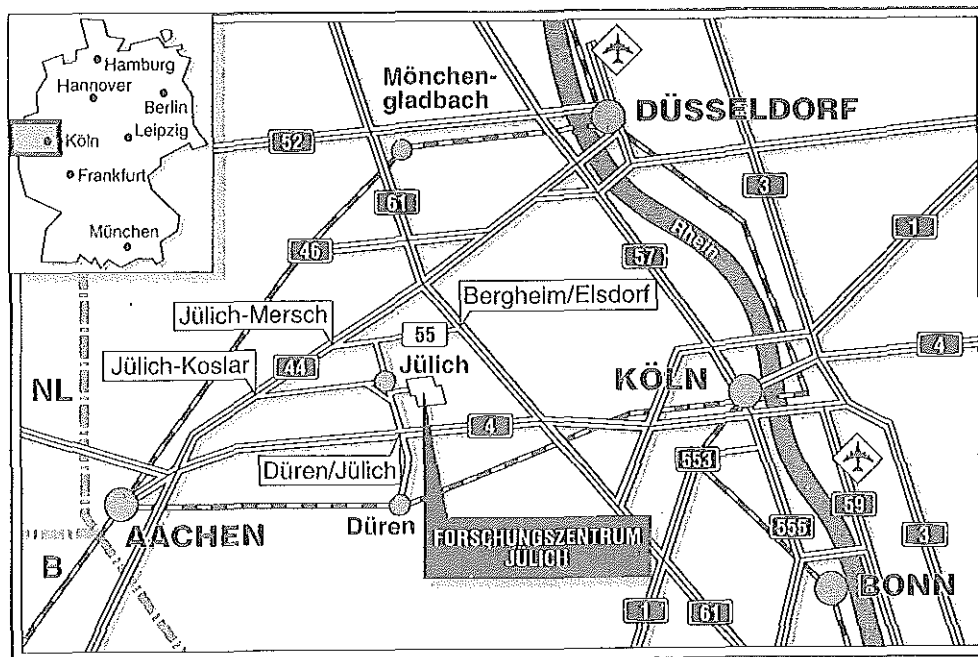


Institut für Biotechnologie

**Der Einsatz von Wirbelschichtreaktoren
in der Zellkulturtechnik –
Beiträge zur Verfahrensentwicklung**

Berthold Hambach



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2886

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jüli-2886

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

**Der Einsatz von Wirbelschichtreaktoren
in der Zellkulturtechnik –
Beiträge zur Verfahrensentwicklung**

Berthold Hambach

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
1 Einleitung	9
2 Rahmenbedingung und Problemstellung	11
2.1 Bedeutung von Säugerzellkulturen	11
2.1.1 Marktübersicht	13
2.1.2 Zellkultur im industriellen Maßstab	15
2.2 Zielsetzung dieser Arbeit	17
3 Das Reaktor- und Begasungskonzept	18
3.1 Anforderungen an einen Wirbelschichtreaktor für die Zellkultur	18
3.2 Begasung	20
3.2.1 Gasaustauschsysteme und ihre Bedeutung	21
3.2.2 Reaktorintegrierte Permeationsbegasung	26
3.3 Beschreibung der Versuchsanlage	30
4 Verfahrenstechnische Grundlagen	33
4.1 Grundlagen der Wirbelschichttechnik	33
4.1.1 Die flüssig-fest-Wirbelschicht	33
4.2 Zur Flüssigphase	38
4.2.1 Zur Charakterisierung des Stoffsystems	38
4.2.2 Die Löslichkeit von Gasen in Wasser und Kulturmedien	39
4.3 Die Festphase	47
4.3.1 Trägereigenschaften und Anforderungen an das Wirbelgut	47
4.3.2 Trägerdaten	48
4.4 Charakterisierung des Stofftransportes	51
4.4.1 Der transmembrane Transport	51
4.4.2 Übergang flüssig-fest	61
5 Untersuchungen zum transmembranen Stofftransport	64
5.1 Beschreibung der Versuchsanlage	64
5.2 Ergebnisse	66
5.2.1 Vorversuche	66
5.2.2 Stofftransport ohne Wirbelschicht	68
5.2.3 Stofftransport in die Wirbelschicht	70
5.2.4 Untersuchung der Einzelwiderstände	71

6	Charakterisierung des biologischen Systems	75
6.1	Säugerzellen und ihre Umgebung	75
6.2	Sauerstoffbedarf	77
6.3	Auswahl von Testzellen	78
7	Experimente mit Zellkulturen	80
7.1	Adhärenente Zellen	82
7.2	Suspensionszellen	89
7.3	Vergleich verschiedener Trägergrößen	95
8	Auswahl und Berechnung von Begasungsmodulen	100
8.1	Bauform	100
8.2	Zur Auslegung einer reaktorintegrierten blasenfreien Begasung	102
8.2.1	Der Einfluß von Einzelparametern/Modellierung des Sauerstoffgefälles	103
9	Zusammenfassung & Ausblick	110
A	Verwendete Formelzeichen und Abkürzungen	114
B	Geräte- und Chemikalienliste	119
C	Konstruktionszeichnungen und Photographien der Fermentersysteme	124
D	Erläuterungen und Herleitungen	131
	Literaturverzeichnis	137

Abbildungsverzeichnis

2.1	Potential der Zellkulturtechnik als Ersatzsystem für Tierversuche	12
2.2	Bedarf an Zellen zur Herstellung einer vorgegebenen Produktmenge	15
3.1	Oberfläche-Volumenverhältnis bei verschiedenen Reaktorgeometrien	21
3.2	Begasungskonzepte für Zellkulturreaktoren	22
3.3	Sauerstoffgradient bei externer Begasung	24
3.4	Prinzip der reaktorintegrierten und externen Permeationsbegasung	25
3.5	Gradienten des Sauerstoffpartialdrucks in Abhängigkeit von der Leerrohrgeschwindigkeit (zellspez. Sauerstoffaufnahme: $2 \cdot 10^{-13} \text{ [mol/(Zelle} \cdot \text{h)]}$)	27
3.6	Nutzbarer Hohlraumanteil von Collagenträgern bei unterschiedlichem Ballastanteil . .	28
3.7	Begasungsmodul in der Wirbelschicht	29
3.8	Fließbild der Versuchsanlage	31
4.1	Zustandsdiagramm der homogenen Fluidisation	36
4.2	Fließkurven bei unterschiedlichen Serum-Konzentrationen	39
4.3	Molanteil des gelösten Gases in Abhängigkeit von den Medienbestandteilen	45
4.4	Kollagenträger zur Zellimmobilisierung, Verax (Lebanon, New Hampshire)	48
4.5	Glasträger zur Zellimmobilisierung, Schott (Mainz)	49
4.6	Transmembraner Stofftransport gas - fest - flüssig	54
4.7	Berechnete Triebkraftabnahme des Permeationsvorgangs bei Variation der Gasgeschwindigkeit	60
4.8	Darstellung der Einzeltransportschritte im Fließbett	62
5.1	Versuchsanlage zur Stoffeintragsmessung-Prinzipskizze	65
5.2	Sauerstoffeintrag bei vorgegebenem Sauerstoffpartialdruck	66
5.3	Variation der gaseitigen Geschwindigkeit	67
5.4	Stoffübergang bei einer Variation der Flüssigphase	68
5.5	Stoffdurchgang ohne Wirbelschicht	69
5.6	Vergleich zum Stoffübergang mit und ohne Wirbelschicht	70
5.7	Vergleich der Stoffdurchgangskoeffizienten für unterschiedliche Membranstärken . . .	71
5.8	Vergleich der Stoffübergangskoeffizienten für unterschiedliche Membranstärken . . .	72
5.9	Darstellung der Einzelwiderstände für den Stofftransport	73
6.1	Erscheinungsbild immobilisierter CHO-Zellen	75
6.2	Wechselwirkungen zwischen der Zelle und dem Kultursystem	76
6.3	Erscheinungsbild immobilisierter Hybridoma-Zellen	77
7.1	Anwachsverhalten bei einer Variation der Animpfdichte	82
7.2	Konzentrationen von Leitsubstraten und Inhibitoren (kontinuierliche Fermentation) .	85
7.3	Reaktorspezifische Verbrauchsdaten und Verweilzeit	86
7.4	Glutaminverbrauch und Ammoniumproduktion	86
7.5	Produktion von Inhibitoren	87

7.6	Konzentrationen von Leitsubstraten und Laktat (kontinuierliche Fermentation) . . .	89
7.7	Reaktorspezifische Verbrauchsdaten und Verweilzeit (Hybridomzellen)	91
7.8	Glutaminverbrauch und Produktdaten (Hybridomzellen)	91
7.9	Laktatproduktion und Glukoseverbrauch (Hybridomzellen)	92
7.10	Vergleich einer Sauerstoff-Eintragsmessung mit theoretisch ermittelten Werten . . .	93
7.11	Konzentrationsverläufe für unterschiedliche Trägerdurchmesser (kleine Symbole: 500 μm , große Symbole 1000 μm)	96
7.12	REM-Aufnahme aus dem Trägerinnern (Durchmesser: 500 - 560 μm)	98
7.13	REM-Aufnahme aus dem Trägerinnern (Durchmesser: 1000 - 1120 μm)	98
8.1	Benötigte Anzahl an Schläuchen gleicher Wandstärke bei unterschiedlichen Außendurchmessern	104
8.2	Variation des Hohlraumanteils in der Wirbelschicht	105
8.3	Benötigte Anzahl an Schläuchen gleichen Durchmessers bei verschiedenen Wandstärken	107
8.4	Benötigte Anzahl an Begasungsschläuchen bei Vorgabe eines Maximaldrucks	108
B.1	Baugrößen der neuentwickelten Wirbelschichtreaktoren	122
C.1	Photo des 150-Milliliter-Wirbelschichtreaktors für die Zellkultur (externe Begasung) .	124
C.2	Zusammenstellungszeichnung (links) und Photographie (rechts) des 0.5l/1l-Fermenters mit reaktorintegrierter Begasung	125
C.3	Photographie der Versuchsanlage (0.5l/1l) mit reaktorintegrierter Begasung	126
C.4	Zusammenstellungszeichnung des 15-Liter-Wirbelschichtreaktors mit reaktorintegrierter Begasung	127
C.5	Photo des 15-Liter-Wirbelschichtreaktors für die Zellkultur	128
C.6	Umlenkplatte (oben) und Verteilerboden (unten) des 15-Liter-Wirbelschichtreaktors .	129
C.7	Zusammenstellungszeichnung des Reaktorkopfs und des Reaktorbodens (unten) . . .	130
D.1	Bilanzierungen an einem Volumenelement im Reaktor	134

Tabellenverzeichnis

2.1	Herkunft verschiedener Säugerzelllinien	11
2.2	Marktprodukte aus industriellen Zellkulturprozessen	14
2.3	Großtechnische Verfahren mit Säugerzelllinien	16
3.1	Lösungsansätze zur Reaktorgestaltung	19
3.2	Eintragsleistung unterschiedlicher Begasungssysteme	23
3.3	Annahmen zur Auswahl der Begasung	26
4.1	Temperaturabhängigkeit des Wasserdampfdrucks und der Löslichkeit von Gasen in salzfreiem Wasser (bei einem Luftdruck 1.0 bar)	44
4.2	Charakteristische Daten der Glas- und Kollagenträger	50
4.3	Daten zu den Ballastpartikeln	50
4.4	Eigenschaften verschiedener Gase in Silikon (Löslichkeiten bei Gleichgewicht mit dem Reingas für 1 bar absolut)	58
4.5	Eigenschaften verschiedener Gase in Wasser	59
6.1	Sauerstoffbedarf von Zellkulturen	78
B.1	Medienbestandteile (Teil 1)	122
B.2	Medienbestandteile (Teil 2)	123
D.1	Verwendete Glasarten bei der Herstellung von Siran (für die Zellkultur)	136

Kapitel 1

Einleitung

Der zunehmende Bedarf an Wirkstoffen in Pharmazie und Medizin erfordert Neuerungen und Verbesserungen bei ihrer Herstellung. Die Gestaltung der Herstellungswege, also die zielgerichtete Nutzung naturwissenschaftlicher Beobachtung hin zu neuen Produkten, ist eine zentrale Aufgabe der Verfahrenstechnik. Warum aber ergänzt diese Disziplin ihre traditionellen Methoden mit *biologischen* Komponenten?

Eine gleichlautende Frage, die auf die Naturwissenschaften Chemie und Physik abzielt, wurde nie formuliert. Ihre Anwendung zur Herstellung hochwertiger Produkte rechtfertigt sich aus rein ökonomischer Sicht *per se*. Die jeweils angewandte Technik orientiert sich in der Verfahrenstechnik am Prozeßziel, im vorliegenden Falle an einem Produkt.

Wirkstoffen für den diagnostischen und therapeutischen Bereich ist vielfach ein vernetzter, hochmolekularer Aufbau zu eigen — zum Beispiel besteht der Blutgerinnungsfaktor VIII aus 2332 Aminosäuren; in vielen Fällen können nur biologische Prozeßstufen ihre Synthese leisten. Die Gründe für ihren Einsatz zum geradezu perfekten Aufbau natürlicher Substanzen sind folgerichtig *spezifisch* biologische:

- Biologische Prozesse setzen sich aus untereinander vernetzten Teilreaktionen und Reaktionskreisläufen zusammen. Der Aufbau der hieraus hervorgehenden Produkte kann daher ausschließlich in einem komplexen Organismus vollzogen werden, der das gleichzeitige Einhalten zahlreicher notwendiger Randbedingungen gestattet. Nur so können die Schwierigkeiten von in Serie geschalteten Einzelsynthesen umgangen werden.
- *Produkte* für den medizinischen Bereich stellen häufig Proteine dar, sie bilden körpereigene Sequenzen nach, oder sie orientieren sich an der Aufgabe, mit Bindungsstellen in einem lebenden Organismus in Wechselwirkung zu treten. Eine weitergehende Forderung an solche Wirkstoffe zielt auf eine Vermeidung aller unerwünschten Wechsel- und Nebenwirkungen.

Was liegt also näher, als eine durch *Evolution gereifte* Technik in Anspruch zu nehmen (vgl. [42])?

Zellen *höherer* Lebewesen können vorteilhaft Produkte höchster Komplexität aufbauen und abgeben. Da sie dazu aus dem natürlichen Zellverbund gelöst werden, besteht die wesentliche Aufgabe der Zellkulturtechnik darin, geeignete Lebensbedingungen für den lebenden Organismus *Zelle* bereitzustellen. Den Anforderungen an ein industrielles Verfahren ist durch eine geeignete Prozeßführung Rechnung zu tragen. Die Untersuchungen hierzu bilden den Inhalt und das Ziel dieser Arbeit.

Kapitel 2

Rahmenbedingung und Problemstellung

Die Bedeutung biologischer Verfahren ist vielschichtig; sie nur auf eine Betrachtung des verfahrenstechnischen Aspekts reduzieren zu wollen, scheint in bezug auf die Bemühung, den Zugang zur untersuchten Thematik zu erleichtern, nicht angebracht. Daher soll zu Beginn dieser Arbeit zunächst durch das einleitende Kapitel der Hintergrund beleuchtet werden, vor dem die hier durchgeführte Arbeit Bedeutung gewinnt.

2.1 Bedeutung von Säugerzellkulturen

Historische Entwicklung Der Beginn einer systematischen Kultivierung von Säugerzellen¹ datiert aus dem Jahr 1925 und ist eng mit der Gründung der ATCC-Zellbank (ATCC: American Tissue Culture Collection) verknüpft. Dem Aufbau und der Betreuung von Zellbanken [6, 51] kann das Verdienst zugeschrieben werden, daß heute eine breite Auswahl gut beschriebener Primär- und Permanent-Zelllinien² für die Zellkulturtechnik zur Verfügung steht. So geht auch ein Großteil der Zellen für die heutigen industriellen Verfahren aus diesen Quellen hervor.

Zelltyp	Ursprungsorganismus	kultiviert seit
Namalva	Mensch	1972
Vero	Affe	1962
BHK ^a	Hamster	1961
HeLa	Mensch	1951
CHO ^b	Hamster	1957

^aBHK: Baby Hamster Kidney

^bCHO: Chinese Hamster Ovary

Tabelle 2.1: Herkunft verschiedener Säugerzelllinien

Ihre Bedeutung für den produktorientierten Bereich erhalten die Säugerzellen erst durch die Rekombinationstechniken ([52], S.239–245, [80]). Hierbei wird die natürliche Erbinformation der Zellen verändert. Der Transport der neuen Information kann durch Vektoren, durch physikalische Kräfte, durch Hilfssubstanzen (facilitators) oder durch Mikrokapseln (vesicles) bewerkstelligt werden [2]. Bei einer gelungenen Übertragung wird die neue Eigenschaft von der Zelle aufgenommen und verwertet: Sie wird exprimiert. Durch eine solche Technik wird ein Organismus gezielt in die Lage versetzt und dazu benutzt, ein Produkt in Abweichung von seinem ursprünglichen Stoffwechsel zu erzeugen.

Eine erhebliche Erweiterung hat die Zellkulturtechnik im Jahr 1984 durch die *Hybridom*-Technik [124] erfahren. Durch das Verschmelzen von Milzzellen aus immunisierten Mäusen und Krebszellen

¹Neben den Säugerzellen werden auch andere eukaryotische Zellen (Tier- und Pflanzenzellen) unter dem gemeinsamen Oberbegriff „Zellkulturen“ zusammengefaßt, sie werden an dieser Stelle nicht weiter betrachtet.

²Bei Primärkulturen ist im Gegensatz zu permanenten Zelllinien nur eine zeitlich begrenzte Fähigkeit der Zellen zur Vermehrung gegeben.

(Myelomzellen) verknüpft man die Fähigkeit zur Synthese bioaktiver Naturstoffe mit einem permanenten Zellwachstum [15]. Somit können Zellen außerhalb eines *lebenden* Organismus kultiviert werden und – theoretisch unbegrenzt – z. B. Antikörper erzeugen. Da sich die *in vivo*-Produktion von humanen Antikörpern verbietet, wird durch diese *in vitro*-Technik ihre Herstellung überhaupt ermöglicht³.

Der Begriff *Zellkulturtechnik* wird insbesondere im Zusammenhang mit der Produktion pharmazeutisch wichtiger Substanzen angewandt. Hierzu zählen Antikörper, Impfstoffe, Hormone und Enzyme gleichermaßen wie Hilfsstoffe zur Therapie und Diagnostik von Krebs und Immunkrankheiten (AIDS) [109]. Neuerdings werden unter diesem Sammelbegriff gleichermaßen Forschungs- und Anwendungsgebiete zusammengefaßt, deren Ursprung zum Teil vor die Entwicklung von Produktionstechniken zurückreicht, wie

- Modellsysteme zur Durchführung von Kompatibilitätsuntersuchungen (Implantate, Pharmaka [10])
- Neurobiologie [48]
- Diagnostik (in vitro bioassays, Virologie [96, 128])
- Analyse onkogener Substanzen [188]
- somatische Gentherapie [14, 191, 53]
- Untersuchungen zum Zellzyklus

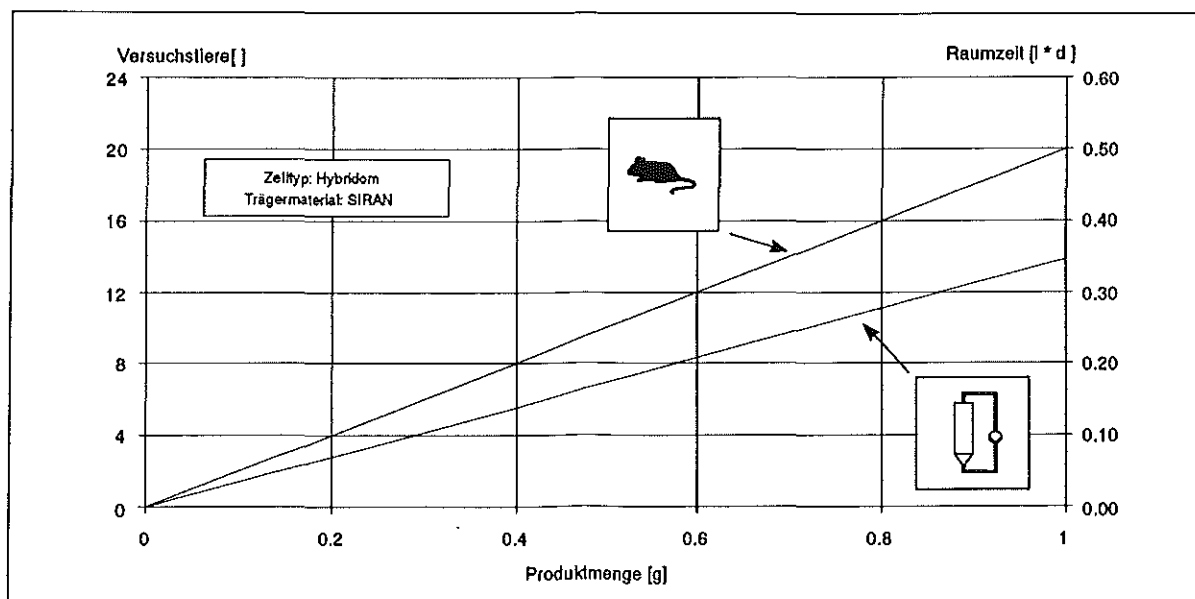


Abbildung 2.1: Potential der Zellkulturtechnik als Ersatzsystem für Tierversuche

³Mausantikörper werden zu Forschungszwecken häufig noch *in vivo*, also in einem Versuchstier produziert.

Reduktion von Tierversuchen Der Wert einer Technik wird häufig an den aus ihr hervorgehenden Produkten gemessen. Im Fall der Zellkulturtechnik darf an dieser Stelle zumindest ein wesentlicher Aspekt hinzugefügt werden: Mit Hilfe von Säugerzellkulturen kann erheblich zu einer Reduzierung von Tierversuchen in den zuvor aufgelisteten Bereichen beigetragen werden. 1982 betrug ihre Anzahl weltweit 280 Millionen, im Bundesgebiet lag ihre Zahl im Jahr 1991 bei 2.4 Millionen [192].

Abb. 2.1 zeigt beispielhaft den Minderbedarf an Versuchstieren (Mäusen) bei der Produktion eines monoklonalen Antikörpers durch den Einsatz von Labor-Wirbelschichtreaktoren (Forschungszentrum Jülich). Hieraus wird ersichtlich, daß ein Reaktor mit 30 ml Festbettvolumen innerhalb einer Woche (Raumzeit = 0.21 l*d) die gleiche Menge Produkt [15] liefert wie die — nach dem Tierschutzgesetz ([115], S. 316) mittlerweile strafbare — *Herstellung* in 12 Ascites-Mäusen⁴. Bei der Produktion des Polio-Impfstoffes ermöglichte die Zellkulturtechnik einen Rückgang bei der Zahl der hierzu verwendeten Primaten in 10 Jahren um annähernd 90 Prozent ([147], S. 138).

In Zukunft wird die Zellkulturtechnik sicherlich an ihren Konkurrenzverfahren gemessen werden. Ein Entwicklungspotential steht dieser Technologie in der BRD jedoch erst mit einer zu erwartenden Novelle des Gentechnikrechts [72] offen. Der derzeit feststellbaren Tendenz der pharmazeutischen Industrie, ihre Aktivitäten im Bereich der Gentechnik im Ausland anzusiedeln, kann so begegnet werden. In mehreren Industrieländern gehört die Säugerzellkultur in Forschung und Produktion heute bereits zum Stand der Technik. Eine weitere Schwierigkeit steht dem Zellkulturbereich durch Auswirkungen der Maßnahmen zur Kostendämpfung im Gesundheitswesen ins Haus. Betrachtet man jedoch das Potential der Produktpalette, so stimmen auch vorsichtige Prognosen zur weiteren Bedeutung der Zellkulturtechnik optimistisch.

2.1.1 Marktübersicht

Eine Übersicht über den derzeitigen Markt für Produkte aus Zellkulturprozessen kann in Hinsicht auf die Entwicklung neuer Verfahren der Orientierung dienen; der Zugang zu Informationsmaterial von Industrieseite beschränkt sich verständlicherweise in aller Regel auf die Zeit *nach* der Markteinführung eines Produktes. Auch dann liegt jedoch nur in selten Fällen weiterführendes, für eine Studie verwertbares Material vor, das zu einem Vergleich von großtechnischen Verfahren führen könnte. Somit können an dieser Stelle im wesentlichen also Aussagen nur über die Produkte als solche getroffen werden. Im Jahr 1991 waren auf dem Markt 16 therapeutische Proteine erhältlich, die durch Zellkulturverfahren hergestellt wurden. Hiervon zählten neun zu den Glycoproteinen ^{A,5}. Weiterhin ist der Einsatz von 58 Antikörper-Präparaten für den klinischen Bereich gemeldet.

Tabelle 2.2 zeigt exemplarisch die Zusammenfassung einiger Prozesse, die zu den genannten Produkten führen. Hierbei ist festzustellen, daß eine Reihe von Verfahren Produkte hervorbringen, die auch durch andere biologische Systeme (z. B. rekombinante Bakterien) erzeugt werden können. Weiterhin trägt zum Verständnis bei, daß die Produktnamen als Sammelbegriffe angesehen werden müssen. Dies wird aus der Tatsache ersichtlich, daß unter gleichem Namen Produkte zugelassen werden, die sich lediglich in einer Aminosäure unterscheiden oder deren Glykosylierung voneinander abweicht ([81], S. 1-5), [116].

⁴Bei dieser Vorgehensweise wurden die Tiere bei der Entnahme der Antikörper aus der Bauchhöhle getötet.

⁵Die mit ^A gekennzeichneten Begriffe werden im Anhang D, S. 131 ff. erläutert.

Produkt	Indikation	Hersteller	Zelltyp	Quelle	Handelsname ^a	Preis
Faktor VIII	Hämophilie A	Miles Cutter	BHK	[30, 191]	Kogenate	
hGH (human growth hormone)	Kleinwuchs	CalBiotech	CHO	[17]		
EPO (Erythropoietin)	Blutbildung, Anemie	Amgen, Genzyme	CHO	[17]	EPO/ N	20 U 495 US-\$
tPA (tissue Plas. Activator)	Herzinfarkt	Genentech/ Thomae	CHO	[40, 149]	Actilyse/ Böhlinger	1 g 22000 US-\$
Interleukin 2	Blut, Knochenmark		Säuger		Interleukin 2/ ICN	10,000 U 200 US-\$
Interleukin 4	klin. Forschung	Schering	CHO			
MIS (Mullerian Inh. Substance)	Krebstherapie	Biogen	CHO			
Hepatitis Vakzine	Hepatitis B		CHO	[121]	Recomb. HB/ Merck	
Interferon β	Krebstherapie, Virusinfektion	Biogen		[121]	Interferon β Life Sciences	500 kU 720 DM
AT III (Antithrombin)	Thrombose	Behringwerke	CHO	[121]	AT III	1 g 4420 DM
TGF (Transf. Growth Factor)	Krebstherapie	Imm. Systems	CHO	[17]	TGF/ICN	0.5 μ g 410 US-\$
Protein C	gen. Mangel	Eli Lilly	BHK	[121]		
Polio Vakzine	Polio	PHS Bilthoven Inst. Merieux	Affen	[130, 147]		

^aDie unter *Handelsname* aufgelisteten Produkte können auch aus anderen Expressionssystemen stammen; das jeweilige Produkt wird jedoch auch mittels Säugerzellkulturen von dem genannten Hersteller produziert.

Tabelle 2.2: Marktprodukte aus industriellen Zellkulturprozessen

Der Produktpreis für humane monoklonale Antikörper kann bis zu 500 DM/mg betragen. Bei der Abnahme (Mengen größer 100 g) therapeutischer Antikörper aus validierten Prozessen mit Zulassung für die klinische Prüfung werden 3000 – 5000 DM/g bezahlt [50]. Im Jahr 1980 lag die weltweite Produktion an monoklonalen Antikörpern bei 1 g, 1988 wurde sie auf 50 kg geschätzt [65]. Der Bedarf an solchen Produkten steigt in beeindruckender Weise weiter an. So werden beispielsweise zur Therapie eines Krebspatienten Mengen von 5 Gramm Antikörpern benötigt [49, 92]. Hieraus kann ein Jahres - Gesamtbedarf nicht sicher abgeschätzt werden, er darf jedoch selbst für einzelne Produkte in der Größenordnung von 50 kg angenommen werden (vgl. auch [137]).

Die Behandlung eines Herzinfarktpatienten mit tPA erfordert erfahrungsgemäß eine Menge von 100 mg pro Patienten [40]. Hiermit bestätigt sich die zuvor genannte Größenordnung für Produktmengen aus Zellkulturprozessen. Sie wurde für tPA für das Jahr 1990 mit 84 Kilogramm prognostiziert [164]. Neuere Marktstudien über den weltweiten Bedarf an tPA [40] belaufen sich auf 280 Kilogramm.

2.1.2 Zellkultur im industriellen Maßstab

Die Auswahl von Produktionsverfahren für den pharmazeutischen Bereich — und insbesondere für die therapeutische Anwendung — orientiert sich a priori an der Produktqualität. Da ein Zusammenhang zwischen der Produktqualität und der Verweilzeit in Reaktoren bisher nicht festgestellt werden konnte, (vgl. [137], S. 364), können sowohl eine kontinuierliche als auch eine diskontinuierliche *Fahrweise* in der industriellen Anwendung ihre Berechtigung finden.

Eine Hinterfragung des Begriffs *industrieller Maßstab* führt nicht schlüssig auf die Technologie von Großreaktoren. Eine Vielzahl von Produkten — 1988 wurden alleine 5000 verschiedene Antikörper produziert [115, 139] — werden in industriellen Apparaten synthetisiert, für die eine Maßstabsvergrößerung nicht nötig, aber auch nicht möglich ist [13, 61, 64, 71, 85].

Es muß weiterhin in Betracht gezogen werden, daß sich jedes großtechnische Verfahren zur Zellkultivierung aus einer Reihe von Vorstufen aufbaut [92], die schließlich alle auf Ansätze im Milliliter-Maßstab in einem Brutschrank zurückzuführen sind. Zellen werden *gezüchtet*, und bei jedem Prozeßschritt benötigen sie zu einem raschen Aufwachsen eine hohe Zelldichte. Für die einzelnen Schritte der zuvor erwähnten Reihe können somit ganz unterschiedliche Verfahrensführungen zum Tragen kommen.

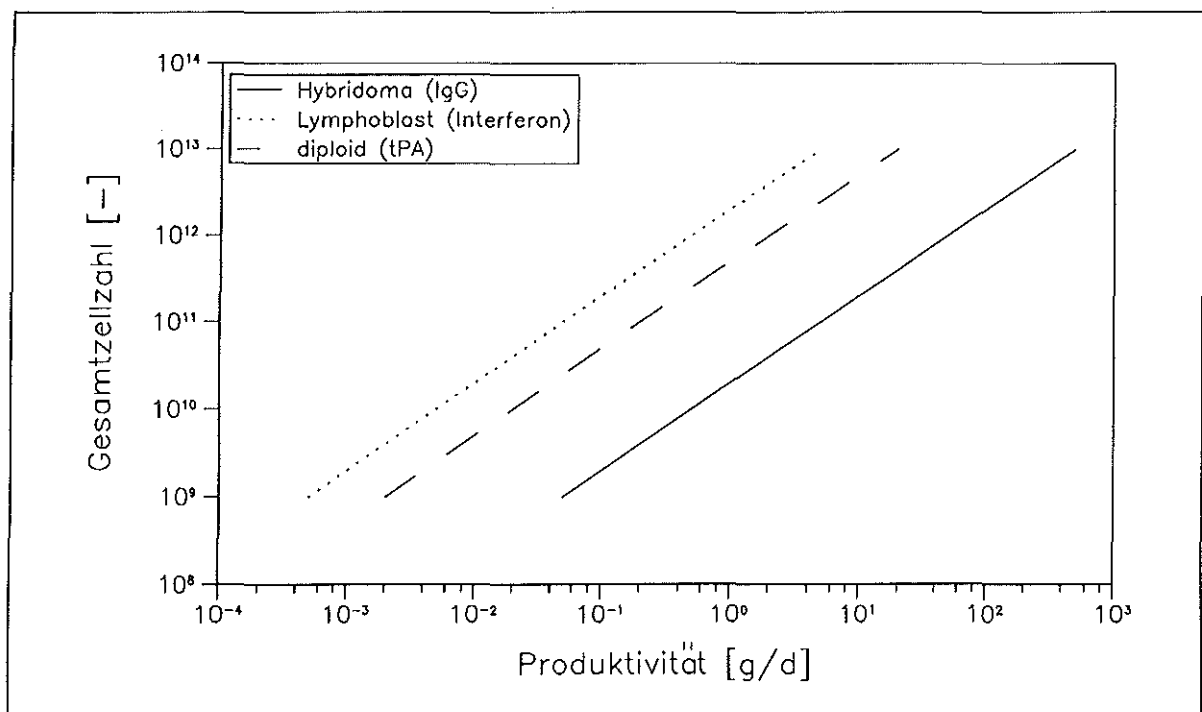


Abbildung 2.2: Bedarf an Zellen zur Herstellung einer vorgegebenen Produktmenge

Maßgeblich für die Baugröße eines Bioreaktors zu Produktionszwecken bei einem vorgegebenen Produktausstoß ist die erreichbare Raum-Zeit-Ausbeute und hiermit verknüpft die Menge an Zellen im Reaktor (Katalysatorkonzentration). Bei einer Erhöhung der Zelldichte kann das Produktionsvermögen mit einer nicht von der Betriebsweise abhängigen Zellproduktivität linear gesteigert werden⁶. Gemessen an der Vielzahl von Veröffentlichungen zur Frage der Maßstabsvergrößerung [8, 18, 63, 66, 148, 183], also nach einer Technik, die *auch* große Produktmengen in vertretbarer

⁶In der Literatur wird von einer Verdopplung der zellspezifischen Produktivität bei Perfusionsbetrieb, das meint kontinuierlicher Fahrweise mit Zellrückhaltung, berichtet [90].

Zeit ermöglicht, soll diskutiert werden, welche Anforderungen hierzu an ein Verfahren gestellt werden.

Betrachtet man die oben ausgeführte Nachfrage, dann sind Produktmengen von 10 Kilogramm also eine realistische Zielgröße. Aus Abb. 2.2 geht hervor, welche Zellzahlen in einem Reaktor vorhanden sein müssen, um eine bestimmte Menge Produkt in einem vorgegebenem Zeitraum zu erzeugen. Bei den spezifischen Produktionsraten handelt es sich dabei entweder um Literaturangaben oder um eigene Daten aus Fermentationen mit unterschiedlichen Hybridomazellen. Hieraus wird ersichtlich, daß selbst bei hohen zellspezifischen Produktionsraten Zellzahlen von 10^{13} benötigt werden, um die erforderliche Produktmenge in einem realistischen Zeitraum zu gewinnen. Ebenso wird deutlich, in welchem Maße durch eine Erhöhung der zellspezifischen Produktivität auf die Größe der Gesamtanlage eingewirkt werden kann.

