Referenzbild invertiert. Eine Invertierung der Prozessbilder über das gemittelte Referenzbild kann nur bei konstanter Belichtung angewendet werden. D.h dass die Intensitäten zwischen den einzelnen Laserpulsen (A und B) nicht zu starke Schwankungen aufweisen dürfen. Analog dazu können die Prozessbilder mittels berechneter Referenzbildern invertiert werden. Dazu wird aus jedem Prozessbild ein eigenes Referenzbild berechnet, mit welchem das Prozessbild anschliessend invertiert wird. Durch Wahl dieser Option kann eine Schwankung der Belichtungsintensität bei der Auswertung vernachlässigt werden. Die Auswertung der Prozessbilder kann für jede Bildserie (Messpunkt) einzeln sowie analog dazu in einer Schleife (Hyperloop) durchgeführt werden. Mit der Schlaufenauswertung können mehrere Bildserien (Messpunkte) mit den gleichen Auswertungsparametern während eines Auswertungsprozesses ausgewertet werden. Im Nachfolgenden wird die Einzelauswertung (Batch- Processing) einer Bildserie näher aufgeführt. Die Schlaufenauswertung kann jedoch analog dazu durchgeführt werden. Die einzige Abweichung stellt die Auswahl der auszuwertenden Bildserien (Messpunkte) unter dem Menüpunkt (Hyperloop) dar. Genauere Beschreibungen einzelner Auswertungsparameter (Filter, Thresholds) können dem Benutzerhandbuch (Particle Master Shadow) entnommen werden und werden daher nicht näher aufgeführt. Die vorgeschlagenen Parameterwerte bieten keine Musterlösung, da die Wahl der einzelnen Filter sehr spezifisch und abhängig von der Qualität der Prozessbildern sind. Es handelt sich bei den vorgeschlagenen Parameterwerten um Werte mit welchen bis anhin die besten Resultate erzielt wurden.

- Mittels der rechten Maustaste wird für die auszuwertende Bildserie im Popout- Menü der Punkt „**Batch- Processing**“ gewählt. (Abbildung A - 37; rot umrandet)

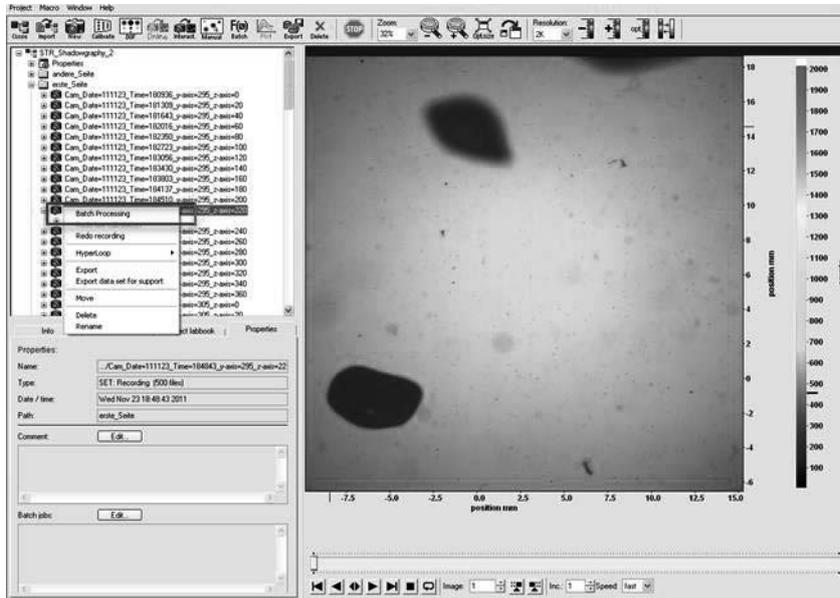


Abbildung A - 37: Batch- Processing für die Prozessbilder.

- Löschen der bestehenden „**processing list**“.
- Tätigen der folgenden Einstellungen unter „**Operation 1**“.

Group = Particle sizing
 Operation = Shadowgraphy
 Storage = default

- Im linken Bildbereich sind nun die folgenden Untermenüs auswählbar (Abbildung A - 38).
 (Multiframe selection, Preprocessing, Particle recognition, Recognition filter, Velocity parameters, Statistical results, Output selection)

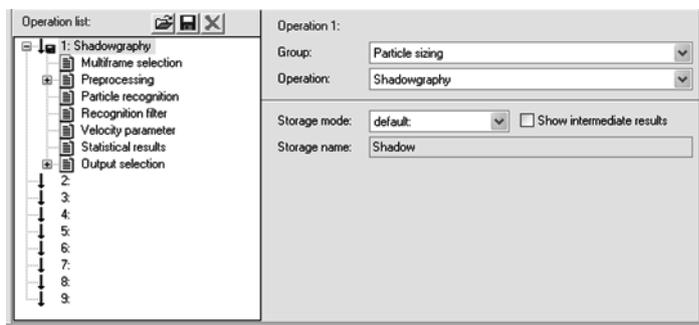


Abbildung A - 38: Untermenüs Shadowgraphyauswertung.

- „**Multiframe selection**“ steht nur bei multiframe images zur Verfügung, welche für die Bestimmung der Blasengrößenverteilung nicht verwendet werden.
- Im „**Preprocessing**“ werden Filter (3x3 avg, 3x3 median, 3x3 peak filter) gewählt mit welchen das Prozessbild vor Invertierung bearbeitet wird (Abbildung A - 39; rot). Dabei

eignet sich vor allem der 3x3 avg Filter zum Reduzieren von Rauschen und zum Glätten der Blasenränder.

- Unter dem „**Preprocessing**“ wird zudem die Art des Referenzbildes („recorded reference file“; „calculate reference image for each source image“) gewählt. (Abbildung A - 39; gelb)

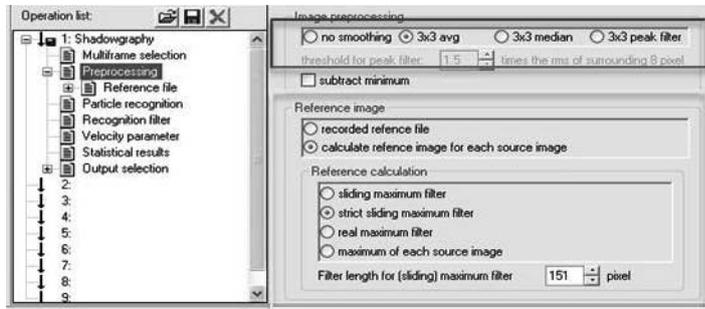


Abbildung A - 39: Auswahl der Preprocessing- Parameters.

- Bei Wahl der berechneten Referenzbilder muss zusätzlich ein Filter für die Berechnung ausgewählt werden. Dabei wird in viele Fällen der „**strict sliding maximum filter**“ eingesetzt, da dieser ein glattes Referenzbild erzeugt.
- Bei Wahl des „**recorded referenc file**“ muss unter dem Punkt „**Reference file**“ der Dateipfad des gemittelten Referenzbildes angegeben werden.
- Der Punkt „**Particle recognition**“ stellt den wichtigsten Punkt für die Blasenerkennung dar. Die hier getätigten Einstellungen (Global threshold, low- high level threshold, AOI expansion) haben einen starken Einfluss auf die Blasenerkennung und dadurch auf die Auflösung der Blasengrößenverteilung. (Abbildung A - 40)

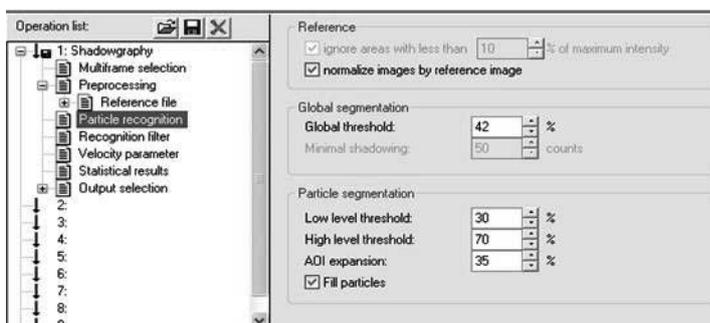


Abbildung A - 40: Auswahl der Particle recognition

- „Global threshold“
Stellt einen Schwellenwert für die erste Segmentation dar. Bildintensitäten welche während der ersten Segmentation unterhalb des Global thresholds liegen werden für die Weiterberechnung nicht mehr verwendet. Der optimale Wert für den Global threshold kann iterativ durch das „Test processing“ einzelner Bilder bestimmt werden. (Bewährt haben sich Werte von 25- 50%)
- „low- bzw. high level thresholds“
Der low level threshold stellt den unteren Intensitätsschwellenwert bei der zweiten Segmentation dar. Analog dazu stellt der high level threshold den oberen Intensitätsschwellenwert dar. Es gilt zu beachten, dass die Summe des low sowie high

level thresholds nicht grösser als 100% betragen darf. Des Weiteren muss beachtet werden, dass je grösser die Differenz zwischen dem high und dem low levelthreshold gewählt wird, desto grösser werden diese zwei Flächen voneinander abweichen. Dies trifft besonders bei Blasen auf, welche sich nicht in der Fokusebene befinden. Dies kann zu Abweichungen bei den Berechnungen führen. Die Wahl des low sowie high level threshold muss für jeden Fall einzeln durch das „Test processing“ beurteilt werden. (Bewährte Einstellungen sind 30%/ 70% bzw. 40%/ 60%)

- „AOI expansion“
Der AOI Expansionsfaktor definiert den Wert mit welchem die „Area Of Interest“ bezogen auf die resultierende Fläche aus der ersten Segmentation expandiert wird. Dieser liegt in der Regel zwischen 10- 40% kann jedoch während dem „Test processing“ überprüft und gegebenenfalls angepasst werden.
- „fill particles“
Die Funktion „Fill particles“ wird für die Untersuchung der Blasen angewendet, da diese in der Mitte aufgrund physikalischer Eigenschaften (Lichtdurchlass) eine andere Intensität aufweisen.
- „Recognition filter“
Unter dem Punkt „Recognition filter“ stehen folgende Filter zur Verfügung:
 - maximum low level area (% of high level area)
 - minimum area (pixel)
 - maximum area (mm x mm)
 - minimal centricity (%)
 - Height (mm)
 - Width (mm)
 - remove particles touching the image border
- Mittels diesen Filtern können gewisse Blasen bzw. Partikelgrössen ausgeschlossen werden. Die gewählten Filtereinstellungen sind sehr spezifisch und abhängig von der Fragenstellung der Untersuchung und müssen dadurch individuell durchgeführt werden. Es empfiehlt sich jedoch die Einstellung „remove particles touching the image border“ auszuwählen. Dadurch werden nur Blasen für die Berechnung der Blasengrössenverteilung verwendet, welche den Bildrand nicht schneiden und dadurch vollständig abgebildet werden.
- „Velocity parameter“
Die Parameter unter dem Punkt „velocity parameter“ werden nur bei Doppelbildaufnahme verwendet. Da für die reine Blasengrössenverteilung keine Doppelbilder aufgezeichnet werden, wird darauf nicht näher eingegangen.

- „Statistical results“
Im Punkt „statistical results“ kann die Klassenbreite sowie der Datenbereich für das Histogramm (Blasengrößenverteilung) definiert werden. Diese wird je nach Fragestellung individuell definiert.
- „Output selection“
Unter „Output selection“ werden die verschiedenen benutzerdefinierten Histogramme, Scatterplots sowie die verschiedenen Prozessbilder während den Segmentationsprozessen ausgewählt. Die dort vorgenommenen Einstellungen sind abhängig von der Fragestellung. Es gilt jedoch zu beachten, dass je nach Auswertung sowie der Art der aufgezeichneten Prozessbilder (Einzelbild, Doppelbild) nicht alle Resultate ausgegeben werden können.
- Durch betätigen der Taste „Start processing“ wird das Processing für alle Prozessbilder durchgeführt.
- Das Processing kann einige Zeit dauern. Dabei hängt die Dauer des Processings von der Anzahl der Prozessbilder sowie Messpunkten und der momentan zur Verfügung stehenden Rechnerleistung ab und kann je nachdem mehrere Stunden bis Tage beanspruchen.

Mitgeltende Unterlagen

- Benutzerhandbuch (Particle Master Shadow; 1105032) der Firma LaVision
- Benutzerhandbuch (DaVis 7.2 Software) der Firma LaVision
- Benutzerhandbuch BIOSTAT CultiBag STR (Sartorius Stedim Biotech)
- Jossen, V. 2012. Bestimmung der Gasblasengrößenverteilung in einem modernen Zellkulturbioreaktors mittels PIV/Shadowgraphy. ZHAW. *Nicht veröffentlicht.*

Anhang E: Kultivierung von CHO-Zellen im BIOSTAT® STR 50 L und S.U.B.