Produzent	Maßstab [l]	Zelldichte [$10^6/ml$]	Gesamtzellzahl [10^{12}]	Reaktortyp	Quelle
Celltech	1000	2	2	Blasensäule	[18]
Eli Lilly	1300	5	6.5	Rührkessel	[8]
Wellcome	8000	2	16	Rührkessel	[148, 65]
Genentech	10000	^a	^a	^a	[119]
Verax	24 ^b	240	5.7	Wirbelschicht	[183]

^aKeine Angaben.

^bDie Volumenangabe bezieht sich auf die fluidisierte Wirbelschicht.

Tabelle 2.3: Großtechnische Verfahren mit Säugerzelllinien

Tab. 2.3 zeigt die Anlagen für den Bereich der Säugerzellkultur mit dem derzeit größten Produktausstoß. Es ist zu erkennen, daß Anlagen mit hoher Zelldichte enorme Gesamt-Zellzahlen aufnehmen und das Gesamtvolumen eines Fermenters somit sinnvoll beschränken. Die Menge an Kulturmedium, die zur Herstellung einer bestimmten Produktmenge benötigt wird, muß natürlich in gleichem Umfang bereitgestellt werden. Die hierzu benötigten Volumina können jedoch, im Gegensatz zum Satzbetrieb, in einer gewünschten konzentrierten Form vorgelegt werden.

Da die Baugröße einer Fermentationsanlage für die Säugerzellkultur nach oben begrenzt ist⁷, kann die Tendenz zur Entwicklung in Richtung kontinuierlicher Verfahren mit hoher Zelldichte abgesehen werden.

⁷Der mit einer Kontamination der Anlage verursachte Wertverlust und die damit verbundene zeitliche Verzögerung beeinflussen wesentlich die Entscheidung über die Unterteilung des Anlagen-Gesamtvolumens in mehrere kleine Einheiten [5].

2.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der verfahrenstechnischen Ausarbeitung und Realisierung eines Konzeptes zur Kultivierung von Säugerzellen in Wirbelschichtreaktoren.

Ein Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Anforderungen von Säugerzellen an ein künstliches System bereits bei der Konstruktion des Reaktors zu berücksichtigen. Hiermit liegt eine wesentliche Unterscheidung zu den bisher gewählten Strategien beim Bau von Zellkulturreaktoren vor. Sie lassen sich zwei Wegen zuordnen:

- Vorhandene Bioreaktoren werden für den Anwendungsfall Zellkulturtechnik *aufgerüstet*: *serielle* Vorgehensweise.
- Es werden maßgeschneiderte Systeme für Zellen mit einem bestimmten Adhärenzverhalten gebaut: *typenorientierte* Vorgehensweise.

Solche Systeme können auf dem Zellkultursektor nur lokal begrenzt Bedeutung erlangen, sie sind für den industriellen Einsatz zur Gewinnung unterschiedlicher Produkte zu wenig flexibel. Durch den neuen Ansatz soll den hiermit verbundenen Nachteilen begegnet werden.

Der Aspekt des Sauerstofftransportes in einen Zellkulturfermenter wird bei der Konstruktion des Reaktors auf Grund seiner Bedeutung besonders berücksichtigt.

Die Untersuchungen dieser Arbeit beschäftigen sich gleichermaßen mit der Beschreibung des Sauerstofftransportes und mit der Eignung einer Membranbegasung in einer Wirbelschicht. Hierzu wird an Testständen der Transport des Sauerstoffs mit einfachen Modellsystemen betrachtet und die Eignung von Wirbelschichtreaktoren für unterschiedliche Trägermaterialien und Zelltypen an Realsystemen erprobt.

Anhand von Berechnungen zur Auslegung soll vorgeführt werden, in welcher Weise die so ermittelten Ergebnisse zu einer Maßstabsvergrößerung genutzt werden können.

Kapitel 3

Das Reaktor- und Begasungskonzept

Das im folgenden beschriebene Reaktorkonzept zielt vor allem auf die Gestaltung des Reaktionsraums ab, in dem der Prozeß stattfindet. Hierbei wird angestrebt, die Kultivierung grundsätzlich jedes Zelltyps zu ermöglichen und mit der Kenntnis der Freiheitsgrade der zellspezifischen Parameter Bandbreiten in der Form zuzulassen, daß das System die derzeit bekannten Extremwerte beherrscht. Es wird im folgenden anhand der Anforderungen an einen Zellkulturreaktor dargestellt, wie der jeweilige Lösungsschritt für den Wirbelschichtreaktor durchgeführt wird und wie die Lösung zu bewerten ist. Weiterhin werden zu Vergleichszwecken Verfahren anderer Arbeitsgruppen [93, 102, 117, 158, 164, 168] mit in die Beschreibung aufgenommen.

3.1 Anforderungen an einen Wirbelschichtreaktor für die Zellkultur

Der Prozeß der Zellkultivierung bedingt immer ein Ineinandergreifen verschiedenartiger Komponenten, bei deren Auswahl neben der Frage nach der Erfüllung von Anforderungskriterien auch ihre Verfügbarkeit auf dem Markt gewährleistet sein muß. Zelllinien mit einem aus kommerzieller Sicht interessanten Produkt sind aus den Primärkulturen und permanenten Zelllinien der Zellbanken zunächst abzuleiten, oder sie werden, im Falle der Hybridomazelle, erst durch eine mehr oder weniger unkontrollierte Fusion in aufwendigen Verfahren hergestellt. Somit stellen sie Spezialwissen dar: ein Wert, der nicht frei zugänglich ist. Ebenso sind Trägermaterialien auf dem Markt in großer Vielfalt erhältlich (s. Kap. 4.3.1), vielversprechendes poröses Wirbelgut hingegen unterliegt häufig entweder Schutzrechten, ist unverhältnismäßig teuer oder befindet sich noch im Erprobungsstadium. Medien für die Zellkultivierung müssen für den jeweiligen Zelltyp mittels Untersuchungen zur Reaktionskinetik erst optimiert werden, um die Leistungsfähigkeit des Organismus ausschöpfen zu können.

Charakterisierung und Abgrenzung des Verfahrens

Die kontinuierliche *in vitro*-Produktion mittels Säugerzellen geschieht vorteilhaft, wenn die Zellen in ihrer direkten Umgebung Bedingungen vorfinden, unter denen sie über einen langen Zeitraum — dieser kann mitunter mehrere Monate betragen — in stabiler Form möglichst viel Produkt erzeugen. Mit zunehmendem Systemvolumen wird das Einhalten dieser Bedingungen jedoch erheblich erschwert [92]. Tab. 3.1 verdeutlicht, welche Bedingungen bei einem Wirbelschichtreaktor ermöglicht werden können, damit in der Zellumgebung, also im flüssigen Substrat, diese Bedingungen vorzufinden sind. Hierbei sind auch diejenigen Voraussetzungen aufgenommen, die nicht speziell für die Ausstattung von Wirbelschichtreaktoren gelten; ihre Einhaltung ist für jeden Zellkulturprozeß notwendig.

Anströmung der Wirbelschicht Zu den spezifischen Anforderungen an einen Wirbelschichtreaktor gehören in erster Linie die Fluidisierungseigenschaften der Träger. Erste Ansätze in der Zellkulturtechnik führten bereits früh zu gerührten Systemen mit sehr leichten Trägern [180] ($\rho < 1.05 \text{ kg/l}$); sie

Kriterium	Realisierung	Vorteil	Nachteil
Zelldichte	Zellrückhaltung durch Immobilisierung	hohe Raumzeitausbeute, Kompakte Bauform, gute Medianausnutzung	Gradientenbildung
Scherkräfte	Wirbelschicht	unkritische Belastung in Träger und Medium	Begrenzung des spez. Gewichts
Gleichmäßiges Sauerstoffniveau	reaktorintegrierte Begasung	beliebige Maßstabsvergrößerung	Preis
blasenfreier Sauerstofftransport	Einbau von Permeationsmembranen	keine Schaumbildung, keine Sterilitätsprobleme, hohe Zellvitalität	Preis
Zell-Zell-Kontakt	Immobilisierung	beschleunigtes Anwachsen	hohe Animpfdichte
gleichmäßige Anströmung	Anströmböden, Trägerfraktionierung	kein Trägeraustrag, homogene Zellumgebung	—
Durchmischung	Wirbelschicht	Verminderung der Gradientenbildung	als Regelparameter wenig beeinflussbar
großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis	poröses Trägermaterial	größtmögliche Oberfläche	zusätzlicher Transportschritt
Substratzufuhr, Inhibitorabtrennung	Verweilzeitregelung	— ^b	— ^b
Sterilität	GMP – Bedingungen ^a	— ^b	— ^b
Zellkompatibilität der Werkstoffe	Silikon, Teflon, Edelstahl [45], Glas	— ^b	— ^b

^aGMP: Good Manufacturing Practice

^bnicht spezifisch für die Wirbelschichttechnik

Tabelle 3.1: Lösungsansätze zur Reaktorgestaltung

können jedoch lediglich bei niedrigen Trägerkonzentrationen (15 g/l) stabil — d. h., ohne unzulässig hohen Zellverlust — betrieben werden.

Ein weiterer Ansatz zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Anströmung und Verteilung der Träger wurde mit der Verwendung statischer Mischer verfolgt, von der betreffenden Arbeitsgruppe jedoch mittlerweile durch Glasfritten ersetzt [93]. Die Erfahrungen mit statischen Mixern (vgl. S. 120) wurden in eigenen Arbeiten überprüft. Die Auslegung solcher Mischer für die Kleinstfermenter führte auf unverhältnismäßig lange Mischzonen, bei einer Verkürzung der Mischzone konnte keine befriedigende Fluidisierung erreicht werden. Der Einsatz von Sieben und Glasfritten [117] konnte in eigenen Untersuchungen jedoch ebenfalls zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führen. So können hierdurch die Zellen zerstört werden; in anderen Fällen — so etwa mit der Zelllinie C 127-CAT 18 [120] — wurde in der Arbeitsgruppe *Zellkultur* des Instituts für Biotechnologie ein starkes Bewachsen aller Einbauten beobachtet. Für den langzeitstabilen Einsatz können Systeme ohne Anströmeinheit erfolgreich eingesetzt werden ([183], eigene Untersuchungen mit Diffusoren), sie zeigen jedoch bei der Maßstabsvergrößerung keine gleichmäßige Flüssigkeitsverteilung.

Vor dem Hintergrund eines beabsichtigten scale up des Systems wurden die Reaktoren — mit Ausnahme der zuvor erwähnten Kleinstfermenter — mit einem Anströmboden ausgestattet.

Hierbei zeigte sich, daß auch in diesem Falle die einfachsten Modelle, das sind Lochböden mit geraden Bohrungen, für den Einsatz in der Zellkultur sehr zuverlässig arbeiten. Sie werden mehreren Anforderungen gerecht:

- Ein Durchfallen von Trägern in den Anströmbereich und daraus resultierende Verstopfungen werden erschwert ($D_{Loch}/d_{Kugel} \sim 5$).
- Eine gleichmäßige Anströmung wird weithin gewährleistet.
- Große Bohrungen vermeiden ein Zuwachsen des Anströmbodens.
- Der Anströmboden dient gleichzeitig der Fixierung des Begasungssystems.

Solche Böden wurden bei Fermentationen über einen Zeitraum von sechs Wochen erfolgreich und ohne Störung eingesetzt.

Scherempfindlichkeit

Den Untersuchungen zur Scherempfindlichkeit widmen sich in der Literatur die Arbeiten zahlreicher Arbeitsgruppen [24, 37, 68, 100, 175]. Hierbei wird im allgemeinen der Zusammenhang zwischen der Scherbelastung der Zellen und ihrer Vitalität dargestellt.

Ein Zellsterben in der Suspension, das durch eine strömungsbedingte Belastung der Zellen bedingt ist, tritt bei der blasenfreien Begasung von Wirbelschichtfermentern mit Glas- oder Collagenträgern nicht auf. Diese Aussage konnte mittlerweile an sieben unterschiedlichen Zelltypen (BHK, C 127, CHO, Hybridomatypen) durch Messungen der Laktatdehydrogenase sowie durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Der Grund hierfür liegt in der extrem langsamen Durchströmung der Wirbelschicht, bei der das Ablösen von Wirbeln auf der Rückseite der Träger weitestgehend vermieden wird [165].

3.2 Begasung

Von apparatetechnischer Seite betrachtet handelt es sich bei dem Transport gasförmiger Komponenten um die *zentrale* Fragestellung bei der Führung aerober biotechnischer Prozesse. Dies ist vor allem in der hohen Organismendichte begründet, die in vielen Fällen mit leistungsfähigen Verfahren einhergeht. Der Sauerstoffeintrag ist in der Zellkulturtechnik — mehr noch als der Austausch des Kohlendioxids — zentrales Thema zahlreicher Untersuchungen, Veröffentlichungen und Realisierungen. Trotz der Berechtigung unterschiedlicher Systeme für variierende Anforderungen und Maßstäbe muß an dieser Stelle die Frage erlaubt sein, wieviele *optimale* Begasungssysteme existieren, und bei wievielen Lösungen es sich um Variationen handelt, deren Zweck ökonomischer Natur und deren Zugewinn an Effektivität begrenzt ist. Diese enorme Vielfalt an Begasungseinrichtungen kann besonders an Systemen bis zu einem Liter Gesamtvolumen beobachtet werden. Sie werden auf Grund ihrer begrenzten Einsatzmöglichkeiten hier ausschließlich in der Grundform vorgestellt.

Die Sauerstoffversorgung für einen Zellkulturfermenter sollte schon bei der Auslegung eines Fermenters als ein wesentliches Element angesehen werden. Nachträglich installierte Systeme zeigen stets Mängel bei einer Maßstabsvergrößerung. Wichtigste Maxime für ihre Funktionstüchtigkeit ist — wie dies für jedes Element eines Zellkulturfermenters gilt — **größtmögliche Einfachheit**. Ein Begasungssystem sollte, mit Ausnahme der rein diffusiven Sauerstoffversorgung, im Idealfall auf eine Zellkultur keinerlei Einfluß nehmen. Hierin liegt begründet, daß der Vergleich zwischen Begasungssystemen, der häufig von verschiedenen Seiten vorgenommen wurde, nahezu immer ein Vergleich quantitativer Eintragsdaten ist; bei der Empfindlichkeit mancher Zelllinien steht jedoch häufig die Qualität der Eintragsmethodik im Vordergrund.

Im folgenden soll in gestraffter Form ein Überblick über die wichtigsten Realisierungen vorgenommen werden. Im Anschluß hieran wird das eigene Konzept vorgestellt.

3.2.1 Gasaustauschsysteme und ihre Bedeutung

Begasung von Suspensionen und gerührten Mikroträgern

Die einfachste Form der Begasung von Zellkulturreaktoren stellt der Rührkessel mit Oberflächenbegasung dar (Abb. 3.2a). Mit diesem System wurden umfangreiche Untersuchungen zur Entwicklung von Rühraggregaten entwickelt, die bei guten Durchmischungseigenschaften lokal hohe Schergeschwindigkeiten im Reaktionsgefäß vermeiden. Als ein wichtiges Kriterium für diese recht einfache Form der Begasung gilt die Vermeidung von Gasblasen [74].

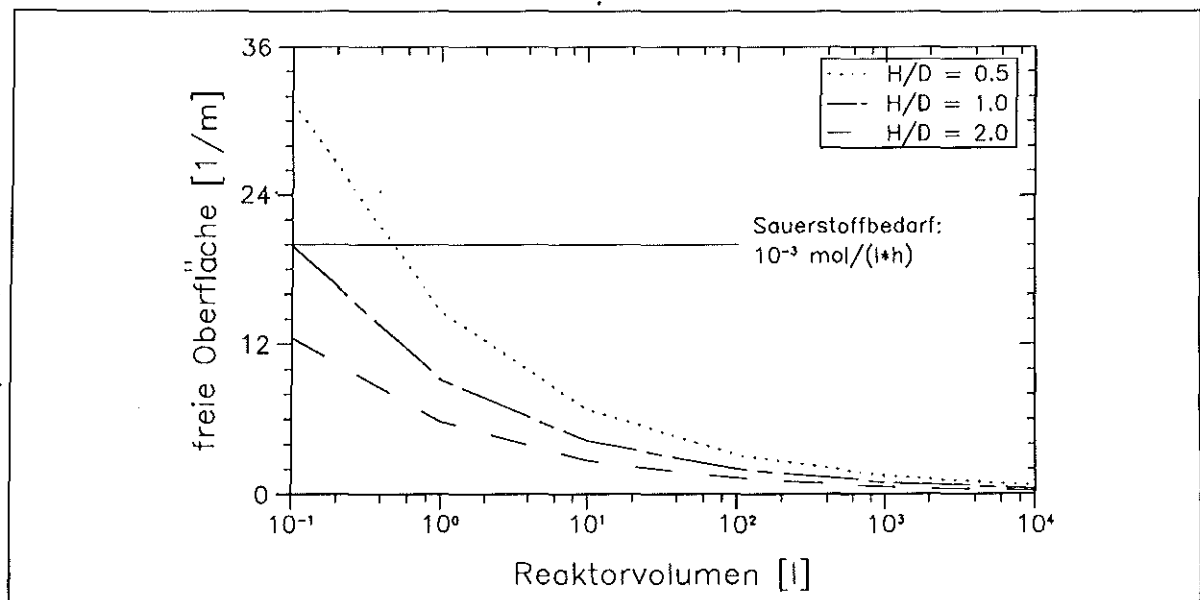


Abbildung 3.1: Oberfläche-Volumenverhältnis bei verschiedenen Reaktorgeometrien

Durch einfache Überlegungen kann für einen *zellkulturablen* Betrieb die Leistungsgrenze des Systems gezeigt werden. Abb. 3.1 zeigt den Zusammenhang zwischen der volumenbezogenen Oberfläche a_R und dem Reaktordurchmesser für unterschiedliche H/D – Verhältnisse. Für den zylindrischen Reaktor gilt die Beziehung:

$$a_R = (H_R/D_R)^{-2/3} * V_R^{-1/3} * (\pi/4)^{1/3} \quad (3.1)$$

Abb. 3.1 veranschaulicht weiterhin, daß für die üblichen Zelldichten in einem Rührkessel ohne Rückhaltung ($2 * 10^6 / \text{ml}_{\text{Reaktorvolumen}}$) bei einer angenommenen Sauerstoffaufnahme der Zellen ($5 * 10^{-13} [\text{mol}/(\text{Zelle} * h)]$) in Abhängigkeit vom H/D-Verhältnis schon bei Kleinfementern eine Sauerstofflimitierung vorliegen kann (Gesamtbedarf: $10^{-3} [\text{mol}/(\text{l} * h)]$)¹. In diesem Fall berechnet sich die freie Oberfläche zu $20 * (1/\text{m})$. Ein entsprechender Reaktor kann bei reiner Oberflächenbegasung also nur im Kleinmaßstab bei einem H/D-Verhältnis ≤ 0.5 ausreichend versorgt werden. Die erreichbaren k_L -Werte (Tab. 3.2) müssen unter Berücksichtigung von zellkulturverträglichen Rührgeschwindigkeiten ermittelt werden.

¹Dieser Wert kann bei Luftbegasung und einer 50 %-gesättigten Flüssigphase bei einem H/D-Verhältnis von eins durch einen Transportkoeffizienten von $k_L = 2.8 * 10^{-4} \text{ m/s}$ erreicht werden.

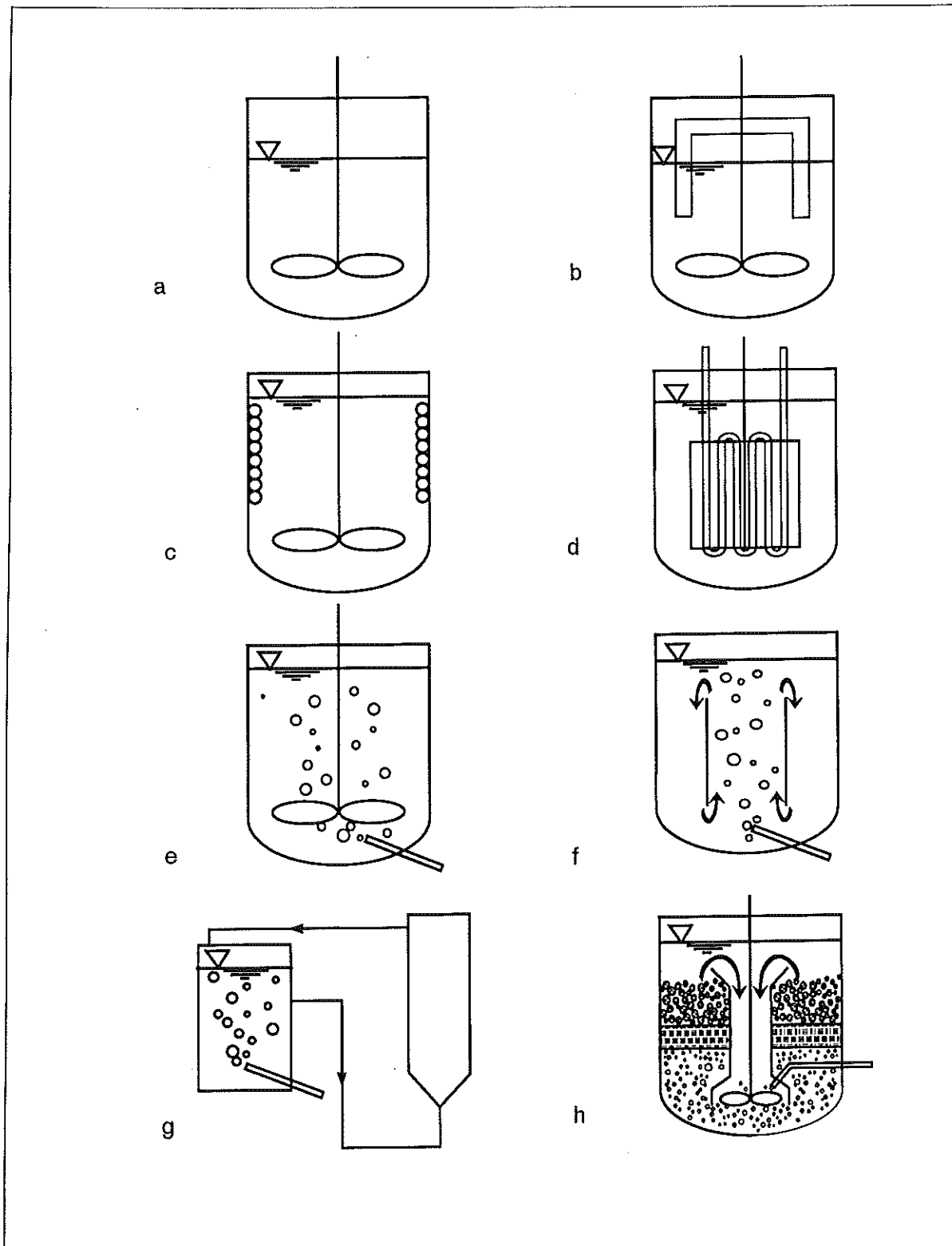


Abbildung 3.2: Begasungskonzepte für Zellkulturreaktoren

Eine einfache und effektive Form der Erweiterung des Rührkesselfermenters wird in kleinem Maßstab durch den Einsatz eines Oberflächenbegasers (Abb. 3.2b) erreicht. Hierdurch kann ohne eine aufwendige Konstruktion der Eintrag um den Faktor 5 erhöht werden [82]. Eine häufig angewandte Technik zur Erweiterung oberflächenbegaseter Rührkessel stellt das Einbringen eines Begasungsschlauches in das Reaktionsgefäß dar [7, 97, 125, 190]. Zum Einsatz kommen Schlauchmaterialien mit guten Permeationseigenschaften, sie werden spiralförmig entweder an der Innenwand oder aber auf einem Gestell im Zellkulturreaktor befestigt (Abb. 3.2c). Die in der Literatur angegebenen Daten² (Tab. 3.2) enthalten keine reproduzierbaren Angaben zu den Strömungsverhältnissen, ihr Zahlenwert wird jedoch an anderer Stelle bestätigt ([28], S. 197).

Lehmann [108] entwickelte eine Technik zur blasenfreien Begasung mittels poröser Polypropylenmembranen (Abb. 3.2d). Die Membran dient hierbei gleichermaßen als Sterilfilter der Gasphase (mittlere Porenweite: $0.3 \mu\text{m}$) und Begasungseinheit. Mit diesem System wird – bei einer maximalen transmembranen Differenzdruck von 13 mbar [99] – eine Maßstabsvergrößerung bis zu 300 Litern Reaktorvolumen vorhergesagt³. Durch die Beweglichkeit der Membran kann die Eintragsleistung variiert werden.

Begasungsart	Genannte Eintragsleistung	Quelle
Oberflächenbegasung ^a	$3 - 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$	[82],[86],[105],[90] ^b .
Schlauchbegasung im Rührkessel ^{a,c}	$1.1 \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$	[56],[57]
Accurelmembranen ^a	$0.25 \cdot 10^{-5} \text{ mol}_{\text{O}_2}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$	[107]
Blasensäulen	$0.6 - 1.0 \text{ mmol}_{\text{O}_2}/(\text{l} \cdot \text{h})$	[81]
Mikroblasen	2 und 5 $\text{mmol}_{\text{O}_2}/(\text{l} \cdot \text{h})$	[158]

^aReinsauerstoff in der Gasphase

^bKeine Geometriedaten

^cBei der Schlauchbegasung in Wirbelschichtfermentern können nach eigenen praktischen Erfahrungen Schlauchdichten von $100 \text{ m}^2/\text{m}^3$ realisiert werden. Hieraus ergeben sich mit dem genannten flächenbezogenen Wert für die Schlauchbegasung volumenspezifische Eintragsraten von $10 \text{ mmol}_{\text{Sauerstoff}}/(\text{l} \cdot \text{h})$.

Tabelle 3.2: Eintragsleistung unterschiedlicher Begasungssysteme

Blasenbegasung von Suspensionen

Eine direkte Begasung von gerührten Fermentern (Abb. 3.2e) [1] scheint auf Grund der resultierenden Zellschädigung und weiterer (nachfolgend genannter) Nachteile nicht sinnvoll. Eine eindeutige Zuordnung zwischen dem Zelltod und dem Schädigungsmechanismus ist bis heute nicht erbracht.

Zum Stand der Technik gehören mittlerweile die Blasensäulenreaktoren (Abb. 3.2f) [92]. Hierbei liegen die Aufstiegsgeschwindigkeiten der Blasen für den Anwendungsfall im Zellkulturbereich bei Höhe-Durchmesser-Verhältnissen von 6 – 8 bei $10 - 30 \text{ cm/s}$; die Blasengröße beträgt idealerweise 1 – 4 mm [20]. Aufgrund ihrer einfachen Handhabung und der Möglichkeit zur Maßstabs-

²Diese Eintragsdaten werden in der sich zeitlich anschließenden *Zellkulturliteratur* häufig falsch (zu niedrig) zitiert.

³Es wird nicht erläutert, wie der Differenzdruck bei zunehmender Reaktorhöhe (Druckgefälle in der Flüssigphase) konstant gehalten wird.

vergrößerung scheinen Blasensäulenreaktoren zunächst für Suspensionskulturen prädestiniert. Nach Aussagen entsprechender Forschungsgruppen begründet sich die Problematik jeder Blasenbegasung im Gebrauch von Antischaummitteln, der in Bezug auf Zulassungsbestimmungen [20] und Produktaufarbeitung [108] unvorteilhaft erscheint.

Begasung von Wirbelschichtfermentern

Bei der Begasung von Wirbelschichtfermentern kann zwischen *internen* und *externen* Begasungssystemen unterschieden werden. Wie bei der reinen Oberflächenbegasung kann auch im Fall der externen Begasung [16, 63, 71, 87, 93, 196] — unabhängig von der Art der Sauerstoffversorgung — das begrenzte Potential zur Maßstabsvergrößerung leicht gezeigt werden.

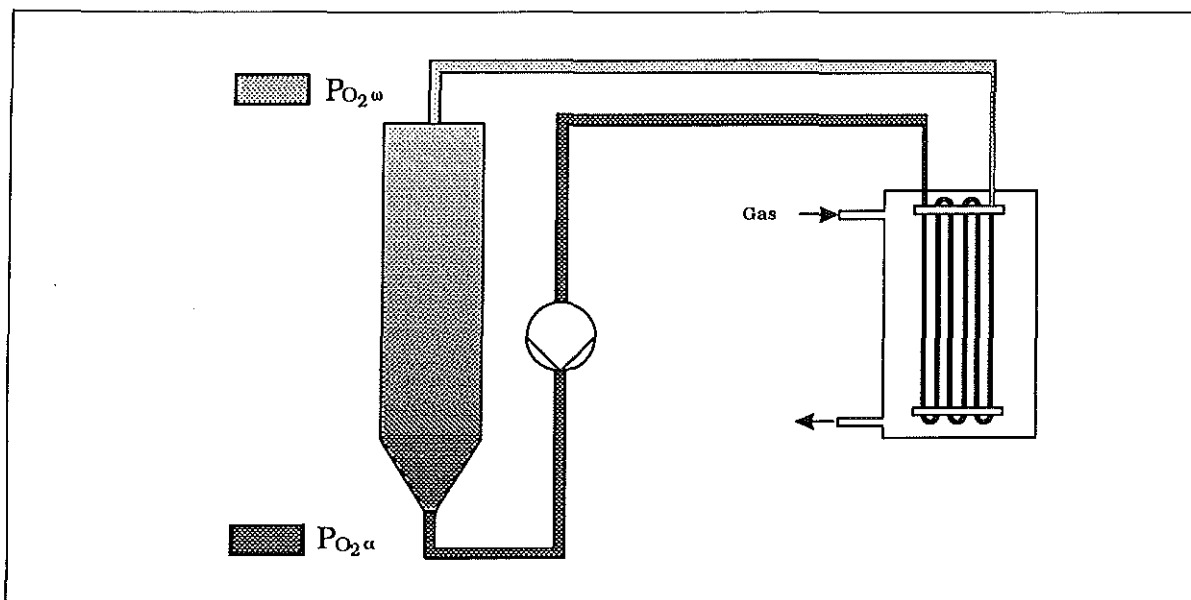


Abbildung 3.3: Sauerstoffgradient bei externer Begasung

Abb. 3.3 führt vor Augen, daß die Reaktorhöhe durch das Gefälle der Sauerstoffkonzentration begrenzt wird. Für einen Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase von über 0.5 bar_{Sauerstoff} werden toxische Effekte beobachtet [89], ein zu geringes Partialdruckniveau führt in aller Regel zu nicht optimalen Betriebszuständen⁴. Extrem kurze Verweilzeiten im Reaktorgefäß bedingen Zellschädigung durch Turbulenz oder einen Verlust an Wirbelgut.

Eine Variante zur reaktorintegrierten Begasung von Wirbelschichtfermentern in der Zellkulturtechnik wird durch die Erzeugung von Kleinstblasen (Größenbereich: 0.3 – 0.5 µm)⁵ erreicht, die eine Sauerstoffpufferung des Gesamt-Systems bewirken (Abb. 3.2h). Auch für diese Methodik, die bislang im 80 - Liter Maßstab erprobt wird, ist der Zusatz von Antischaummitteln notwendig [158].

⁴Verschiedene immobilisierte Zellen können interessanterweise auch über einen längeren Zeitraum (mindestens 40 Stunden) ganz ohne Sauerstoff überleben (eigene Beobachtungen, [163]).

⁵Das angegebene Intervall scheint für eine Zellkulturfermentation recht eng vorgegeben.

Zusammenfassung zu den Begasungsmethoden

Aus der vorangegangenen Beschreibung zur Realisierung von Begasungssystemen für die Zellkultur können in Hinblick auf den Sauerstoffeintrag in einen Wirbelschichtreaktor die folgenden Anforderungen aufgestellt werden:

- Der blasenfreie Betrieb ist für jeden Zellkulturfermenter ein Idealzustand (vgl. auch [20]). Blasen können zu einer Destabilisierung von Langzeitprozessen und zur Zell- und Produktschädigung führen [64, 196]. Der Gebrauch von Antischaummitteln reduziert den Stofftransport erheblich [105, 197], viel entscheidender stört er darüber hinaus das *downstream processing*. In Hinblick auf die geforderte Reproduzierbarkeit für Produktionsverfahren mit Zellkulturen sollte der Einsatz dieser Mittel durch eine geeignete Reaktorauslegung vermieden werden. Dies erlauben Permeationsmembranen.
- Die Begasungsvorrichtung muß in Hinblick auf eine Maßstabsübertragung am Ort des Verbrauches installiert sein. Für den gradientenfreien Betrieb eines Wirbelschichtreaktors muß also das Sauerstoffeintrags-System in das Wirbelbett integriert werden.
- Die Anordnung der Permeationsmembranen darf die Fluidisierung nicht behindern, da sonst eine gleichförmige Durchmischung nicht gewährleistet werden kann.
- Der Sauerstoffeintrag muß dem Verbrauch jederzeit angepaßt werden, für die bestmögliche Auslegung der Membranfläche sollten daher Verbrauchsraten und die größte Zelldichte bekannt sein oder abgeschätzt werden.