Definitionen und Abkürzungen

AS	Aminosäure
DCU	Bezeichnung der Sartorius Stedim Biotech-Steuerung
FFU	Fan-Filter-Units
LDH	Laktatdehydrogenase
MFCs	Multi-Fermentor Control System
Rpm	Rotation per Minute
BPC	Bioprocess container

Scale-up und Anschlussplan

Zu Beginn erfolgt die Anzucht der Zellen in der T-Flasche 75 cm². Anschliessend werden diese in den vier 1L Schüttelkolben mit einem Arbeitsvolumen 200 mL und diese wiederum in den BIOSTAT® CultiBag RM 20 mit einem Arbeitsvolumen von 10 L transferiert. Letztlich erfolgt die Kultivierung im STR mit einem Arbeitsvolumen von 50 L. Die einzelnen Schritte mit den definierten Kultivierungsparametern sind in Abbildung A - 41 dargestellt und im folgendem detailliert aufgeführt.

1. Zellvermehrung in T-Flaschen mit dem FMX-8 Medium im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.
2. Transferieren der T-Flasche in die 1L Schüttelkolben durch absetzen lassen der Zellen. In den Schüttelkolben, mit einem Startarbeitsvolumen von 150 mL und einer Zellzahl von 0.7*10⁶ Zellen/mL werden die Zellen herangezüchtet, bis sie eine Zellzahl von 4-5*10⁶ Zellen/mL in einem Arbeitsvolumen von 270 mL erreicht haben. Zusätzlich wird die Vitalität überprüft um später eine optimale Kultivierung zu erhalten.
3. Überimpfen der Schüttelkolben in den CultiBag RM 20 mit einem Startvolumen von 2000 mL und einer minimalen Anfangszellzahl von 0.5*10⁶ Zellen/mL. Das Wachstum der CHO-Zellen wird auf drei bis vier Tage geplant. Das Feeding richtet sich nach der resultierten Zellzahl sowie den Stoffwechselprodukten Laktat, Ammonium und Glutamin.
4. Anschliessend folgt die Kultivierung im STR Das Startvolumen beträgt zwischen 20 und 25 L und die Zelldichte soll 0.5*10⁶ Zellen/mL nicht unterschreiten. Die Feedstrategie erfolgt analog zur Kultivierung im CultiBag RM 20. Innerhalb des Kultivierungszeitraumes, welche planmäßig bei vier bis sechs Tagen liegt wird viermal täglich eine Probe genommen. Der Versuch wird bei einer Zellvitalität von 60 % abgebrochen.

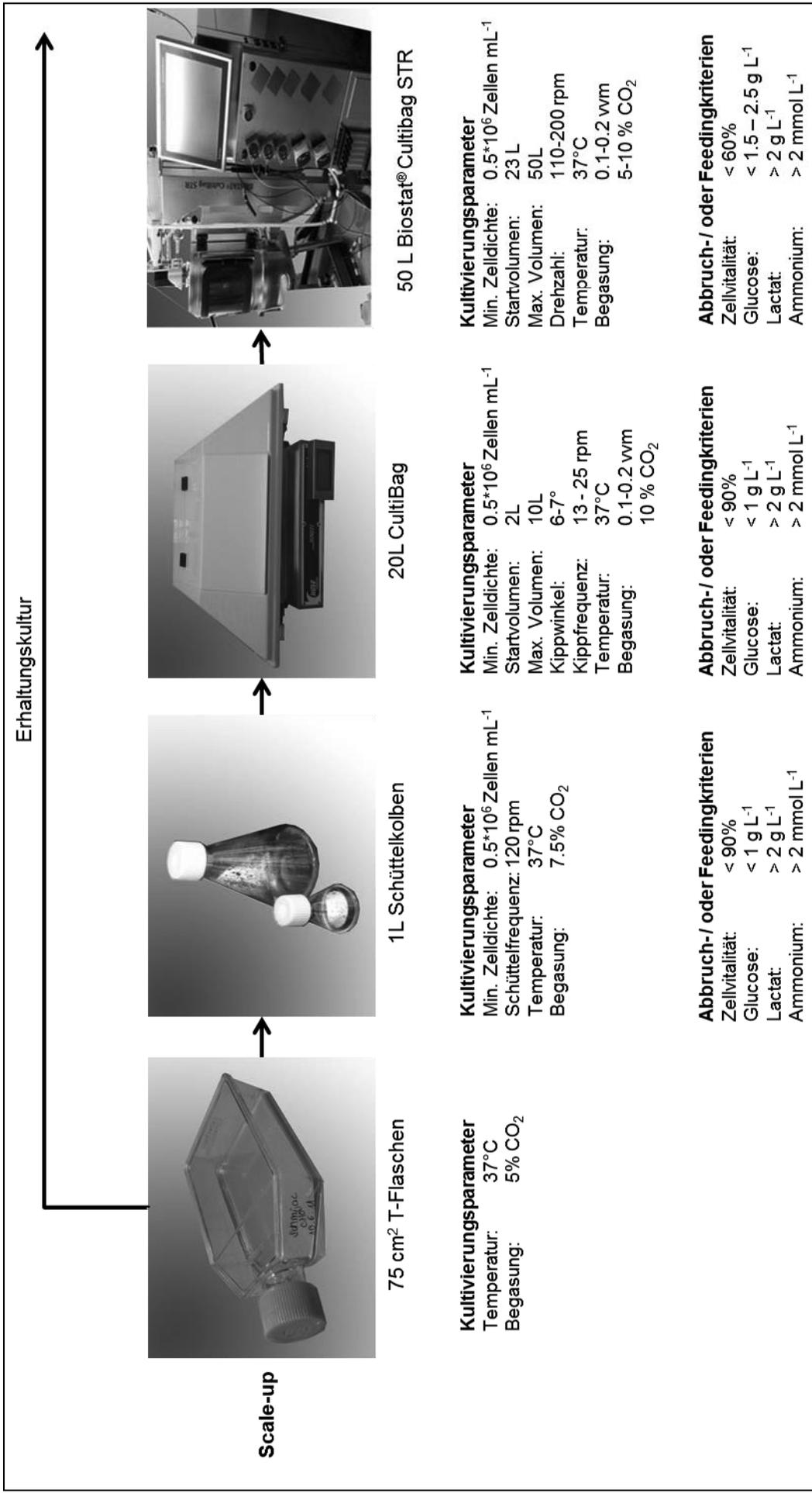


Abbildung A - 41: Scale-up Schritte mit den dazugehörigen Kultivierungsparametern und Abbruch- / Feedingkriterien

Anschlussplan

Der Flexboy des BIOSTAT® CultiBag RM 20 wird durch eine Sterilverbindung gekoppelt. Die beiden Flexboys des STR werden jeweils durch eine Schweißverbindung miteinander verbunden. In Abbildung A - 42 werden die Anschlüsse schematisch dargestellt. Die einzelnen Verbindungsstücke müssen vorerst zusammengebaut, autokaviert und anschliessend unter sterilen Bedingungen zusammengekoppelt werden. Die Verbindungen für das Schweißen werden ebenfalls vorerst autokaviert.

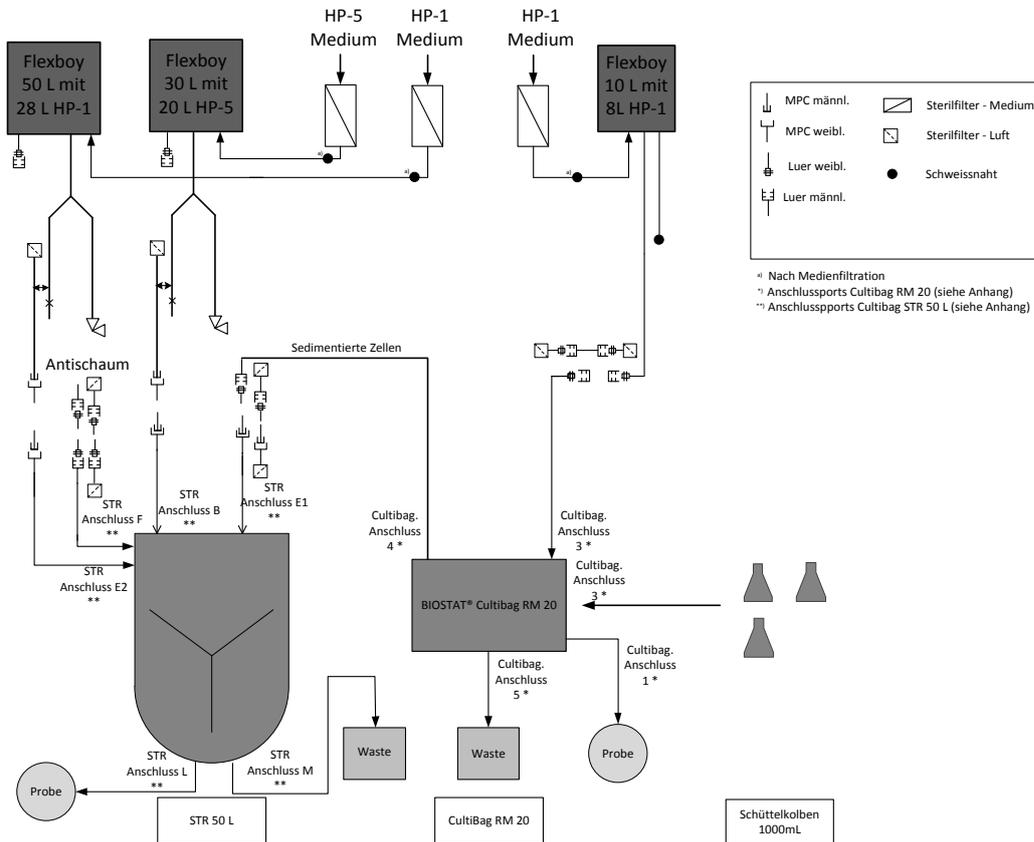


Abbildung A - 42: Anschlussschema der Kultivierungen mit den BIOSTAT® STR

Material

Inokulumvorbereitung

Objekt	Hersteller/Lieferant
1 L Erlenmeyer Flask	Corning/Vitaris
CultiBag RM 20 L optical	Sartorius-Stedim
Einweg-Reaktor Biostat® CultiBag RM inkl. Steuereinheit	Sartorius-Stedim
Filterheizung	Nicht spezifiziert
Lichtleiterkabel für die pH- und O ₂ -Elektroden	Nicht spezifiziert
Omnifix, 50 mL Luer Lock Spritzen	Braun
Schlauchleitungen für Gase	Nicht spezifiziert
STD Flexboy® 10 L	Sartorius-Stedim
T75 (75 cm ² Flask, Canted Neck), Vent Cap	Corning

Kultivierung im BIOSTAT® CultiBag STR 50 L(Sartorius-Stedim)

Objekt	Hersteller/Lieferant
2x Flexboy® 50L (3/8" MPC Male Couplers)	Sartorius-Stedim
Bagtainer®	Nicht spezifiziert
CultiBag STR 200, Sterile Filter Line (2x IN; 1X OUT)	Sartorius-Stedim
CultiBag STR 50L inkl. Mischorgan	Sartorius-Stedim
Einweg-Reaktor CultiBag STR plus 50 L inkl. Steuereinheit	Sartorius-Stedim
Lichtleiterkabel für die pH- und O ₂ -Elektroden	Nicht spezifiziert
MPC-Kupplung (male/female)	MPC-Kupplung (male/female)
Pt100 Temperatursensor	Nicht spezifiziert
Pumpe	Watson Marlow
Schlauchleitungen für Gase	Nicht spezifiziert
Silikonschläuche	Nicht spezifiziert
Sonden-Halterung	Nicht spezifiziert
Wasserschläuche	Nicht spezifiziert

Medien Kits und zusätzliche Reagenzien

Objekt	Hersteller/Lieferant
Antifoam C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schweiz
Aqua purificata	ZHAW
ChoMaster® FMX-8 für 10L	Cell Culture Technologies
ChoMaster® HP-1 Kit für 8L und 20L	Cell Culture Technologies
ChoMaster® HP-5 Kit für 20L	Cell Culture Technologies
G-418-Sulfate	Sigma-Aldrich
L-Glutamine	Fluka
Mikrocid® AF liquid	
Natriumhydrogencarbonat	Fluka
pH-Kalibrierpuffer (pH 4 und 7)	
Pluronic F-68	Sigma-Aldrich
pO ₂ -Elektrolytlösung	
Puromycin	Enzo
Tetracycline	Sigma-Aldrich

Geräte allgemein

<i>Bioprofile Analyzer 100 Plus</i>	<i>Nova Biomedica Corporation</i>
Cedex	Innovatis
Cedex HiRes	Innovatis
CO ₂ - Inkubator	Heraeus
CO ₂ - Schüttelinkubator	MultiTemp
Laminar Flow Bench	Skanair
Magnetrührer	Nicht spezifiziert
NucleoCounter	Digitana
Pipettboy	Integra Biosciences
Pumpe	Chemap
Reinstwassersystem GenPure	TKA
Schweissgerät - Biosealer®	Sartorius-stedim
Schweissgerät - REEWELDER® Thermasept	REED Electronics AG
Waage	Mettler Toledo
Wasserbad mit Thermostat	Biofinet

Verbrauchsmaterialien

<i>Analysegefäß, Bioprofile Analyzer</i>	<i>Flückiger</i>
Cedex Sample Cups	Greiner
Diverse Kabelbinder	Nicht spezifiziert
Eppendorf-Tubes	Eppendorf
HiRes Sample Cups, Sample cups 4mL	Innovatis
Messbehälter	Nicht spezifiziert
Nalgene Flasche 10L / 20L	Nalgene®
NucleoCassetten	ChemoMetec A/S, Dänemark
Reagent A-100	ChemoMetec A/S, Dänemark
Reagent B	ChemoMetec A/S, Dänemark
Omnifix, 10 mL Luer Lock Spritzen	Braun
Pipette 10 mL Costar® Stripette	Corning Incorporated
Pipette 25 mL Costar® Stripette	Corning Incorporated
Pipette 50 mL Costar® Stripette	Corning Incorporated
Schottflasche	Nicht spezifiziert

Durchführung

Die folgende Anweisung behandelt sowohl die Inokulumproduktion über ein Scale-up Verfahren von der T-Flasche bis zur Kultivierung im BIOSTAT® CultiBag STR plus 50 L der Firma Sartorius-Stedim Biotech. Vor der Durchführung muss diese Anweisung gründlich gelesen werden.

Methoden

Die Kultivierung der CHO *XM 111-10* Zellen erfolgt über einen Scale-up Prozess von der T-Flasche über den Schüttelkolben, zum CultiBag RM 20 bis anschliessend zur Kultivierung im 50L Biostat® CultiBag STR. Für die Erhaltungskultur werden ebenfalls T-Flaschen verwendet. Während des Versuches wird mit drei verschiedenen Medien gearbeitet. Die Medienzusätze der jeweiligen Medien sind in Tabelle A - 2 aufgelistet.

Tabelle A - 2: Medienzusätze mit Mengenangaben (für 10 L Medium).

		<i>FMX-8</i>	<i>HP-1</i>	<i>HP-5</i>
G-418-Sulfate	mL/L	4.0	-	-
Tetracyclin	mL/L	2.5	2.5	2.5
Puromycin	mL/L	1.3	-	-
Pluronic (20%)	mL/L	-	10	10

Medienherstellung

Vorerst müssen die benötigten Medien für die einzelnen Kultivierungssysteme hergestellt werden. In den nachfolgenden Kapiteln werden die einzelnen Medien der verschiedenen Kultivierungssysteme inkl. Mengenangabe erläutert. Die Medien müssen Minimum zwei bis drei Tage vor gebrauch hergestellt werden.

T-Flasche

Für die T-Flaschen werden 10L FMX-8 Medium hergestellt gemäß Herstellerinformationen angefertigt.

Die Schottflaschen werden anschliessend auf ihre Sterilität geprüft. Ohne Antibiotikazusätze werden diese 24h bei Raumtemperatur und lichtgeschützt gelagert. Falls keine Trübung oder Farbveränderung festzustellen ist kann eine Sterilität garantiert werden. Die Schottflaschen werden dann im Dunkeln bei 4°C gelagert. Kurz vor gebrauch werden die Medium Zusätze mittels Sterilfilter dazugegeben.

Schüttelkolben

Für die Kultivierung in den Schüttelkolben werden 8L HP-1 Medium gemäß Herstellerinformationen angefertigt.

CultiBag RM 20 L

Für die Kultivierung im CultiBag RM 20L werden 8L HP-1 Medium gemäß Herstellerinformationen angefertigt. Anstelle der sterilen Filtration in die Schottflaschen wird das Medium direkt in den STD Flexboy® 10 L Sterilfiltrier. Dazu wird ein Medienfilter der eine Porengröße 0.2µm oder kleiner besitzt verwendet. Aufgrund der direkten Filtration in den Flexboy® 10L werden die Medienzusätze direkt bei der Medienherstellung hinzugegeben. Um den Sterilitätstest durchzuführen wird der Medienbag bei Raumtemperatur und mit Alufolie zugedeckt 24h liegen gelassen. Tritt keine Trübung oder Farbveränderung auf kann eine Sterilität garantiert werden und der Bag kann lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt werden.

CultiBag STR plus 50L

Für den CultiBag STR plus 50 L werden 28 L HP-1 und 30 L HP-5 high glu gemäß Herstellerinformationen angefertigt.

Zellvermehrung der CHO-Zellen für die Kultivierung im 50 L S.U.B.**Inokulumproduktion in der T-Flasche (75 cm²)***Vorbereitung und Anzucht der CHO-Zellen in der T-Flasche*

1. Bereitstellen von fünf T-Flaschen in die Laminar-Flow-Bench.
2. FMX-8 Medium im Wasserbad auf 37°C erwärmen.
3. Pipettieren von 20 mL FMX-8 Medium (37 °C) unter der Laminar-Flow-Bench in jede T-Flasche.
4. Zugabe von 3 - 4 ml der Zellsuspension (CHO-Zellen, die bereits in einer T-Flasche kultiviert wurden) in die vorbereiteten T-Flaschen.
5. Inkubation der T-Flaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ für zwei bis drei Tage.
6. Mikroskopische Betrachtung (Auflichtmikroskop) der Zellen auf Zellteilung oder evtl. Kontaminationen.
7. Nach zwei bis drei Tage Zugabe von 20 mL FMX-8 Medium in jede T-Flasche.
8. Dazu das Medium im Wasserbad bei 37°C erwärmen und unter der Flow-Bench hinzupipettiert.
9. Nach 2 Tage werden die Zellen passagiert. Dazu gleiches Vorgehen wie oben beschrieben.

Inokulumproduktion im Schüttelkolben (1000 mL)*Inokulation der Schüttelkolben*

1. Steriles Becherglas (Alufolie nicht wegwerfen) unter der Flow-Bench mit 200 mL HP-1 Medium (temperiert) befüllen und die CHO-Zellen aus 4 T-Flaschen vorsichtig zu pipettieren.
2. Becherglas mit autoklavierter Alufolie wieder verschliessen und die Zellen für 3 – 4 Stunden im Inkubator (37°C und 5 % CO₂) absetzen lassen.
3. Überstand mittels Pipette absaugen und 1 mL Probe vom Zellsediment entnehmen.

4. Zellzahl-Bestimmung (Cedex) und Berechnung des notwendigen Inokulum für die Schüttelkolben (Startgesamtvolumen: 150 mL; Start-Lebendzellzahl: $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL.

$$V_{\text{Inokulum}} = \frac{V_{\text{Start SK}} \cdot LZZ_{\text{Start SK}}}{LZZ_{\text{Zellsediment}}}$$

5. 3 Schüttelkolben (1000 mL) mit dem entsprechenden Volumen an HP-1 Medium (37 °C) vorlegen und die sedimentierten CHO-Zellen überführen.
6. Probenahme von 2 mL und Analytik mittels BioProfile und Cedex (= Startprobe).

Kultivierung der CHO-Zellen im Schüttelkolben

1. Kultivierung erfolgt im Inkubator – Infors Orbitron bei 37°C, 7,5% CO₂ und 120 rpm.
2. Probenahme ist aller 24 h vorgesehen (Bioprofile & Cedex), sowie vor und nach dem Feeden.
3. Nach ca. 3 Tagen erfolgt die Zugabe von 50 mL HP-1 Medium pro Schüttelkolben.
4. Am 4. Kultivierungstag ist die Überimpfung der CHO-Zellen in den CultiBag RM bereits möglich.

Inokulumanzucht im CultiBag RM 20

1. Rockeraufbau überprüfen
 - a. Heizplatte muss auf der Rückseite des Rockers angeschlossen sein und die silbrige Fläche des Oberflächentempersensors muss nach oben gerichtet sein.
 - b. Der Temperatursensor muss mit dem Rocker verbunden sein und bei der Kultivierung direkt am CultiBag anliegen.
 - c. Der Rocker muss mit einem Netzkabel und dieser mit einer Stromquelle verbunden sein.
 - d. Der Rocker muss mit der Steuereinheit verbunden sein.
 - e. Eine Abluftfilterwärmematte muss an einer Stromquelle angeschlossen sein und auf seine Funktionalität überprüft werden.
2. Medienvorlage
 - a. Den Bag mit mindestens zwei Liter Medium befüllen. Dazu wird der Bag unter eine Laminarflowbench gelegt und der Stopfen einer Omnifix, 50 mL Luer Lock Spritze entfernt damit diese Spritze an den Anschluss 3 gemacht. Anschliessend wird der Bag mit zwei 1L Schottflaschen mit Medim befüllt. (siehe Abbildung A - 43).
 - b. Der Anschluss 3 wieder schliessen und den Bag zurück auf den Rocker legen.
 - c. Die Zu- und Abluft anschliessen und den Bag mit einem Volumenstrom von 5 lpm befüllen. Dazu im Menu „Main“ auf den Button „Control Gasfl“ (1) drücken und den Luftstrom auf 5 lpm (2) einstellen. Die Regelung auf „Auto“ (3)stellen und mit „OK“ bestätigen.

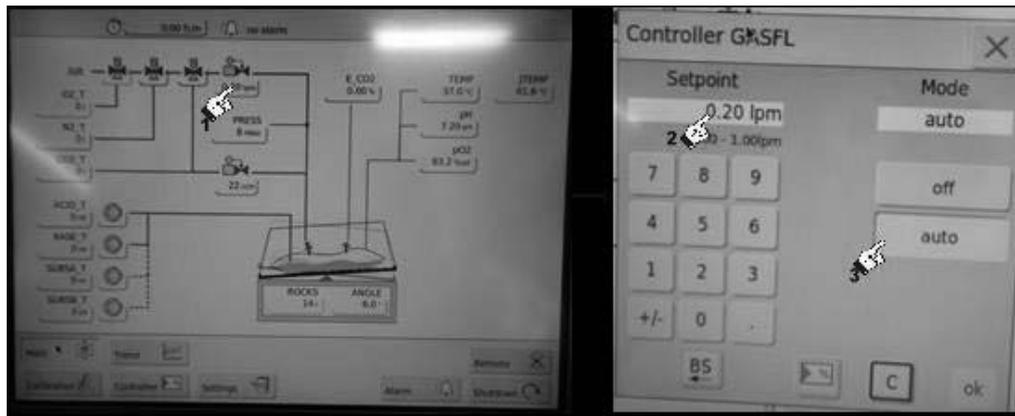


Abbildung A - 43: Befüllen des Bags. (1) Menü für die Belüftung, (2) einstellen des Gasflow in lpm und (3) durch betätigen des „auto“ Botton statet die Belüftung und der Bag füllt sich.

3. Einbau/ -kalibration der Sonden

- a. Die Lichtleiterkabel pH und DO an der Steuereinheit anschließen.
- b. Die Lichtleiterkabel in den dazugehörigen Sensor-Port am Bag bis zum Anschlag führen und mit der Halterung fixieren. (siehe Abbildung A - 44).
- c. Auf dem Display den Botton Calibration wählen und „pH“ wählen. Den Botton „Enter init. Parameter“ wählen und die gegebenen Parameter welche auf Kalibrieretiketten am Bag stehen, eingeben. Alle Daten werden mit „OK“ bestätigt und zum Schluss wird die Messung auf „Measure“ gestellt und Calibration pH wird geschlossen.
- d. Die Kalibrierung des pO₂ wird gemäß Kalibrierung des pH durchgeführt.
- e. Im Menü „Calibration“ bei „pH“ und pO₂“ die „Samp. Rate“ eingeben und mit „OK“ bestätigen. Die Sampling Rate muss je nach Kultivierungsdauer ausgerechnet werden. Um eine optimale Messgenauigkeit sicherzustellen soll während des gesamten Kultivierungsversuch nicht mehr als 10'000 Messungen gewählt werden. Bei einer Kultivierung von maximal vier Tagen kann beispielsweise eine Messung von 60s gewählt werden womit ca. 5800 Messungen gemacht werden.
- f. Die Sonden müssen zwei, besser vier Stunden im Medium eingeweicht werden damit eine optimale Messung garantiert werden kann.
- g. Amplitude des pH und des pO₂ überprüfen. Diese sollte bei beiden oberhalb von 20000 liegen. Falls der Wert unter 20k fällt, muss die Position der Lichtleiterkabel überprüft werden.
- h. Sobald der pO₂ Wert stabil ist muss dieser recalibriert werden. Dazu im Menu „Calibration“ den „pO₂-A1“ anwählen und den Botton „(Re-)Calibrate“ drücken. Anschliessend mit „OK“ bestätigen.
- i. Nachdem Equilibrierung der Sensor-Patches (minimal zwei Stunden im Medium bei konstanter Prozesstemperatur) müssen diese recalibriert werden. Dazu eine Probe beziehen und mit dem pH-Metrom den pH-Wert bestimmen. Den Wert im Menu „Calibration“ beim Button „pH-A1“ im Feld „Re Calibration“ eingeben.

4. Inokulation

- a. Verschließen aller Schläuche mit einer Schlauchklemme. Die Sonden aus dem Bag entfernen und die Messungen auf „Hold“ stellen.

- b. Den Bag aus der Halterung nehmen und unter eine Flowbench legen.
- c. Eine 50 mL Luer-Spritze und das Inokulum ebenfalls in die Flowbench stellen.
- d. Den Port 3 am CultiBag öffnen und mit reichlich Mikrocid absprühen.
- e. Der Stopfen der 50 mL Luer-Spritze herausnehmen und die Spritze mit dem Port 3 verbinden.
- f. Das Inokulum über die Spritze hinzugeben. Gleiches Prinzip wie die Medienvorlage.
- g. Nach Beendigung die Spritze entfernen und den Flexboy® 10 L, mit den 8L HP-1 Medium, anschließen.
- h. Den Bag auf den Rocker legen und einspannen. Den mit Alufolie abgedeckt Flexboy daneben legen.
- i. Die Sonden wie zuvor beschrieben einlegen und Messung von „Hold“ auf „Measure“ umstellen.
- j. Das MFCS starten.
- k. Nullprobe nehmen.