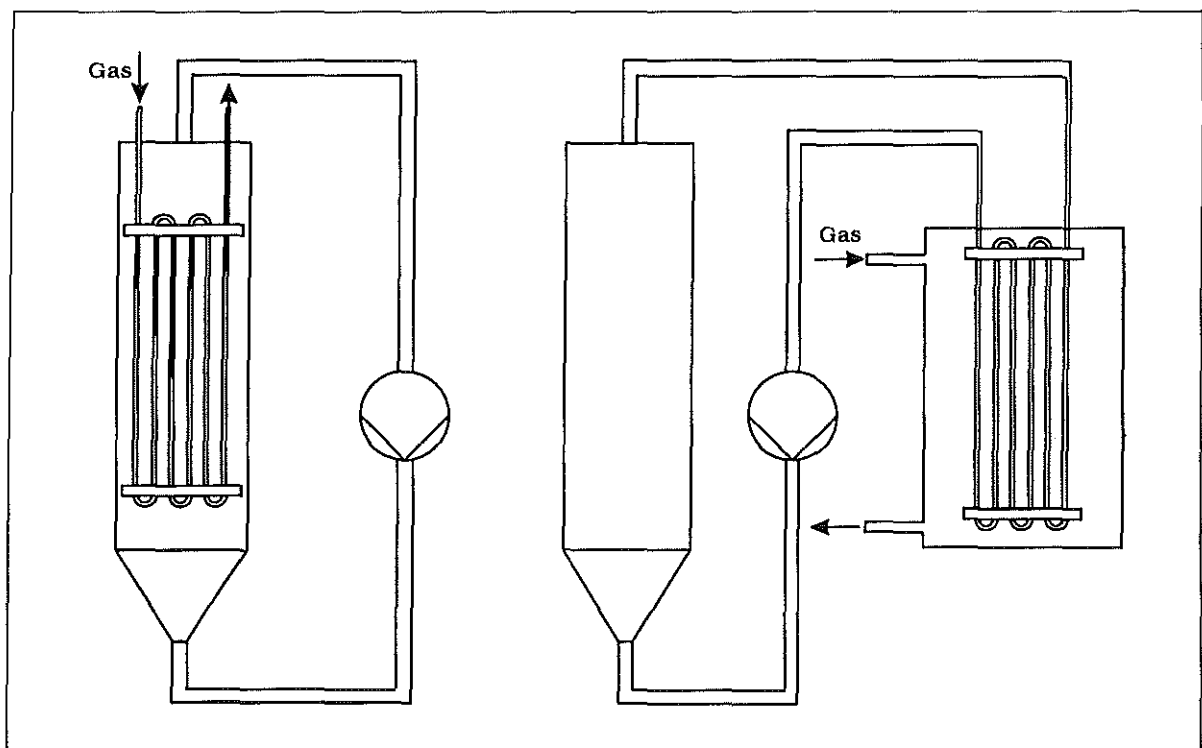


Abbildung 3.4: Prinzip der reaktorintegrierten und externen Permeationsbegasung

3.2.2 Reaktorintegrierte Permeationsbegasung

Zur Sauerstoffversorgung von Wirbelschichtreaktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit Reaktoren sowohl mit integrierter Begasung (Abb. 3.4) als auch mit einer externen Begasungseinheit konzipiert, sie bilden einen Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe *Zellkultur* des Instituts für Biotechnologie im Forschungszentrum Jülich. Ihre Auswahl richtet sich — unter der Voraussetzung optimaler Kulturbedingungen — alleine nach der Gesamtzahl an Zellen im Reaktor. Eine begründete Entscheidung für den Übergang zur — in jedem Falle aufwendigeren — reaktorintegrierten Begasung setzt Annahmen oder Kenntnisse über zellspezifische Sauerstoffaufnahme und die größtmögliche Zelldichte während einer Fermentation voraus⁶. Diese notwendigen Randbedingungen können gemäß Tab. 3.3 formuliert werden:

Zellzahl pro Trägervolumen	zellspezifische Sauerstoffaufnahme	Hohlraumanteil im Fließbett
$1 \cdot 10^{11} \text{ [Zellen/l]}$	$0.5 \cdot 10^{-9} \text{ [mmol/(Zelle \cdot h)]}$	0.6 [—]

Tabelle 3.3: Annahmen zur Auswahl der Begasung

Hieraus errechnet sich der größtmögliche zu erwartende Sauerstoffbedarf zu:

$$r_{O_2} = 0.02 \text{ mol}/(l_{\text{fluidisiertes Wirbelbett}} \cdot h) \quad (\text{oder: } 0.64 \text{ g}/(l_{\text{fluidisiertes Wirbelbett}} \cdot h)) \quad (3.2)$$

mit

r volumenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit

Zur Abschätzung des Konzentrationsgefälles für den Sauerstoff wird die Bilanz für die Stoffart in Zylinderkoordinaten^A aufgestellt ([19], S. 559) und in eindimensionaler, stationärer Form angewendet:

$$v_z \frac{\partial c_i}{\partial z} = R_i \quad (3.3)$$

mit

v_z Geschwindigkeit in Strömungsrichtung

c_i Molkonzentration der Komponente i

R_i Quell-/Senkenterm

Bei vorgegebenem Trägermaterial (spezifischem Gewicht der Festphase) und idealem Anströmverhalten führt eine Variation der Leerrohrgeschwindigkeit (s. Kap. 4.1) zu einer Änderung des Hohlraumanteils in der Wirbelschicht. Die Verweilzeit des Mediums in der Wirbelschicht und damit verknüpft das Problem der Gradientenbildung sind durch die Expansion jedoch nur wenig zu beeinflussen, ein Regelungsparameter ist hiermit nicht gegeben⁷.

Durch die Änderung des spezifischen Gewichtes des Trägermaterials⁸ ist eine Einflußnahme auf die Gradientenbildung durch eine erhöhte Geschwindigkeit im Wirbelbett prinzipiell möglich (Abb. 3.5). Diese Technik kann erfolgreich eine — gleichwohl begrenzte — Maßstabsvergrößerung begünstigen. So wurden Verfahren entwickelt, mittels derer beschwerende Materialien in zellkompatible Trägermaterialien eingebracht werden. Im Falle von Collagenmaterialien kann so die mittlere Dichte um den Faktor 4 erhöht werden [184] (vgl. Abb. 3.6). Eine grundlegende Lösung zur Maßstabsvergrößerung

⁶Prinzipiell ist die Installation einer integrierten Begasung auch bei Kleinstsystemen möglich [23].

⁷Mit der Expansion der Wirbelschicht steigt auch die Verweilzeit des Frischmediums im Reaktionsraum.

⁸Die verwendeten Materialien werden in Kap. 4.3.2, S. 48 vorgestellt.

von Wirbelschichtreaktoren ist jedoch auch so nicht zu erreichen. Abb. 3.6 verdeutlicht, daß das besiedelbare Trägervolumen durch die Zunahme an beschwerenden Materialien im Falle des Collagen stark abnimmt. Dieser Negativeffekt wird dadurch verstärkt, daß die nicht immobilisierten freien Zellen im Umlauf des Reaktors und in der Flüssigphase des Wirbelbettes bei einer Vergrößerung der Anströmgeschwindigkeit einer erhöhten Beanspruchung ausgesetzt sind und zerstört werden können. Aussagen, die die Sinkgeschwindigkeit von Trägern als Kriterium für die Verwendung eines Träger-typs ansehen [91], versuchen diesen Effekt theoretisch zu fassen. Die hieraus gezogene Folgerung, daß poröse Glasträger zur Kultivierung von Suspensionszellen ungeeignet sind, beruht, wie eigene erfolgreiche Experimente zeigen, auf einer falschen Einschätzung der Grenzwerte. Dies konnte durch zahlreiche Fermentationen unterschiedlicher Hybridomzellen unter Verwendung des Siran-Trägers durch Messungen aller wichtigen Prozeßparameter einschließlich der Zellvitalität gezeigt werden.

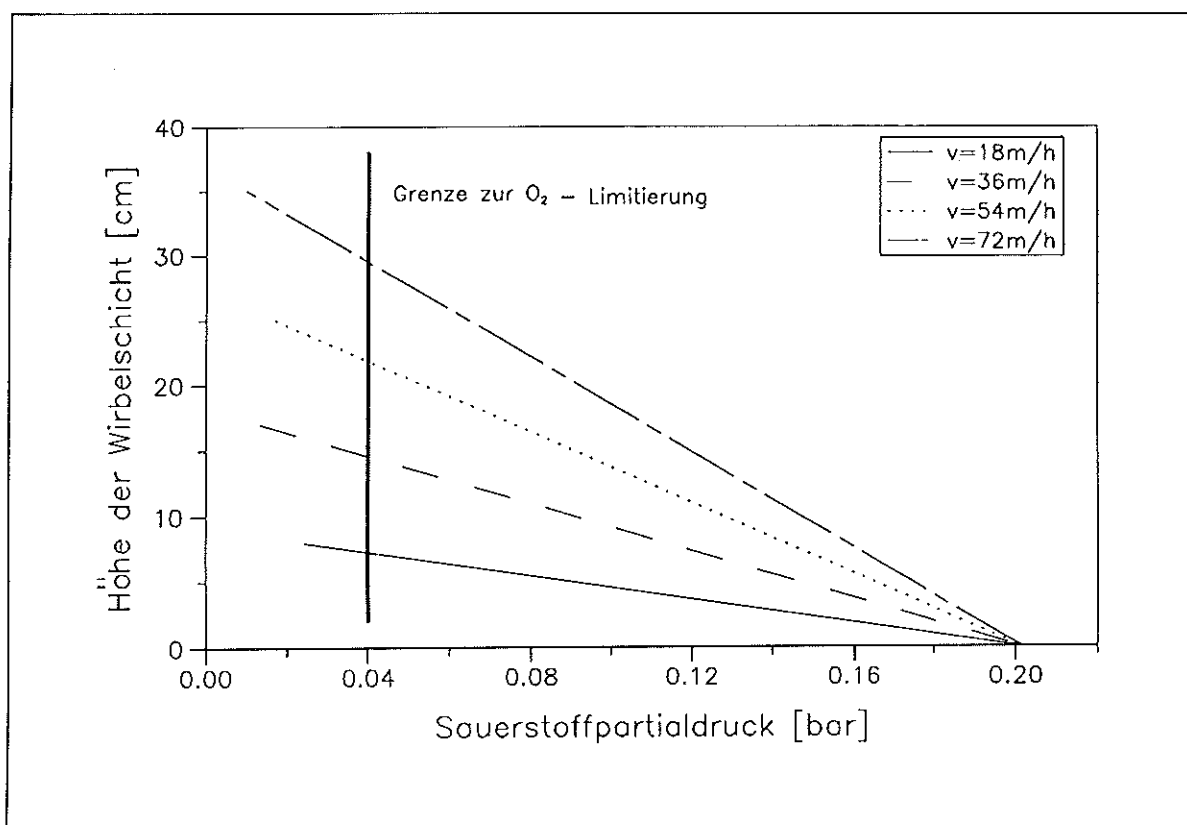


Abbildung 3.5: Gradienten des Sauerstoffpartialdrucks in Abhängigkeit von der Leerrohrgeschwindigkeit (zellspez. Sauerstoffaufnahme: $2 \cdot 10^{-13} \text{ [mol/(Zelle} \cdot \text{h)]}$)

Aus Abb. 3.5 geht hervor, daß bei einer Reaktorhöhe größer 0.25 m auch bei Trägern hoher effektiver Dichte (Anströmgeschwindigkeiten: 36 – 54 m/h) eine integrierte Begasung vorgesehen werden sollte⁹.

Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Anordnung der Permeationsmembranen gewählt, bei der die Schlauchmembranen parallel zur Strömungsrichtung angeordnet werden. Somit werden Toträume im Wirbelbett gänzlich vermieden, Ablagerungen in Totwassergebieten werden durch diese

⁹Bei der Berechnung wurde der Hohlraumanteil im Fließbett zu $\epsilon = 0.6$, die trägerbezogene Zellzahl zu $1 \cdot 10^{11} \text{ [Zellen/l]}$ angenommen.

Konstruktion ausgeschlossen. Bei dieser Methodik besteht der Vorteil, daß die Membranen in einem frei wählbaren Abstand zueinander über den Kreisquerschnitt verteilt angeordnet werden können und somit ein unzulässig hohes Gefälle für die Sauerstoffkonzentration über den Reaktorquerschnitt vermieden werden kann.

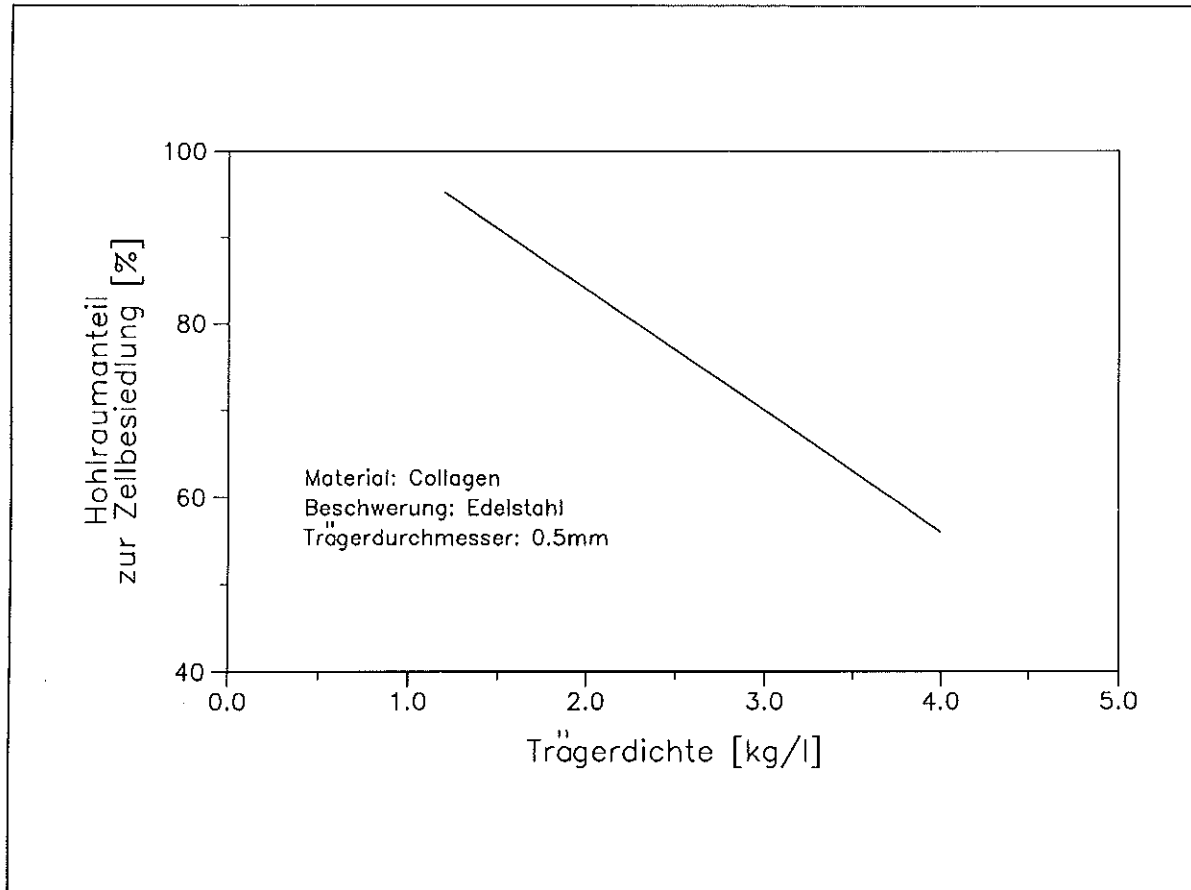


Abbildung 3.6: Nutzbarer Hohlraumanteil von Collagenträgern bei unterschiedlichem Ballastanteil

Die Berücksichtigung dieses Effekts wird bei unkritischer Betrachtung häufig als ein Verlust an Reaktorvolumen durch die Unterteilung des Begasungssystems in Kompartimente aufgefaßt, er erweist sich jedoch gerade in bezug auf eine Maßstabsvergrößerung als ein enormer Vorteil. Die gewählte Anordnung ist also nicht Kompromiß, sondern Sinn dieser Begasungstechnik. Die Abstraktion (Minimierung der Schlauchzahl) führt auf die begaste Rohrwand, diese bringt im Großmaßstab jedoch wiederum Limitierungen oder sehr schwer zu handhabende Systeme mit sich. Die Lösung dieses Problems liegt also in einer Optimierung des Membrandurchmessers. Durch das Einbringen der Membran in das Fließbett wird ein ständiger Selbstreinigungseffekt der Membran erreicht. Ein zusätzlicher Transportwiderstand für den Sauerstoffeintrag durch adhärente Zellen (fouling) tritt somit nicht auf. Abb. 3.7 zeigt das Begasungsmodul sowie die in die Wirbelschicht integrierte Membran während der Fluidisierung.

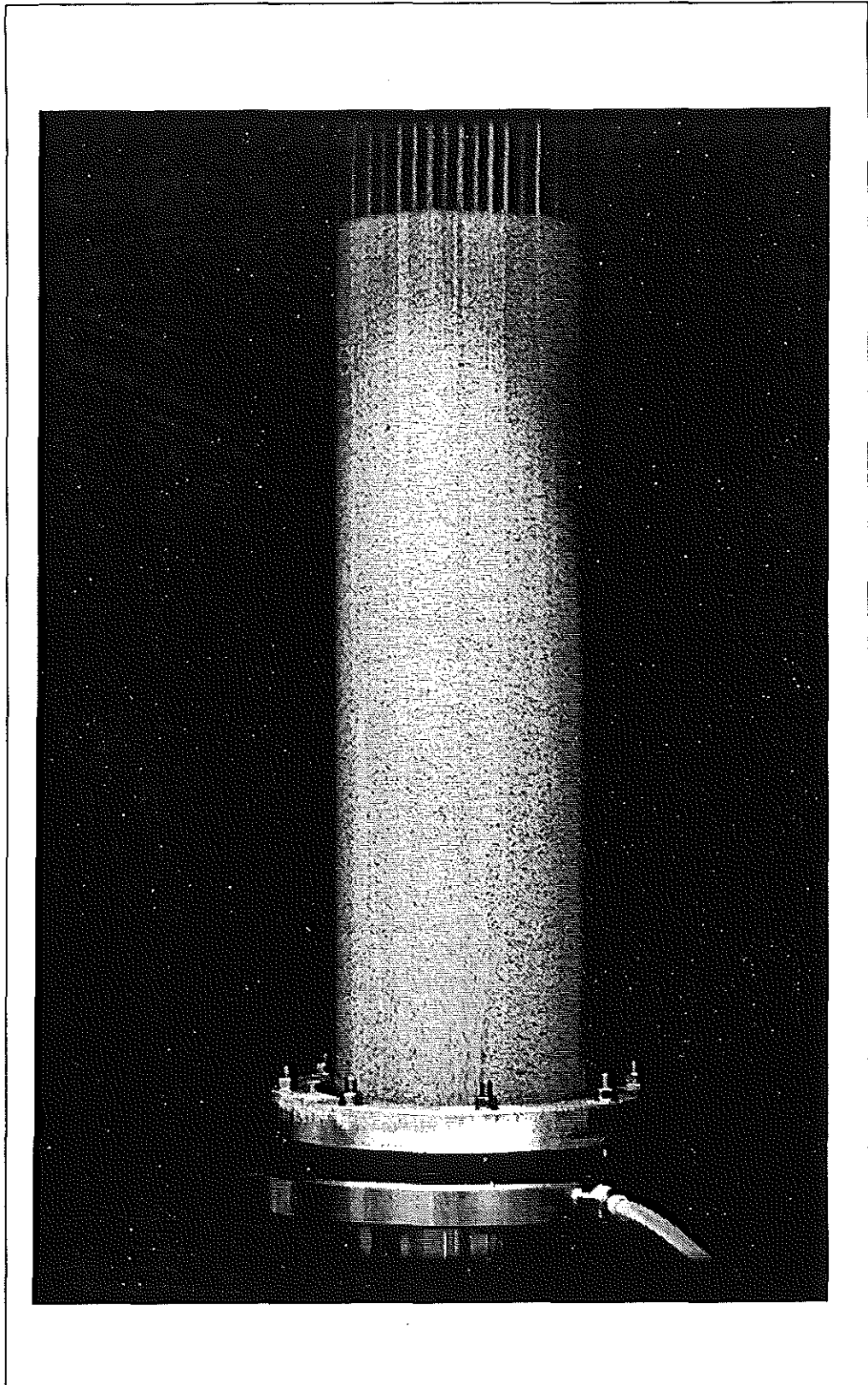


Abbildung 3.7: Begasungsmodul in der Wirbelschicht

3.3 Beschreibung der Versuchsanlage

Anlagen zur Fermentation von Säugerzellen stellen eine Verknüpfung einfachster verfahrenstechnischer Grundoperationen dar. Die Anlagenumgebung, also die Analytik, die Aufarbeitung und das Bereitstellen geeigneter Zellen verkörpern hingegen äußerst komplizierte Prozesse.

Eine fehlende Detailkenntnis bei der Auslegung eines Zellkulturreaktors führt häufig dazu, daß die Zellen entweder nicht wachsen oder unzureichend produzieren. Ein gutes System zur Kultivierung von Säugerzellen zeichnet sich durch ein konsequentes Minimieren überflüssiger Bauteile aus, die verwendeten Komponenten sollten die größtmögliche Zuverlässigkeit und Einfachheit aufweisen. Insbesondere sind die (bereits in Kap. 3.1 erwähnten) Kriterien

- Sterilität,
- Vermeidung von Verstopfungen,
- gute Durchmischung bei geringem Energieeintrag und
- Vermeidung von Inhibierungen (z. B. durch Stoffwechselprodukte) und Limitierungen (z. B. durch die Konzentration der Substrate)

schon bei der Auslegung eines Systems zu beachten. Die Zelle sollte das künstliche System idealerweise nicht wahrnehmen. Unstetige Bedingungen, so zum Beispiel Totgebiete, unstetige Querschnittsveränderungen, Einbauten quer zur Strömung und zusätzliche Phasen gefährden den einwandfreien Betrieb einer Anlage.

Zellkulturfermentationen können auf Grund der Verdopplungszeiten der Zellen (20–30 Stunden) den langsamen und zeitintensiven Prozessen zugerechnet werden. Reaktionen des biologischen Systems „Zelle“ treten bei korrekter Anlagenbedienung daher ebenfalls stets langsam auf, die Regelung von Fermentern ist hierauf abzustimmen. Dem Anfahrvorgang^A sollte durch konstruktive Maßnahmen Gewicht beigemessen werden, da die Möglichkeit zur direkten Einflußnahme und Steuerung zu Beginn der Fermentation die Dauer des Prozesses und somit seine Leistungsfähigkeit wesentlich beeinflußt.

Aus steriltechnischer Sicht sollte ein Zellkulturfermenter über Monate ohne den Zusatz von Antibiotika oder ähnlichen Mitteln betrieben werden können. Solche Substanzen, die aus Aufarbeitungsgründen und zellphysiologischer Sicht im Einzelfall Probleme mit sich bringen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *nicht* verwendet.

Anlage mit reaktorintegrierter Begasung (0.6–1.0 l)

Wesentliches Element der hier beschriebenen Anlage (Abb. 3.8) ist der Flüssigkeitskreislauf (Umlauf), in dem eine Schlauchpumpe (P1) dem Reaktionsgefäß (Ve1) von unten ($\rho_{\text{Wirbelgut}} > 1 \text{ kg/l}$) das Zellkulturmedium zuführt. In diesem Rohrreaktor wird das Wirbelgut durch zuströmendes Substrat fluidisiert, der umgewälzte Volumenstrom richtet sich also ausschließlich nach dem spezifischen Gewicht der Träger sowie nach dem gewünschten Expansionsgrad der Wirbelschicht. Der Pumpenschlauch wird derart dimensioniert, daß durch die von ihm aufgebrachte Pulsation das Verwirbelungsverhalten nicht negativ beeinträchtigt wird (Im vorliegenden Fall wurde für das Verhältnis von Reaktordurchmesser zum Schlauchinnendurchmesser 5.2 gewählt).

Dem Kreislauf wird zur Versorgung der Zellen gekühltes Frischmedium (P4) zugeführt, die hierbei verdrängte Flüssigkeitsmenge – sie enthält das gewünschte Produkt in verdünnter Form (Größenordnung: 10–50 mg/l) – wird wahlweise in Sammelbehälter (Ve5, Ve6) geleitet. Der Massenstrom an Frischmedium, das dem Reaktor zugeführt werden muß, wird anhand der Verbrauchsrate eines Leitsubstrats (Glukose, Glutamin) bestimmt und zwischen den diskontinuierlichen Analysen konstant

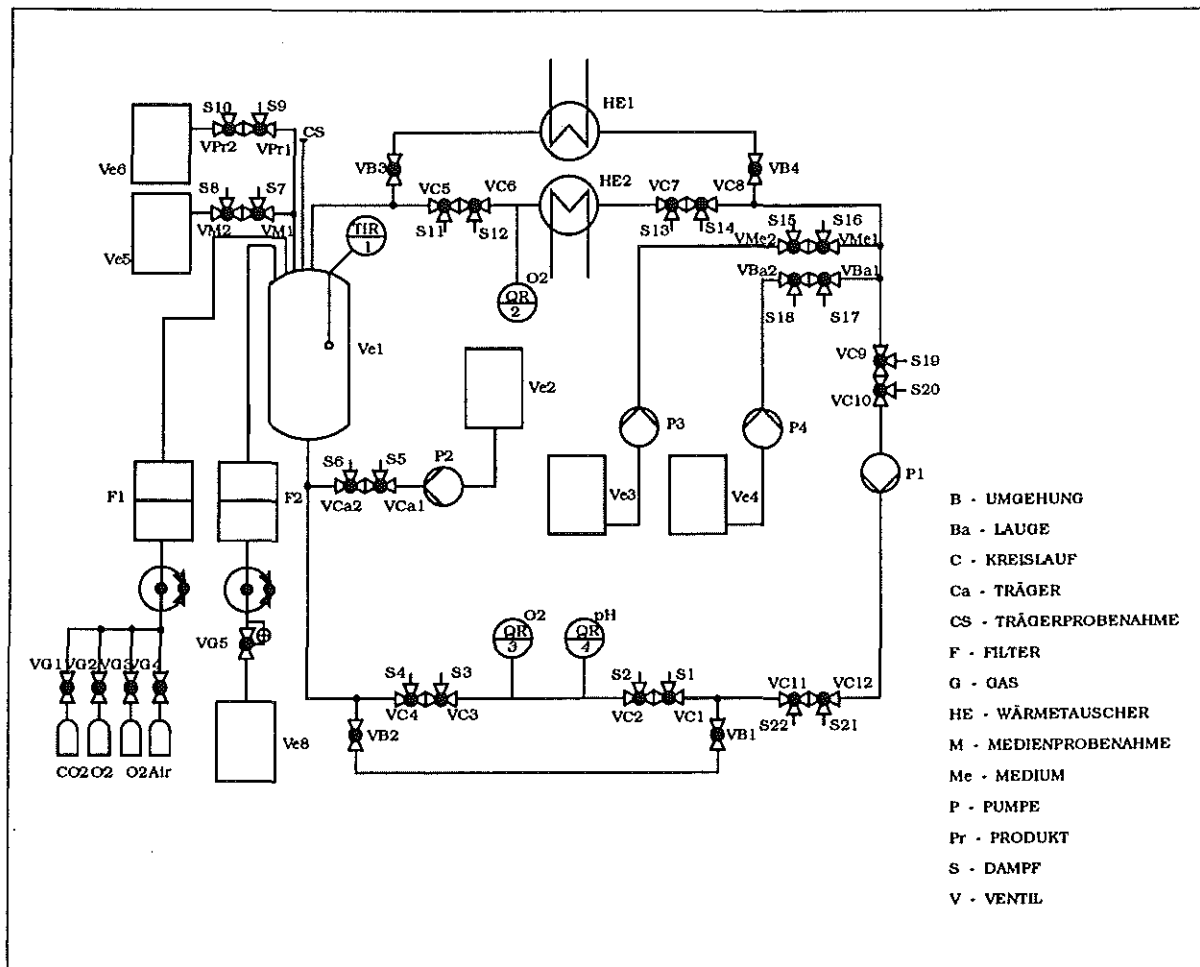


Abbildung 3.8: Fließbild der Versuchsanlage

gehalten (vgl. Kap. 7, Abb. 7.7). Aus diesem Massenstrom kann die jeweilige Verweilzeit des Frischmediums im Wirbelbett bei Kenntnis des Expansionsgrades ϵ sowie des Trägervolumens berechnet werden. Die Dosieraufgabe übernimmt eine *Dosierstrecke*, die in Verbindung mit einem sich auf einer Waage befindlichen Vorlagegefäß eine Dosierpumpe (P4) ansteuert. Die Zusammensetzung des Frischmediums wird darüber hinaus so eingestellt, daß seine übrigen Komponenten nach Wissensstand zu keiner Zeit die Fermentation limitieren, weder bezüglich der einzelnen Komponenten noch durch die Osmolarität des Zellkulturmediums (vgl. Anh. B, S. 122).

Auf Grund der recht kleinen Bauausführung reicht zur Regelung der Medientemperatur die Temperaturmessung (TIR1) an einer einzelnen Stelle *im* Reaktor. Als Bindeglied zwischen einem Wasserbad mit einem Externregler und dem Kreislaufstrom dienen Gegenstromwärmetauscher (He1, 2). Ihre Dimensionierung richtet sich nach der Innenwandtemperatur des Kreislaufes.

Die Sauerstoffversorgung und -partialdruckregelung werden über einen in das Reaktorgefäß eingebrachten Membranmodul gewährleistet. Durch eine Lochplatte werden die parallel angeordneten Silikonmembranen angeströmt. Dieser Schlauchmembran wird über ein Filter (F1) ein Gasgemisch mit Sauerstoffanteil zugeführt. Die Zusammensetzung des gasförmigen Stroms wird über eine Gasmischstation eingestellt, in dem die Gase Kohlendioxid, Luft und Sauerstoff über geregelte Massendurchflußmesser (VG1-VG4) bereitgestellt werden. Der Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigkeit wird

mittels zweier Elektroden (QR2, 3) kontinuierlich erfaßt. Sein Sollwert wird der Gasmischstation über eine manuelle Vorgabe oder über den Prozeßrechner mitgeteilt. Der Abgasstrom wird über ein ebenfalls geregeltes Druckhalteventil (VG5) geleitet. Bei hohen reaktorspezifischen Verbrauchsdaten kann durch das Zufahren dieses Ventils der Gesamtdruck über die Membran erhöht und mehr Gas eingetragen werden. Die Filter (F1, 2) werden als redundante Sicherheitsvorkehrungen benutzt, der Gaseintrag über die Silikonmembran selbst wirkt bereits als Sterilgrenze.

Die Membran dient in weiterer Funktion der Einstellung des pH-Wertes im Flüssigkeitskreislauf. Hierzu wird der Anteil an CO_2 in der Gasphase variiert. Das Zuführen von Kohlendioxid findet besonders zu Beginn einer Fermentation zur Gewährleistung der pH-Konstanz Anwendung, während beim Durchströmen der Membran mit einem anderen Gas der Anlage kontinuierlich Kohlendioxid entzogen wird. Der zweitgenannte Effekt wird ab dem Zeitpunkt der Fermentation genutzt, zu dem die Zellen selber CO_2 produzieren. In diesem Fall kann zusätzlich zu dem erwähnten Strippeffekt durch die Pumpe (P3) verdünnte Natronlauge aus dem Behälter (Ve3) in den Fermenter dosiert werden. Auch diese Regelung beruht auf einer pH-Elektrodenmessung (QR4) im Flüssigkeitskreislauf.

Zur Ermittlung des aktuellen Prozeßzustands sind eine Flüssigkeitsprobenahme (wahlweise Ve5 oder Ve6) und eine Trägerprobenahme vorgesehen. Zur Trägerentnahme wird an den Reaktor ein selbstentwickeltes Probenahmemodul angekoppelt (CS).

Das Animpfen des Reaktors sowie das Befüllen des Systems mit Wirbelgut während des sterilen Betriebs geschieht über ein weiteres Vorlagegefäß (Ve2).

Der gesamte Kreislauf setzt sich aus hochlegierten Edelstahlkomponenten (V4A-Qualität) zusammen, die nur durch den flexiblen Schlauch der Kreislaufpumpe unterbrochen werden. Das Reaktionsgefäß selber besteht aus einem zylindrischen Spezial-Glasrohr, das zwischen Reaktorkopf und Reaktorboden eingespannt wird.

Zum *vor Ort*-Sterilisieren der hier beschriebenen Versuchsanlage wird das gesamte Anlagenvolumen gleichzeitig mit Heißdampf durchströmt. Lediglich der Pumpenschlauch wird extern in einem Autoklaven vorbereitet und an die Anlage angekoppelt. Alle Ankopplungsvorgänge an den Fermenterkreislauf werden mit einer Heißdampfbehandlung vorbereitet. Im Bedarfsfall können ebenso Anlagenbauteile (z. B. defekte Elektroden) abgekoppelt, vorbereitet und erneut zugeschaltet werden.

Das Auswechseln einer Sauerstoffelektrode bei laufendem Prozeß kann anhand des Fließbildes (Abb. 3.8) wie folgt beschrieben werden:

- Die Ventile VB2 und VB1 werden geöffnet.
- Die Ventile VC1, VC2, VC3 und VC4 werden geschlossen.
- Die Sondenstrecke mit den Elektroden QR3 und QR4 kann demontiert und gegebenenfalls überholt werden.
- Bei offener Ventilstellung von VC3 und VC2 wird die Sondenstrecke in einem Standautoklav sterilisiert. Anschließend werden die Ventile unter einer Sterilbank verschlossen. Die Sondenstrecke wird wieder eingebaut.
- Durch das Ventil S4 wird Heißdampf eingeleitet, der durch VC4 und VC3 auf direktem Wege aus S3 wieder entweicht. Der gleiche Vorgang wird an der Ventilkombination S2, VC2, VC1 und S1 wiederholt.
- Nun werden die Ventile VC4, VC3, VC2 und VC1 geöffnet, die Bypass-Ventile VB1 und VB2 werden wieder geschlossen.

Bei den Bedampfungsvorgängen an der Fermentationsanlage bei einem laufenden Prozeß ist Vorsorge zu treffen, daß durch Wärmeleitungsvorgänge die Temperatur des Zellkulturmediums im Reaktorkreislauf nicht ansteigt.

Kapitel 4

Verfahrenstechnische Grundlagen

Für die Fermentation von Säugerzellen in einer Wirbelschicht sind umfangreiche Vorkehrungen zu einer gezielten Gestaltung der Zellumgebung zu treffen. Erst grundlegende Kenntnisse über die Wechselwirkung zwischen Zelle und Umgebung ermöglichen und erleichtern den Kultivierungsprozeß. Hierzu gehört wesentlich ein vertieftes Wissen um den Mechanismus der Fluidisierung (Kap. 4.1) sowie das Verhalten und die Eigenschaften der beteiligten Stoffsysteme (Kap. 4.2 und Kap. 4.3). Im Anschluß wird als ein zentraler Aspekt dieser Arbeit der experimentell untersuchte Stofftransport durch eine physikalisch-mathematische Ableitung beschrieben (Kap. 4.4).

4.1 Grundlagen der Wirbelschichttechnik

Im folgenden werden die fundamentalen Zusammenhänge der fest-flüssig-Wirbelschichten vorgestellt und ihre Relevanz für den vorliegenden Anwendungsfall diskutiert. Zielsetzung ist es, die zum Verständnis der hier verwendeten Wirbelschichten notwendigen Beziehungen vorzustellen bzw. herzuleiten. Dies erscheint angebracht, da viele Lehrbücher die Theorie der Fluidisierung auf die Gas-Feststoff-Systeme reduzieren. In Ableitungen werden so z. B. häufig Vereinfachungen wie die Vernachlässigung der Fluidichte gegenüber dem Feststoff ohne Nennung der Randbedingungen vorausgesetzt. Zum Studium weitergehender Zusammenhänge sei auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen [41, 75, 104, 129, 186].

4.1.1 Die flüssig-fest-Wirbelschicht

Der Sachverhalt *fluidisieren* meint, eine Schüttung fester Partikel mittels einer durch sie strömende Phase in einen flüssigkeitsähnlichen Zustand zu versetzen.