A



B

Abbildung A - 44: Halterung für die DO- und die pH- Sonde (A) sowie die Medienvorlage mittels 50 L Luer-Spritze (B).

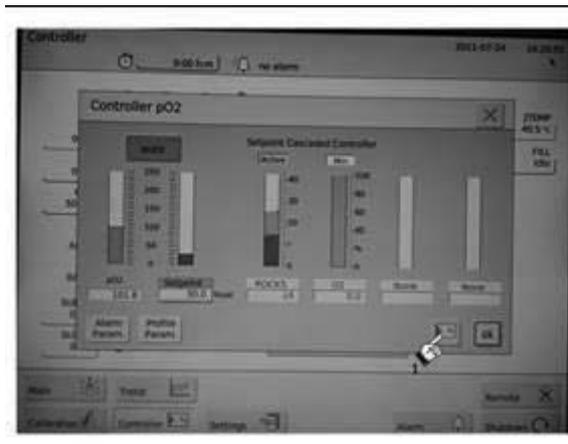
5. Kultivierungsparameter

Die Prozessparameter werden je nach Arbeitsvolumen und Zelldichte angepasst. In der Tabelle A - 3 werden die jeweiligen Volumen inkl. spezifischer Einstellungen dargestellt. Um die Einstellungen vorzunehmen muss im Menü „Controller“ der „pO₂“ angewählt werden. Anschliessend auf den Cascadebutton (Abbildung A - 45; A) drücken und mit dem Passwort 19 die Parameter im Feld „Controller Parameter pO₂“ (Abbildung A - 45; B) gemäss der Tabelle A - 3 eingeben. Zum Schluss mit „OK“ bestätigen.

Tabelle A - 3: Kultivierungsparameter in Abhängigkeit des Volumens

Volumen	Setpoint			
	pO ₂	pH	Kipprate	Kippwinkel
2L	70 - 80%	7.3	15-19	6
4L	40 - 45%	7.3	19-21	6
8L	45 - 50%	7.3	19-21	6 - 7
10L	50 - 55%	7.3	19-21	6 - 7

A



B

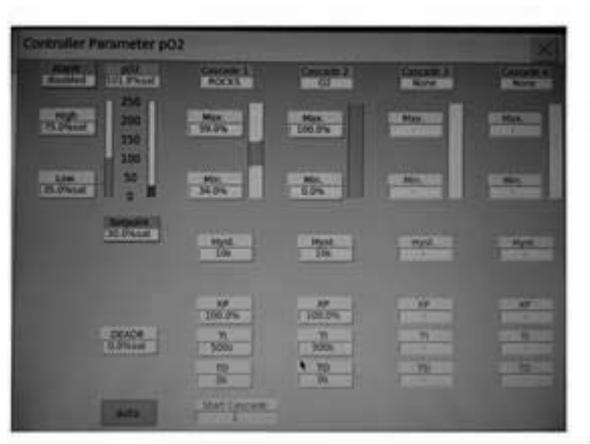


Abbildung A - 45: Einstellung der Kaskadenregelung der Prozessparameter

6. Manuelle Regelung

Falls diese Automatische Regelung nicht funktioniert, was sich durch den pH-Wert erkennen lässt, müssen die Parameter manuell eingestellt werden.

Dazu muss im Menu „Main“ der Gasvolumenstrom von „CO₂_T“ und den „O₂_t“ manuell eingestellt werden. Dies muss auf das Volumen angepasst werden. Der Luftvolumenstrom beträgt 0.2 vvm, bei gleichzeitiger, manueller einzustellender CO₂-Zugabe von 10%. Die automatische Regelung muss ausgeschaltet werden.

Probenahme

1. Vor jeder Probenahme muss die Kipprate kurzzeitig um 3 rpm erhöht werden – bessere Durchmischung.
2. Die Startprobe wird nach dem Erreichen der Temperatur bei 37°C entnommen.
3. 2 Luer-Lock Spritzen (steril; 10 mL) vorbereiten.
4. Schutzkappe am Probenahmeventil entfernen und auf eine mit Mikrozid gereinigte Fläche legen (Öffnung nach oben) und etwas Mikrozid in die Schutzkappe sprühen.

5. Probenahmeventil mit einer „Sprüh-Wolke“ aus Mikrocid benetzen und eine Luer-Lock Spritze befestigen.
6. Wenn die Flüssigkeitsschwelle sich am Probenahmeventil befindet ca. 1 mL Vorlauf entnehmen (Port kurz in die Flüssigkeit drücken – keine Luft einsaugen).
7. Spritze entfernen und erneut das Ventil mit Mikrocid besprühen (nicht direkt, sondern Sprüh-Wolke).
8. Zweite Spritze ankoppeln und analoge Vorgehensweise (4 mL Probe entnehmen)
9. Nach der Entfernung der Spritze Port nochmals mit einer Mikrocid-Wolke reinigen und Verschlusskappe befestigen.
10. Weitere Probenahme erfolgt alle 12 h, sowie vor und nach jedem Feed.

Die Messung der Probe erfolgt mittels NucleoCounter, HiRes und Bioprofile gemäß den Arbeitsanweisungen der mitgeltenden Bedingungen.

Feeding-Strategie

Die Feed-Rate richtet sich nach der vorhandenen Zellzahl und der Metaboliten. Die Feed-Kriterien sowie die Abbruchkriterien sind in Abbildung A - 41 aufgelistet. Bei der Mediumzugabe wie folgt vorgegangen:

1. Bestimmung der Zellzahl und der Metabolite.
2. Waage und Ständer mit Halterung für den Flexboy bereitstellen.
3. Abdeckung des CultiBag RM entfernen.
4. Ständer mit Halterung auf der Waage platzieren.
5. Flexboy aufhängen und Waage tarieren.
6. Schlauchklemmen öffnen und gewünschte Menge Medium einlassen.
7. Anschliessend die Schlauchklemmen schließen, den Bag wieder in die Kiste zurücklegen und den Deckel des CultiBag RM schließen.
8. Probe nehmen und Bestimmung der Zellzahl sowie Metabolite.

Kultivierung im CultiBag STR

Vorbereitung des CultiBag inkl. Mediumanschluss

Damit eine Kontaminationsgefahr möglichst gering gehalten wird, müssen vor der Installation des CultiBag in den STR die Medien angeschlossen werden.

1. Karton öffnen, Inhalt entnehmen und entfernen des Kartons.
2. Bagtainer mit Medienbags unter den FFU stellen.
3. Entfernen der schwarzen Schutzfolie des Bags unter dem FFU.
4. Entfernen der Schutzfolie von den notwendigen Schläuchen und sofortiges schließen aller Schlauchklemmen.
5. HP-1 Mediumschlauch mit dem Bag am Anschluss E2 unter sterilen Bedingungen verbinden.
6. HP-5 Mediumschlauch mit dem Bag am Anschluss B unter sterilen Bedingungen verbinden.
7. Antischaumschottflasche mit dem Bag am Anschluss F unter sterilen Bedingungen verbinden.
8. Ab-/ Zuluftfilter anschließen.

Installation des CultiBag

Bevor der CultiBag installiert wird muss der Motorarm auf seine maximale Höhe gebracht werden. Hierfür ist die Feststellbremse zu lösen und die Höheneinstellung zu ändern. Den Verschluss der Bag-Halterung (Abbildung A - 46 (4)) sowie den Bodenauslass (Abbildung A - 46 (5)) öffnen. Tri-Clamp an der Magnetkupplung entfernen.

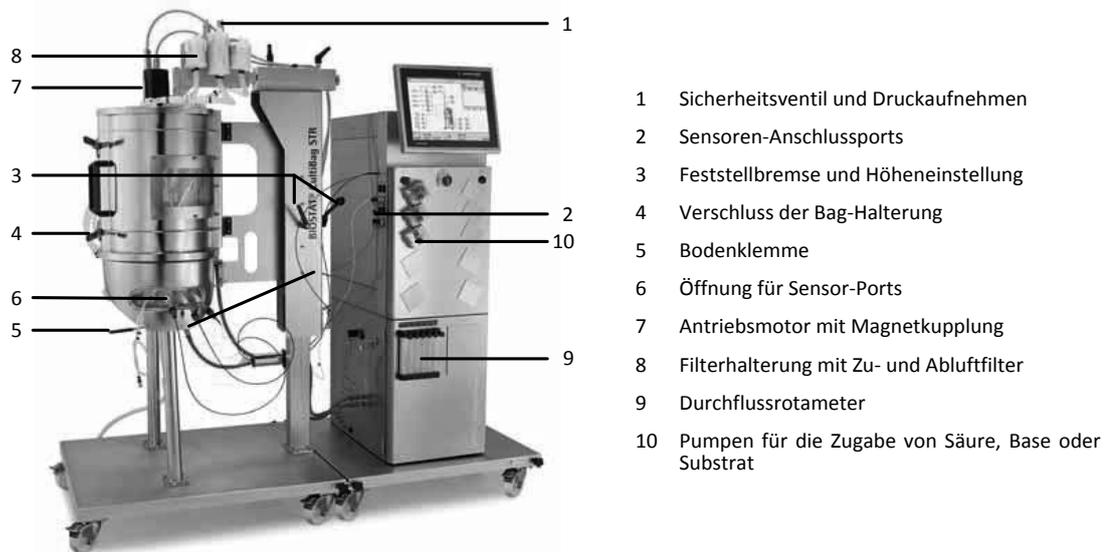


Abbildung A - 46: Komponenten des BIOSTAT® CultiBag STR plus 50 L.

- Für die weiteren Arbeiten werden zwei Personen benötigt.
- Der Auslassschlauch wird durch den Bodenklemme geführt und
- anschliessend wird der CultiBag auf die Bodenklemmen-Halterung gesetzt. Die Klemme für den Schlauch muss möglichst weit oben montiert werden, damit der Platz für das Absetzen der Zellen möglichst gering ist.
- Den CultiBag so ausrichten, dass die Sensor-Ports in die Richtung der vorgesehenen Öffnung (Abbildung A - 46 (6)) zeigen.
- Schließen der Bodenklemme. Dabei sollte die Bodenklemme die Bag-Halterung umschließen.
- Für das Absenken des Motors muss der CultiBag nach unten gedrückt werden, da er sonst aus der Bodenablass-Halterung gezogen wird.
- Vorsichtig absenken des Motorarms (nach Lösen des Feststellhebels; (Abbildung A - 46 (3))) bis kurz oberhalb der CultiBag-Magnetkupplung (Abbildung A - 46 (7)), um ein Stauchen des Rührorgans zu vermeiden.
- Beide Magnetkupplungen aufeinander ausrichten.
- Weiteres Absenken des Motorarmes bis beide Kupplungen drucklos aufeinander liegen.
- Position des Motorarmes mit der Feststellbremse (Abbildung A - 46 (3)) fixieren.

Sterilverbindungen

Nach erfolgter Montage des Bags im Bag-Halter sind die Filter und deren Heizung am Filterhalter des Motorarmes zu installieren, bzw. am Tower anzuschließen. Im CultiBag-STR-Lieferumfang sind jeweils zwei Zuluft (kleinere Filter) und ein Abluftfilter (größerer Filter) enthalten. Die Filter werden gemäß Abbildung A - 46 (1) an die entsprechenden Positionen über Sterilverbindungen angeschlossen. Nachfolgend wird die sterile Verbindung anhand des Zuluftfilters für den Kopfraum aufgezeigt.

- Vorsichtiges Entfernen der Schutzhülle des Zuluftfilters und nachfolgendes schließen aller Schlauchklemmen.
- Der Zuluftfilter für den Kopfraum wird an der Position A (siehe Abbildung A - 46 1) angebracht.
- Schutzkappen der Verbindungsenden entfernen.
- Die zueinander passenden Verbindungsenden in beide Hände nehmen und so ausrichten, dass die Blattenden zum Körper zeigen (beiden Blattenden müssen gleichlang sein).
- Das Filterende wird vorsichtig in die Führungsschiene des CultiBag-Endes eingeführt, bis ein deutliches „Knacken“ zu hören ist. Ist dies erfolgt, sind zwei Arretierstifte eingerastet. Die Arretierstifte sind am oberen Ende zu sehen und müssen eine gleiche Länge aufweisen. Beide Enden lassen sich nicht mehr voneinander trennen.
- Die Papierstreifen vorsichtig und mit gleicher Kraft aus der Verbindung ziehen. Werden die Papierstreifen nicht gleichzeitig herausgezogen, ist keine sterile Verbindung gewährleistet.
- Abschliessend wird die durchsichtige Schutzkappe auf die sterile Verbindung gesetzt und verschraubt.
- Das anschließen des Zuluftfilters am Sparger (Abbildung A - 46 1, Position D) und des Abluftfilters (Abbildung A - 46 1, Position H1) wird identisch durchgeführt. Sorgfältige und exakte Vorgehensweise sind besonders bei den Sterilverbindungen wichtig, **da bei falscher Handhabung keine weitere Sterilität** des CultiBag gewährleistet ist.
- Die Zuluftfilter in die äusseren Positionen der Filterhalterung setzen (Abbildung A - 46 (8)).
- Die Filterheizung um den Abluftfilter montieren und mit den Klettbandern fixieren.
- Das Kabel mit dem vorgesehenen Port (Kontrolleinheit) verbinden.
- Abluftfilter in mittlere Position der Filterhalterung setzen.
- Auf Knicke in den Schläuchen achten und beheben.