Eine flüssig-fest Wirbelschicht, und nur solche werden im folgenden Abschnitt behandelt, zeichnet sich dadurch aus, daß nach dem Überschreiten einer Mindest-Fluidisierungsgeschwindigkeit die geschichteten Partikel eine gleichmäßige Ausdehnung erfahren. Dieses Verhalten kann von der Minimalfluidisation (*Hohlraumanteil* $\epsilon \sim 0.4$) durchgehend bis zur Schwebegeschwindigkeit des Einzelteilchens und dem damit verbundenen gleichmäßigen Teilchenaustrag (*Hohlraumanteil* $\epsilon = 1$) beobachtet werden¹. Ein ausgeprägter Lockerungspunkt tritt nur dann auf, wenn die Schüttung ausreichend eng fraktioniert worden ist. Beim Durchströmen des Haufwerks muß zu seiner Fluidisierung nur das um den Auftrieb verminderte Gewicht in der Schwebe gehalten werden [154]. Hierzu sind in aller Regel bereits sehr niedrige Anströmgeschwindigkeiten (Partikel-Reynoldszahlen) ausreichend.

¹Unter dem Hohlraumanteil versteht man das Verhältnis des freien Volumens zwischen den Trägern in der Schüttung zum Gesamt-Schüttungsvolumen (vgl. S. 48).

Das Strömungsverhalten

Das Strömungsverhalten einer Wirbelschicht läßt sich nach Reh [153] durch sechs Ähnlichkeitskenngrößen ausreichend charakterisieren:

- Das Verhältnis aus der Strömungskraft auf die Wirbelschicht und der Widerstandskraft durch das (um den Auftrieb verminderte) Gewicht der Wirbelschicht.

$$n = \frac{\Delta p \cdot A_0}{h A_0 (\rho_s - \rho_l)(1 - \varepsilon)g} \quad (4.1)$$

mit

n	Lastvielfaches
Δp	Druckverlust der Schüttung
A_0	Querschnittsfläche
h	Fließbetthöhe
ρ_s	Dichte des Feststoffs
ρ_l	Dichte der Flüssigkeit
ε	Hohlraumanteil
g	Erdbeschleunigung

Bei einem Fließbett nimmt dieser Wert unabhängig von der Bettausdehnung den Wert 1 an, das heißt, der Druckverlust über die Wirbelschicht bleibt auch bei zunehmender Anströmung annähernd konstant.

- Den Hohlraumanteil ε , also das Flüssigkeitsvolumen in der Wirbelschicht bezogen auf das Gesamt-Wirbelschichtvolumen.

$$\varepsilon = 1 - Z \cdot \frac{2}{3} \cdot \frac{d_s^3}{D^2 \cdot h} \quad (4.2)$$

mit

Z	Partikelzahl
d_s	Teilchendurchmesser
D	Reaktordurchmesser

Die Teilchenzahl Z einer Wirbelschicht läßt sich mit einer Genauigkeit von 5 % aus der einfach geschütteten Schicht von kugelförmigen Partikeln der Höhe H_0 berechnen. Hierfür liegt das statistische Mittel für den Hohlraumanteil zwischen $\varepsilon_0 = 0.4$ und 0.37.

- Die Partikelreynoldszahl Re_l .

$$Re_l = \frac{u_l \cdot d_s}{\nu} \quad (4.3)$$

mit

u_l	Anströmgeschwindigkeit (Leerrohrgeschwindigkeit)
ν	kinematische Viskosität der Flüssigkeit

- Die Archimedeszahl Ar . Sie hängt nur von den Stoffgrößen der flüssig-fest-Wirbelschicht ab und charakterisiert das Stoffsystem. Sie kann auch als dimensionsloser Teilchendurchmesser betrachtet werden.

$$Ar = \frac{d_s^3 \cdot g \cdot (\rho_s - \rho_l)}{\nu^2 \cdot \rho_l} \quad (4.4)$$

- Eine erweiterte Froude-Zahl.

$$Fr^2 \cdot \frac{\rho_l}{(\rho_s - \rho_l)} = \frac{u_l \cdot \rho_l}{d_s \cdot g \cdot (\rho_s - \rho_l)} \quad (4.5)$$

Diese Kennzahl geht aus der Druckverlustbeziehung Gleichung 4.1 hervor, indem man diese Gleichung einem empirischen Ansatz zur Beschreibung des Druckverlustes in einem (z. B. nach Ergun oder Carman-Kozeny) Modellsystem gleichsetzt.

- Eine weitere, häufig verwendete Kennzahl zur Erstellung von Zustandsdiagrammen für die Wirbelschicht ist durch die Zahl Ω definiert ([129], S.32).

$$\Omega = \frac{u_l^3}{g \cdot \nu} \cdot \frac{\rho_l}{(\rho_s - \rho_l)} \quad (4.6)$$

Aus den angeführten Ähnlichkeitskenngrößen läßt sich ein *Zustandsdiagramm der homogenen Fluidisation* aufbauen (Abb. 4.1), das das Verhalten von flüssig-fest-Wirbelschichten in weiten Bereichen hinreichend charakterisiert (vgl. [129]). Für den Bereich der Wirbelschichtfermenter mit immobilisierten Bakterien- oder Säugerzellkulturen können somit zum Zweck der Reaktorauslegung und zur Abschätzung der Scherbelastung von Organismen durch den Strömungszustand wichtige Aussagen vorab ermittelt werden.

Vergleicht man das hier beschriebene Verhalten noch einmal mit dem der Gaswirbelschichten, so läßt sich die folgende Aussage treffen:

Eine Aggregatbildung tritt bei der homogenen flüssig-fest-Wirbelschicht nicht auf. Der auf das Einzelteilchen bezogene Widerstand in der Flüssigkeit liegt stets höher als in der Gasphase, da die Teilchen gleichmäßig angeströmt werden und sich nicht hintereinander anordnen, was üblicherweise den Widerstand absenkt. Daher ist der Betrieb einer Flüssig-Wirbelschicht bei einer Fluidisierungsgeschwindigkeit, die einen größeren Wert annimmt als die Sinkgeschwindigkeit des Einzelteilchens, im Vergleich zum Gas nicht möglich, sie führt zum Teilchenaustrag.

Weiterführende Aussagen zum Verhalten einer Flüssig-Wirbelschicht und zu ihrer Auslegung werden durch die Gleichung von Richardson und Zaki [161] möglich:

$$\frac{u_l}{u_s} = \varepsilon^n \quad (4.7)$$

mit

- u_l Leerrohrgeschwindigkeit (superficial velocity)
- u_s Sinkgeschwindigkeit des Einzelteilchens
- n Exponent

Diese Gleichung gilt für enge Kornfraktionen, vernachlässigbare Wandeffekte und gleichzeitig blasenfreien Betrieb. Sie kann auch auf Träger mit anhaftendem Biofilm übertragen werden [187].

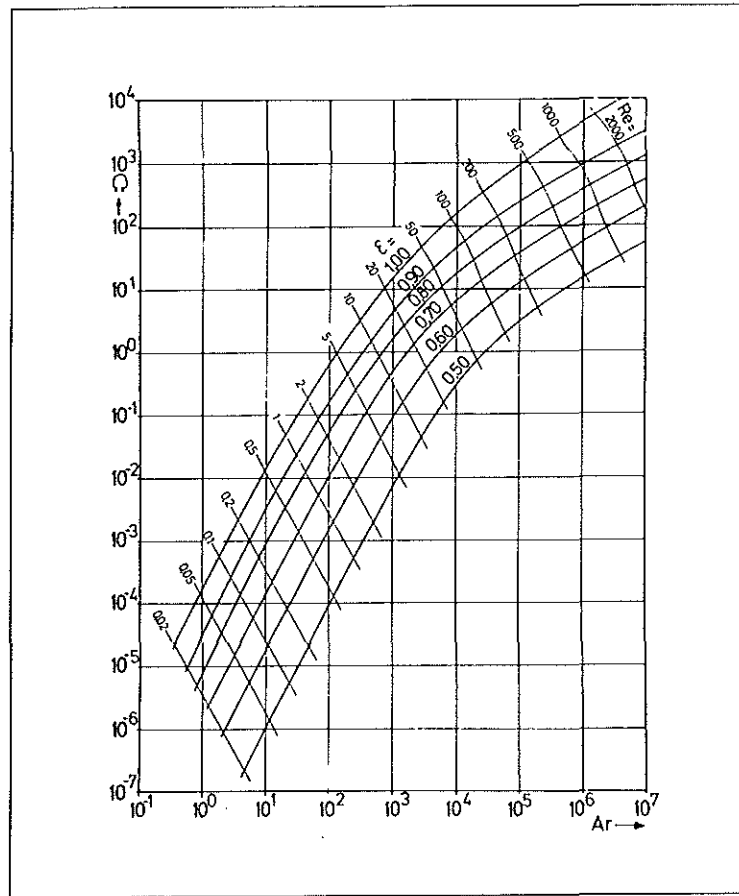


Abbildung 4.1: Zustandsdiagramm der homogenen Fluidisation

Der Exponent n wird in der Literatur [4, 3] durch eine einfache Bestimmungsgleichung

$$\frac{5.1 - n}{n - 2.7} = 0.1 \cdot Re_s^{0.9} \quad (4.8)$$

mit

Re_s Reynoldszahl, gebildet mit der Sinkgeschwindigkeit der Partikel

errechnet. Aus diesen Gleichungen läßt sich nun die mittlere Verweilzeit der Flüssigkeit in der Wirbelschicht $\bar{\tau}$ gemäß

$$\bar{\tau} = \frac{H \cdot (1 - \varepsilon)}{u_l} \cdot \frac{\left(\frac{u_l}{u_s}\right)^{\frac{1}{n}}}{\left[1 - \frac{u_l}{u_s}\right]^{\frac{1}{n}}} \quad (4.9)$$

ableiten.

Entmischung

Flüssig-fest-Wirbelschichten neigen auf Grund der geringen Feststoffbewegung zur Entmischung. Weiterhin trägt die Biofilm-Ausbildung auch bei zuvor eng klassierten Trägerfraktionen zu einer ungleichmäßigen Vergrößerung des Teilchendurchmessers und hieraus resultierend zu einer Verringerung der Teilchen-Gesamtdichte ($\rho_{\text{Film}} < \rho_{\text{Feststoff}}$) bei. Dies bewirkt eine Schichtenbildung in der Wirbelschicht über die Reaktorhöhe. Gemäß Gleichung 4.7 führt eine geringere Sinkgeschwindigkeit der Teilchen zu einem erhöhten Hohlraumanteil im oberen Reaktorabschnitt. Dies kann auch in der Zellkulturtechnik mit einer beträchtlichen Ausdehnung der Wirbelschicht verbunden sein. Einem solchen Effekt muß bereits beim Befüllen des Reaktors bzw. bei seiner Auslegung Rechnung getragen und begegnet werden.

Der gradientenfreie Betrieb verhindert einen bei Bioreaktoren häufig beobachteten Effekt, der durch eine Schichtenbildung verursacht wird: Das Nährstoffangebot nimmt in Richtung des Reaktorkopfes nicht ab, die Filmdicke im oberen Teil des Reaktors wird durch diesen Effekt nicht vermindert. Durch die Abnahme des Hohlraumanteils nimmt der Druckverlust durch die Wirbelschicht nach oben hin ab. Die im Vergleich zu gerührten Trägersystemen wesentlich geringeren Scherkräfte [3] verstärken den Effekt des Trägerauftriebs durch einen Außenbewuchs. Ihm ist durch geeignete Wahl der Strömungsbedingungen oder durch eine Modifizierung der Trägeroberfläche entgegenzuwirken.

Weitere Maßnahmen, die einer Entmischung grundsätzlich entgegenwirken, sind im folgenden zusammengestellt:

- Enge Fraktionierung der Träger.
- Geringes H/D-Verhältnis, Einlaufeffekte über die gesamte Reaktorlänge führen zu einer verstärkten Rückvermischung.
- Abweichung von der vertikalen Reaktorlage (Abweichungen größer 0.5° von der Vertikale führen bereits zu Abwärtsströmungen [110].
- Große, schwere Partikel.

Eine weitere Maßnahme zur Steigerung der Rückvermischung kann durch eine leicht konische Ausführung des Reaktorrohres getroffen werden, da so leichte Partikel beim Aufsteigen durch die verminderte Anströmgeschwindigkeit wieder nach unten sinken.

Entmischungsvorgänge können in Zellkulturreaktoren nach eigener Erfahrung mit adhärenen Zellen zu erheblichen Prozeßstörungen führen. Dieses Phänomen tritt bei verschiedenen Zelllinien in Wirbelschichtreaktoren nach mehrwöchiger Fermentationsdauer auf. Durch die Auswahl eines Trägertyps vor Beginn der Fermentation werden die Anströmgeschwindigkeit, die Verweilzeit und die Scherkräfte im Reaktor festgelegt. Ein während der Fermentation auftretender Außenbewuchs ist nur bedingt handhabbar und führt sowohl aus zellphysiologischer Sicht (Transportlimitierungen, Mangelversorgung) als auch aus prozeßtechnischer Sicht (Trägerzirkulation durch das gesamte System, Verstopfungen) zu Störungen. Daher sind weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet, so z. B. eine gezielte Trägerzirkulation, besonders für adhärenen Zellen anzustreben.

4.2 Zur Flüssigphase

Die kultivierte Zelle *sieht* die Flüssigphase als ihre direkte Umgebung. Eine Beeinflussung des Zellzustands während der Fermentation geschieht daher stets durch das Einstellen gezielter Umgebungsbedingungen. Bei trägerimmobilisierten Zellen ist zu beachten, daß die in der Flüssigkeit gemessenen Zustände weder denjenigen im Trägerinneren noch denen in der Zelle entsprechen. Für die angewandte Fermentationstechnik sind jedoch gerade die Zustände im Hauptstrom — im Gegensatz zu zellbiologischen Untersuchungen, für die die intrazellulären Verhältnisse von weiterführendem Interesse sind — für die Prozeßsteuerung von besonderer Bedeutung.

4.2.1 Zur Charakterisierung des Stoffsystems

Die Stoffeigenschaften der Flüssigphase bestimmen den Stofftransport der am Stoffwechsel beteiligten Komponenten gleichermaßen wie das Strömungsverhalten in der Wirbelschicht. Das Verhalten der Flüssigphase während der Fermentation unterliegt meßbaren Änderungen. Hieran sind nicht zuletzt auch die frei suspendierten Organismen selber beteiligt, durch deren Anwesenheit sich das Fließverhalten der Kulturflüssigkeit verändert [103]. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit des Wirbelguts verstärkt [34, 59]. Da die Prozeßstabilität durch die Strömungseigenschaften bei der blasenfreien Begasung in der Wirbelschicht in weiten Bereichen jedoch nicht negativ beeinflusst wird, ist in bezug auf den Stofftransport der Einfluß der Stoffeigenschaften vorrangig zu untersuchen. Hierzu wird zunächst das Frischmedium betrachtet, das dem Reaktor kontinuierlich zugeführt wird. Es ist frei von Zellbestandteilen, und seine Zusammensetzung (vgl. S. 122) gleicht bei den Standardmedien stark dem des Produktablaufs. Hiervon weichen nur die sogenannten Leitsubstrate wie z.B. Glukose und Glutamin ab, die im Basalmedium zu einem Faktor 4 - 5 höher vorgelegt werden.

Zellen stellen enge Anforderungen an die Osmolarität des Zellkulturmediums. Sie ist direkt an die Wasseraktivität gekoppelt. Der Vergleich mit anderen Organismen (vgl. [144]) weist darauf hin, daß die möglichen Intervalle, in denen Säugerzellen wachsen und produzieren, eng gefaßt sind. Die Osmolarität in der Umgebung einer Maus - Maus-Hybridoma-Zelle wird mit 0.30 bis 0.40 *osmol/kg* angegeben. Untersuchungen der Jülicher Arbeitsgruppe ergaben, daß die Einstellung noch engerer Grenzen den Erfolg einer Fermentation verbessert. So wurden die Frischmedien im Falle von CHO-Zellen zu 0.36 *osmol/kg*, im Falle der Hybridomazellen zu 0.32 *osmol/kg* eingestellt. Hierzu muß jedoch kritisch angemerkt werden, daß eine kontinuierliche Überwachung der Osmolarität in sterilen Bioreaktoren zwar eine erfolgversprechende Maßnahme ist, bisher jedoch in Ermangelung an geeigneter online-Meßtechnik nicht durchgeführt wurde.

Die Dichte des Zellkulturmediums wurde durch Pyknometermessung zu 1002.3 *kg/m³* bestimmt [23]. Der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Zellkulturmedium wird auf Grund stark schwankender Literaturangaben zu $2.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ bei einer Temperatur von $T = 37^\circ \text{ C}$ nach unten hin abgeschätzt. Für die Henry-Konstante von Sauerstoff in Zellkulturmedium wurde ein Wert von $1.013 \cdot 10^5 \text{ (Pa} \cdot \text{l/mol)}$ ermittelt (vgl. Kap. 4.2.2).

Die Viskosität des Zellkulturmediums

Bei der Viskosität handelt es sich um die Stoffeigenschaft, die während einer Fermentation den stärksten Schwankungen unterliegt. Häufig wird sie zu Parameterstudien für den Stofftransport und zu Untersuchungen zur Zellschädigung herangezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Viskosität des verwendeten Zellkulturmediums vermessen. Des weiteren wurde auf Grund zahlreicher Literaturhinweise die Viskosität des Grundmediums mit der Viskosität bei Serumzusatz verglichen².

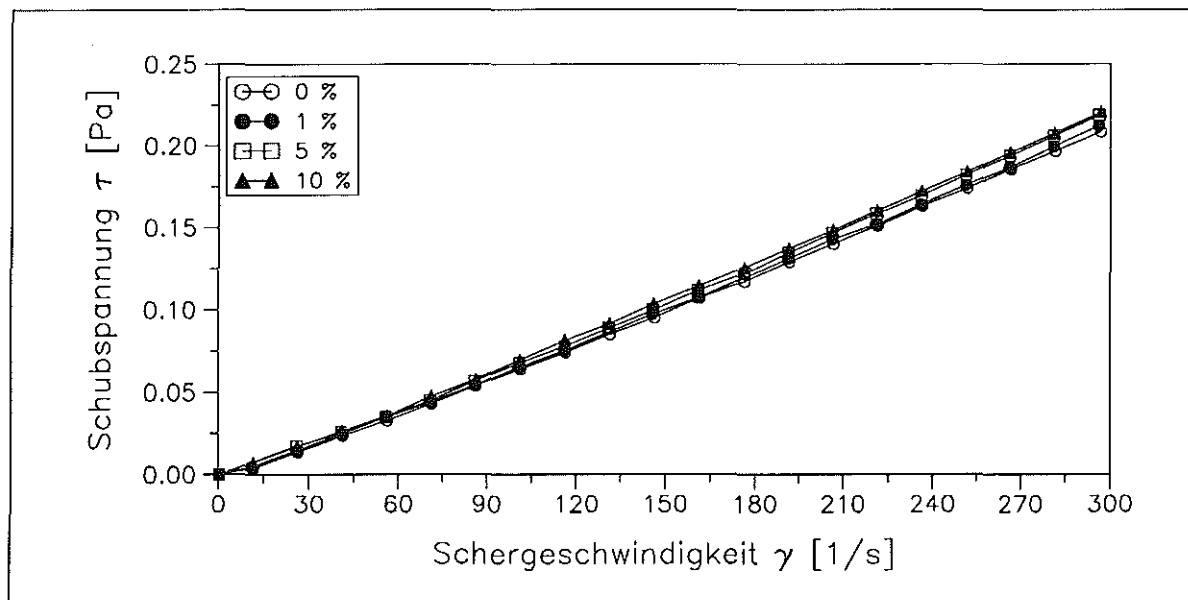


Abbildung 4.2: Fließkurven bei unterschiedlichen Serum-Konzentrationen

Abb. 4.2 verdeutlicht, daß der positive Einfluß des Serums auf die Viskositätseigenschaften des Mediums ebenso zu vernachlässigen ist wie der hiermit verbundene Nachteil der häufig nicht beachteten verstärkten Ammoniumbildung durch den Serumzusatz (eigene Messungen, [114]). Zur Änderung der Viskosität des Zellkulturmediums existieren effektivere und preiswertere Hilfsmittel als fötales Kälberserum. Es sei angemerkt, daß zahlreiche Zelltypen sich nach einer ausgewogenen Adaptionsphase ohne Serumzusatz kultivieren lassen.

4.2.2 Die Löslichkeit von Gasen in Wasser und Kulturmedien

Die zunächst —nicht zu unrecht— akademisch anmutende Frage nach dem Löslichkeitsverhalten gasförmiger Komponenten im Zellkulturmedium trägt wesentlich zum Verständnis von Meßergebnissen und den hieraus gezogenen Schlüssen bei. Unbegründete Abschätzungen zur Löslichkeit relativieren die Aussagekraft von Untersuchungen. Einerseits beschränken sich Experimente zum Stofftransport häufig auf die Bestimmung der Übergangswiderstände und nicht auf die Triebkraft des Prozesses. Veröffentlichungen zu zellphysiologischen Untersuchungen enthalten andererseits Angaben über ein Sauerstoffniveau als Randbedingung der Experimente, sofern dieser Parameter nicht selber den Mittelpunkt der Ausführungen darstellt.

Ein Studium der Literatur ermittelte für die Werte der Sauerstofflöslichkeit im Zellkulturmedium [60, 61, 63, 74, 81, 141, 143, 170] eine Schwankungsbreite von bis zu 25 Prozent bei einer unzureichenden Charakterisierung der Medienbestandteile. Die überschneidende Verwendung der Begriffe Konzentration, Partialdruck, Fugazität und „oxygen tension“ erschwert den Vergleich und vermindert

²An dieser Stelle geht es nicht um eine Diskussion, ob Serum benutzt werden sollte. Trotz aller erkennbaren Nachteile ist sein Einsatz auf Grund bisher fehlender Beiträge zur Medienuntersuchung bei einigen Zelltypen immer noch notwendig.

die Aussagekraft von Versuchsergebnissen. Durch seine Bedeutung für jeden aeroben Prozeß werden genaue Aussagen über das Löslichkeitsmaß erforderlich:

- Die Löslichkeit wirkt gleichermaßen auf den Stofftransport gas-flüssig und innerhalb der Flüssigphase ein. Bei abnehmender Löslichkeit während eines Prozesses muß der Stoffübergang durch strömungstechnische Maßnahmen verbessert oder aber das treibende Gefälle für den Eintrag des Gases erhöht werden.
- Die absolute Menge an Gas, das sich im Reaktionsmedium befindet, wird durch die Löslichkeit quantifiziert (Speichermaß).
- Der Stoffwechsel der Organismen und ihre Produktivität wird durch die Anwesenheit von Sauerstoff in einem Intervall beeinflusst, dessen Grenzen die Mangelversorgung (untere Grenze) und die Überversorgung bis zur Giftigkeit bilden [138, 160, 173].

Der Druckeinfluß auf das Gleichgewicht

Im folgenden findet die allgemeine Phasengleichgewichtsbeziehung auf den Spezialfall der Gaslöslichkeit in einer Flüssigphase Anwendung. Der Einfluß veränderbarer Prozeßgrößen auf die Löslichkeit bei der blasenfreien Begasung wird diskutiert, um abschließend unter Berücksichtigung aller Medienbestandteile eine Aussage über die Löslichkeit in einem Zellkulturreaktor zu treffen.

Ein Phasengleichgewicht ist gegeben, wenn neben der Temperatur und dem Druck das chemische Potential jeder Einzelkomponente in den unterschiedlichen Phasen gleich ist:

$$\mu_i^m = \mu_i^n = \dots = \mu_i \quad (4.10)$$

mit

μ_i^m chemisches Potential der Komponente i in Phase m
 i als Index: Komponente i

Durch Ansätze der Mehrstoffthermodynamik (Fundamentalgleichung, Gibbs-Duhem-Gleichung) kann die Identität des chemischen Potentials einer Komponente mit der partiell molaren Gibb'schen Enthalpie gezeigt werden [62]:

$$\mu_i = \bar{g}_i = g_i^{\text{rein}}(T, P^o) + RT \ln \frac{f_i}{f_i^o} \quad (4.11)$$

mit

$g_i^{\text{rein}}(T, P^o)$ Gibbssche Enthalpie des reinen Stoffes bei Systemtemperatur
 und frei wählbarem Standarddruck
 $\mathcal{R}$ allgemeine Gaskonstante ($\mathcal{R} = 8,314 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$)
 f Fugazität
 o als Index: frei wählbarer Bezugszustand

Die Isofugazitätsbedingung ersetzt nun als neue Gleichgewichtsbeziehung die Gleichung 4.10:

$$f_i^m = f_i^n = \dots = f_i \quad (4.12)$$

Lewis [113] beschreibt die Fugazität in Analogie zum Verhalten von Wärme bei ungleichmäßiger Temperatur als eine *Fluchttendenz* von Stoffen (fugare (lat.): fliehen). Der Gleichgewichtszustand ist genau dann erreicht, wenn alle Fluchttendenzen in einem System überall gleich groß sind. Die Fugazität wird in Realsystemen als korrigierter Partialdruck verwendet. Bei *idealen* Mischungen

($P \rightarrow 0$) sind Partialdruck und Fugazität identisch. Der Zusammenhang zwischen Partialdruck und Fugazität wird über die Definition einer Hilfsfunktion für den **Fugazitätskoeffizienten** in der Mischung beschrieben:

$$\varphi_i = \frac{f_i}{y_i P} = \frac{f_i}{p_i} \quad (4.13)$$

$$\lim_{P \rightarrow 0} \frac{f_i}{y_i P} = 1$$

mit

φ Fugazitätskoeffizient
 y Molanteil in der Gasphase
 P Gesamtdruck

Analog verknüpft der **Aktivitätskoeffizient** die **Aktivität** mit einem für die jeweilige Anwendung vorteilhaft zu wählenden Konzentrationsmaß [47]:

$$a_i = \frac{f_i}{f_i^o} \quad (4.14)$$

$$\gamma_i = \frac{a_i}{\zeta} \quad (4.15)$$

mit

a Aktivität
 γ Aktivitätskoeffizient
 ζ frei wählbares Konzentrationsmaß

Aus den Definitionsgleichungen Gln. 4.14–4.15 können die Fugazitäten in der Flüssig- und in der Gasphase formuliert werden; ihre Bestimmung ist mittels unterschiedlicher Ansätze zugänglich:

Ansatz 1: Beschreibung der Fugazität mit den Fugazitätskoeffizienten.

$$\begin{aligned} f_i &= x_i \varphi_i P \quad (\text{Flüssigphase}) \\ f_i &= y_i \varphi_i P \quad (\text{Gasphase}) \end{aligned} \quad (4.16)$$

mit

x Molanteil in der flüssigen Phase
 φ_i unbekannt

Lösungsweg Der Fugazitätskoeffizient läßt sich aus dem p-V-T-Verhalten unter Zuhilfenahme der Zustandsgleichungen (z. B. Virialgleichungen, kubische Zustandsgleichung) darstellen.

Ansatz 2: Wahl einer Standardfugazität f_i^o .

$$f_i = x_i \gamma_i f_i^o \quad (4.17)$$

mit

γ_i, f_i^o unbekannt

Lösungsweg Als Standardfugazität wird im Falle der Löslichkeit eines Gases in einer Flüssigkeit die Henry-Konstante verwendet³. Sie ist wie folgt definiert:

$$H_{i,j} = \lim_{\substack{x_i \rightarrow 0 \\ x_j \rightarrow 1 \\ P \rightarrow P_j^s \\ T = \text{const.}}} \frac{f_i}{x_i} = \frac{f_i \gamma_i}{a_i} \quad (4.18)$$

mit

$H_{i,j}$ Henrysche Konstante des gelösten Stoffes i im Lösungsmittel j
 P_j^s Sättigungsdampfdruck des Lösungsmittels

Solange es sich bei dem betrachteten System um stark verdünnte Lösungen^{4,4} handelt, führt die Annahme $\gamma = 1$ auf ausreichend genaue Ergebnisse. Für die Löslichkeit von Gasen folgt damit unter Verwendung der Gleichung 4.16 – 4.18:

$$f_i = y_i \varphi_i P = x_i H_{i,j} \quad (4.19)$$

Bei geringem Druck und idealem Gasverhalten sind Wechselwirkungen zwischen den Molekülen des gelösten Stoffes zu vernachlässigen ([146], S.336), hier kann $\varphi_i = 1$ gesetzt werden (vgl. Gl. 4.14). Welche Schlüsse können aus dem bisher Gesagten gezogen werden?

- Für den hier betrachteten Fall der Löslichkeit von Sauerstoff und Kohlendioxid können bei einer Temperatur von 37°C und einem Absolutdruck von 5 bar für den Sauerstoff und 1 bar für das Kohlendioxid ihre Molanteile in Wasser zu

$$x_{O_2} \leq 0.0001, \quad x_{CO_2} \leq 0.000045$$

abgeschätzt werden. Die Anwendung des Henryschen Gesetzes (Gl. 4.19) ist also in dem wesentlich niedrigeren Druckbereich bei der blasenfreien Begasung (Sauerstoffpartialdruck $\leq 2 \text{ bar}$, Kohlendioxidpartialdruck $\leq 0.1 \text{ bar}$) zulässig.

- Die Isofugazitätsbedingung Gleichung 4.12 besagt, daß die Fugazität des Sauerstoffs in wässrigen Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung die gleiche ist, wenn sie mit derselben Gasphase im Gleichgewicht stehen. Diese Aussage erhält insbesondere deshalb Gewicht, weil die in der Zellkultur eingesetzten Sauerstoffelektroden üblicherweise die Fugazität messen und nicht die Konzentration. Bei gleicher Anzeige kann die Sauerstoffkonzentration um beliebige Werte schwanken⁵. Werden also Untersuchungen zum Einfluß des Sauerstoffs auf lebende Organismen durchgeführt, so muß der Transportmechanismus in die Zelle bestimmt werden.

Einfluß des hydrostatischen Druckes

Der Einfluß des hydrostatischen Druckes auf den Partialdruck von Sauerstoff in Gasblasen und somit auf den Stoffübergang wird bei den sogenannten Hochreaktoren großtechnisch eingesetzt. Hier soll aufgezeigt werden, ob ein solches Phänomen auch bei der blasenfreien Begasung, besonders in bezug auf ihre Maßstabsübertragung, zu beobachten ist.

³Besonders bei mehrphasigen Stoffsystemen ergeben sich für das jeweils betrachtete Gas unterschiedliche Henry-Koeffizienten bzw. Standardfugazitäten. Daher sollte als Referenzzustand hier analog zu Dampf-Flüssiggleichgewichten die hypothetisch reine Flüssigkeit gewählt werden [62]. Für den Zellkulturbereich muß dieser Fall beim Zusatz von löslichkeitssteigernden Substanzen berücksichtigt werden.

⁴Die mit $\mathcal{A}$ gekennzeichneten Begriffe werden im Anhang D, S. 131 ff. erläutert.

⁵Bei Zugabe eines Salzes in einen wassergefüllten Behälter ändert sich die Sauerstoffkonzentration, bei einer gleichzeitigen Partialdruckmessung jedoch nicht die Anzeige der Sauerstoffelektrode.

Die Druckabhängigkeit der Henry-Konstanten $H_{i,j}$ wird in der Literatur [62, 77] durch die Gleichung

$$\ln H_{i,j}(P) = \ln H_{i,j}(P_j^s) + \frac{\bar{v}_i^\infty (P - P_j^s)}{\mathcal{R} \cdot T} \quad (4.20)$$

mit

$\bar{v}_i^\infty$ Partiiell molares Volumen des gelösten Gases bei unendlicher Verdünnung.

beschrieben, aus Gründen der Übersichtlichkeit hier jedoch nicht hergeleitet.

Mit den Gleichungen für eine isotherme Änderung der Fugazität in einem Potentialfeld ([77], S. 30)

$$f_i = f_i^o \exp \frac{M_i g h}{\mathcal{R} \cdot T} \quad (4.21)$$

mit

M molare Masse
 h Höhe der Flüssigkeitssäule

und der Beziehung für den Druck

$$P = P^o + \rho_l \cdot g \cdot h \quad (4.22)$$

berechnet sich die Konzentration des gelösten Gases in Abhängigkeit von der Höhe der Wassersäule über dem betrachteten Ort zu^{6,7}

$$x_2 = \frac{P^o}{H_{i,j}(P_j^s)} \exp \frac{(M_2 - \rho_l \cdot \bar{v}_2^\infty) g h}{\mathcal{R} \cdot T} \quad (4.23)$$

Hieraus wird ersichtlich, daß der durch die Flüssigkeitssäule aufgebrachte statische Druck bei **blasenfreiem** Betrieb keinen Beitrag zu einem erhöhten Molanteil an Sauerstoff in der Flüssigphase leistet, verallgemeinernde Literaturaussagen (z.B. [138]) also vorsichtig betrachtet werden müssen.

⁶Werte für das partiell molare Volumen finden sich bei [55, 156].

⁷Der zweite Term auf der rechten Seite besitzt die Form des natürlichen Logarithmus der Poynting-Korrektur; er berücksichtigt die Änderung der Fugazität durch Kompression bzw. Expansion der Flüssigkeit vom Sättigungsdampfdruck auf den Systemdruck ([62], s. 165).

Temperatureinfluß

Der Einfluß der Temperatur auf die Löslichkeit von Gasen in Wasser war in der Vergangenheit bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [33, 62, 77, 79], so daß auf deren Ergebnisse zurückgegriffen werden kann. Die Variation der Temperatur ϑ besitzt bei Zellkulturen keine wesentliche Bedeutung⁸. Mit hinreichender Genauigkeit ist die Löslichkeit von Gasen in Wasser durch den Bunsenkoeffizienten⁹ in der Form

$$\alpha = a + b\vartheta + c\vartheta^2 + d\vartheta^3 + e\vartheta^4 \quad (4.24)$$

zu beschreiben. Hieraus können die Löslichkeitswerte für Sauerstoff und Kohlendioxid in Abhängigkeit von der Temperatur errechnet werden [77].

$c^*[mg/l]$	$\vartheta [^\circ C]$	0	5	10	15	20	25	30	35	40
O_2	[77]	14.5	12.7	11.3	10.1	9.1	8.2	7.5	7.0	6.4
CO_2	[167]	1.34	1.11	0.93	0.78	0.69	0.58	0.50	0.44	0.38
$p^D[mbar]$	[106]	6.11	8.72	12.28	17.05	23.37	31.66	42.41	56.21	73.74

Tabelle 4.1: Temperaturabhängigkeit des Wasserdampfdrucks und der Löslichkeit von Gasen in salzfreiem Wasser (bei einem Luftdruck 1.0 bar)

Einfluß der Medienbestandteile

Abschließend kann durch die Betrachtung des Einflusses einzelner Medienbestandteile auf die Löslichkeit von Kohlendioxid und Sauerstoff im Zellkulturmedium die Untersuchung abgerundet werden. Hierzu wird ein Ansatz nach Schumpe [167] gewählt, der den Einfluß organischer Substanzen und Salze auf die Löslichkeit berücksichtigt:

$$\log \frac{\alpha^o}{\alpha} = \underbrace{\sum_i H_i I_i}_{\text{Salzeffekt}} + \underbrace{\sum_j K_j w_j}_{\text{org. Anteil}} \quad (4.25)$$

mit

- i als Index hier: Salzkomponenten
- j als Index hier: organische Komponenten
- w Massenkonzentration
- α Bunsenkoeffizient

⁸Für den Bereich Zellkulturtechnik sind wenige Ansätze bekannt, Effekte durch eine Änderung der Medientemperatur zu nutzen [136, 159]. Die Medientemperatur beträgt durchweg $37^\circ C$.