Begasung des Bag's

Nach sachgemäßem Anschluss der Filterstrecken (Kopfraum, Sparger und Abluft) werden diese für die Begasung des Bag's, sozusagen zum ersten befüllen, genutzt.

- Offenes Silikonschlauchende am Druckventil mit dem Zuluftfilter für den Kopfraum verbinden.
- Offenes Silikonschlauchende am Spargerausgang (2 m langer Schlauch von der Kontrolleinheit) mit dem Zuluftfilter des Spargers verbinden.
- Der Ausgang des Abluftfilters bleibt offen.
- Öffnen der Schlauchklemmen für Kopfraum und Sparger.
- Manuelle Begasung mit Air über den Kopfraum-Zugang am Kontrolldisplay (Abbildung A - 47; A).
 - Im Hauptbildschirm „Main“ das Feld „AIR-OV1“ drücken.
 - Im aufgehenden Fenster den Volumenstrom 5 L/min (Maximum) über das Ziffernfeld eingeben.
 - Den Modus auf „Auto“ stellen.
 - Mit OK bestätigen.
- Manuelle Begasung mit Air über den Sparger-Zugang am Kontrolldisplay (Abbildung A - 47; B).
 - Im Hauptbildschirm „Main“ das Feld „AIR-SP1“ drücken.
 - Im aufgehenden Fenster den Volumenstrom 5 L/min (Maximum) über das Ziffernfeld eingeben.
 - Den Modus auf „Auto“ stellen.
 - Mit OK bestätigen.

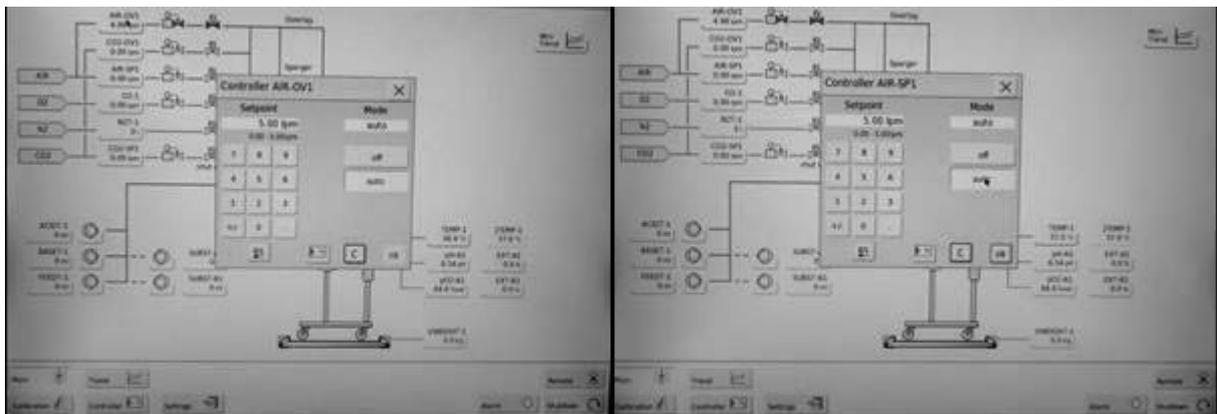


Abbildung A - 47: Manuelle Begasung vom Kopfraum (A) und dem Sparger über das Kontrolldisplay (B).

- Öffnen der Schlauchklemmen für die Abluftstrecke wenn der Bag seine annähernde Form erreicht hat.
- Nach dem Aufblasvorgang die Begasung ausstellen.
 - Im Hauptbildschirm „Main“ die Felder AIR-OV1 bzw. AIR-SP1 aufrufen.
 - Den Modus auf „off“ stellen.
 - Mit OK bestätigen.
- Abschließende Justierung des Bags im Bag-Halter.
- CultiBag so ausrichten, dass die Sensor-Ports sich mittig in der dafür vorgesehenen Öffnungen des Bag-Halters befinden (Abbildung A - 46; 6).
 - Bei massiver Ausrichtung die Bodenklemme öffnen (Abbildung A - 46; 4).
 - CultiBag justieren und
 - Bodenklemme schließen (Abbildung A - 46; 4).
- Mit einer Triclamp-Klemme die Magnetkupplung des Motors und des CultiBag fixieren (handfest anziehen) (Abbildung A - 46; 4).

Die Position des Mischorgans wird nach dem exakten Justieren des Bag ausgerichtet. Wird das Mischorgan über den Motorarm zu tief fixiert, reibt die Halterung des Mischorgans auf dem Bag-Bodenablass, was die frühzeitige Zerstörung des Bag zur Folge haben kann. Abermals eine zu hohen Fixierung das Mischorgan aus seiner Halterung bzw. den Bag aus der Bodenklemme ziehen.

- Manuelle Einstellung der Rührerdrehzahl über das Kontrolldisplay (Abbildung A - 48).
 - Im Hauptbildschirm „Main“ das Feld „STIRR-1“ drücken.
 - Im aufgehenden Fenster die Drehzahl auf 25 rpm über das Ziffernfeld eingeben.
 - Den Modus auf „Auto“ stellen.
 - Mit OK bestätigen.
- Mischorgan sollte gleichmäßig drehen.
- Die Feststellbremse lösen und den Motorarm langsam absenken. Bei der Rushton-Turbine muss der Motorarm bei maximaler Senkung um 5-10 mm angehoben werden.
- Sobald ungleichmäßige Rotation auftritt, sofort den Motorarm anheben.
- Mit der Feststellbremse fixieren.
- Überprüfen der Rotation bei einer Rührerumdrehung von 50 und nachfolgend 100 rpm, gegebenenfalls nachjustieren.

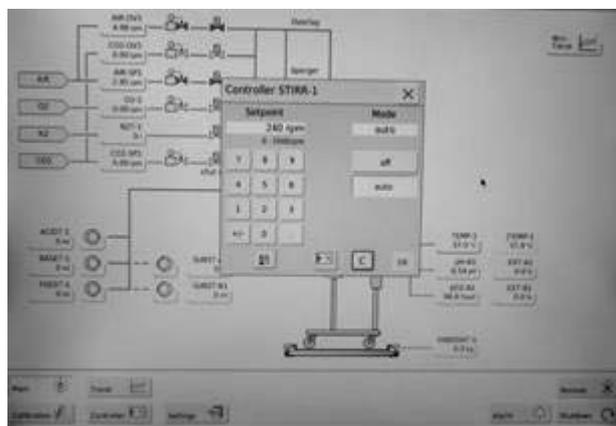


Abbildung A - 48: Manuelle Steuerung für die Rührerdrehzahl.

Medienvorlage

Die Medienvorlage sollte zwei Tage vor der Inokulation erfolgen damit die Sonden eingeweicht werden und das Medium auf 37°C temperiert werden kann. Zusätzlich kann somit eine Sterilität des Mediums garantiert werden.

- Watson Marlow Schlauchpumpe auf den Bagtainer stellen und am Netzwerk anschließen.
- Schlauch des HP-1 Mediums in die Pumpe einspannen.
- Pumpe auf minimaler Drehzahl laufen lassen und langsam auf die maximale Drehzahl erhöhen.
- 20L in den Bag laufen lassen.
- Anschliessend Pumpe abstellen und der Schlauch aus der Pumpe entfernen.

Anschluss der Sensoren

Im Folgenden wird neben der Installation diverser Sensoren beschrieben. Bei ordnungsgemäßer Installation des CultiBag's sind die integrierten (optischen) Sensor-Ports in der Öffnung zu erkennen (Abbildung A - 49). Neben dem Probenentnahmeschlauch sind die Ports für einen pH-, pO₂ und Temperatur-Sensor vorhanden (Abbildung A - 49)).

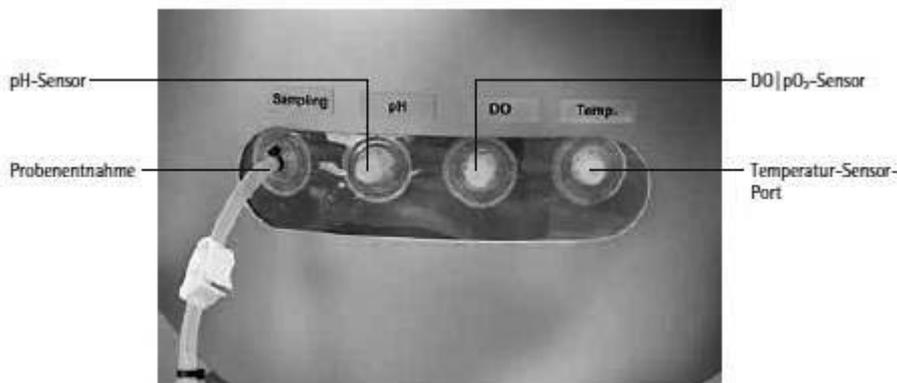


Abbildung A - 49: Aufsicht auf die (optischen) Sensor-Ports im CultiBag, die durch die Öffnung der Bag-Halterung sichtbar sind.

Einbau des Sensoren:

- Der Pt100 Sensor wird vorsichtig bis zum Anschlag in den vorgesehenen Port (Abbildung A - 49) eingeführt.
- Fixieren der Sonden-Halter an den beiden Positionen der Sensor-Ports (Abbildung A - 50).
- Die Lichtwellenleiter vorsichtig durch den Sonden-Halter bis zum Anschlag in den dazugehörigen Sensor-Port am Bag führen (Abbildung A - 50). Der Lichtwellenleiter für

die pH Messung wird mittels blauem und für die pO₂ Messung über grünes Licht gemessen.

- Das Endstück der Sonden-Halter um ca. 3 cm hinausziehen (Feder etwas spannen) (Abbildung A - 50).
- Position des Halters durch das Festschrauben der Kontermutter fixieren (Abbildung A - 50).
- Die Lichtwellenleiter werden abschliessend an die Ports der Kontrolleinheit (beschriftet mit pH und pO₂) angeschlossen (Abbildung A - 50).

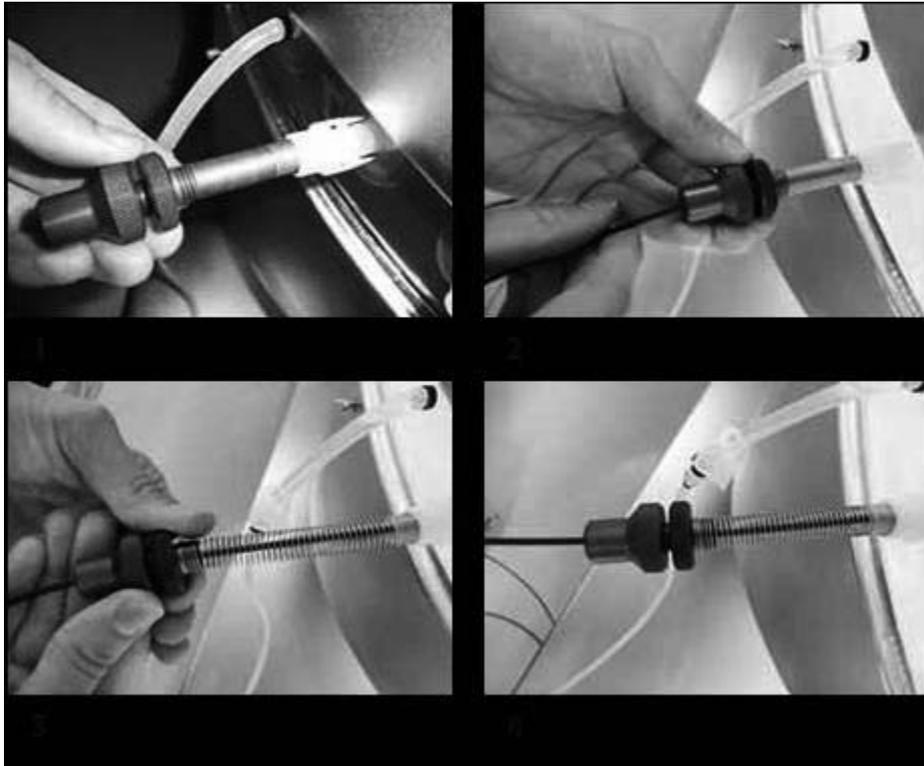


Abbildung A - 50: Vorgehensweise zum Einbau der Lichtwellenleiter.

(Re-)Kalibration der Lichtwellenleiter für die pH- und pO₂-Sensoren

- Den CultiBag mit Medium füllen.
- Den Pt 100 Temperatursensor in den dafür bezeichneten Port einführen.
- Verbindung zwischen dem Sensor und dem DCU herstellen.
- Begasung starten durch einstellen der „AIR-OV1“ im Menu „Main“ auf 5.0 lpm (Abbildung A - 51).

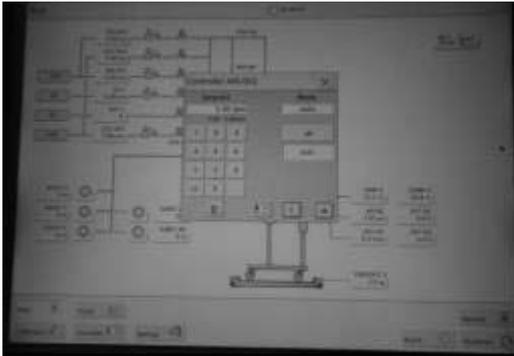


Abbildung A - 51: Einstellung der Begasung.

- Den Setpoint der Temperatur auf 37°C stellen. Dazu im Menu „Main“ den Botton „Temp-1“ wählen und den Setpoint auf 37°C stellen. Mode auf „auto“ stellen und mit „OK“ bestätigen.
- Die Leitleiterkabel am DCU anschliessen und für den pH und das pO₂ in den vorgesehenen Anschlussport legen und mit der Halterung fixieren. Die Positionierung der Lichtleiterkabel muss zwingend überprüft werden. Diese müssen direkt am Plastik anliegen um eine optimale Messung garantieren zu können. Dazu im Menu „Calibration“ den Button „pH-A1“ wählen.
- Sonden kalibrieren durch eingeben der Kalibrationsdaten, welche auf dem roten und gelben Aufkleber am Bag zu finden sind. Dazu im Menu „Calibration“ den „pH-A1“ resp. „pO2-A1“ anwählen. Im Button „Mode“(Abbildung A - 52; 1) „Enter init. Parameters“ (Abbildung A - 52; 2) wählen und Parameter eingeben (Abbildung A - 52; 3 und 4).

Schritt 1



Schritt 2



Schritt 3



Schritt 4



Abbildung A - 52: Einstellungsschritte für die Kalibration der Lichtleiterkabel.

- Im Menu „Calibration pH-A1“ resp. „Calibration pO2-A1“ „Samp. Rate“ eingeben und mit „OK“ bestätigen. Die Sampling Rate muss je nach Kultivierungsdauer ausgerechnet werden. Um eine optimale Messgenauigkeit sicherzustellen soll während des gesamten Kultivierungsversuch nicht mehr als 10'000 Messungen gewählt werden. Bei einer Kultivierung von maximal vier Tagen kann beispielsweise eine Messung von 60s gewählt werden womit ca. 5800 Messungen gemacht werden.
- Amplitude des pH und des pO₂ überprüfen. Diese sollt bei beiden bei über 20000 liegen (Abbildung A - 53). Falls der Wert unter 20k fällt muss die Position der Lichtleiterkabel überprüft werden.

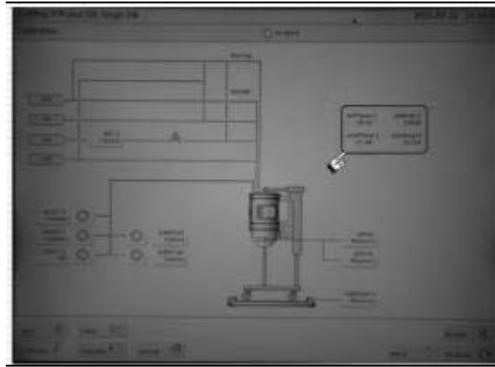


Abbildung A - 53: Überprüfung der Amplitude des pH und des pO₂.

- Sobald der pO₂ Wert stabil ist muss dieser recalibriert werden. Dazu im Menu „Calibration“ den „pO₂-A1“ anwählen und den Botton „(Re-)Calibrate“ drücken. Anschliessend mit „OK“ bestätigen.
- Nachdem die pH-Patches zwei Stunden mit dem Medium in Kontakt waren und die Temperatur konstant ist, muss dieser ebenfalls recalibriert werden. Dazu eine Probe beziehen und mit dem pH-Meter von Mettler Toledo diese messen. Den Wert im Menu „Calibration“ beim Button „pH-A1“ im Feld „Re Calibration“ eingeben.

Steuerung

Die Kultivierungsparameter müssen je nach Volumen angepasst werden. Für die automatische Regelung muss eine Kaskade erstellt werden.

- Im Menu „Controller“ den „pO₂-A1“ anwählen und die Kaskade für den O₂ und die Rührerdrehzahl einstellen (Abbildung A - 54). Für die Kaskadenregelung können weitere Parameter hinzugefügt werden. Die spezifischen Einstellungen für die Kaskade von O₂ und Rührerdrehzahl sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet.
- Den Setpoint des pO₂ ebenfalls gemäß Volumen einstellen.

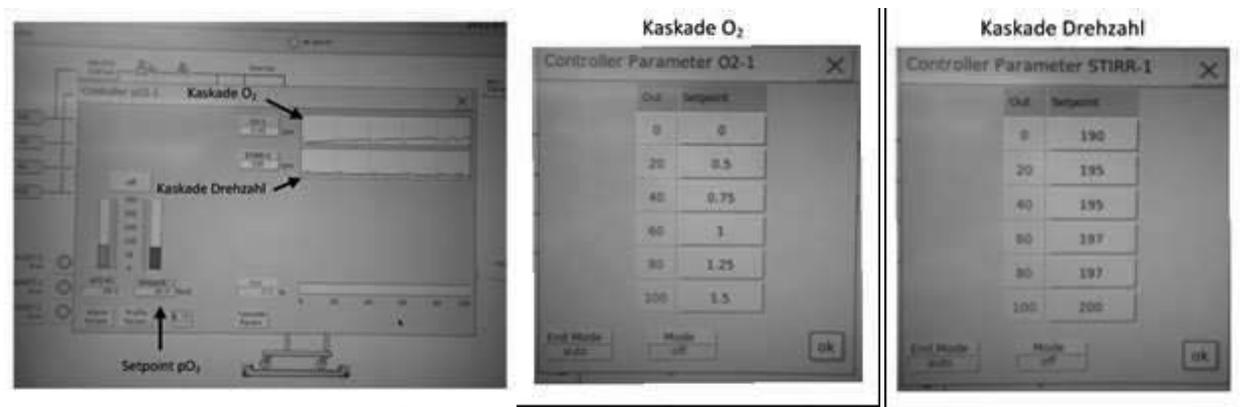


Abbildung A - 54: Kaskadeneinstellung für den O₂ und die Rührerdrehzahl

Volumen: 20L

Setpoint pO₂: 40-50 %

		0	20	40	60	80	100
O2	[lpm]	0	0.25	0.5	0.75	1	1
Drehzahl	[rpm]	110	115	120	130	130	130

Volumen: 35L

Setpoint pO₂: 60-65 %

		0	20	40	60	80	100
O2	[lpm]	0	0.25	0.6	0.9	1	1.25
Drehzahl	[rpm]	125	128	130	135	135	135

Volumen: 50L

Setpoint pO₂: 80 %

		0	20	40	60	80	100
O2	[lpm]	0	0.5	0.75	1	1.25	1.5
Drehzahl	[rpm]	180	183	185	187	187	200

Manuelle Regelung

Falls diese Automatische Regelung nicht funktioniert, was sich durch den pH-Wert erkennen lässt, müssen die Parameter manuell eingestellt werden.

- Dazu muss im Menu „Main“ den „CO2-OV“ auf 0.2 L/min eingestellt werden. Die automatische Regelung muss ausgeschaltet werden.
- Nach 10, 30 und 60 min Probe nehmen und mit dem pH-Meter von Mettler Toledo die Probe messen. Dieser muss konstant beim 7.3 ± 0.1 sein. Ist dies nicht der Fall müssen die Parameter der Gaszufuhr angepasst werden.

Inokulation

1. Vorbereitung des Inokulum

- Ständer und Halterung unter den FFU stellen.
- Steuerung des CultiBag RM 20 ausschalten.
- Alle Schläuche des Bags mit einer Klemme verschließen.
- Zuführende Schläuche entfernen.
- Bag aus dem Rocker nehmen und am Ständer im FFU aufhängen.
- Bag mit Alufolie abdecken und Zellen zwei bis vier Stunden absetzen lassen.
- Nach Minimum zwei Stunden überstehendes Medium über den Anschluss 5 (Abbildung A - 56) entfernen.
- Probe der restliche Zellsuspension entnehmen und die Zellzahl bestimmen.

2. Inokulation in den STR CultiBag 50L

- Verbindung für den Zusammenschluss des CultiBag RM 20 und des CultiBag STR 50L unter der Flowbanch öffnen.
- Anschluss 4 am CultiBag RM 20 unter die Flowbanch bringen.
- Ende des Anschluss 4 am CultiBag RM 20 und diese des Verbindungsstücks reichlich mit Mikrocid absprühen.
- Schutzkappen des Verbindungsstück und des Anschlusses 4 (Anhang Abbildung A - 56) entfernen und miteinander zusammenschließen.
- Verbindung mit Mikrocid abspritzen und mit Parafilm umwickeln.
- Zusammenschließen des Anschlusses E1 (Abbildung A - 58) am Verbindungsstück. Dazu gleiche Vorgehensweise wie die letztlichen vier Punkte.
- Nun sind zwingend zwei Personen nötig.
- Alle Schlauchklemmen des Schlauches öffnen und Inokulum durch Höhendifferenz in den Bag laufen lassen.
- Mit der Hand gegen den Bag drücke so dass das Inokulum an der Wand runter laufen kann.
- Sobald der CultiBag RM 20 leer ist alle Schlauchklemmen verschließen und den Bag abschweißen.
- 2 mL Probe nehmen und Zellzahl sowie Metabolite bestimmen.

Kultivierung von CHO XM 111 Suspensionszellen im 50 Liter Single-Use Bioreactor (S.U.B.) der Firma Thermo Scientific

Vorbereitungen für die Kultivierung im S.U.B.

Integrieren des BPC in den Edelstahlcontainer

- BPC vorsichtig aus der Schutzhülle entnehmen und in den Edelstahlcontainer einführen (Stellung der Sondenports beachten).
- Kontrolle ob alle Klemmen geschlossen sind.
- BPC am Rührmotor mittels Klemme fixieren und Rührerwelle einführen.
- Ankopplung der Anschlüsse für Begasung (Sparger & Kopfraum) und Bag vorsichtig aufblasen.
- BPC nochmals Ausrichten (Probenahmeverrichtung, Sondenports; Ernteschlauch) und freie Ecken richtig positionieren; Befestigung über Ankerbügel.
- Einführen des Temperaturmessfühlers (unterhalb des Probenahmeventils).

Vorbereitung der Sonden

- pH-Sonde mit der Steuereinheit BIOSTAT® MD verbinden und über Menü → Calibration → F1 Sonden-Kalibrierung eine 2-Punkt-Kalibrierung mittels Pufferlösung 4 und 7 durchführen (Anleitung der Steuereinheit folgen).
- Überprüfen ob die Membran der pO₂-Sonde unbeschädigt ist und genügend Sondenflüssigkeit vorliegt.
- Sonden-Einheiten aus der Verpackung entnehmen und unter der Sterilwerkbank mit ca. 0.5-1 mL PBS in die Spitze des Sonden-Assembly befüllen und die jeweilige Sonde (pH- und pO₂-Sonde) einführen (Gewinde richtig befestigen).
- Die Sondereinheiten auf dem Autoklavierständer fixieren und autoklavieren.

Vorbereitung des Kulturmediums

- 48 L HP-1 Medium bereitstellen (2x20 L Medienkit + 8 L Kit; Herstellung laut SOP „Medienherstellung ChoMaster HP-1“) + Zusatz von Pluronic und Tetracyclin.
- 2x20 L und 1x10 L FlexBoys unter der Sterilwerkbank über ein Schlauchsystem verbinden und nacheinander mit Medium steril befüllen.
- An den 20 L Medienbags jeweils ein steriles Schlauchstück mit MPC-Kupplung (männlich) anschweißen.
- Nach dem Medientransfer alle Schlauchklemmen schließen und die Bags separat mit Alufolie bedecken.
- Sterilhaltetest für 24 Stunden und bis zum Gebrauch kühl und dunkel lagern.

Einstellung der Setpoints an der Steuereinheit BIOSTAT® MD

- Sicherstellen, dass O₂, Luft, N₂ und CO₂ an der Gasmischstation angeschlossen sind und den Vordruck jeweils auf 1 bar einstellen.