⁹Der Bunsenkoeffizient α bezeichnet das Gasvolumen—bei $0^\circ C$ und bei $101.3 kPa$ —pro Volumeneinheit des Lösungsmittels bei Versuchstemperatur und einem Partialdruck des Gases von $101.3 kPa$.

i Salzeffekt

Der Parameter H wurde für verschiedene Kationen und Anionen vermessen, I bewertet die Ionenstärke. Der Einfluß der einzelnen Salze auf die Löslichkeit kann hierbei aufsummiert werden.

ii organische Anteile

Der Anteil der organischen Komponenten ist durch einen einfachen Produktansatz zu beschreiben, wobei die Konstanten K experimentell bestimmt und mit den Massenkonzentrationen multiplikativ verknüpft werden.

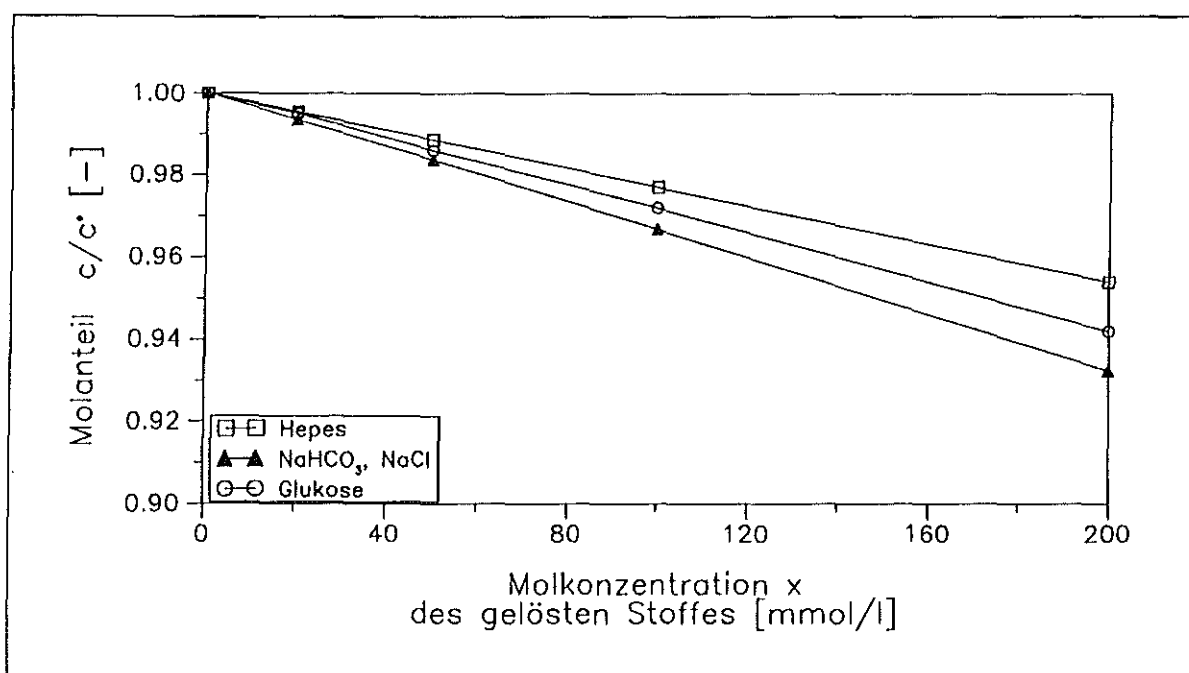


Abbildung 4.3: Molanteil des gelösten Gases in Abhängigkeit von den Medienbestandteilen

Die Abweichungen der mit dieser Methode rechnerisch ermittelte Werte von experimentellen Daten betragen hierbei weniger als 2 %, verglichen mit dem Absolutwert. Eine Bestätigung dieses Resultats stellen die Ergebnisse von Slininger et al. [169] dar, der die Sauerstofflöslichkeit von Kulturbrühen über ein kolorimetrisches Verfahren bestimmt¹⁰.

Die Überprüfung, welche Medienkomponenten die Löslichkeit bei der vorgegebenen Zusammensetzung beeinflussen, führt auf die Bestandteile: Glukose, NaCl , NaHCO_3 , Hepes, CaCl_2 , KCl und Aminosäuren¹¹. Die angegebenen Gleichungen ermöglichen, bei gegebenen Prozeßbedingungen den Wert für die Löslichkeit der Gase im Zellkulturmedium zu bestimmen. Für die bei allen Versuchen benutzten Standardbedingungen ergibt sich so ein zahlenmäßiger Wert von 6.45 mg/l. Dieser Wert weicht von den eingangs zitierten Veröffentlichungen um bis zu 16 % ab.

¹⁰Die Bedeutung dieses Verfahrens wird besonders bei konzentrierten Substraten ersichtlich. Hierbei kann die Löslichkeit für den Sauerstoff im Vergleich zum Substrat ohne gelöste Stoffe nach der obigen Berechnung bis zu 50 % abnehmen.

¹¹Für den Einfluß der Aminosäuren wurde ein Wert K_j zu 12.5 abgeschätzt.

Neben der Beschreibung der Löslichkeit von Gasen in Kulturmedium kann durch die vorangehenden Überlegungen eine Abschätzung darüber abgeleitet werden, welche Folgen durch eine Änderung der Einflußgrößen (Temperatur, Druck, Zusammensetzung) der reinen Flüssigphase auf die Triebkraft des Prozesses entstehen. Es kann daher nun zusammenfassend festgestellt werden, daß alle Komponenten des Grundsubstrats die Löslichkeit des Sauerstoffs, verglichen mit seinem Löslichkeitsvermögen in reinem Wasser, vermindern. Dies muß als negativer Effekt bei der Auslegung von Begasungssystemen berücksichtigt werden.

Die hier ermittelte Absenkung der Löslichkeit durch die Bestandteile des Zellsubstrats besitzt nach den festgestellten Ergebnissen bei der blasenfreien Permeationsbegasung jedoch keine Relevanz. Eine Abnahme der Löslichkeit, auch durch Maßnahmen der Medienänderung während einer Fermentation, kann in diesem Fall durch eine Erhöhung der Triebkraft mittels Anhebung des gasseitigen Sauerstoffpartialdrucks bei entsprechend dimensionierten Begasungssystemen leicht aufgefangen werden.

Weiterreichende Folgen hingegen kann eine Temperaturänderung im Fermenter nach sich ziehen. Ein solcher Vorgang ist, wie dies oben beschrieben wurde, in der Regel nicht vorgesehen, war durch Störungen der Temperaturregelung (z.B. durch Stromausfall) bei den hier durchgeführten Untersuchungen nicht vollständig auszuschließen. Hierbei rückt weniger die Änderung von Stofftransporteigenschaften als vielmehr das Problem der Blasenbildung durch gasförmige Medienbestandteile in den Vordergrund. Dies bewirkt bei vielen Trägermaterialien eine Störung der homogenen Fluidisierung.

4.3 Die Festphase

Die Prozeßoptimierung und die Vermeidung von patentrechtlichen Auseinandersetzungen sind gleichermaßen wesentliche Ursachen für die ständige Weiter- und Neuentwicklung der Immobilisierungstechniken für die Säugerzellkultur. Seit den ersten Schritten zur Erhöhung der Zellverweilzeit in Reaktoren für die Zellkulturtechnik [180] haben neben der Beschreibung zahlreicher Rückhaltesysteme in der Literatur einige Fermentertypen die Marktreife erreicht [31, 63]. Im folgenden wird detailliert nur auf die in dieser Arbeit verwendeten kugelförmigen, porösen Trägermaterialien eingegangen.

4.3.1 Trägereigenschaften und Anforderungen an das Wirbelgut

Die Auswahl von porösen Trägern für einen Wirbelschichtprozeß zur Züchtung von Säugerzellen basiert auf den folgenden Eigenschaften und Besonderheiten der *carrier*:

Porengröße Die Säugerzelle muß nach dem Inokulieren in den Träger eingeschwemmt werden können. Als Mindestmaß für das Verhältnis Porendurchmesser/Zellgröße sollte zur verbesserten Immobilisierung und Nährmedierversorgung nach Literaturaussagen [65] ein Faktor 2-3 gewählt werden. Bei Einsatz von Suspensionszellen übernimmt das Trägervolumen als Rückhaltesystem auch eine Schutzfunktion. Die Zellen stellen keine direkte Anforderung an die Geometrie der inneren Trägerwand. Bei adhärennten Zellen hingegen muß der Krümmungsradius der Trägerporen ein Anheften der Zellen ermöglichen. Dies ist bei Unterschreiten eines Mindestwertes nicht mehr gegeben.

Porosität Eine hohe Porosität mechanisch stabiler Träger bewirkt ein günstiges Verhältnis von Trägervolumen zu Reaktorvolumen. Dies führt auf eine Anhebung der möglichen Biomassekonzentration im Reaktor und somit zu einer Steigerung der Reaktorproduktivität [198].

Oberflächenbeschaffenheit Zur Bedeutung der Oberflächeneigenschaften innerhalb eines nicht-toxischen Trägermaterials zur Zellzüchtung liegt bis heute kein eindeutig verwertbares Material vor. Obwohl z. B. das *biologische* Kollagenmaterial (vgl. S. 50) sehr gute Voraussetzungen für die Zellimmobilisierung bietet, kann es selbst im Vergleich zu unmodifiziertem Glas keine relevant besseren Zelldichten ermöglichen [120]. Erweiterte Untersuchungen tun an dieser Stelle not.

Trägergröße Die Durchführung eines kontrollierten Prozesses impliziert die Kenntnis über die Bedingungen im Reaktionsraum. Homogene Bedingungen in einem Mehrphasensystem erfordert die Gleichverteilung aller Stoffe. Im vorliegenden Falle entsteht aus vorangehender Aussage die Forderung nach einer definierten Trägergröße. Voruntersuchungen sind auf Grund des Vielkomponenten-Stofftransports nur dann sinnvoll, wenn sie mit der gleichen engen Trägerfraktion durchgeführt werden wie der Realprozeß. Breite Kornverteilungen (Größenspektren), wie sie vereinzelt in der Zellkultur Verwendung finden¹², erschweren daher die Prozeßkontrolle. Hiermit verbundene Kosteneinsparungen, besonders im Großmaßstab, müssen daher kritisch analysiert werden¹³.

Stabilität Abriebs- oder Alterungserscheinungen der Träger sind nur dann von Bedeutung, wenn sie bereits während des Zeitraums möglicher Fermentationen (≤ 6 Monate) auftreten. Sowohl das

¹²Für das Siran-Material (Schott) werden häufig Fraktionen von 400 bis 700 μm vertrieben, an anderer Stelle werden Bereiche von 1500 bis 2000 μm angegeben [21].

¹³Eine ineffiziente Nutzung des Trägervolumens, die durch Transportlimitierungen im Trägerinnern bedingt sein kann, ist von wesentlich höherem Gewicht als eine Kostenersparnis durch Grobsiebungen.

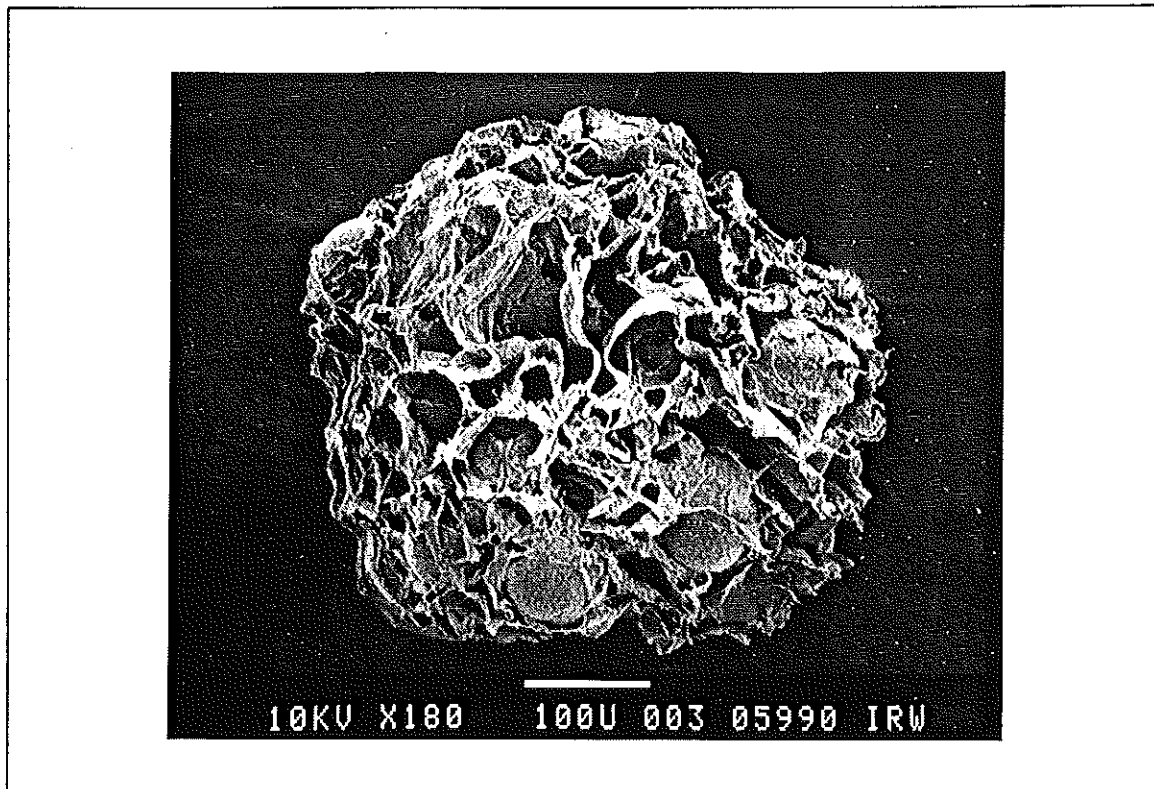


Abbildung 4.4: Kollagenträger zur Zellimmobilisierung, Verax (Lebanon, New Hampshire)

Kollagenmaterial (vgl. S. 50) als auch poröses Sinterglas genügen den Anforderungen an ihre Stabilität bei ihrer Verwendung in einer homogenen Wirbelschicht. Die Forderung nach einer Vielfach-Verwendung von Trägern zur Herstellung von Pharmaka und der damit verbundenen Beständigkeit gegenüber Reinigungsprozeduren sollte auf Grund der besonderen Anforderung an die Produkte nicht gestellt werden.

4.3.2 Trägerdaten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Säugerzellen wurden ausschließlich mit zwei Trägertypen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um beschwertes Kollagenmaterial der Verax Corporation (vgl. Abb. 4.4) sowie um ein speziell für Zellkulturzwecke entwickeltes, oberflächenmodifiziertes Borosilikatglas [120] (Typenoberbegriff: Siran) der Firma Schott (vgl. Abb. 4.5). Beide Träger konnten während dieser Untersuchungen sowie in weiteren Arbeiten der Zellkulturgruppe des IBT, Forschungszentrum Jülich, in den gleichen Reaktoren zur Zellzüchtung eingesetzt werden, da ihre Fluidisierungseigenschaften sich nicht relevant voneinander unterscheiden. Im folgenden werden nun die wesentlichen Eigenschaften gegenübergestellt.

Glasträger Die wesentlichen Daten des verwendeten Siranmaterials zeigt Tab. 4.2. Zur Versuchsdurchführung wurde das von der Schott AG bereitgestellte Glas^{A,14} mittels Normsieben auf die gewünschte Trägerfraktion ($500\mu\text{m} \leq d_s \leq 560\mu\text{m}$) klassiert. Die verschiedenen Hohlraumanteile,

¹⁴Die mit ^A gekennzeichneten Begriffe werden im Anhang D, S. 131 ff. erläutert.

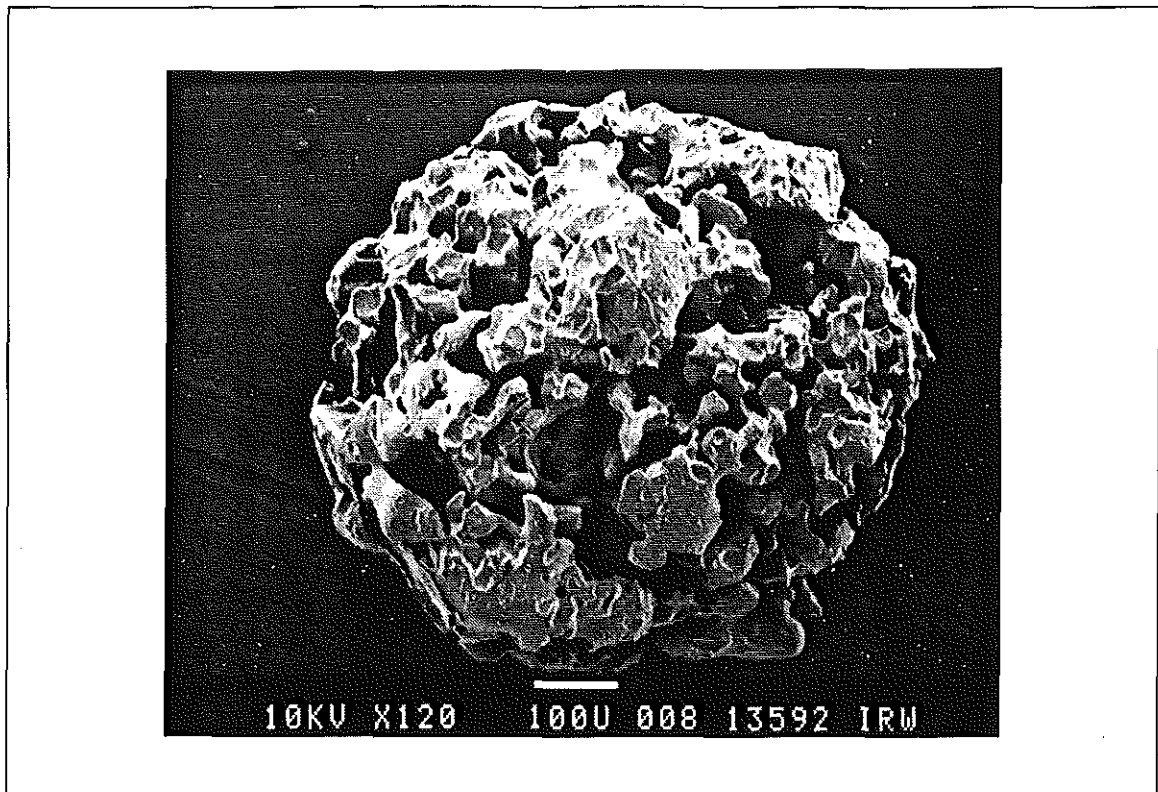


Abbildung 4.6: Glasträger zur Zellimmobilisierung, Schott (Mainz)

die zu einer vollständigen Beschreibung des Immobilisierungsverhaltens benötigt werden, konnten durch Messungen und Bilanzierungen wie folgt ermittelt werden:

- $\varepsilon_i = 0.49$. Hiermit wird die Porosität in einem einzelnen Träger beschrieben.
- $\varepsilon = 0.48$ (vgl. Literaturwert: 0.47 [181]). Der Hohlraumanteil im Festbett bezieht sich auf das Volumen zwischen den Trägern¹⁵.
- $\varepsilon_{gesamt} = 0.74$ (vgl. Literaturwert: 0.76 [118]). Dieser Wert beschreibt das gesamte *freie* Volumen in einer Schüttung poröser Partikel.

Als weitere Daten, die zu einer genaueren Charakterisierung der Wirbelschicht dienen, stehen basierend auf Meßreihen zusätzlich die folgenden Daten zur Verfügung: Pro Träger existiert ein Hohlraum von etwa $3 \cdot 10^{-5}$ ml. Die Anzahl der Träger pro Liter Festbett beträgt $8 \cdot 10^6$ (vgl. identische Angabe in [164] für das Kollagen-Material). In einem einfachen Fallversuch schließlich konnte die stationäre Sinkgeschwindigkeit der Glasträger (u_s) zu 0.04 m/s ermittelt werden.

Zu erwähnen bleibt, daß die für die Anheftung der Zellen wichtige innere Oberfläche 0.4 m²/g beträgt [117]. Sie ist also gegenüber anders lautenden Aussagen für den Glasträger mit neuentwickelten Trägermaterialien vergleichbar [157].

¹⁵Mit ε wird im Gegensatz zu ε_{gesamt} das „durchströmbare“ Volumen charakterisiert.

Eigenschaft	Einheit	Kollagenträger (Verax)	Quelle	Glasträger (Schott)	Quelle
Porengröße	μm	20-40	[164]	≤ 120	[118]
Besiedelbare Oberfläche	m^2/l	30 300	[164] [64]	90	[118]
Mittlere Teilchengröße	μm	450	eigene Messungen	530	eigene Messungen
Porosität des Trägers	-	0.85	[32]	0.49	eigene Messungen
Dichte	g/cm^3	1.6-1.7	[32]	1.5	eigene Messungen
Anström- geschwindigkeit	m/s	0.011	[164]	0.01	[118]
Mittlere Trägermasse	mg	0.107	eigene Messungen	0.067	eigene Messungen

Tabelle 4.2: Charakteristische Daten der Glas- und Kollagenträger

Kollagenträger Die Daten zum Kollagenträger können ebenfalls der Tab. 4.2 entnommen werden. Das Kollagenmaterial wird aus biologischen Komponenten (z. B. Sehnen, s. [177]) gewonnen, seine Herstellung ist aufwendig. Im Vergleich zum Glasträger kann das Kollagen nicht mit Heißdampf behandelt werden, es muß zudem auf Grund seiner biologischen Abbaubarkeit stets steril gehandhabt werden.

Anzahl pro Träger	-	46
Mittlerer Durchmesser	μm	83
Volumenanteil	%	28
Gewichtsanteil	%	91
Ballastmaterial	-	Titan, Edelstahl

Tabelle 4.3: Daten zu den Ballastpartikeln

Ein interessanter Aspekt ergibt sich aus einer Entwicklung, das sehr leichte Kollagen ($\rho = 1.05 \text{ g/ml}$) mit schwereren Komponenten zu beladen und so eine erhöhte Anströmgeschwindigkeit zu erlauben. Das spezifische Gewicht läßt sich im Bereich zwischen $\rho = 1.05 \text{ g/ml}$ und $\rho = 3 \text{ g/ml}$ [164] variieren. Tab. 4.3 verdeutlicht einige Daten der Beschwerungsmaterialien, die den beladenen Träger zusätzlich charakterisieren. Wie der bereits hohe Anteil der hier verwendeten Träger am Volumen widerspiegelt, sind der Beladung der Kollagenträger Grenzen gesetzt (vgl. auch Abb. 3.6). Somit wird die Anwendung der Wirbelschichttechnik durch diesen Ansatz für das Kollagen zwar ermöglicht, eine Umgehung der Problematik zur Maßstabsvergrößerung ist durch eine Steigerung der Leerrohrgeschwindigkeit jedoch nicht gegeben.

4.4 Charakterisierung des Stofftransportes

4.4.1 Der transmembrane Transport

Der Austausch aller gasförmigen Komponenten in der Wirbelschicht erfolgt — nur ergänzt durch einen geringen Anteil in den zu- und abgeführten Flüssigkeitsströmen — über eine Permeationsmembran. Sinn und Zweck der Membran liegen in der Vergrößerung der Gasaustauschfläche gegenüber der Oberflächenbegasung.

Die Begründung für den Einsatz der apparatetechnisch anspruchsvollen reaktorintegrierten blasenfreien Permeationsbegasung zur Kultivierung von Säugerzellen ist an dieser Stelle ausdrücklich hervorzuheben. Sie kann in ihren wesentlichen Zügen vor der Beschreibung des eigentlichen Stofftransportes wie folgt stichpunktartig zusammengefaßt werden:

- Eine Schaumbildung im Reaktor, die bei einer Blasenbegasung durch die Bestandteile des Zellkulturmediums gefördert wird, tritt nicht auf.
- Produkt- und Zellschädigungen durch die zusätzliche Phasengrenzfläche werden gleichermaßen ausgeschlossen.
- Radiale und axiale Gradienten für den Sauerstoffpartialdruck werden auf ein Minimum reduziert, eine Maßstabsvergrößerung des Wirbelschichtreaktors wird somit erst ermöglicht.
- Eine Permeationsbegasung ist an dieser Stelle auch aus quantitativen Überlegungen vertretbar, da der volumetrische Sauerstoffbedarf von Säugerzellkulturen auch bei hohen Zelldichten erheblich unter dem der meisten aeroben mikrobiellen Fermentationen liegt.

Durch die Verwendung einer zusätzlichen Festsphase wird ein zusätzlicher Widerstand in die Transportkette geschaltet. Somit wird der Übergang vom dreiphasigen System der Direktbegasung zum Zweiphasensystem geschaffen, da sich, von einem Standort in der Flüssigphase aus betrachtet, die Membran wie eine Behälterwand verhält. Es wird also bewußt ein (im Verlauf der Untersuchungen zu quantifizierender) Nachteil in Kauf genommen, der dem Prozeß jedoch den Vorteil einer Langzeitstabilität erbringt und sich letztendlich an einer Steigerung der Prozeßeffektivität orientiert.

Triebkraft

Entscheidend für den Transportvorgang ist letztendlich die Triebkraft, also die Differenz der chemischen Potentiale zu beiden Seiten der Membran [122]. Zu ihrer für Berechnungen verwertbaren Beschreibung muß als Ausgangspunkt analog zur Herleitung der Löslichkeit (vgl. Kap. 4.2.2, S. 39) von der Phasengleichgewichtsbeziehung ausgegangen werden. Eine Abweichung vom Gleichgewichtszustand ist ein Maß für die Triebkraft des Stofftransportes, die sich im Falle der hier vorliegenden Permeation eines Gases von einer Gasphase in eine Flüssigphase wie folgt darstellen läßt:

Chemisches Potential einer Komponente in der Flüssigphase

$$\mu_i = \mu_i^0 + \mathcal{R} \cdot T \ln a_i + \tilde{V}_i(P - P_i^0) \quad (4.26)$$

mit

$\tilde{V}_i$ Molvolumen

Chemisches Potential einer Komponente in der idealen Gasmischung

$$\mu_i = \mu_i^0 + \mathcal{R} \cdot T \ln \frac{f_i}{f_i^0} \quad (4.27)$$

Für den vorliegenden Fall gilt unter Vernachlässigung des Terms $\tilde{V}_i(P - P_i^0)$ [151] für die Triebkraft des Prozesses:

$$\Delta\mu_i = \mathcal{R} \cdot T \ln \frac{P_g \varphi_{i,g} y_i}{x_i H_{g,l}} \quad (4.28)$$

Die Bedingung für einen Sauerstofftransport in das System ergibt sich zu:

$$P_g \varphi_{i,g} y_i \geq x_i H_{g,l}$$

Der Unbekannten $\varphi_{i,g}$ kann im vorliegenden Fall der Wert 1 zugeordnet werden⁴.

Transportbeschreibung

Membrantransportvorgänge können in aller Regel genau dann als wohl definiert bezeichnet werden, wenn eine instationäre Belagbildung (fouling, scaling)¹⁶ nicht auftritt und das Transport- und Trennverhalten als konstant angesehen werden kann. Dies zu erreichen und die hierzu notwendigen Maßnahmen zu erkennen ist mit Ziel dieser Betrachtung. Hinter der Zielsetzung, möglichst hohe Eintragsraten in den Fermenterraum zu erreichen, steht das bei den meisten technischen Anwendungen erwünschte Trennvermögen der Membran für die Einzelkomponenten zurück. Eine sinnvolle Obergrenze für den Höchstwert zum Sauerstoffeintrag kann jedoch dann gefunden werden, wenn der transmembrane Widerstand geringer ist als derjenige in der Flüssigphase. In diesem Fall ist das eigentliche Ziel der Permeationsbegasung, nämlich der blasenfreie Sauerstoffeintrag, nicht mehr zu gewährleisten. Eine genaue Betrachtung der Transportgleichungen kann an dieser Stelle Abhilfe schaffen.

Die Beschreibung des Stofftransportes kann über Diffusionskoeffizienten und das Ficksche Gesetz sowie durch die numerische Integration der Bilanzgleichungen angegangen werden [152]. Im vorliegenden Fall liegt es jedoch näher, einen hiervon prinzipiell zu unterscheidenden Weg mit der Verwendung von Stofftransportkoeffizienten einzuschlagen. Charakteristisch für diese Vorgehensweise ist es, die auftretenden Konzentrationsänderungen gedanklich in einer dünnen Schicht nahe der Phasengrenzfläche zusammenzufassen.

Die verallgemeinernde Darstellung des Transports kann wie folgt vorgenommen werden:

$$\dot{n}''' = k \cdot a \cdot \Delta c \quad (4.29)$$

$$\left(\begin{array}{l} \text{transportierte} \\ \text{Stoffmenge} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Stofftransport-} \\ \text{koeffizient} \end{array} \cdot \begin{array}{l} \text{Oberfläche} \\ \text{pro Volumen} \end{array} \cdot \begin{array}{l} \text{Konzentrations-} \\ \text{differenz} \end{array} \right)$$

a meint die Membranfläche pro Reaktorvolumen. Bei dem hier gewählten Ansatz für den volumenbezogenen transmembranen Fluß ergibt sich für den Stoffübergangskoeffizienten k die Einheit einer Geschwindigkeit.

Die Darstellung des Stofftransports mittels Übergangskoeffizienten korrespondiert mit einer Unterteilung des Stoffdurchgangs in Einzelschritte [58, 194]. Der Vorgang kann — bei Betrachtung der Sauerstoffkomponente — wie folgt charakterisiert werden durch:

1. Gasseitiger Transport an die Membran
2. Sorption auf der Feedseite
3. Diffusion durch die Membranphase
4. Desorption auf der Permeatseite
5. Transport in die Flüssigphase

Zu diesem Transport können, bei Verwendung von Stützsichten oder Composite-Membranen, zusätzliche Schritte hinzukommen. Die Vorgänge 2 - 4 werden als Permeation bezeichnet. Ein Permeationsprozeß unterscheidet sich von einem Diffusionsprozeß dadurch, daß der *allgemeinere* Permeationsvorgang eine Diffusion nicht zwingend beinhalten muß (z. B. bei konvektiven Transportmechanismen), (vgl. auch [195]). Die Bestimmung der Einzelwiderstände, die den unterschiedlichen

¹⁶ *scaling* meint das Auskristallisieren gelöster Komponenten an Oberflächen nach Überschreiten seiner Löslichkeitsgrenze, während *fouling* die Ablagerung von suspendierten oder kolloidalen Partikeln an einer Membran bezeichnet [150].

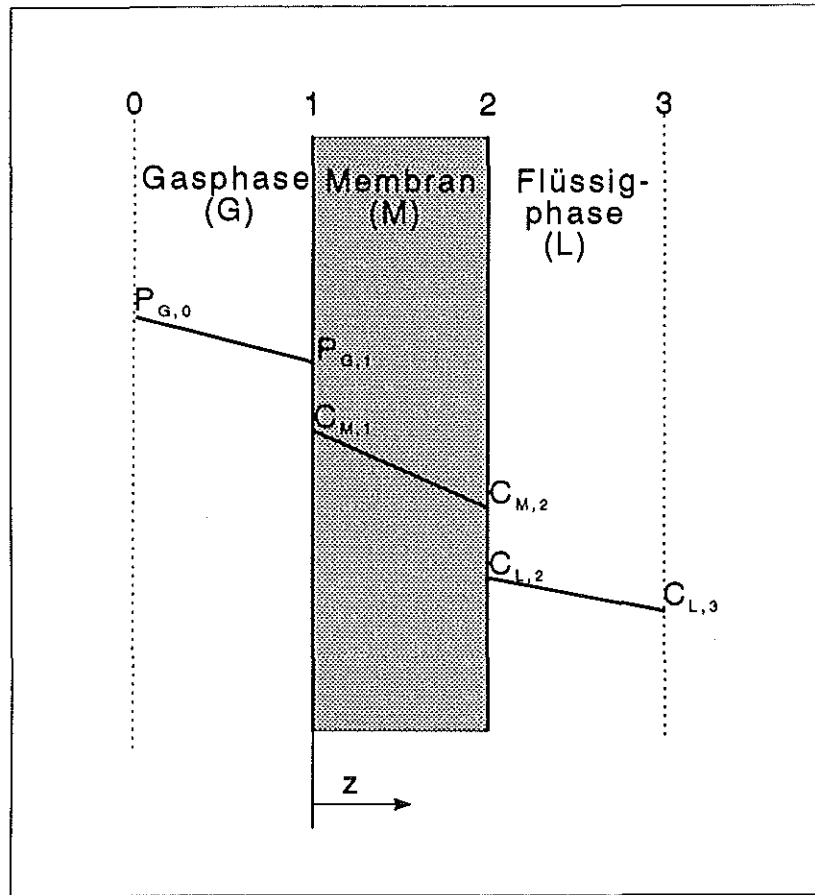


Abbildung 4.7: Transmembraner Stofftransport gas - fest - flüssig

Prozeßschritten zugeordnet werden können, kommt der Prozeßkontrolle bei der blasenfreien Begasung entgegen und ermöglicht das Auffinden von Optima bei der Reaktorauslegung. Zur Beschreibung des Stofftransportes müssen nun die zugehörigen Grundgleichungen aufgestellt und miteinander verknüpft werden. Durch ihre Kopplung kann ein Transportansatz abgeleitet werden, aus dem die Einflußgrößen auf den Stofftransport sowie die Transportwiderstände erkennbar sind. Sie lauten, exemplarisch für den Sauerstoff, wie folgt (Indizierung gemäß Abb. 4.7):

Membrandiffusion (1. und 2. Ficksches Gesetz [38]):

$$\dot{n}'' = -D_{O_2,M} \cdot \frac{\partial c_{O_2,M}}{\partial z} \quad (4.30)$$

$$\frac{\partial c_{O_2,M}}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c_{O_2,M}}{\partial z^2} + 1/A \cdot \frac{\partial A}{\partial z} \cdot \frac{\partial c_{O_2,M}}{\partial z} \right) \quad (4.31)$$

mit

$D_{O_2,M}$	Diffusionskoeffizient für den Sauerstoff in der Membranphase
$c_{O_2,M}$	Konzentration des Sauerstoffs in der Membranphase
A	Durchtrittsfläche für den Stoffstrom

Mit den Annahmen:

1. Konstante Durchtrittsflächen
2. Stationäre Diffusion
3. Geringe Stoffströme
4. Konstanter Diffusionskoeffizient

errechnet sich die Molstromdichte zu:

$$\dot{n}''_{O_2,M} = D \cdot \frac{c_{O_2,M1} - c_{O_2,M2}}{\delta} \quad (4.32)$$

mit

δ Membrandicke

Sorptionsgleichgewichte (s. [26]):

Mit den Annahmen:

1. Große Sorptionsgeschwindigkeit (Sorptionsgleichgewicht) und
2. Konstante Löslichkeit

werden die Gleichgewichte zu beiden Seiten der Membran formuliert:

$$p_{O_2,M1} = H_{O_2,M} \cdot c_{O_2,M1} \quad (4.33)$$

$$p_{O_2,M2} = H_{O_2,M} \cdot c_{O_2,M2} \quad (4.34)$$

Henrysches-Gesetz

$$p_{O_2,M2} = H_{O_2,l} \cdot c_{O_2,l2} \quad (4.35)$$

Durch das Henrysche-Gesetz kann der (zunächst) unbekannte Partialdruck an der flüssigseitigen Phasengrenzfläche aus Gl. 4.34 eliminiert werden.

Flüssigseitiger Stoffübergang

Die Beschreibung des flüssigseitigen Stoffübergangs ermöglicht es, die (meßbare) Konzentration im Hauptstrom der Flüssigkeit in das Gleichungssystem einzuführen. Durch diese Gleichung kann, bei Kenntnis des Stoffübergangskoeffizienten, die Konzentration an der Membranoberfläche berechnet werden.

$$\dot{n}''_l = k_l \cdot (c_{O_2,l2} - c_{O_2,l3}) \quad (4.36)$$

mit

k_l Flüssigseitiger Stoffübergangskoeffizient

Gasseitiger Stoffübergang

$$\dot{n}''_g = k_g^* \cdot (p_{O_2,g0} - p_{O_2,g1}) \quad (4.37)$$

$$k_g^* = \frac{k_g}{\mathcal{R} \cdot T} \quad (4.38)$$

mit

 k_g^* Gasseitiger Stoffübergangskoeffizient

Der übergehende Stoffstrom zeigt genau dann ein stationäres Verhalten, wenn die Bedingung

$$\dot{n}''_{O_2} = \dot{n}''_{O_2,M} = \dot{n}''_{O_2,l} = \dot{n}''_{O_2,g} \quad (4.39)$$

erfüllt wird. Die Gleichungen 4.30 bis 4.39 können nun zusammengefaßt werden:

$$\dot{n}''_{O_2} = \left(\frac{p_{O_2,g0}}{H_{O_2,l}} - c_{O_2,l3} \right) \cdot \frac{1}{\left(\frac{\delta \cdot H_{O_2,M}}{D \cdot H_{O_2,l}} + \frac{1}{k_g^* \cdot H_{O_2,l}} + \frac{1}{k_l} \right)} \quad (4.40)$$

Hierdurch wird die Untergliederung des Transportansatzes in ein treibendes Gefälle und einen Widerstandsterm deutlich. Zur besseren Verständlichkeit und Handhabung können jedoch einige Vereinfachungen eingeführt werden. Der Stofftransportwiderstand auf der Gasseite ist *von Größenordnung klein* verglichen mit dem flüssigkeitsseitigen Wert [46]. Weiterhin kann mit der Definitionsgleichung für die Permeabilität [84, 179]:

$$P := \frac{D}{H_{O_2,M}} \quad (4.41)$$

und der Bestimmungsgleichung für eine charakteristische Membrandicke [35, 133]:

$$\delta_M = r_a \cdot \ln \frac{r_a}{r_i} \quad (4.42)$$

mit

δ_M Charakteristische Dicke einer Schlauchmembran
 r_a Innenradius
 r_i Außenradius

Gleichung 4.40 wie folgt formuliert werden:

$$\dot{n}''_{O_2} = \left(\frac{p_{O_2,g}}{H_{O_2,l}} - c_{O_2,l3} \right) \cdot \frac{1}{\left(\frac{\delta_M}{P \cdot H_{O_2,l}} + \frac{1}{k_l} \right)} \quad (4.43)$$

In dieser Darstellung sind bis auf den k_L -Wert alle Größen bekannt oder aber durch Messungen erfaßbar, so daß die Einzelwiderstände für den transmembranen Transport experimentell zu ermitteln sind (vgl. Kap. 5). Ersetzt man den Term

$$\frac{\delta_M}{P \cdot H_{O_2,L}} := \frac{1}{k_M}$$

mit

 k_M Membranseitiger Widerstand

so erkennt man im Vergleich mit Gleichung D.9 den Transportkoeffizienten als Kehrwert des Widerstandsterms:

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{k_M} + \frac{1}{k_L} \quad (4.44)$$

mit

K Stoffdurchgangskoeffizient

Die Abweichung der hier abgeleiteten Form von der Grundgleichung für den Stoffdurchgang trägt dem physikalischen Effekt Rechnung, daß durch die Serienschaltung verschiedener Transportphasen der *Grundwiderstand* durch den jeweiligen Verteilungskoeffizienten gewichtet wird. An dieser Stelle sei noch einmal an die Voraussetzung für das Sorptionsgleichgewicht S. 55 erinnert, die eine wichtige Grundlage für die hier angestellten Betrachtungen darstellt.

Membranwerkstoffe

Die Membran stellt, wie dies bereits an früherer Stelle erwähnt wurde, gleichermaßen Hilfsmittel zur verfahrensgerechten Begasung und Transportwiderstand dar. Die Auswahl muß sich jedoch zunächst an den Anforderungen der Zellkultur an das Material orientieren, d. h., Zellkompatibilität, Sterilisierbarkeit, Langzeitstabilität der Stoffeigenschaften unter Prozeßbedingungen und Selektivität¹⁷ sind von übergeordneter Bedeutung. Silikon erfüllt mit seinen Stoffeigenschaften alle notwendigen Randbedingungen und stellt eine nahezu kompromißfreie Lösung des Transportproblems dar. Die wesentlichen Stoffeigenschaften anderer in Frage kommender Materialien sind häufig mit denen des Silikons verglichen worden, hier sei daher nur auf einige aussagekräftige Literaturstellen verwiesen [36, 69, 84, 83, 162]. Silikon wird bereits seit der Mitte der vierziger Jahre in der Medizintechnik eingesetzt [25]. Hier diente es neben seiner Verwendung für Implantate (Herzklappen, Blutgefäße) bereits als Oxygenatorwerkstoff. Als FDA¹⁸-zugelassener Werkstoff gilt Silikon als geprüftes Material auch in der pharmazeutischen Industrie. Weitere, vielfältige Anwendungen sind in der entsprechenden Fachliteratur beschrieben (vgl. auch [112, 133, 162]).

In der Membrantechnik wird Silikon vor allem bei der Gaspermeation zur Auftrennung von Gasgemischen als Deckschicht benutzt. Neuere Verfahren, so die Pervaporation, nutzen die selektiven Eigenschaften des Silikons zur Trennung organischer Flüssigkeits-Gemische sowie zur Alkoholabtrennung aus Bier und Wein [176].

Stoffeigenschaften

Wesentlich für den Anwendungsfall der blasenfreien Begasung sind die Löslichkeit der gasförmigen Komponenten in der Membran sowie die Diffusionseigenschaften. Sie werden von den Einflußgrößen Druck und Temperatur bestimmt und wirken direkt auf die Permeabilität. Zur Ermittlung der Diffusionskonstanten von Gasen in Polymeren können unterschiedliche Verfahren Anwendung finden, häufig werden die time-lag-Methode und die Permeabilitäts-Löslichkeitsmethode benutzt [132]. Die Temperaturabhängigkeiten des Diffusionskoeffizienten und der Permeabilität wird im Falle einer porenfreien Polymerschicht häufig durch einen Arrhenius-Ansatz beschrieben:

$$D = D_0 \cdot \exp\left(\frac{-E_d}{R \cdot T}\right) \quad (4.45)$$

¹⁷An dieser Stelle wird häufig alleine die Selektivität für die zugeführten Gase verstanden. Bei Membranprozessen in der Lebensmittelindustrie und im pharmazeutischen Bereich nimmt jedoch der Verbleib wichtiger Prozeßstoffe (niedermolekulare Medienbestandteile, Aromastoffe) einen wichtigen Stellenwert ein.

¹⁸FDA: Food and Drug Administration

	$\vartheta [^{\circ} \text{C}]$	O_2	CO_2	N_2	$\text{H}_2\text{O} - \text{Dampf}$
Permeabilität $\left[\frac{\text{g} \cdot \text{mm}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{bar}} \cdot 10^{-9} \right]$	25	62.9 ^a	346.4 ^b	33.1 ^a	3860 ^c
Diffusionskoeffizient $\left[\frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \cdot 10^{-6} \right]$	25	17.0 ^d	15.0 ^e	13.2 ^d	—
Löslichkeit ^f $\left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3 \cdot \text{bar}} \cdot 10^{-6} \right]$	25	370	2310	250	—

^a[69], Umrechnung der in der Literatur angegebenen amerikanischen Einheit barrer: Siehe Anhang S. 114.

^b[83]

^c[162]

^d[36]

^e[179]

^fAus der Permeabilität und dem Diffusionskoeffizienten errechnet.

Tabelle 4.4: Eigenschaften verschiedener Gase in Silikon (Löslichkeiten bei Gleichgewicht mit dem Reingas für 1 bar absolut)

$$P = P_0 \cdot \exp \left(\frac{-E_d}{R \cdot T} \right) \quad (4.46)$$

mit

E_d Aktivierungsenergie

Daten für die Bezugswerte sowie die Aktivierungsenergien für die unterschiedlichen Gase in Silikon können der Literatur [36, 84] entnommen werden.

Gemäß Gl. 4.41 wirken die Diffusionseigenschaften der permeierenden Gase sowie die Löslichkeit im Silikonmaterial direkt auf die Permeabilität ein. Die Aufschlüsselung in beide Faktoren fördert jedoch das Verständnis für den Transportmechanismus und die Möglichkeit, ihn bei veränderlichen Umgebungsbedingungen gezielt zu beeinflussen. Nur so kann das Permeationsverhalten der unterschiedlichen Gase vorhergesagt werden. Tab. 4.4 zeigt die Eigenschaften der Gase Kohlendioxid, Stickstoff und Sauerstoff in der Silikonmembran¹⁹. Hierbei kann festgestellt werden, daß die vergleichsweise hohe Permeationsrate von Kohlendioxid in einer Silikonmembran auf seine gute Löslichkeit zurückzuführen ist, die Diffusionskonstanten hingegen sind von gleicher Größenordnung. Dieser Effekt findet bei der blasenfreien Begasung besondere Beachtung, da die Permeationsmembran neben der Zufuhr des Sauerstoffs das von den Zellen gebildete Kohlendioxid abtransportiert. Neben dem vorhandenen hohen treibenden Gefälle für das Kohlendioxid — in der Gasphase liegen maximal 5 Volumenprozent vor — steht diesem Transport nur ein geringer Widerstand entgegen. Vergleicht man die Werte von Diffusion und Löslichkeit der gasförmigen Komponenten in Silikon mit denen in Wasser (vgl. Tab. 4.5), so können sehr ähnliche Diffusionseigenschaften festgestellt werden. Das Sorptionsverhalten kann beim Phasenübergang fest-flüssig entscheidend mit auf den Gesamttransport einwirken. Der Vergleich der Löslichkeiten der Reingase bei einem Absolutdruck von 1.0 bar zeigt für den Sauerstoff ein Löslichkeitsverhalten, das in Wasser um eine Größenordnung niedriger liegt als im Silikon. Beim Kohlendioxid kann im Gegensatz ein Wert in der gleichen Größenordnung festgestellt werden²⁰.

Der Stoffüberbegriff *Silikon* soll nicht über die Tatsache hinwegtäuschen, daß je nach Aufbau des Werkstoffs auch die hier betrachteten Eigenschaften erheblich voneinander abweichen können. Unter-

¹⁹Die Zusammenstellung der Werte in Tab. 4.4 aus verschiedenen Quellen bedingt, daß sich die genannten Eigenschaften auf unterschiedliche Silikonmaterialien beziehen. Leider fehlen hierbei meist die notwendigen Materialangaben.

²⁰Die in Tab. 4.5 genannten Werte beziehen sich auf einen Anteil von 0.04 % Kohlendioxid in der Luft.

	$\vartheta [^{\circ} \text{C}]$	O_2	CO_2	N_2
Diffusionskoeffizient ^a $[\frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \cdot 10^{-6}]$	25	18.0	16.4	16.4
Löslichkeit ^b $[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \cdot 10^{-6}]$	25	8.2	0.58	—
Löslichkeit ^c $[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \cdot 10^{-6}]$	25	39.4	1443.9	—

^a[145]^bBei 1 bar Luftdruck (vgl. S. 44).^cBei 1 bar Reingas.

Tabelle 4.5: Eigenschaften verschiedener Gase in Wasser

suchungen von unterschiedlichen Polydialkylsiloxanen beleuchten die Bandbreite der Permeationseigenschaften [83]. Bei der Variation von Seitengruppen chemisch modifizierter Siloxane (Phenyl- und Methylgruppen) schwankt die Sauerstoffpermeabilität um mehr als zwei Zehnerpotenzen [162]. Eine genauere Charakterisierung der Membran sollte folgerichtig unter Angabe der Zusammensetzung oder zu Vergleichszwecken, unter Angabe des Herstellers erfolgen. Von dieser Seite besteht jedoch für den bislang recht engen Markt der blasenfreien Begasung kein Optimierungspotential. Die im Laufe dieser Arbeiten verwendeten Membranen bestanden aus Materialien, die in der Elektroindustrie und in der Lebensmitteltechnik Anwendung finden [140]. Aus den durchgeführten Experimenten sowie aus eigenen Permeationsuntersuchungen ergab sich, daß die Werte für die verwendeten Membranschläuche mit den oben beschriebenen Literaturwerten übereinstimmen.

Gasseitige Gradientenbildung/Druckverlust

Die Einteilung der Begasungseinheit in kleine Teileinheiten muß der Tatsache Rechnung tragen, daß in einem Zellkulturreaktor jede Verbindungsstelle eine potentielle Kontaminationsquelle sein kann. Die Anschlüsse von Silikon an andere Materialien, die die im vorliegenden Anwendungsfall gewünschte Druckstabilität aufweisen, fehlerstellenfrei und gleichzeitig für die erforderliche Heißdampfbehandlung ausgelegt sind, sollten aus Sicherheitsgründen reduziert werden. Somit müssen — solange stabile Schlauchmembranen großen Durchmessers nicht erprobt sind — die bisher verwendeten dünnen Schläuche umgelenkt werden. Dieser Methode sind jedoch physikalische Grenzen gesetzt:

- Der Druckverlust beim Durchströmen der Membranen führt zu einer Absenkung des gasseitigen Sauerstoffpartialdrucks und somit zu einer Verminderung des treibenden Gefälles.
- Durch die permeierenden Komponenten kommt es zu einer Abreicherung — im Falle des umgekehrten Partialdruckgefälles zu einer Anreicherung — der Strömung für die einzelnen Bestandteile, dies bedeutet ebenfalls eine Verminderung der Permeationsleistung.

Ersterer Effekt kann durch sogenannte *dead end*-Module vermieden werden, bei denen das Gas nicht strömt. Hierbei kommt es jedoch zu einem Gleichgewicht der rückpermeierenden Anteile, so daß im Falle des Stickstoffs die Gasphase bei einem Gesamtdruck von einem bar zum größten Teil (80 Prozent) aus der unerwünschten Komponente besteht. Lediglich die eingetragene Sauerstoffmenge wird dann in das Begasungsmodul nachgeführt. Weiterhin tritt in diesem Falle auch eine zusätzliche Grenzschichtbildung an der Innenseite der Membran durch permeierenden Wasserdampf auf, der die Eintragsleistung stark vermindert. Das Durchströmen der Membran mit trockenem Gas führt zu einem ständigen Abtransport aller störenden Komponenten. Dieses hat sich bei allen durchgeführten

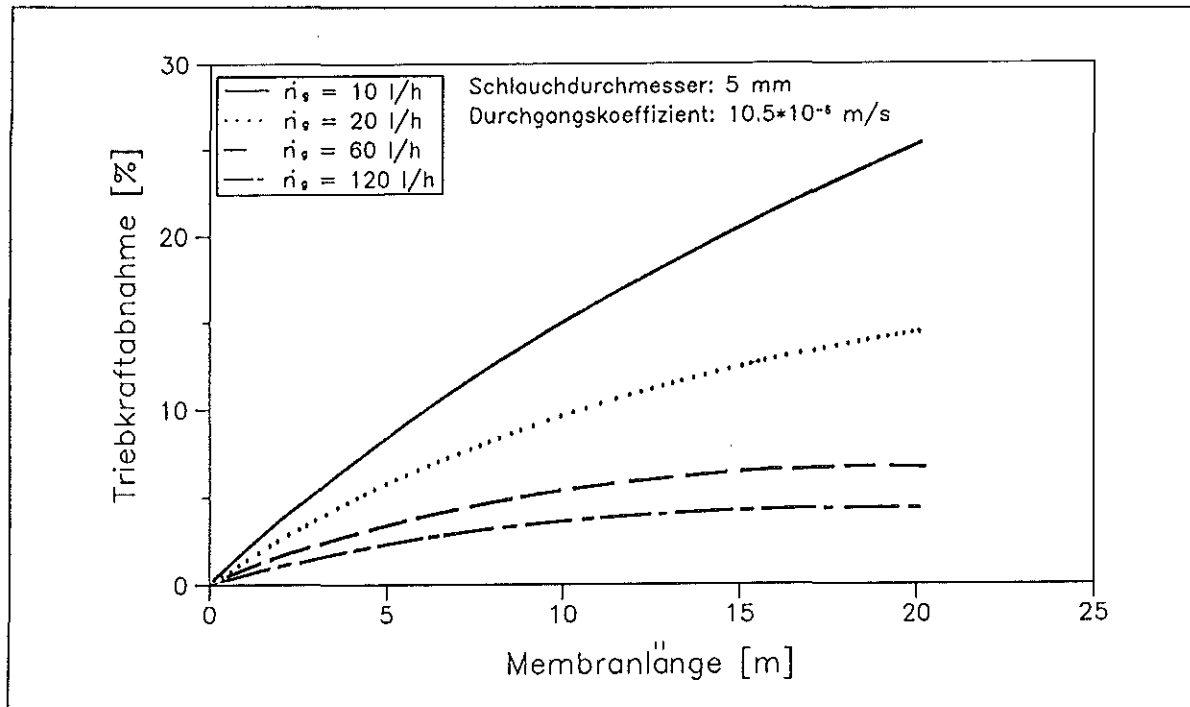


Abbildung 4.7: Berechnete Triebkraftabnahme des Permeationsvorgangs bei Variation der Gasgeschwindigkeit

Untersuchungen auch aus Gründen der gleichzeitigen Regelung von Sauerstoff und Kohlendioxid als besonders vorteilhaft erwiesen. Eine quantitative Darstellung des Einflusses durch die gaseitige Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks kann aus Gleichung 4.43 durch die Darstellung eines *mittleren treibenden Gefälles* für den Sauerstoffeintrag abgeleitet werden:

$$\left(\frac{p_{O_2,g\alpha}}{H_{O_2,l}} - \frac{p_{O_2,g\omega}}{H_{O_2,l}} \right) \cdot \frac{1}{\ln \left(\frac{p_{O_2,g\alpha} \cdot \frac{1}{H_{O_2,l}} - c_{O_2}}{p_{O_2,g\omega} \cdot \frac{1}{H_{O_2,l}} - c_{O_2}} \right)} = \frac{\dot{n}'''_l}{K \cdot a} \quad (4.47)$$

mit

α, ω Eintritts- bzw. Austrittszustand

Die Abreicherung des gaseitigen Massenstromes durch den übergehenden Sauerstoffteilstrom vermindert sich bei langen Membranschläuchen zum Ende hin; die relative Triebkraftminderung nimmt, wie Abb.4.7 zeigt, bei großen Schlauchlängen ab. Als Einflußparameter zum Erhalten eines hohen Triebkraftpotentials über die gesamte Schlauchlänge kann die Strömungsgeschwindigkeit im Membranschlauch benutzt werden. Bereits bei den für biotechnische Prozesse geringen Volumenströmen von 60-120 l/h bleibt der Triebkraftverlust für den Stoffübergang bei Membranlängen von 20 m unter 5 % des Ausgangswertes. Eine Steigerung der Strömungsgeschwindigkeit führt zu einer Erhöhung des Druckverlustes. Die Dissipationsverluste in der graden Schlauchmembran sind im Vergleich zum absoluten Druckniveau bei der Gasströmung verschwindend klein. Wichtige Anteile können durch das Abklemmen von Schläuchen oder bereits durch zahlreiche Umlenkungen erzeugt werden (vgl. [182]).

Hierzu ist auf eine sorgfältige Montage der Begasungseinheit zu achten, um bei einer parallelen Durchströmung mehrerer Membranen über die gesamte Auslegungsfläche zu begasen und so ein lokales Ausgasen durch eine zu hohe Triebkraft bei zu geringer Membranfläche zu verhindern.

4.4.2 Übergang flüssig-fest

Neben dem Stofftransport gas-flüssig besitzt der Transport von der Flüssigphase in das Innere des Wirbelguts für die immobilisierte Zelle eine erhebliche Bedeutung. Obgleich dieses Gebiet durch die mathematische Beschreibung mittels Differentialgleichungen zugänglich ist [44, 94, 189], kann eine sinnvolle Annäherung an dieses Themengebiet vorteilhaft mit Abschätzungen gewonnen werden. Hierfür mögen die folgenden Gründe angeführt werden:

- Die Strömungsbedingungen variieren während des Fermentationszeitraums erheblich.
- Im Falle adhärenter Zellen tritt eine instationäre Deckschichtbildung auf, eine Vermessung der Teilchengröße während der Fermentation erscheint aufwendig.
- Die Porosität der Träger unterliegt Schwankungen.
- Selbst bei enger Fraktionierung variiert die Teilchengröße um etwa 10 Zellschichten.
- Die Stoffwerte (z. B. Diffusionskoeffizienten) unterliegen Schwankungen, die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten für alle beteiligten Komponenten (Gase, Produkte, Substrate) in Säugerzellschichten erweist sich als schwierig.
- Bei den Transportvorgängen handelt es sich um einen Vielkomponententransport in die Wirbelkörper und aus ihnen heraus. Hierdurch sind Analogiebetrachtungen nicht angebracht [155].

Im folgenden sollen die Einzelschritte des Gesamttransports (vgl. Abb. 4.9) dargestellt werden.

Stoffübergang an das Einzelteilchen Für Flüssigkeit-Feststoff-Wirbelschichten kann im Bereich von Reynoldszahlen unter 120 analog zum Stoffübergang an die Einzelkugel das Widerstandsgesetz

$$Sh = 2 + 1.5 \cdot Sc^{0.33} [(1 - \epsilon) \cdot Re_l]^{0.5} \quad (4.48)$$

mit

Sh Sherwoodzahl

Sc Schmidtzahl

formuliert werden [39, 54, 104, 134]. Abweichungen von diesem Verhalten wurden bei Flüssigkeiten auf Grund fehlender Aggregatbildung im Bereich von Reynoldszahlen unter 10 nicht beobachtet.

Aus diesem Gesetz ist abzulesen, daß eine Erhöhung der Leerrohrgeschwindigkeit u_l zu einer Änderung des Stoffübergangs führt ($Re_l = f(u_l)$). Dieses Phänomen kann leicht mißinterpretiert werden. Bei dem Modell der idealen Anströmung des Einzelteilchens in der Wirbelschicht erhöht sich nicht die Strömungsgeschwindigkeit am Teilchen selber. Diese muß auf Grund der Schwebebedingung des Teilchens gleich bleiben. Die Erhöhung der Geschwindigkeit verändert jedoch den Hohlraumanteil. Die Änderung der Partikeldichte und die damit verbundene Turbulenzänderung (Schwarmturbulenz [27]) bewirken den Einfluß auf den Stofftransport.

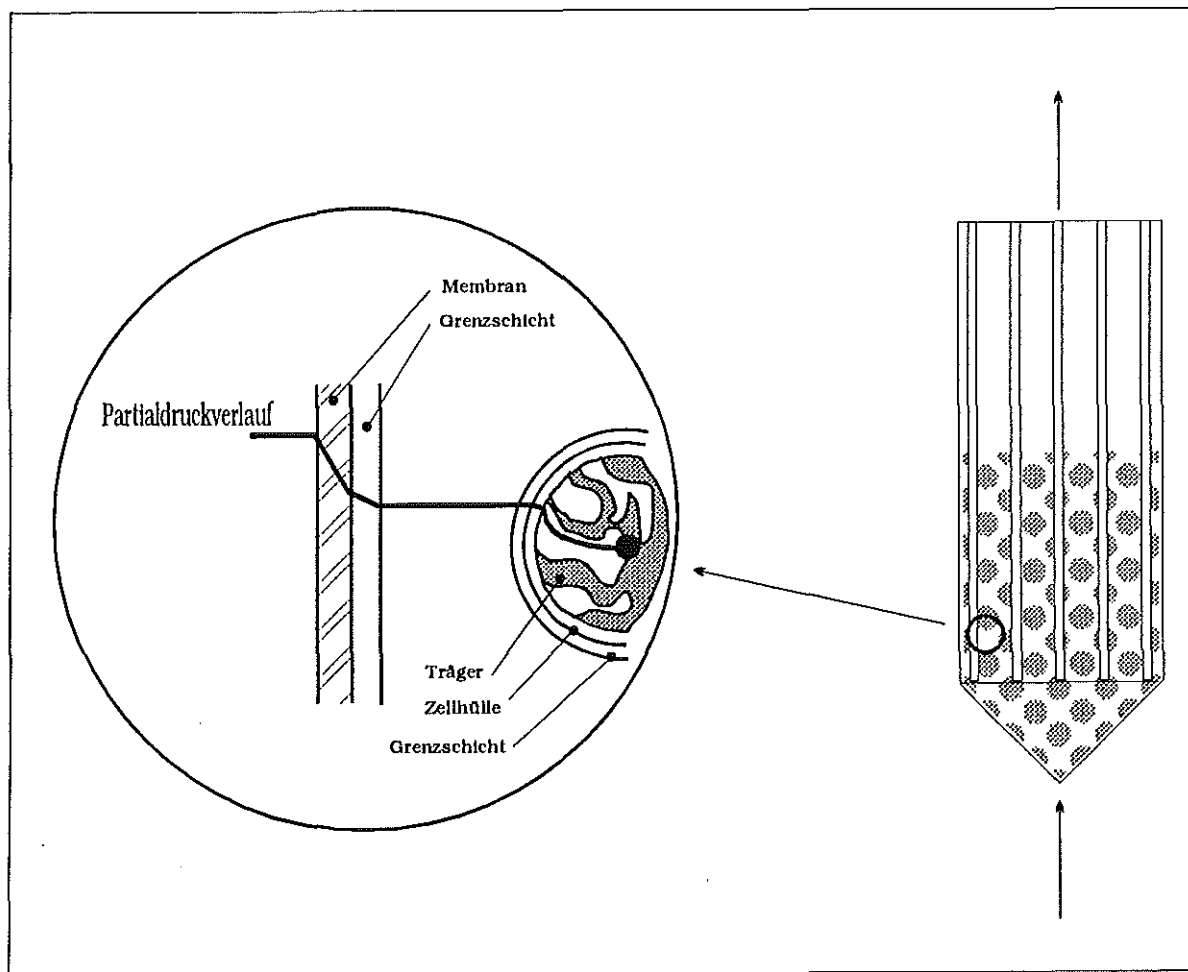


Abbildung 4.9: Darstellung der Einzeltransportschritte im Fließbett

Die aufwendige Geschwindigkeitsmessung in Wirbelschichten kann durch einen Alternativansatz vermieden werden. Dieser stützt sich auf die Theorie der lokalisotropen Turbulenz nach Kolmogorov [98, 76, 172]. Hierzu wird in den Gesetzmäßigkeiten zum Stoffübergang die Reynoldszahl durch die im Reaktor dissipierte Energie dargestellt. Die Sherwoodzahl kann dann in der Form

$$Sh = f(\varepsilon, d_s, \nu, Sc) \quad (4.49)$$

mit

ε Energiedissipation

ausgedrückt werden [29, 73, 95]. Neben den Wirbelschichten wird dieser Transportansatz häufig auch zur Beschreibung von Blasensäulen verwendet.

Der Stofftransport in einer Zellohülle und im Träger Die mathematische Umsetzung zur Beschreibung dieser beiden physikalischen Vorgänge gelingt durch die gleiche Differentialgleichung. Es handelt sich hierbei um eine Diffusion bei einer gleichzeitigen Reaktion in Kugelschalen. Hierzu kann der (im Falle eines Substrats) eintretende Massenstrom wie folgt formuliert werden:

$$\dot{n}''' = -4\pi r_s^2 D \frac{dc_i}{dr_s} \quad (4.50)$$

Im stationären Zustand entspricht die Änderung des Stoffstroms mit dem Kugelradius der von den Zellen verbrauchten Menge:

$$\frac{d}{dr_s} \dot{n}''' = R_i \quad (4.51)$$

Mit den Gleichungen 4.50 und 4.51 ergibt sich die beschreibende Differentialgleichung für den im Feststoff auftretenden Massentransport:

$$0 = \frac{D}{r_s^2} \frac{d}{dr_s} r_s^2 \frac{dc}{dr_s} - R_i \quad (4.52)$$

Der Diffusionskoeffizient in der Zellohlle um den Träger muß zur Bestimmung des Konzentrationsprofils bekannt sein. Die hierzu in der Literatur angegebenen Werte schwanken erheblich (z. B. [78, 131, 111]). Des weiteren sollten Werte zum Diffusionsverhalten im verwendeten Trägermaterial sowie Ansätze zur Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Zelldichte im Innern des Trägers vorliegen [44, 88, 171].

Die in der Literatur genannten Randbedingungen zur Lösung der obigen Differentialgleichungen sowie Vereinfachungen bei der Formulierung des Reaktionsterms führen zwar auf handhabbare Lösungen; da bei einem Bewachsen der Träger ein System von zu koppelnden Differentialgleichungen [123] bei äußerst unbestimmten Kenntnissen über die aktuellen Daten im Träger vorliegen, muß die Relevanz solcher Berechnungen und Simulationen kritisch beurteilt werden.

Kapitel 5

Untersuchungen zum transmembranen Stofftransport

Zielsetzung der hier aufgezeigten Untersuchungen ist es, die Abhängigkeit des Sauerstoffeintrages von der Variation

1. des gaseitigen Partialdruckniveaus
2. der gaseitigen Geschwindigkeit
3. der durch die reine Fluidströmung erzeugten Turbulenz
4. der zusätzlich durch die Wirbelschicht erzeugten Turbulenz

zu erarbeiten. Es soll weiterhin Aufschluß darüber gewonnen werden, inwieweit der Weg Erfolg verspricht, glasfasergestützte dünne Silikonmembranen für eine Maßstabsvergrößerung des Systems (Minimierung der Membranlänge, große Membrandurchmesser) zu verwenden.

5.1 Beschreibung der Versuchsanlage

Zur Vermessung des transmembranen Stofftransports wurde ein zusätzlicher Teststand errichtet (vgl. Abb. 5.1) [23]. Die am Fermentationssystem durchgeführten Messungen erlauben nicht, die Strömungs- und Materialparameter unter wohlbestimmten Geometriebedingungen in erforderlicher Weise zu variieren, sie dienen lediglich zur Bestätigung einzelner Ergebnisse.

Die Durchführung einer Zellkulturfermentation alleine zur Bestimmung von Eintragsdaten ist auf Grund des erforderlichen Zeitaufwands als nicht sinnvoll anzusehen. Bezüglich der hier angestrebten Ergebnisse reicht ein vereinfachtes System „ohne Biologie“ aus. Die Testeinheit zur Stofftransportbestimmung basiert auf dem im Rahmen dieser Dissertation konzipierten Klein-Wirbelschichtfermenter (Gesamtvolumen: 150 ml, externe Begasung, vgl. Abb. C.1 im Anhang). In das Reaktorrohr der Testeinheit können mittig Begasungsmembranen eingebracht werden, so daß Geometrie- und Strömungseinflüsse untersucht werden können.

Membranen Bei dem verwendeten Membranmaterial handelt es sich um Silikon. Die bereits bei früheren Zellkulturfermentationen eingesetzte Membran (M1) besitzt einen Innendurchmesser von 3 mm und eine Wandstärke von 0.8 mm. Hierdurch errechnet sich eine effektive Membrandicke zu $\delta_M = 0.98 \text{ mm}$ (Gl. 4.42). Die Membran wird hergestellt, indem ein dünnes Schlauchmaterial zunächst mit Nylon umgarnt wird. Abschließend erfolgt eine Beschichtung mit einem ebenfalls dünnen Silikonfilm. Somit wird eine glatte Oberfläche erreicht, die die Gefahr von Ablagerungen vermeidet. Wie alle Silikonschläuche kann die Membran bei der erforderlichen dünnen Wandstärke nur mit kleinen Durchmessern hergestellt werden ($\leq 8 \text{ mm}$). Dies ist durch die Geometrien der Düsen beim Produktionsprozeß begründet.