- Für die Kultivierung die jeweiligen Kippschalter an der Gasmischstation auf „auto“ stellen.
- An der DCU den Menüpunkt „Parameter“ wählen und den Setpoint für pH-Wert und Sauerstoffsättigung einstellen (Drehzahl und Temperatur später über die Steuerung am S.U.B. festlegen).
- Für den pH-Wert die Maske unter „pH“ aufrufen und den Setpoint für 7.2 eingeben und mit ENTER bestätigen → mit der Eingabe von 1 und ENTER die Steuerfunktion auf „auto“ stellen.
- Analoge Vorgehensweise bei der Sauerstoffsättigung → Setpoint von 40 % unter dem Punkt pO₂ festlegen

Inokulation

Medienvorlage und Anschluss der Sonden

- Unter der Sterilwerkbank den 20 L FlexBoy über MPC-Kupplung an Port 11 ankoppeln (Abbildung A - 55 und Abbildung A - 59).
- Schlauchklemmen öffnen und Medium zuführen.
- Drehzahl und Temperatur an der S.U.B.-Steuerung einstellen (60 rpm; 37 °C).
- Sonden-Einheit aus dem Autoklavierständer entnehmen und Kappe von Kleenpak-Verbindung lösen.
- Zusammendrücken der Kleenpak-Enden („Klicken“).
- Zur Stabilisierung wird die Kleenpak-Verbindung (Sonde/S.U.B.) in die dafür vorgesehene Halterung platziert.
- Sicherung an der Verbindung (graue Schlaufe) entfernen, Papierstreifen lösen und „Hub“ in die Verbindung drücken (O-Ring-Dichtung).
- Sonde vorsichtig in den Bag einführen – Zusammenschieben des Sonden-Assembly und im Sondenständer am S.U.B. fixieren.
- Kalibrierung der pO₂-Sonde → Menüpunkt Calibration (Achtung Sode muss nach dem Autoklavieren für mind. 5-6 h polarisiert werden - Netzanschluss).

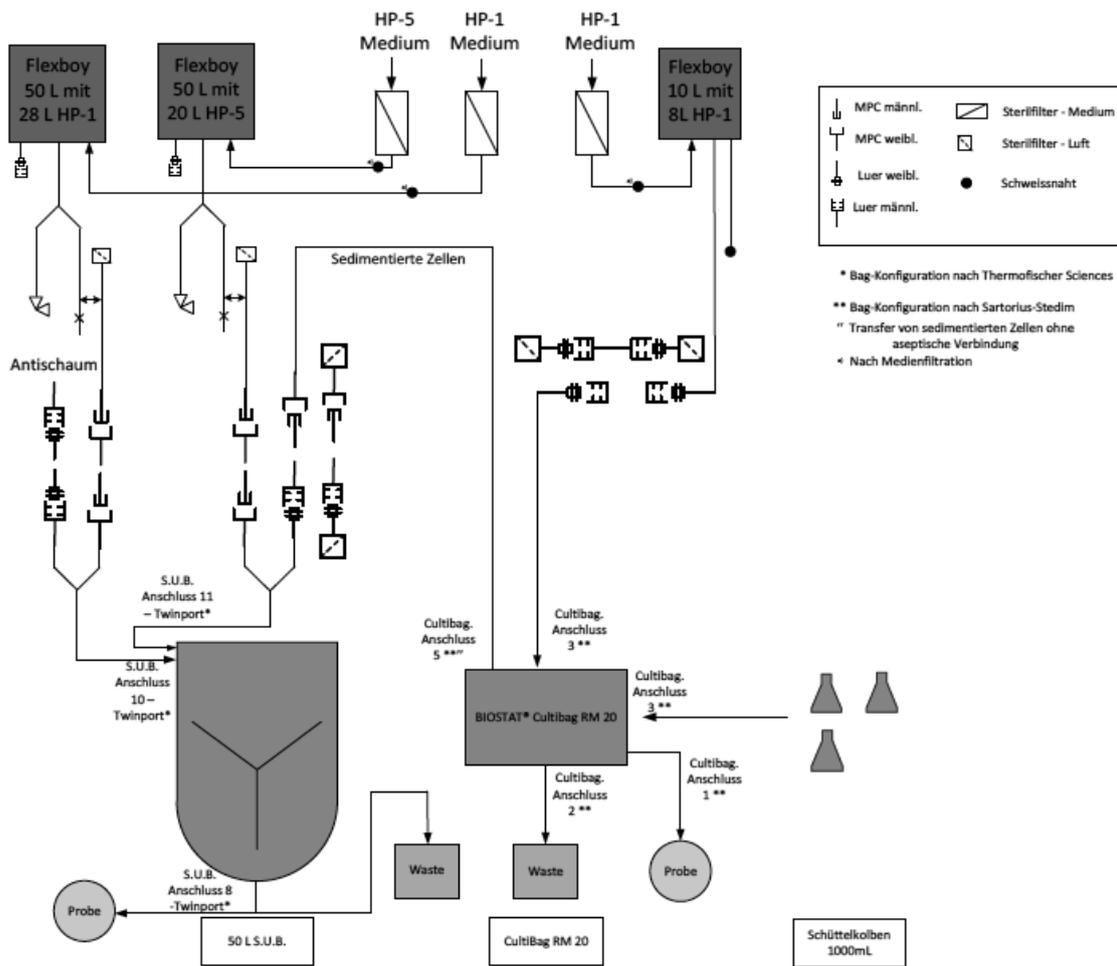


Abbildung A - 55: Anschlussplan für die Kultivierungen im S.U.B. 50 L

Inokulation

- CultiBag von der Plattform entfernen und unter der Sterilwerkbank 3 Liter HP-1 Medium (37 °C) zugeben (Spritze an Port 3 anknüpfen).
- Bag in eine Halterung (Stativ) fixieren und Zellen für 3 - 4 Stunden absetzen lassen.
- Überstand über Port 4 (Luer-Verbindung) abtrennen (ca. 11 Liter).
- CultiBag über MPC-Kupplung (Port 5) an den 8 Liter FlexBoy anschließen.
- CultiBag mit S.U.B. verbinden (Luer-Anschluss – Port 1_{CultiBag} –Port 11_{S.U.B.}).
- Zellen aus dem Bag in den S.U.B. überführen und mit 3 x 1 Liter aus dem Medienbag nachspülen.
- FlexBoy unter der Sterilwerkbank abkoppeln und CultiBag von System abschweißen (Biosealer®).

Kultivierung der CHO-Zellen im 50 L S.U.B.

- Einstellung der Kultivierungsbedingungen (Temp. 37 °C; 80 rpm; Belüftung Kopfraum mit Luft und Sparger mit O₂ und CO₂).
- Für Medientransfer den jeweiligen FlexBoy über MPC-Kupplung anschließen und mittels Gewichtskontrolle das entsprechende Volumen.
- Anpassung der Drehzahl (100 – 150 rpm).
- Nach Beendigung der Kultivierung Zellsuspension über Ernteventil in eine 50 L Flasche überführen und autoklavieren.
- Entfernung der Sonden und Reinigung des Edelstahlcontainers (Mikrozid).

Probenahme für den CultiBag STR und den S.U.B.

- Vor jeder Probenahme muss die Drehzahl um 20 rpm kurzzeitig erhöht werden. Dazu den ersten Wert der Kaskadenregelung „STIRR-1“ im Menu „Controller“ erhöhen (Abbildung A - 54).
- Die Startprobe wird nach Erreichen der Temperatur bei 37°C entnommen
- 2 Luer-Lock Spritzen (steril; 10 mL) vorbereiten
- Schutzkappe am Probenahmeventil entfernen und auf eine mit Mikrozid gereinigte Fläche legen (Öffnung nach oben) und etwas Mikrozid in die Schutzkappe sprühen.
- Probenahmeventil mit einer „Sprüh-Wolke“ aus Mikrozid benetzen und eine Luer-Lock Spritze befestigen
- Wenn die Flüssigkeitswelle sich am Probenahmeventil befindet 10 mL Vorlauf entnehmen.
- Spritze entfernen und erneut das Ventil mit Mikrozid besprühen (nicht direkt, sondern Sprüh-Wolke)
- Zweite Spritze ankoppeln und analoge Vorgehensweise (7 mL Probe entnehmen)
- Nach der Entfernung der Spritze Port nochmals mit einer Mikrozid-Wolke reinigen und Verschlusskappe befestigen-
- Rührerdrehzahl zurück stellen.
- Weitere Probenahme erfolgt alle 8 h, sowie vor und nach jedem Feed

Die Messung der Probe erfolgt mittels NucleoCounter, HiRes und Bioprofile gemäß SOP-S593-BT1173, SOP-S593-BT1236 sowie SOP-S593-BT1180. Für die Messung von extrazellulären Metaboliten, wie bsp. AS oder LDH, in einem externen Analyselabor wird folgendermaßen vorgegangen:

- 2 mL in ein Eppendorfertube füllen.
- Bei 5000 rpm für 3 min zentrifugieren.
- Überstand einfrieren
- Nach Beendigung des Versuches Proben in das externe Analyselabor bringen.

Feeding-Strategie für den CultiBag STR und den S.U.B.

Die Feedrate richtet sich nach der vorhandenen Zellzahl und der Metaboliten. Die Kultivierungsparameter sind in Abbildung A - 41 aufgelistet. Beim Feeden wird wie folgt vorgegangen.

- Schlauchpumpe von Watson Marlow bereitstellen und am Strom anschließen.
- Schlauch in die Pumpe einspannen.
- Pumpe einstellen und mit 10 rpm laufen lassen.
- Mit der Hand gegen den CultiBag drücken damit das Medium an der Wand hinunterlaufen kann.
- Pumpendrehzahl auf das Maximum erhöhen.
- Gewünschte Menge Medium einlassen.
- Bei erreichter der gewünschten Menge Pumpe anhalten und ausschalten.
- Schlauch aus der Pumpe entfernen und jegliche Klemmen schließen.
- Falls der Flexboy leer ist, kann der Schlauch durch schweißen abgetrennt werden.
- Probe nehmen und Zellzahl sowie Metabolitkonzentration bestimmen. .

Mitgeltende Unterlagen

- Manual_Biostat_CultiBagSTR50-d.pdf
- Manual_Biostat_CultiBagSTR50-e.pdf
- Manual_DCU_CultiBag-STR50_plus.pdf
- S593-BTXXXX Verwendung des MFCS/win 3.0 zur Online-Datenaufzeichnung
- S593-BT1173 Nucleocounter
- S593-BT1179 Sterilbench
- S593-BT1180 Bioprofile
- S593-BT1186 Pipetten
- S593-BT1200 Pipetboy acu
- S593-BT1236 HiRes
- C593-BT1197 Laborordnung für das animale Zellkulturlabor GB213
- AA Aufbau, Inbetriebnahme und Bedienung des BIOSTAT CultiBag STR 50L plus
- AA-M001-01 Herstellung von FMX-8 Zellkulturmedium
- AA-M002-01 Herstellung von ChoMaster® HP-1 Zellkulturmedium
- AA-M003-01 Herstellung von ChoMaster® HP-5 Zellkulturmedium

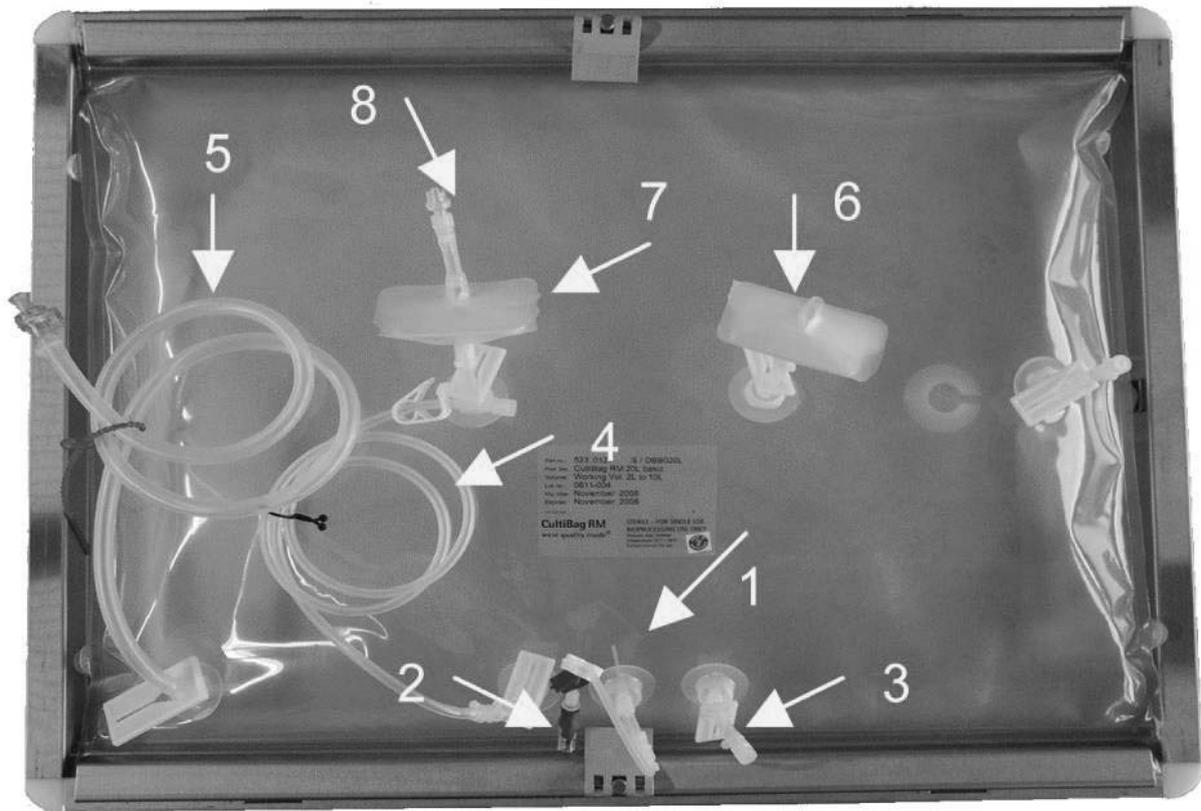
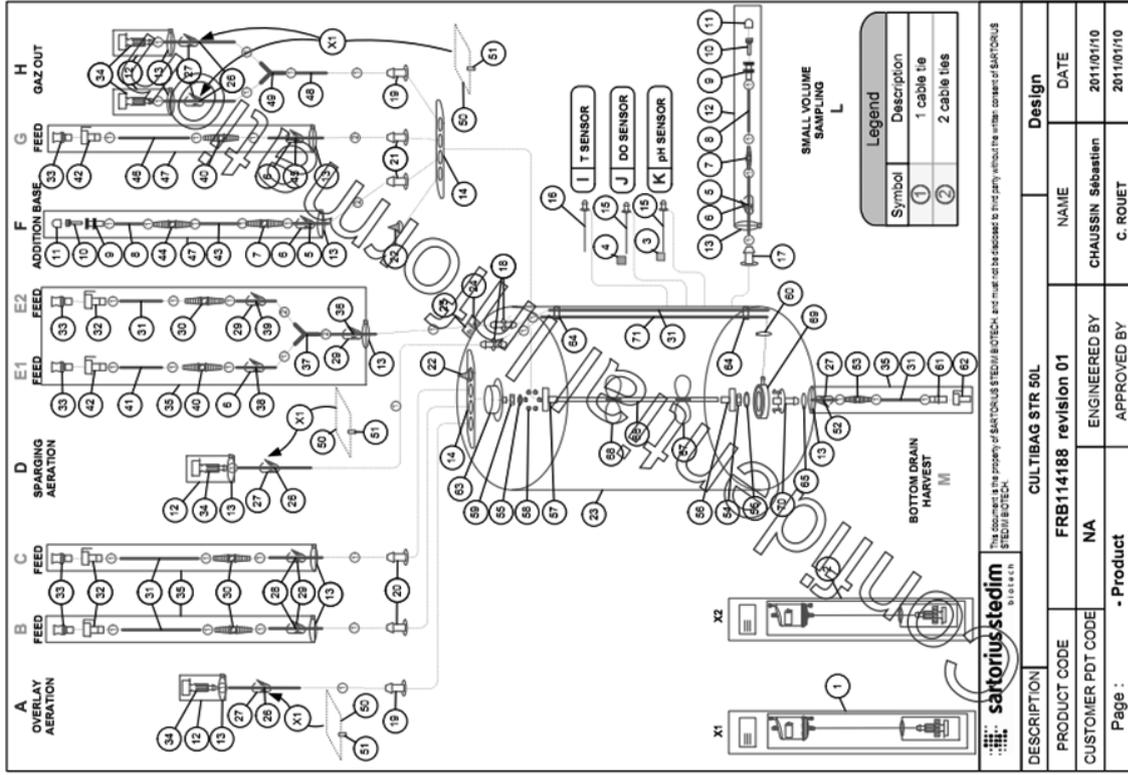
Mitgeltende Abbildungen