Die zweite Membran (M2) wurde ausgesucht, da sie dünne Wandstärken auch bei größeren Durchmessern erlaubt und so die Möglichkeit zu einer Maßstabsvergrößerung von Reaktoren mit

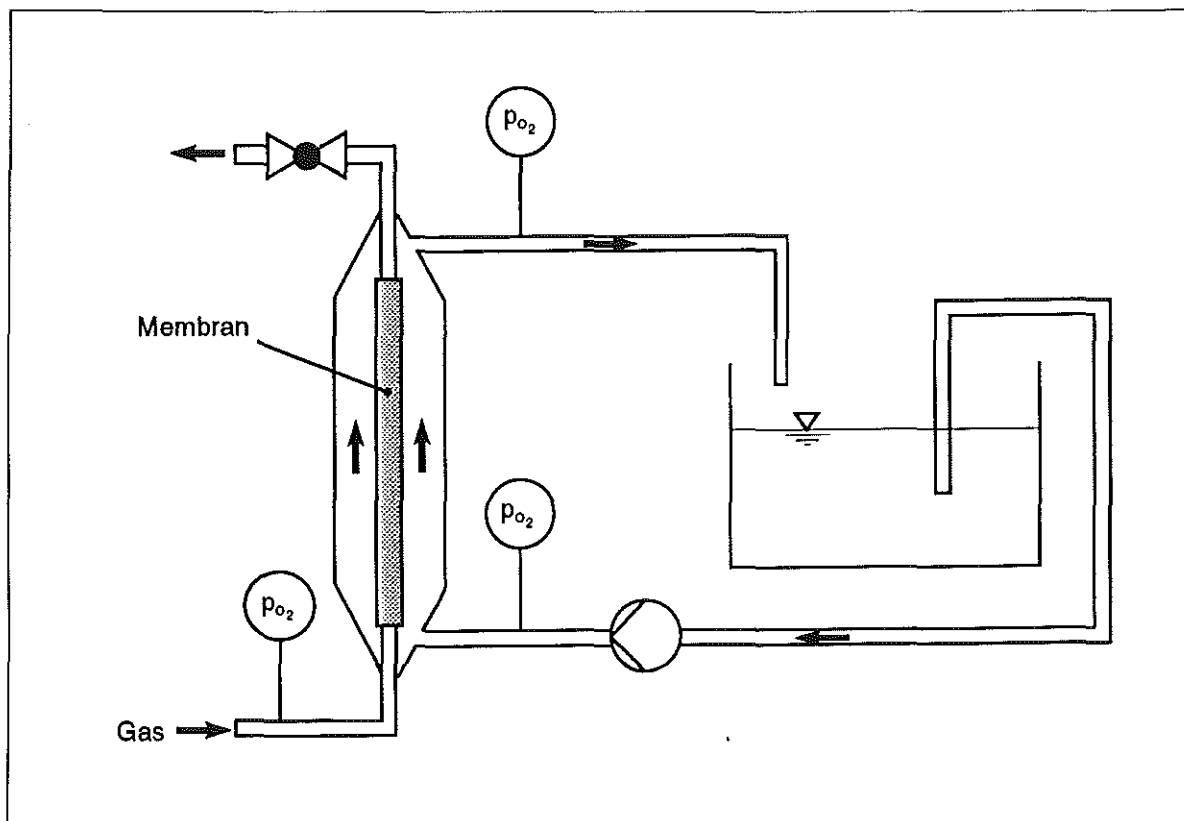


Abbildung 5.1: Versuchsanlage zur Stoffeintragsmessung-Prinzipskizze

einer integrierten blasenfreien Begasung bietet. Sie wird gefertigt, indem auf ein poröses Glasfasermaterial eine dünne Schicht Silikon aufgelegt wird¹. Da hierbei die Glasfaser die Funktion der Stützschiicht bietet und die Glasfaserschläuche auch mit größeren Durchmessern ($\geq 30 \text{ mm}$) gefertigt werden können, sind Begasungsmodule mit extrem dünnen Wänden zugänglich. Durch diese Membranschläuche könnten auf Grund ihres großen Durchmessers die häufig diskutierten großen Membranlängen bei der reaktorintegrierten Begasung erheblich reduziert werden. Die getestete Membran besitzt eine effektive Wandstärke von $\delta_M = 0.32 \text{ mm}$.

Flüssigphase Die Flüssigkeit strömt in Form einer Ringspaltströmung entlang der Außenseite der Membran (vgl. Abb. 5.1). Die Konstruktion erlaubt Messungen mit und ohne Wirbelschicht, das Gefäß wurde bereits erfolgreich zur Zellkultivierung genutzt. Somit liegen gesicherte Angaben darüber vor, ob die hier eingestellten Versuchsbedingungen für die Zellkultivierung von Relevanz sind. Im Versuchsbetrieb kann der Fermenter wahlweise mit Wasser oder Zellkulturmedium gespeist werden. Als Reservoir der im Kreislauf gepumpten Flüssigkeit dient ein Gefäß, das in Verbindung zur Atmosphäre steht. Die hohe Verweilzeit des Fluids in diesem Speicher sowie seine große Oberfläche erlauben die Konstanz der Eingangsbedingungen für den Reaktor; somit können stationäre Versuchspunkte angefahren werden. Der eigentliche Begasungsvorgang findet somit gegen eine luftgesättigte Flüssigkeit statt. Hierzu werden die in Kap. 4.2 ermittelten Werte für die Sauerstoffsättigung von Reinwasser und Zellkulturmedium verwendet. Die Temperatur der eingesetzten Flüssigkeiten beträgt bei allen Testreihen einheitlich 37° Celsius .

¹Auf Grund der geringen Wandstärke wird lediglich ein geringfügiger gaseitiger Überdruck zum Sauerstoffeintrag angelegt, eine Verstärkung der Membran wird in diesem Fall nicht benötigt.

Durch die Zuordnung des gaseitigen Sauerstoffpartialdrucks zu dem in die Flüssigphase eingetragenen Massenstrom werden bei fest eingestellten Strömungsbedingungen die Widerstände für den transmembranen Stofftransport bestimmt. Detaillierte Berechnungs- und Auswertungsvorschriften finden sich in der Literatur [23].

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Vorversuche

Vor Beginn der Untersuchungen muß die Gültigkeit für den allgemeinen Ansatz zur Beschreibung des Stofftransports (Gleichung D.9, S. 133) überprüft werden. Dieser Ansatz drückt Linearität zwischen dem eingetragenen Massenstrom und dem treibenden Gefälle bei vorgegebenen Randbedingungen aus. Hierüber kann ein einfacher Stoffeintragsversuch Klarheit erzeugen (vgl. Abb. 5.2). Für den Bereich der Zellkultur sollte aus Gründen der Sicherheitstechnik ein Druckniveau über 2 bar für die reaktorintegrierte Begasung ausgeschlossen werden. Die hier dargestellten Meßergebnisse weisen aus, daß das gaseitige Druckniveau für die Bestimmung des Stofftransportkoeffizienten irrelevant ist, der Koeffizient kann also bei jedem Meßpunkt einer Meßreihe unter gleichen äußeren Bedingungen ermittelt werden. Bei einem gaseitigen Sauerstoff-Partialdruck von 209 mbar findet kein Gastransport statt.

Bei den Messungen zum Stoffeintrag war es nicht möglich, den Gasvolumenstrom konstant zu halten. Daher wurde durch einen weiteren Vorversuch die Annahme verifiziert, daß Schwankungen der gaseitigen Geschwindigkeit keinen Einfluß auf den Stoffübergang ausüben (vgl. Annahme S. 56). Hierzu wurde der Gas-Volumenstrom derart verändert, daß Reynoldszahlen ≤ 10 (laminarer Bereich) bis zu Werten $Re=10000$ (turbulenter Bereich) erreicht wurden (vgl. Abb. 5.3).

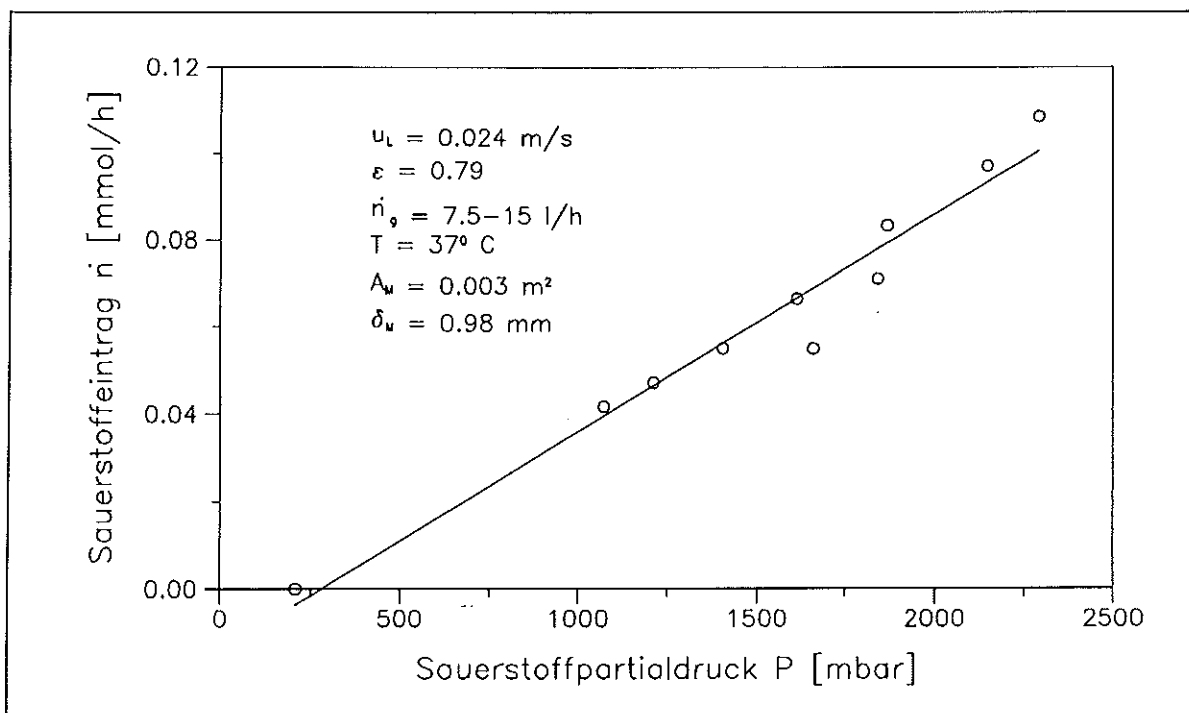


Abbildung 5.2: Sauerstoffeintrag bei vorgegebenem Sauerstoffpartialdruck

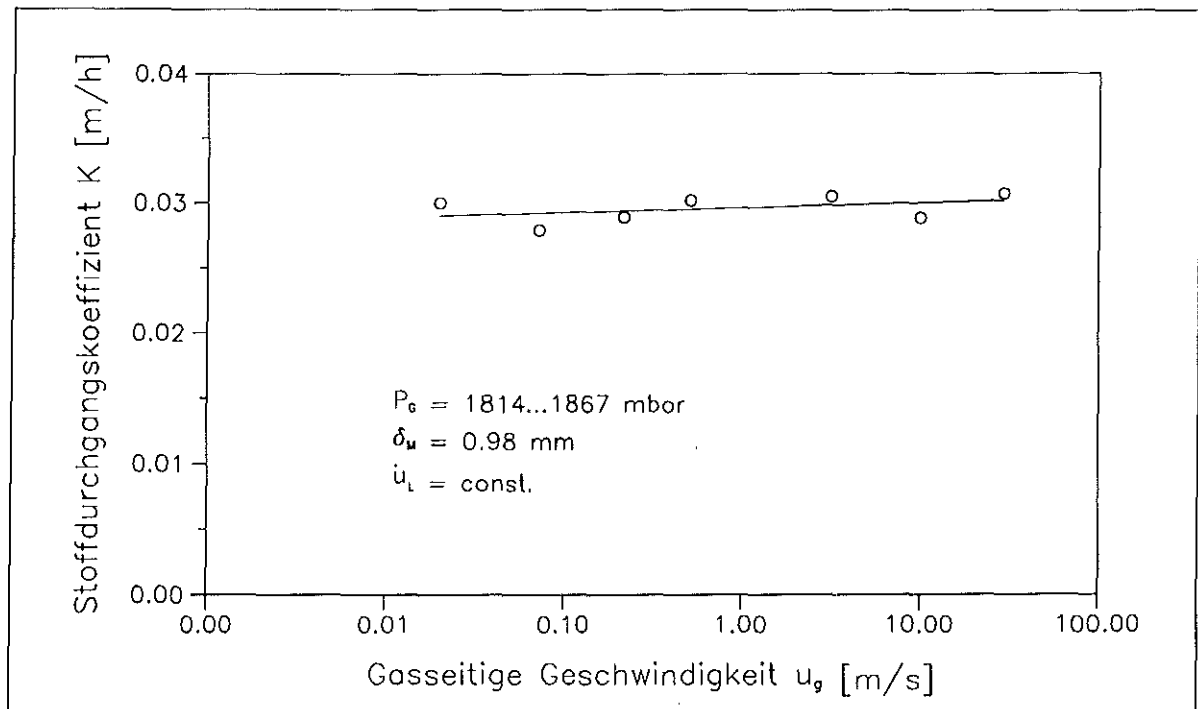


Abbildung 5.3: Variation der gaseitigen Geschwindigkeit

Ein Einfluß auf den Stoffdurchgangskoeffizienten konnte hierdurch nicht beobachtet werden.

Durch die hier durchgeführten einfachen Messungen können also zwei wesentliche Grundannahmen zur Theorie des transmembranen Stofftransportes bestätigt werden:

1. Für die Verknüpfung des eingetragenen Massenstroms und des treibenden Gefälles darf ein linearer Ansatz gewählt werden.
2. Der transmembrane Transport wird durch die gaseitige Geschwindigkeit nicht beeinflusst.

Diese Aussagen sind für die Durchführung und die Gültigkeit der in Kapitel 8 vorgenommenen Modellierungen von erheblicher Bedeutung.

Vergleich zwischen Zellkulturmedium und Wasser Zur weiteren Vereinfachung der Untersuchungen zum transmembranen Stofftransport wurden Überlegungen darüber angestellt, inwieweit Experimente mit Zellkulturmedium² durch Wasser ersetzt werden können. Auf Grund ihrer unterschiedlichen Stoffeigenschaften wird zur Bewertung der Ersatzflüssigkeit Wasser ein Vergleich vorteilhaft durch eine Kennzahlendarstellung durchgeführt. In Abb. 5.4 wird hierzu die Sherwoodzahl über der Strömungskenngröße für die Flüssigphase vorgestellt³. Im Intervall der Reynoldszahlen von 100 bis 500 streuen die Werte der Sherwoodzahl um den Wert 50.

²Hierbei handelt es sich zur Sicherung des Realverhaltens um den zellfreien Überstand aus einer Fermentation mit einer Hybridomazelllinie.

³Bei allen Abbildungen in Kap. 5 wurde die Sherwoodzahl in Abweichung von den übrigen Ausführungen aus dem Diffusionskoeffizienten des Gases im Fluid, dem Stoffübergangskoeffizienten sowie dem hydraulischen Durchmesser des Ringspalts gebildet.

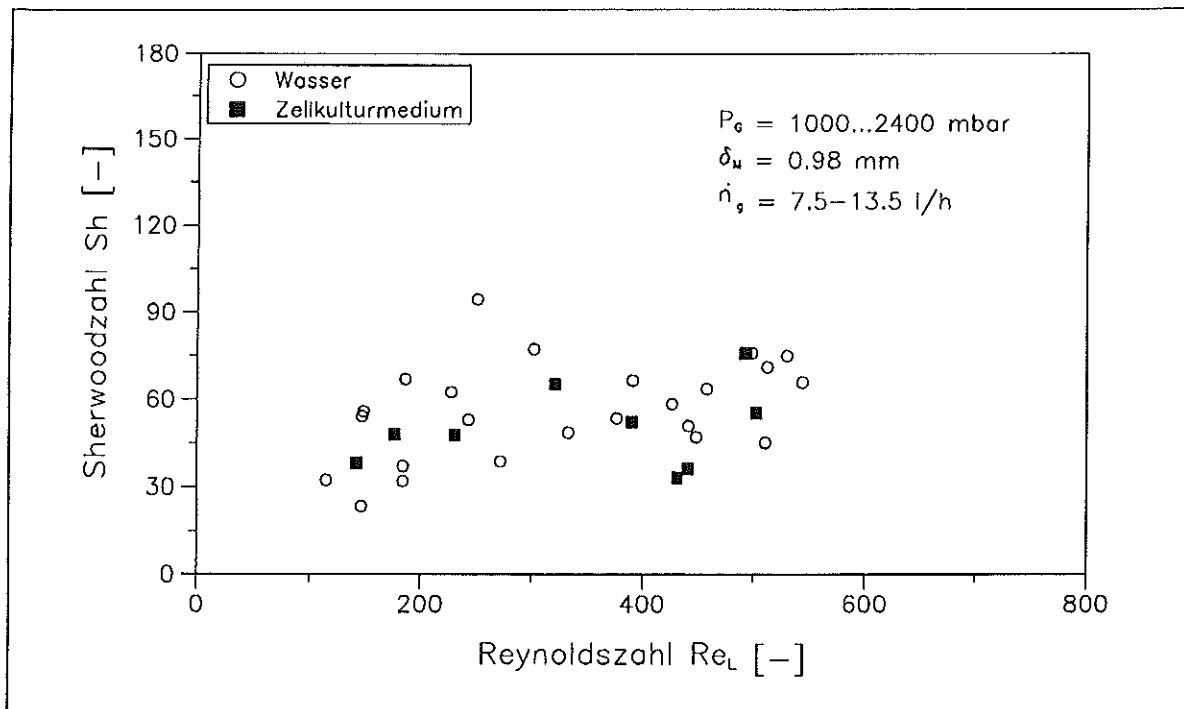


Abbildung 5.4: Stoffübergang bei einer Variation der Flüssigphase

Trotz einer Schwankungsbreite, die auf Ungleichmäßigkeiten in der Wirbelschicht zurückgeführt werden kann, stimmen die Meßergebnisse beim Vergleich zwischen den unterschiedlichen Fluiden gut überein. Es wird weiterhin deutlich, daß bei der Reproduzierbarkeit von Meßwerten auch mit demselben Fluid Abweichungen beim flüssigseitigen Widerstand von 5-10 % in Kauf genommen werden müssen. Da für beide Flüssigkeiten die Meßwerte im gleichen abweichenden Intervall angesiedelt sind, werden die folgenden Experimente mit Wasser durchgeführt.

5.2.2 Stofftransport ohne Wirbelschicht

Zur Charakterisierung des Verhaltens für den Sauerstoffeintrag wird das System zunächst ohne Wirbelschicht betrieben (vgl. Abb. 5.5). Diese Vorgehensweise verfolgt zwei unterschiedliche Zielsetzungen: Zunächst wird ein Kriterium benötigt, das einen Vergleich zwischen dem Einfluß der Ein- und Zweiphasenströmung auf den Stofftransport in den Reaktor ermöglicht, also den Einfluß der Wirbelschicht beschreiben hilft⁴.

Zum anderen muß die Stoffmenge, die durch den Anteil der Begasungsmembran oberhalb der Wirbelschicht eingetragen wird, bekannt sein, um das Verhalten der Einzelwiderstände auf den Stofftransport sinnvoll bewerten zu können. Gemessen wird jedoch die gesamte eingetragene Menge an Sauerstoff, so daß der transmembrane Stoffstrom in die zwei Teilströme in und oberhalb der Wirbelschicht aufgeteilt werden muß. Hierzu trägt der hier beschriebene Versuch bei.

An dieser Stelle wurden die experimentell ermittelten Werte mit denen verglichen, die sich aus einer Analogiebetrachtung von Wärme- und Stofftransport ergeben [23]. So können gegebenenfalls aufwendige Experimente durch Berechnungen ersetzt werden. Für den vorliegenden Fall ohne Wirbelschicht können die Bedingungen für die Analogie als erfüllt angesehen werden^{4,5}.

⁴Prinzipiell ist auch die Kultivierung von Hybridomzellen ohne Wirbelschicht im gleichen System denkbar.

⁵Die mit ⁴ gekennzeichneten Begriffe werden im Anhang D, S. 136 erläutert.

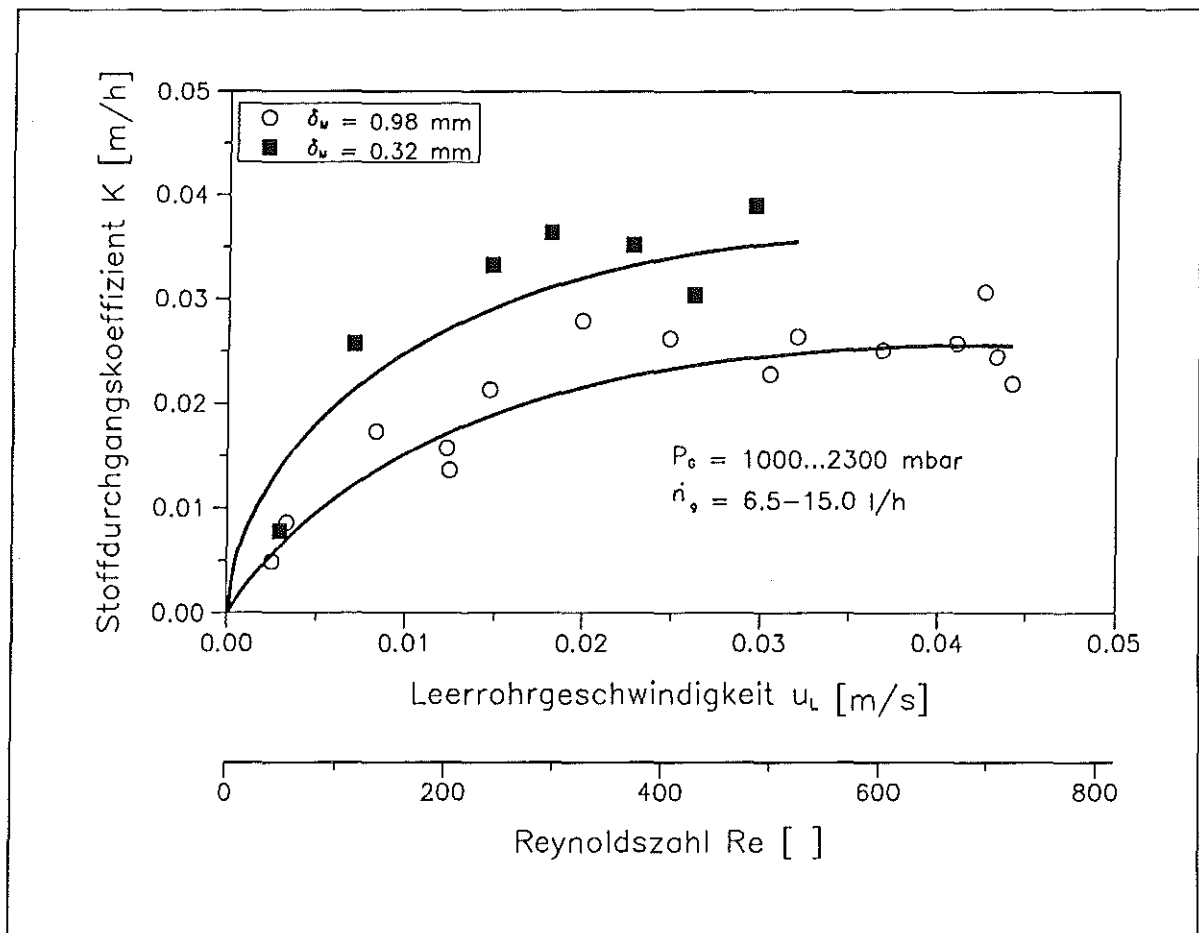


Abbildung 5.5: Stoffdurchgang ohne Wirbelschicht

Es wird deutlich, daß die experimentellen Daten im Bereich $Re_l \leq 320$ ($u_l \leq 0.02$ m/s) einen nahezu linearen Anstieg des Stoffdurchgangs von der Anströmgeschwindigkeit ausweisen (Abb. 5.5). Hiermit wird der Bereich beschrieben, der zur Fluidisierung der Partikel tatsächlich benötigt wird. Oberhalb dieses Wertes ist keine weitere Verbesserung des Stoffeintrags zu beobachten. Bei der Fluidisierung von Partikeln mit einer höheren Gesamtdichte (höhere Leerrohrgeschwindigkeit) darf also von einem konstanten Wert für den Eintrag ausgegangen werden.

Begleitend zu dieser Arbeit wurde betrachtet, inwieweit die Analogie zwischen Wärme- und Stofftransport zur Berechnung des Stofftransports verwendet werden kann (vgl. S. 136). In dem oben angeführten Strömungsbereich können die Meßwerte mit Erfolg vorausberechnet werden. Hierzu muß zuvor aus den Meßergebnissen zum Stoffdurchgang (vgl. Abb. 5.5) der Übergangskoeffizient herausgerechnet werden. Aus der Abweichung zwischen theoretischer und experimenteller Betrachtung wird jedoch auf ein interessantes Phänomen hingewiesen [23]. Zur Bestimmung der Sherwoodzahl für die experimentell gewonnenen Daten muß der membranseitige Widerstand aus dem Gesamtwiderstand eliminiert werden. Die hierzu herangezogenen Literaturwerte für die Permeabilität müssen im Vergleich zu den tatsächlich vorliegenden als zu hoch angesehen werden (etwa 30 %). Dies könnte sowohl durch den Einfluß der Gewebeverstärkung (geringe Teilpermeabilität im Verstärkungsmaterial) als auch auf eine eventuelle Gegendiffusion von Wasserdampf und Stickstoff bei der Versuchsanlage zurückzuführen sein.

Auch mit diesen Einschränkungen verdeutlichen die hier durchgeführten Untersuchungen, daß für eine vereinfachte Abschätzung der Meßwerte im Bereich ($u_l \leq 0.013 \text{ m/s}$) zur Ermittlung des Stoffübergangs außerhalb der Wirbelschicht die Analogie *greift*. Eine zusätzliche getrennte Messung zum Stoffübergang ohne Wirbelschicht kann durch eine Abschätzung aus der Analogie ersetzt werden.

5.2.3 Stofftransport in die Wirbelschicht

Im Anschluß können nun die das Realverhalten beschreibenden Versuche in der Wirbelschicht durchgeführt und, aufbauend auf den Ergebnissen der Vorversuche und grundlegender Messungen, verglichen und interpretiert werden.

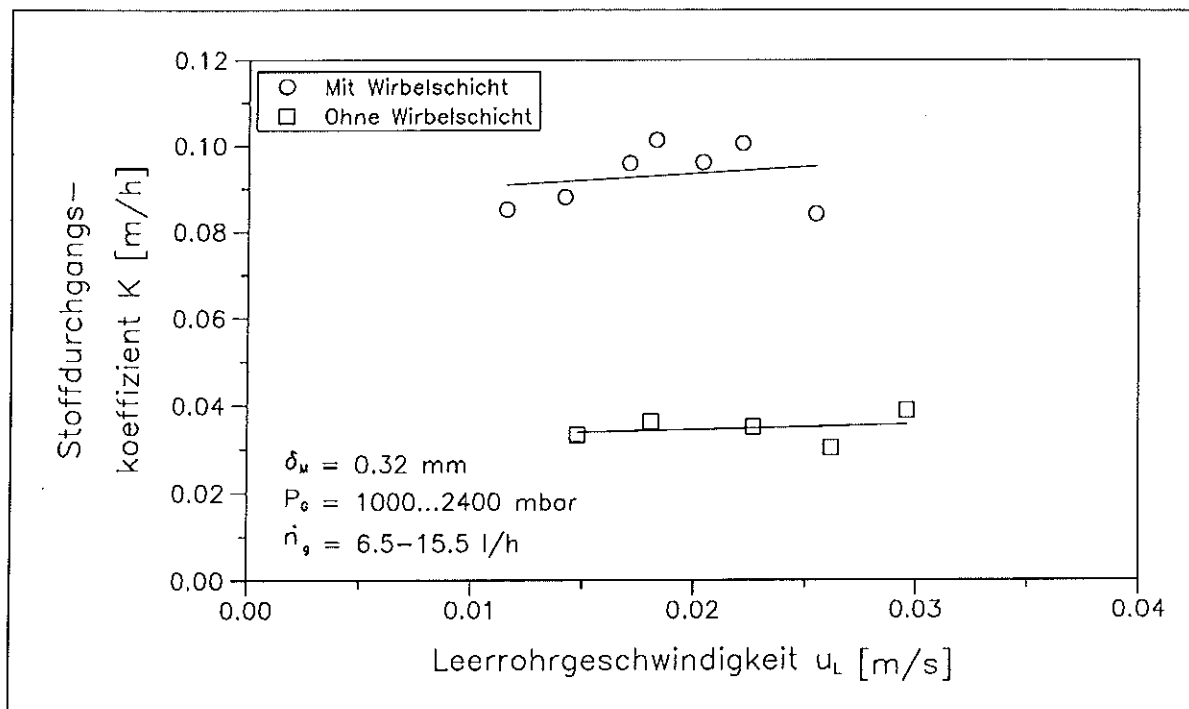


Abbildung 5.6: Vergleich zum Stoffübergang mit und ohne Wirbelschicht

Abb. 5.6 zeigt einen Vergleich zwischen dem Stoffdurchgangskoeffizienten mit und ohne Wirbelschicht⁶. Hierbei fällt ins Auge, daß sich in der Wirbelschicht ein konstanter Wert für den Stoffdurchgang bei einer Geschwindigkeit einstellt, die gering über dem entsprechenden Wert zur Minimalfluidisierung liegt.

Der hier erkennbare verbesserte Stoffübergang nach dem Einbringen einer Wirbelschicht muß auf einen Turbulenzanteil zurückgeführt werden, dessen Intensität durch einen zusätzlichen Energieeintrag durch das flüssig-fest System verursacht wird. Solche Turbulenzarten werden in der Literatur z.B. mit „Schwarm- und Gitterturbulenz“ bezeichnet ([123], S. 98). Für diese beiden Turbulenzanteile muß nicht in jedem Fall der Grad der Betauflockerung verantwortlich sein, sondern sie können — bei einer Zerlegung der Gesamtturbulenz in einzelne Anteile — einen konstanten Wert annehmen. Die Erhöhung der Reynoldszahl durch ein Anheben der Fluidgeschwindigkeit (Reynoldssche Turbulenz) erfolgt bei den hier durchgeführten Untersuchungen hingegen in einem Bereich, der weder im Strömungsrohr, noch im Fließbett eine nennenswerte Änderung des Stofftransports zur Folge hat.

⁶Bei der Ermittlung der Durch- und Übergangskoeffizienten in der Wirbelschicht wurde nur der Anteil der Membran berücksichtigt, die tatsächlich von der Wirbelschicht umgeben war. Der transmembrane Stofftransport oberhalb der Wirbelschicht wurde also vom gemessenen integralen Wert abgezogen.

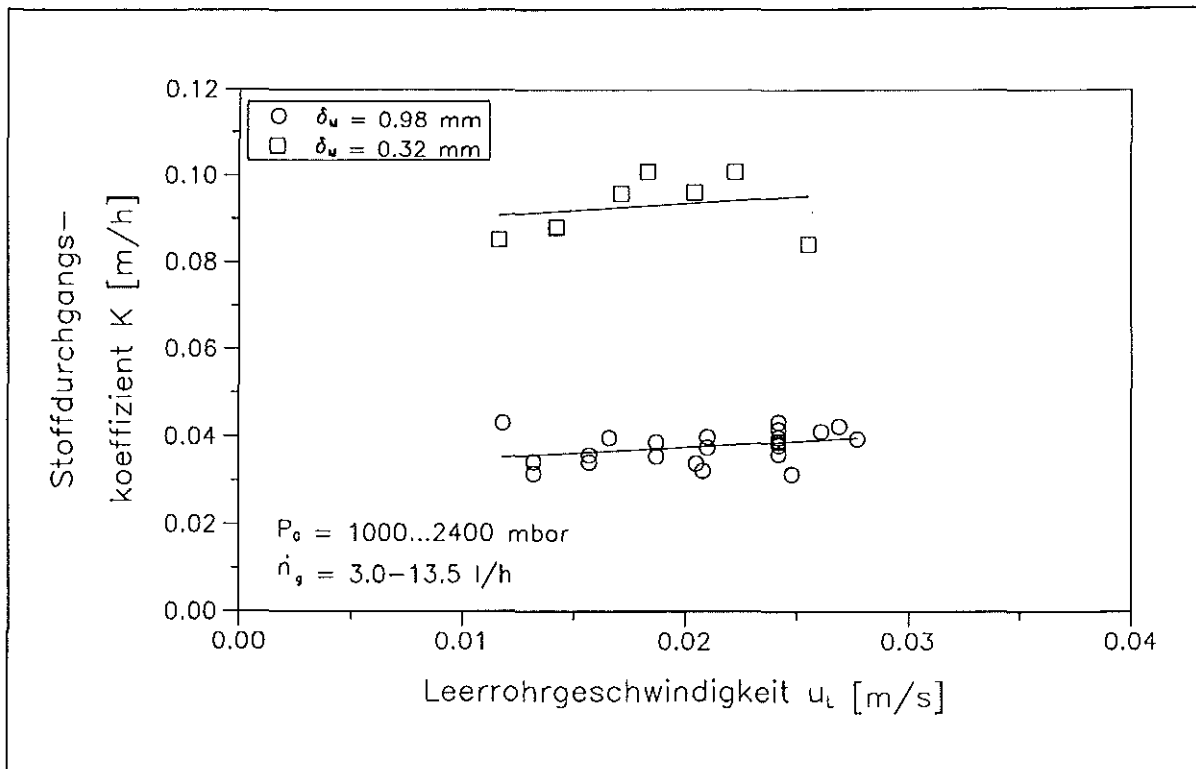


Abbildung 5.7: Vergleich der Stoffdurchgangskoeffizienten für unterschiedliche Membranstärken

Durch vorstehende Erläuterung wird erklärbar, warum der Absolutwert für den Stoffdurchgangskoeffizienten in der Wirbelschicht wesentlich höher liegt als im Ringspalt ohne Fließbett, gleichzeitig jedoch die Leerrohrgeschwindigkeit in keinem der beiden Fälle einen Einfluß ausübt.

5.2.4 Untersuchung der Einzelwiderstände

Grundlage für eine gezielte Änderung des Stoffübergangs aus der Gas- in die Flüssigphase ist die Kenntnis der Einzel-Transportwiderstände. Der Gesamtwiderstand kann durch die Bestimmung des Durchgangskoeffizienten gemäß Gleichung 4.43, S. 56 experimentell ermittelt werden. Mittels Gleichung 4.44 werden dann die Einzelbeiträge formuliert. Hierzu wird der membranbedingte Widerstand berechnet. Nach dem Vergleich zwischen unterschiedlichen Strömungszuständen (Wirbelschicht, Ringspaltströmung) werden nun zwei unterschiedliche Membranen miteinander verglichen. So kann, bei gleichem Strömungszustand, das Verhältnis des transmembranen zum flüssigseitigen Widerstand ermittelt werden. Für die Auslegung von Anlagen für blasenfreien Stoffeintrag ist dies von besonderer Bedeutung.