Abbildung A - 56: CultiBag RM 20L. 1. Tauchschauch (Diptube) zur Zellernte, 2. Luer-Setrum für die Probenentnahme oder Inokulation, Luer-Anschluss, 4. C-Flex-Schlauch mir Luer-Anschluss, 5. C-Flex-Schlauch mit MPC-Kupplung, 6. Zuluft-Sterilfilter, 7. Abluft-Sterilfilter, 8. Überdruckventil



N°	Description	PN	Material
1	FILTER LINE GAZ OUT	TA112735	ACRYLATE/LDPE/PA/PC/PE/PP
2	OPTICAL MICRO SENSORS PH	AX112545	TO BE DEFINED
3	OPTICAL MICRO SENSORS DO	AX112554	TO BE DEFINED
4	TUBING 6.35 X 9.53 L150 (ROLL)	TU108070	S(PI)
5	TUBING 6.35 X 9.53 L150 (ROLL)	TU108070	S(PI)
6	HOSE BARB 1/4" X 1/8"	TC211146	PP
7	TUBING 3.2 X 6.4 L600 (ROLL) (60SH)	TU110889	TPE C.Flex 374 Ⓟ
8	HOSE BARB FEMALE ULR LOCK 1/8"	TC210880	PP
9	CLAVE CONNECTOR	ST107530	ABS/PC/SI
10	FEMALE PROTECTIVE CAP	PR100682	PE
11	REVERSE CABLE 1/4"	CA110144	PE
12	REVERSE CABLE 1/4"	CA110144	PE
13	STEDIM 4PORTS TOP FLANGE	AX112124	PE
14	THERMOWELL ID 3 mm (L135)	AX112870	PE/S(PI)
15	THERMOWELL ID 3 mm (L174)	AX112489	PE/S(PI)
16	1/4" HOSE BARB PORT	TC112489	PE
17	1/4" HOSE BARB 1/2" PORT	TC112528	PE
18	PORT 1/4"	TC112132	PE
19	PORT 1/4"	TC112131	PE
20	STEDIM PORT SYSTEM PLUG	PL112127	PS
21	FLAT S40 (200µ)	SF109301	STEDIM 40
22	FLAT S40 (200µ)	SF109301	STEDIM 40
23	FLAT S40 (200µ)	SF109301	STEDIM 40
24	LABEL CALIBRATION SENSOR DO	LB112466	PAKER
25	LABEL CALIBRATION SENSOR DO	LB112466	PAKER
26	TUBING 12.7 X 19.05 L150 (ROLL)	TU108070	S(PI)
27	PINCH CLAMP FOR 3/4" O.D.	CA108078	S(PI)
28	PINCH CLAMP D75	TU108333	S(PI)
29	COUPLING BODY 3/8"	CA108333	S(PI)
30	COUPLING BODY 3/8"	CA108333	S(PI)
31	COUPLING BODY 3/8"	CA108333	S(PI)
32	MPC SEALING PLUG	PC1080771	TPE C.Flex 374 Ⓟ
33	OPTA SFT CONNECTOR MALE SMALL SIZE 1/2" HB	PC1080666	PC/PS
34	POLYBAG 300 X 400 (100µm)	PK1112815	ACRYLATE/PC/PP/PS/UPV
35	TUBING 9.53 X 9.53 L1000 (ROLL)	TU1082256	LDPE
36	TUBING 9.53 X 9.53 L1000 (ROLL)	TU1082256	S(PI)
37	TUBING 9.53 X 9.53 L1000 (ROLL)	TU1082256	S(PI)
38	TUBING 6.35 X 9.53 L750 (ROLL)	TU108078	S(PI)
39	TUBING 6.35 X 9.53 L750 (ROLL)	TU108243	S(PI)
40	HOSE BARB 1/4" X 1/4"	TC210903	PP
41	TUBING 6.35 X 11.12 L600 (ROLL) (60SH)	TU110890	TPE C.Flex 374 Ⓟ
42	MPC 1/2" COUPLING BODY (PC)	CA100779	PC
43	HOSE BARB 1/8" X 1/8"	TC112338	S(PI)
44	HOSE BARB 1/8" X 1/8"	TC112338	S(PI)
45	TUBING 6.35 X 6.35 L2600 (ROLL)	TU108073	S(PI)
46	TUBING 6.3 X 6 L600 (ROLL) (60SH)	TU112208	TPE C.Flex 374 Ⓟ
47	POLYBAG 200 X 400 (100µm)	PK111985	LDPE
48	TUBING 12.7 X 19.05 L100 (ROLL)	TU108759	S(PI)
49	FOAM 100 X 298 X 3	PK211189	PE
50	ADHESIVE STRIP (WHITE)	OS107101	PE/SYNTHETIC RUBBER
51	TUBING 12.7 X 19.05 L2500 (ROLL)	TU107769	S(PI)
52	HOSE BARB 1/2" X 3/8"	TC111664	PP
53	PLASTIC BALL BEARING 30X10X7	BR112662	GLASS/PAP/PM
54	PLASTIC BALL BEARING 30X10X7	BR112662	GLASS/PAP/PM
55	BOTTOM IMPELLER BODY 200	BR112687	PE
56	MAGNET BODY 263.5	BR112685	PE
57	MAGNET Ø22 (THICKNESS 6.10)	BR112685	MATERIAL TEST
58	BLACK CABLE TIE 1/2"	BR112681	INOX
59	BLACK CABLE TIE 1/2"	BR112681	INOX
60	FEMALE MPC SEALING CAP	CA100682	PC/PS
61	TOP PORT BIODECTOR	BR112664	PE
62	FILM LATCHE (APR)	SF108728	PE
63	CABLE TIE TYRAP-7.5" (LARGE)	CT101144	PA
64	SHAFT Ø20 L85	BR112729	PC
65	IMPELLER TYRE 60mm (STRES50L)	BR112728	PC
66	IMPELLER TYRE 60mm (STRES50L)	BR112728	PC
67	DISK RING SPARGER 50L	BR112685	PC
68	BOTTOM SYSTEM PORT Ø85	BR112685	PE
69	TUBING 6.35 X 19.05 L700 (ROLL) (60SH)	TU113023	TPE C.Flex 374 Ⓟ

DESCRIPTION	Design
CULTIBAG STR 50L	
PRODUCT CODE	FRB114188 revision 01
CUSTOMER PDT CODE	NA
ENGINEERED BY	CHAUSSIN Sébastien
APPROVED BY	C. ROUET
DATE	2011/01/10

Abbildung A - 57: CultuBag STR 50 L. CultuBag mit den entsprechenden Verbindungen.

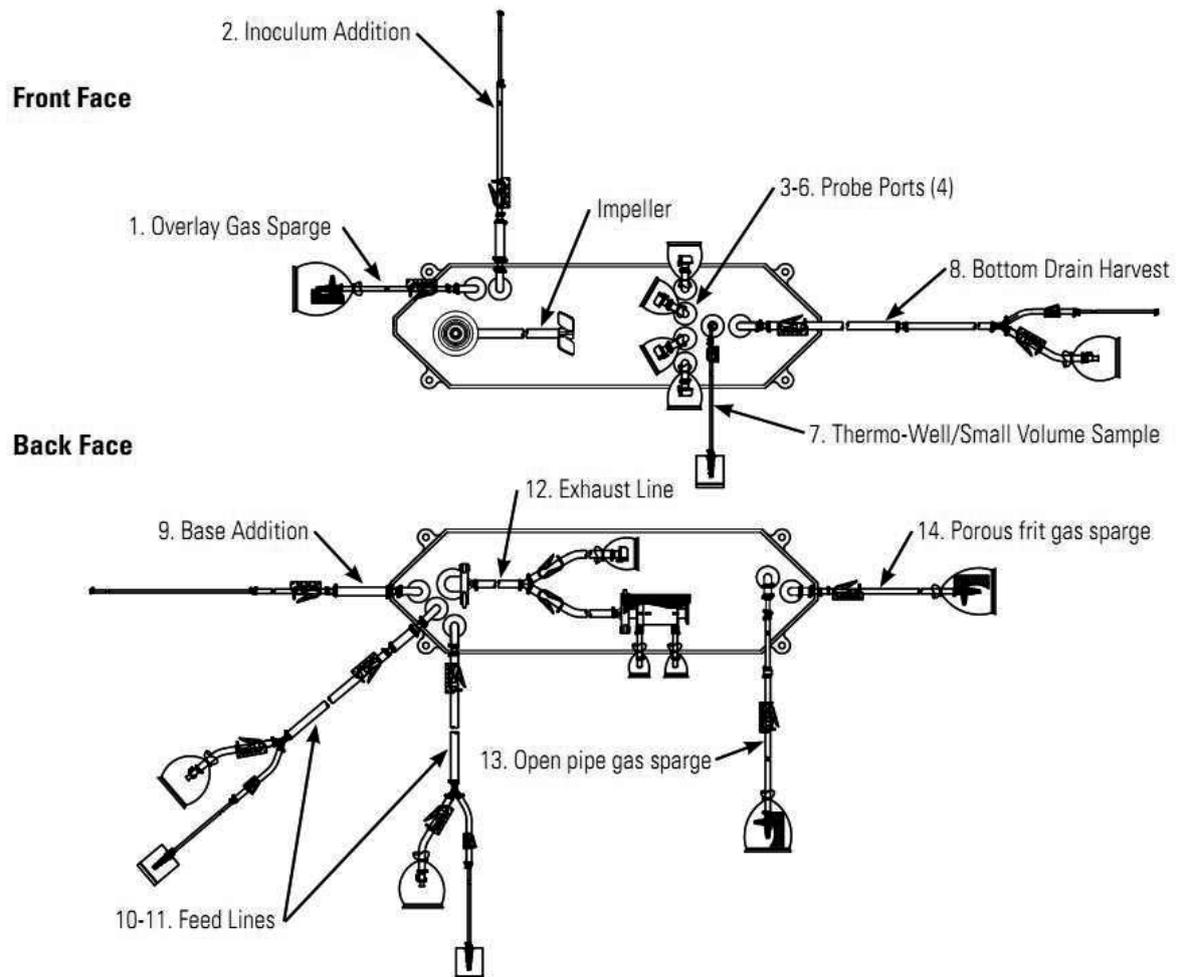


Abbildung A - 59: Anschlussplan des S.U.B. 50 L.