Membraneinfluß Abb. 5.7 zeigt zunächst die Stoffdurchgangskoeffizienten für zwei Membranen unterschiedlicher effektiver Dicke. Hierzu wird der Bereich ohne Strömungsabhängigkeit (voll ausgebildete Wirbelschicht) gewählt. Der - wie erwartet - deutliche Einfluß auf Grund des unterschiedlichen Permeationswiderstands kann festgestellt werden. Bei der hier betrachteten Abnahme der effektiven Wandstärke um 67 % nimmt der Durchgangskoeffizient um 140 % zu. Zieht man in diesen Vergleich den flüssigseitigen Übergangswiderstand (Abb. 5.8) mit ein, so kann bekräftigt werden, daß der Anteil des membranbedingten Widerstands am Gesamtwiderstand bei zunehmender Mem-

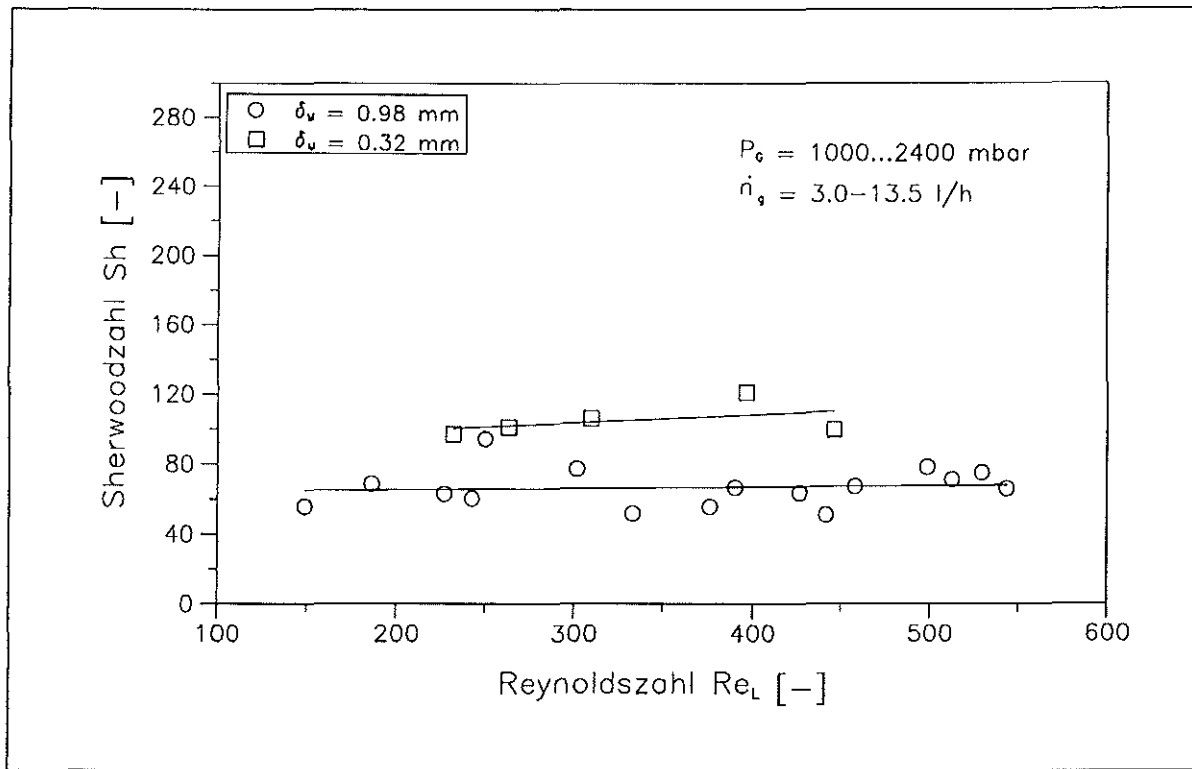


Abbildung 5.8: Vergleich der Stoffübergangskoeffizienten für unterschiedliche Membranstärken

brandicke eindeutig zunimmt. Die Übergangswiderstände unterscheiden sich im hier betrachteten Intervall zwar erkennbar, quantitativ betrachtet kann diese Differenz den oben genannten Anstieg für den Durchgangskoeffizienten nicht begründen. Die Abweichungen der flüssigseitigen Übergangswerte müssen vielmehr eher auf die leicht unterschiedliche Geometrie, bedingt durch die unterschiedlichen Schlauchaußendurchmesser und Ringspaltgeometrien, zurückgeführt werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen werden lediglich zwei Membranen charakterisiert. Zur Ermittlung eines Kennfeldes wäre eine Vielzahl weiterer Messungen von Nöten. Das Ziel, einige quantitative Aussagen über die Einzelwiderstände zu erhalten, wird jedoch erreicht. Aus Abb. 5.9 wird deutlich, welchen Einfluß die Wirbelschicht und die effektive Membranstärke auf den transmembranen Stoffdurchgang ausüben. Quantitativ kann das Ergebnis der Stofftransportuntersuchungen neben den bereits genannten Daten wie folgt formuliert werden⁷:

- In der Wirbelschicht besitzt der Membranwiderstand im Falle der Membran M2 einen Anteil von 32 % am Gesamtwiderstand, bei der M1-Membran 63 %.
- Der Gesamtwiderstand in der Wirbelschicht kann durch die Wahl der M2-Membran um 59 % reduziert werden.
- Durch die Wirbelschicht kann bei der dünnen Membran M2 eine Widerstandsverminderung um 62 %, bei der nylonummantelten Membran (M1) um 32 % erreicht werden.

Als ein wesentliches Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen kann festgehalten werden, daß die Übergangswiderstände für die einzelnen Stofftransportschritte unter den hier vorliegenden Randbe-

⁷Diese Aussagen gelten für den Bereich, in dem die Sherwoodzahl als unabhängig von der Reynoldszahl erkannt wurde.

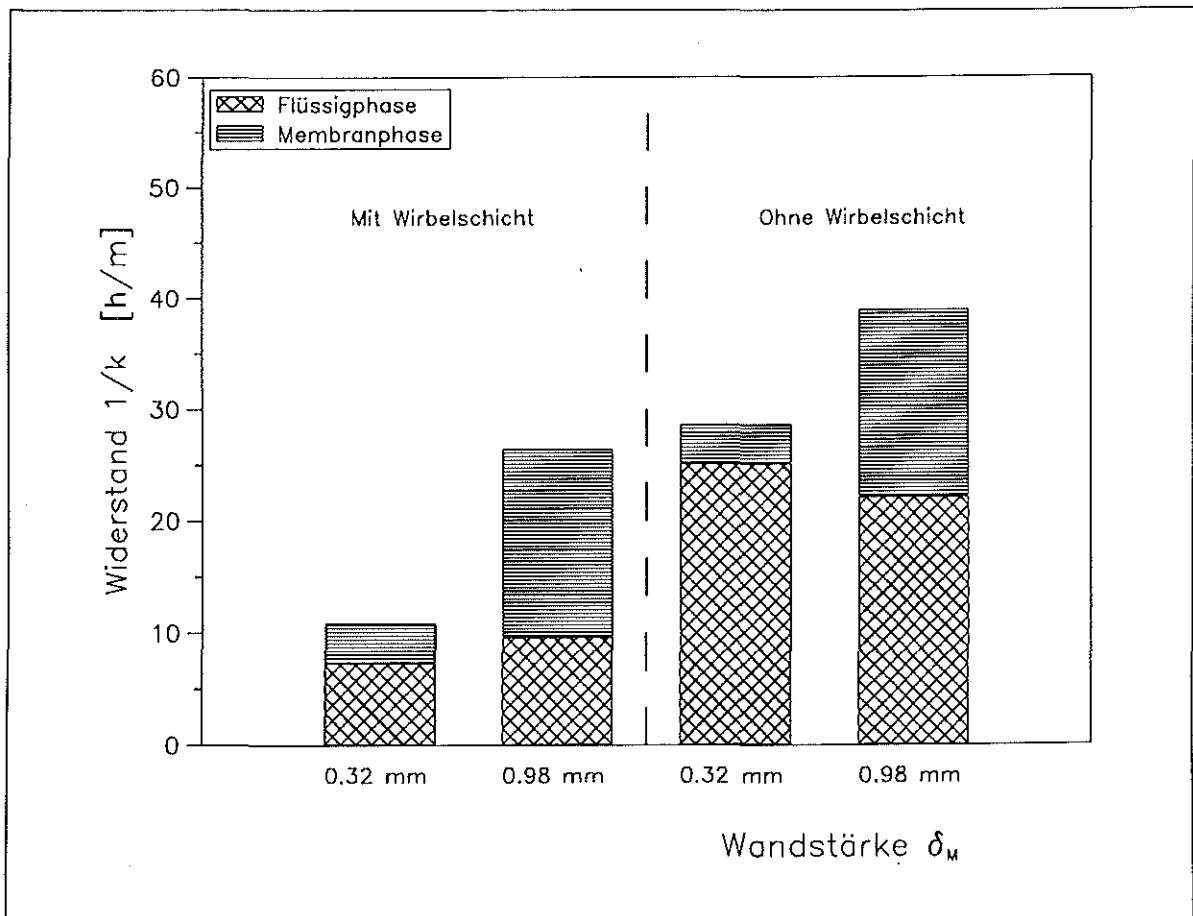


Abbildung 5.9: Darstellung der Einzelwiderstände für den Stofftransport

dingungen in der gleichen Größenordnung angesiedelt sind. Somit bietet sich die Gelegenheit, das Verhältnis der Einzelwiderstände zur Steuerung des blasenfreien Betriebs zu nutzen.

Begasung ohne Überdruck Gemäß der Gleichgewichtsbedingung (Henrysches Gesetz, Gl. 4.19) stellt sich zwischen der Gasphase und der Flüssigphase ein Gleichgewicht ein, Gasblasen treten im Idealfall hierbei nicht auf. Wichtige Voraussetzung hierfür ist, daß sich in der Flüssigphase keine Druckunterschiede aufbauen können, die durch ein starkes Homogenisieren auftreten können. Desweiteren müssen die in Kap. 4.2.2 gemachten Ausführungen zum Löslichkeitsverhalten der Gase in Flüssigkeiten berücksichtigt werden. Hiervon seien besonders die Aussagen zur Temperaturabhängigkeit noch einmal hervorgehoben.

Von Bedeutung ist auch die Tatsache, daß die „Umgebung“ der Flüssigphase für einen Stoffaustausch nicht alleine durch die Membranen gegeben ist, sondern daß dem System zusätzlich kontinuierlich frisches Medium zugeführt wird. Dieses Zellsubstrat befindet sich nicht mit der Gasphase in den Membranen in einem Gleichgewicht, sondern über Sterilfilter mit der Raumumgebung. Beide Umgebungszustände unterscheiden sich bei der Begasung mit einem erhöhtem Sauerstoffpartialdruck auch bei gleichem Gesamtdruck. Für das Löslichkeitsverhalten ist bei einer hohen Frischmediendosierung also eine zweite Gasphase von Bedeutung. Eine blasenfreie Begasung bis zu einem gaseitigen Druckniveau, das dem Umgebungsdruck entspricht, kann trotz der vorher getroffenen Aussagen recht einfach durchgeführt werden.

Begasung mit gaseitigem Überdruck Der Reaktorinnendruck entspricht, sieht man von der Höhe der Flüssigkeitssäule und den Strömungsverlusten einmal ab, dem Umgebungsdruck. Eine Erhöhung des Drucks ist nicht vorgesehen. Wird nun das integrierte Begasungssystem mit einem Innendruck von über 1 bar beaufschlagt, so wird nach der Einstellung des Sättigungswertes weiter Gas in den Reaktor eingetragen, und es kann zu einem Ausgasen kommen. In diesem Fall sind die Einzelwiderstände für den Stofftransport von Bedeutung. Zur Gewährleistung der blasenfreien Begasung muß - bei bekanntem strömungsseitigem Widerstand - die Membran mit einer entsprechenden Geometrie und Stärke so gewählt werden, daß sie den Hauptwiderstand bietet.

Der Stoffstrom über die Membran kann dann aus der flüssigseitigen Grenzschicht abtransportiert werden, ohne daß eine Übersättigung auftritt. Ein hoher membranbedingter Widerstand erleichtert den blasenfreien Betrieb, er führt jedoch auf verhältnismäßig große Membranflächen im Fermentationsraum. Eine Annäherung der beiden Widerstände scheint in diesem Fall angebracht, ein leicht erhöhter Widerstand in der Membran kann aus Gründen der Prozeßregelung durchaus von Vorteil sein.

Bei der Betrachtung des Stoffeintrags sollte stets beachtet werden, daß die Qualität des Begasungssystems sich nicht allein in einer hohen Sauerstoff-Eintragsrate ausdrückt. Gleichwertig muß der Aspekt der blasenfreien Begasung beachtet werden.

Kapitel 6

Charakterisierung des biologischen Systems

6.1 Säugerzellen und ihre Umgebung

Der Sammelbegriff *Säugerzellen* umfaßt ein weites Spektrum eukaryotischer aerober Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit, insbesondere bei den Fermentationen, wurde als reales Stoffsystem immer die Säugerzelle verwendet, obwohl dies einen erheblichen experimentellen Aufwand bedeutet. Nur so können eine Aussage über die Funktionstüchtigkeit einer Anlage gewonnen und die Auslegungsdaten untermauert werden. Daher soll im folgenden der Organismus Zelle in seiner Wechselwirkung mit seiner Umgebung erläutert werden.

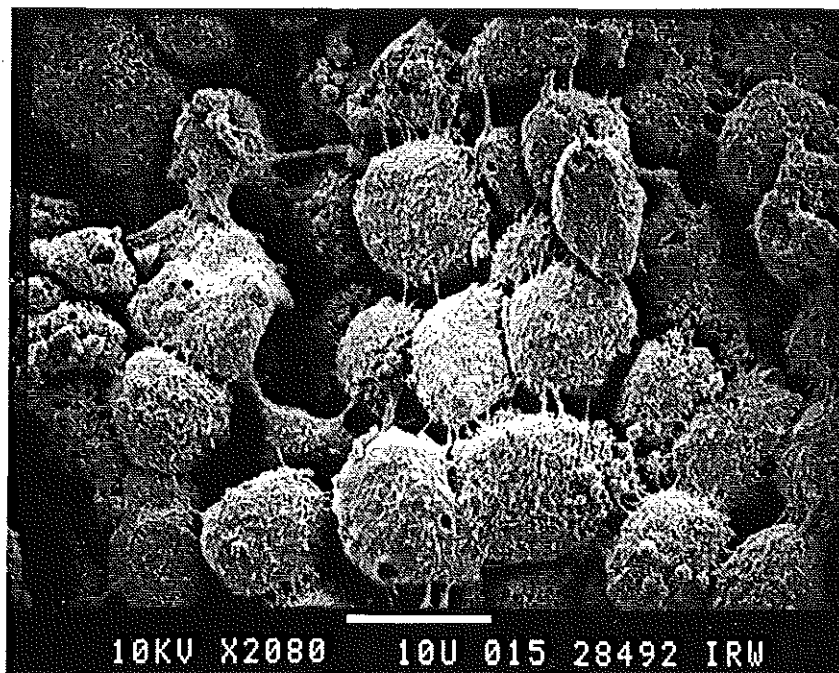


Abbildung 6.1: Erscheinungsbild immobilisierter CHO-Zellen

Der Durchmesser vieler kugelförmiger Säugerzellen (z.B. Hybridoma, vgl. Abb. 6.3) variiert zwischen 8 -15 μm , einzelne Zelltypen erreichen jedoch auch eine Länge von 75 -90 μm ([9], S. 23). Die Größe von Zellen ist besonders bei Fragen der Zellschädigung durch Gasblasen und Turbulenzen von Bedeutung. Zur Immobilisierung in porösem Trägermaterial müssen sowohl Porenvolumen und

Porendurchmesser, als auch, bei adhärennten Zellen, die Wandkrümmung derart gewählt werden, daß die Zelle den Ort der Immobilisierung tatsächlich auch bevorzugt nutzen kann. Es ist bislang nicht ausreichend geklärt, ob Poren mit einem Durchmesser von weniger als $100\ \mu\text{m}$ auch von adhärennten Zelltypen im erforderlichen Maße besiedelt werden.

Die Behandlung der Frage nach der Umgebung und den Wechselwirkungen der einzelnen immobilisierten Zelle mit dem Kultursystem (vgl. Abb. 6.2) erfordert eine dezidierte Vorgehensweise bei ihrer Analyse [43]. Viel zu häufig werden Methoden anderer Kultivierungstechniken übernommen, die bereits bei der Problemformulierung unzulässige Vereinfachungen aufnehmen. An dieser Stelle sei lediglich die Messung von Konzentrationen in der Flüssigphase erwähnt. Jede dieser Messungen beinhaltet durch die Bildung von Gradienten im Trägerkorn neben der Meßungenauigkeit einen mehr oder weniger großen Fehler, so daß bezüglich einer Prozeßoptimierung grob falsche Rückschlüsse aus diesen Vereinfachungen resultieren können. Bei dichtbesiedelten Trägern großen Durchmessers können Konzentrationsspektren im Korn auftreten, die in der Größenordnung der in der Flüssigphase gefundenen Bandbreiten anzusiedeln sind. Für den Sauerstoff kann dies zu anaeroben Verhältnissen in der Mitte des Trägers führen. In der Literatur wird berichtet, daß bei Diffusionswegen von $300\ \mu\text{m}$ für sehr kleine Moleküle bereits Diffusionslimitierungen auftreten [97]. Dies gilt daher insbesondere für die in der Zellkultur häufig anzutreffenden großen Produktproteine. Hier kann bei Maßnahmen zur Verbesserung der Prozeßausbeute die Trägergröße von Bedeutung sein. Bei der Optimierung der Prozeßbedingungen ist daher für immobilisierte Kulturen eine Angabe von Intervallen für die Einzelparameter und nicht einzelner Punkte Zielvorgabe.

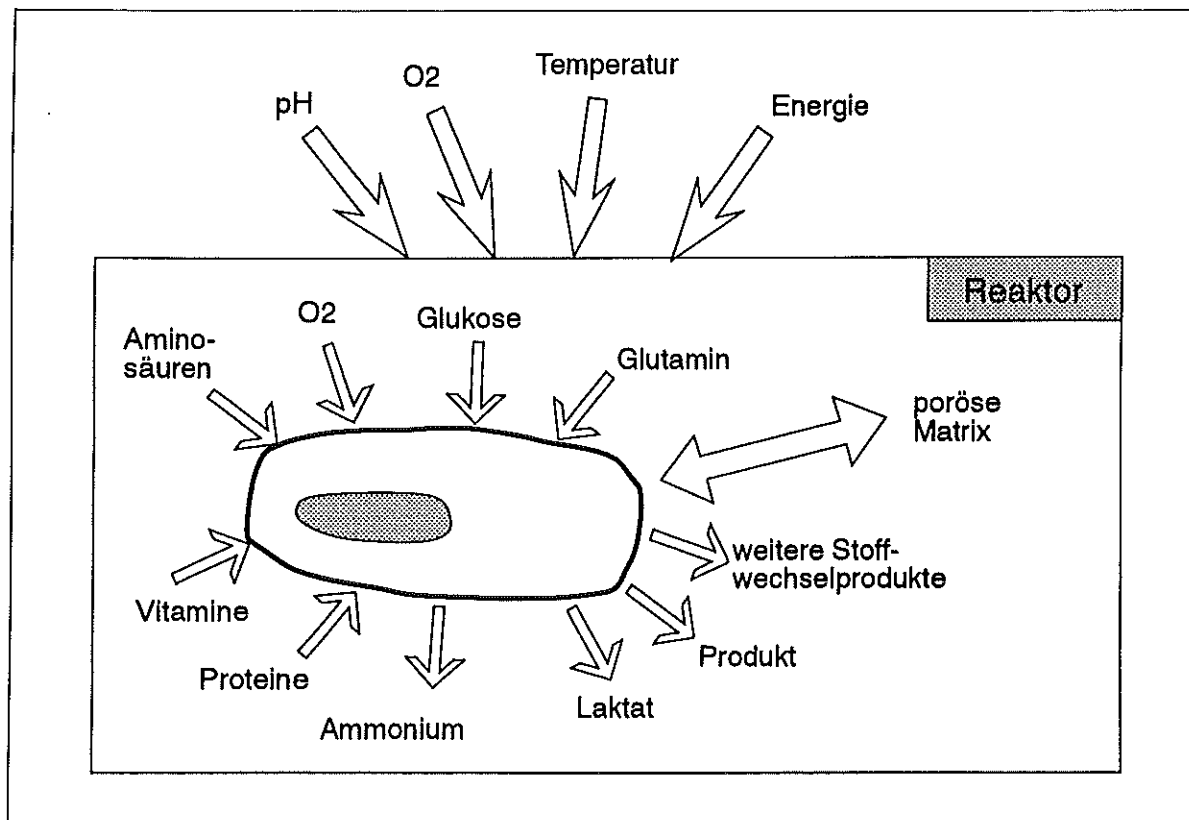


Abbildung 6.2: Wechselwirkungen zwischen der Zelle und dem Kultursystem

Die Anforderungen an das Kulturmedium sind zellspezifisch, ein Standardmedium stellt daher immer einen schlechten Kompromiß dar. Eine Medienoptimierung sollte zur Reduzierung der Medienko-

sten sowie zur Vermeidung von Inhibierungen und Limitierungen auch in der Zellkulturtechnik stets durchgeführt werden. Durch die Analyse des Zell-Stoffwechsels können essentielle Substanzen erkannt, problematische ersetzt sowie überflüssige eingespart werden [12, 173, 193].

Untersuchungen zur hydrodynamischen Belastung auf die Vitalität der Säugerzelle (vgl. [101]) sind zahlreich und beruhen auf dem Wissen, daß dieser Zelltyp keine Zellwand, sondern lediglich eine Zellmembran besitzt. Experimente hierzu wurden im Rahmen dieser Dissertation geplant, jedoch aufgegeben, da bei allen durchgeführten Fermentationen Hinweise auf eine derart hervorgerufene Schädigung nicht festgestellt wurden.

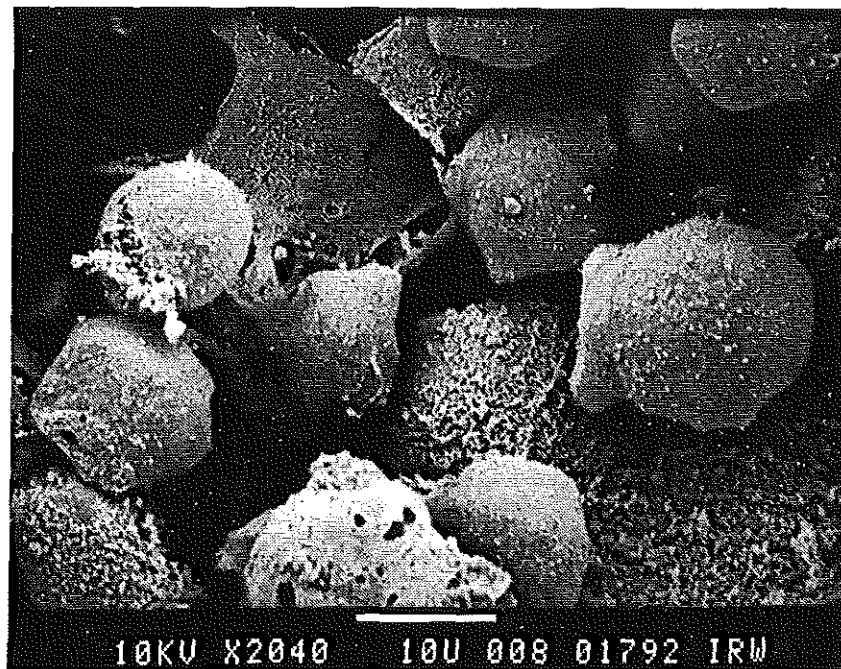


Abbildung 6.3: Erscheinungsbild immobilisierter Hybridoma-Zellen

6.2 Sauerstoffbedarf

Wachstums- und Produktionsraten der Säugerzellen sind eng mit der Sauerstoffkonzentration — und gemäß der obigen Betrachtung bei der immobilisierten Kultur — mit dem Konzentrationsintervall verknüpft, bei dem die Fermentation durchgeführt wird [127]. Die Optima von Zell- und Produktausbeute können sich bezüglich des Sauerstoffniveaus erheblich unterscheiden [159], so daß während der Fermentation eine Verschiebung sinnvoll erscheint. Andere Untersuchungen zeigen ein unabhängiges Verhalten von der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase und zellspezifischen Raten in einem weiten Intervall [22].

Die Analyse solcher Ergebnisse läßt erkennen, wie wenig Resultate, die an einzelnen Zelllinien gewonnen werden, generalisierbar sind. Die Widersprüche bedingen eine jeweilige Anpassung an das zeit- und zellabhängige bestmögliche Sauerstoffniveau.

Zelltyp	Verbrauchsrate [mmol/(l * h)] ^a	Verbrauchsrate [g/(l * h)] ^a	Verbrauchsrate [mmol/(l * h)] ^b	Quelle
Vero	31	0.992	0.78	[185]
Namalwa	2.1	0.067	0.053	[57]
BHK	8	0.256	0.20	[170]
FS 4	2	0.064	0.05	[170]
HeLa	19	0.608	0.47	[57]
WI 38	6	0.192	0.15	[57]
Hybridoma	8.4	0.269	0.21	[70]
E. coli ^c			915	[185]
Sac. cerevisiae ^d			2138	[185]

^a Bezogen auf das fluidisierte Wirbelbett (Hohlraumanteil im Fließbett = 0.6) und einer Zellzahl von $10^{11}/l$ Trägervolumen

^b Bei Säugerzellen: Bezogen auf 10^9 Zellen/l (Angaben aus den Quellen)

^c Biomassekonzentration: 25 g/l

^d Biomassekonzentration: 40 g/l

Tabelle 6.1: Sauerstoffbedarf von Zellkulturen

Tab. 6.1 zeigt die Sauerstoffverbrauchsrate einiger relevanter Zelltypen. Hierbei fällt auf, daß sich die Schwankungsbreite im Rahmen einer Zehnerpotenz hält. Der Verbrauch liegt, bezogen auf 10^6 Zellen/ml, zwischen $0.05 \text{ mmol O}_2/(l * h)$ und $0.78 \text{ mmol O}_2/(l * h)$. Gleichzeitig kann eine erheblich geringere volumenbezogene Verbrauchsrate, verglichen mit Bakterien- und Hefekulturen, festgestellt werden.

6.3 Auswahl von Testzellen

Wie bereits erwähnt wurden bei den Untersuchungen zum Betriebsverhalten des Reaktors mit reaktor-integrierter blasenfreier Begasung Säugerzellen verwendet, so daß im ersten Schritt sofort Aussagen zum Realverhalten vorlagen. Bei der Auswahl von Zellen wurden die folgenden Kriterien berücksichtigt:

Zur Untersuchung der Reaktorauslegung: **CHO K1** (kein Produkt)

- hohe zellspezifische Verbrauchsrate bei gleichzeitig hoher Immobilisierungsdichte
- stark adhärentes Verhalten
- robustes Verhalten bei ersten Untersuchungen

Zur Untersuchung der Reaktorqualität: **Hybridomazelle** (sekretiert einen monoklonalen Antikörper)

- Suspensionszelle
- empfindliche Zelle zur Betrachtung der Vitalität
- Betrachtung der Trägerbesiedlung in der Wirbelschicht

CHO K1

Der Zelltyp CHO K1 wird durch die langjährige Erfahrung mit seinem Umgang (vgl. Kap. 2.1, S. 11) treffernderweise als „*E. Coli der Zellkultur*“ bezeichnet und eignet sich auf Grund seiner Robustheit gut zu Testfermentationen. So führten auch anlagenbedingte Schwierigkeiten bei einer ersten Fermentation (extreme pH-Werte, Sauerstoffverzicht über 36 Stunden, Ausfall der Frischmediendosierung über 24 Stunden, Temperaturshifts) nicht zum Abbruch der Fermentation. Dieser Effekt kann zwar auch bei anderen Zellen beobachtet werden (der immobilisierte Organismus besitzt prinzipiell eine wesentlich höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Prozeßstörungen als die suspendierte Zelle). Im Vergleich mit anderen sehr empfindlichen Säugerzellorganismen hat sich in den durchgeführten Untersuchungen die CHO-Zelle jedoch bei allen Belastungsexperimenten des Reaktors bewährt.

Die hier beschriebene Zelllinie wurde freundlicherweise von der Verax Corporation, Lebanon, New Hampshire zur Verfügung gestellt.

Hybridoma-Zelle

Die verwendete Hybridoma-Zelle sezerniert einen monoklonalen Antikörper, der bei der Behandlung verschiedener Krebsarten einen wichtigen Beitrag zu leisten vermag. Hierzu wird seine Eigenschaft benutzt, an Rezeptormoleküle anzukoppeln, die bei einer Vielzahl der untersuchten Krebsarten vorkommen. Die Zelllinie wurde erstmalig auf modifiziertem Siranmaterial kolonisiert.

Kapitel 7

Experimente mit Zellkulturen

Untersuchungen an Wirbelschichtfermentern für die Zellkulturtechnik sind mangels geeigneter Systeme bislang vergleichsweise selten durchgeführt worden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit, ausgehend von einem Fermenter mit 500/1000 ml¹, Reaktoren mit den Volumina 150 ml und 15 l ausgelegt und gebaut (vgl. Anhang, S. 124 ff.). Im Zentrum der hier durchgeführten Fermentationen stand die Bewertung der Leistungsfähigkeit eines 500 ml-Fermenters, da dieses System erstmalig mit einer reaktorintegrierten blasenfreien Begasung ausgestattet wurde.² Somit galt das Interesse zunächst der Frage, ob das hier entwickelte System den Anforderungen einer Zellkultivierung genügt. Hierbei standen folgende Aspekte im Vordergrund:

- Langzeitsterilität
- Anwachsverhalten
- Fluidisierungseigenschaften der Träger unter besonderer Berücksichtigung der reaktorintegrierten Begasungsmembran
- Zellkompatibilität von Materialien
- Zellzerstörung durch Scherkräfte
- Dimensionierung und Betriebsverhalten der Anlagenperipherie (Vorratsbehälter, Probenahme-systeme)
- Heißdampfsterilisation „vor Ort“ (steam in place, SIP)

Eine Untersuchung jedes einzelnen Sachverhalts kann hier nicht vorgenommen werden. Im Rückblick auf den experimentellen Teil der Arbeit mögen jedoch die folgenden Aussagen die „Tauglichkeit“ des Systems zur Fermentation von Zellkulturen unterstreichen:

- Es wurden acht Fermentationen mit einer Dauer zwischen 300 und 1100 Stunden (12.5 und 46 Tagen) durchgeführt³.
- Der längste zusammenhängende Reaktorbetrieb wurde nach 2100 Stunden (87.5 Tagen) steril abgebrochen.
- Es konnten u. a. zahlreiche Anwachsexperimente mit CHO-Zellen durchgeführt werden.
- Auf den Zusatz von Antibiotika wurde bei allen Experimenten verzichtet.

¹Der Basisfermenter mit 500 ml kann durch die Verlängerung der Reaktorröhre auf 1000 ml vergrößert werden.

²Es sei angemerkt, daß an dieser Stelle Aussagen zum Zellstoffwechsel **nicht** hauptsächlich Gegenstand der Untersuchung waren.

³Die einzigen gravierenden Vorkommnisse, die zu einem Anlagenausfall führten, konnten auf die Fehlfunktion einer Laugenpumpe zurückgeführt werden. Hierdurch wurden zwei Fermentationen nach 3 bzw. 5 Tagen abgebrochen.

Während der genannten Experimente wurden sowohl CHO-Zellen (adhärente Zellen), als auch Hybridomzellen (Suspensionszellen) über die oben genannten Zeitintervalle hinweg fermentiert. Als Trägermaterialien gelangten Collagenträger der Fa. Verax und poröses Sintermaterial der Fa. Schott⁴ zum Einsatz. Letzteres wurde in den Fraktionen 500-560 μm sowie 1100-1120 μm als Festphase zur Trägerimmobilisierung verwendet.

Im folgenden wird am Beispiel zweier Fermentationen mit unterschiedlichen Zelltypen das Verhalten der Zellen während der Kultivierung in ihrer Wechselwirkung mit dem Fermentationssystem charakterisiert. Des weiteren wird das Problem der Trägergrößenklassierung im Wirbelbett diskutiert, das bei allen Fermentationen mit adhärennten Zellen auftrat. Abschließend wird an Hand zweier Fermentationen mit unterschiedlichem Trägerdurchmesser die Stofftransportfrage im Träger kurz angerissen.

Informationen aus dem biologischen System

Die Charakterisierung einer Zellkulturfermentation und der Vergleich zwischen mehreren verschiedenen Prozessen geschieht mittels Informationen aus Flüssigkeitsproben. Hierbei werden kontinuierlich oder diskontinuierlich die Konzentrationen der wesentlichen Einsatzstoffe (Glukose, Glutamin, Sauerstoff) sowie der Stoffwechselprodukte (Laktat, Ammonium, Produkte) ermittelt; sie dienen zur Berechnung der Verbrauchs- und Produktionsraten. Während die Komponente Sauerstoff und die Produkte bereits zuvor behandelt wurden, sollen im folgenden zum Zwecke der Verständlichkeit die übrigen Komponenten vorgestellt werden.

Glukose nimmt als eine zentrale Komponente am Energiestoffwechsel der Säugerzellen teil. Sie galt lange als Hauptenergielieferant der Säugerzellen und wird nicht zuletzt auf Grund der Möglichkeit zu ihrer schnellen Bestimmung noch immer als Leitsubstrat bei Zellkulturfermentationen eingesetzt. Die Aufnahme von Glukose durch die Zelle wird jedoch wesentlich durch ihr Konzentrationsniveau im Zellkulturmedium bestimmt. Bei zu hoch angesetzten Konzentrationen von Glukose im Zellsubstrat wird sie in erhebliche Mengen ineffizient zu *Laktat* abgebaut [173].

Neben *Ammonium* zählt das *Laktat* zu den Inhibitoren bei der Fermentation von Säugerzellen. Hierbei ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob die feststellbaren Wachstumsinhibierungen bei den Zellen direkt einer Laktatkonzentration oder der hiermit häufig verbundenen erhöhten Osmolarität zuzurechnen sind. Das Verhältnis aus Laktatbildung zu Glukoseaufnahme kann aus Gründen der Stöchiometrie maximal den Wert 2 annehmen.

Neben seiner Funktion als Stickstoffquelle dient die Aminosäure *Glutamin* wesentlich der Energiebereitstellung. Aus verfahrenstechnischer Sicht ist hierbei zu beachten, daß *Glutamin* einem pH-Wert- und temperaturabhängigen Eigenzerfall unterliegt und somit entsprechend in einem höheren Maße vorgelegt werden muß, als dies dem eigentlich Zellstoffwechsel genügt. Hierdurch wird die unerwünschte Produktion an *Ammonium* gefördert.

Ammonium entsteht beim Glutaminstoffwechsel der Zellen und inhibiert nachweislich das Zellwachstum, ein möglicher Produktivitätsverlust kann bei verschiedenen Zelllinien jedoch recht unterschiedlich ausfallen. Zur Vermeidung von Nachteilen für einen Prozeß auf Grund erhöhter Ammoniumkonzentrationen werden unterschiedliche Ansätze zur Ammoniumabtrennung aus dem Zellkulturmedium geprüft (z.B. [174]). Hierbei bleibt jedoch im Einzelfall zu prüfen, ob die erreichten Werte der Ammoniumkonzentration einen zusätzlichen Trennschritt notwendig werden lassen.

⁴Hierbei handelt es sich um den Prototyp eines Spezialträgers für die Zellkultur.

7.1 Adhärenente Zellen

Als Testzelle für die erste Fermentation in dem System mit reaktorintegrierter blasenfreier Begasung (vgl. Kap. 3.3, S. 30) wurde eine CHO K1-Zelllinie ausgewählt. Dieses biologische System erwies sich im weiteren auf Grund seiner Robustheit gegenüber anfänglichen Störungen (Temperaturschwankungen, pH-Schwankungen) als ideales Versuchssystem.

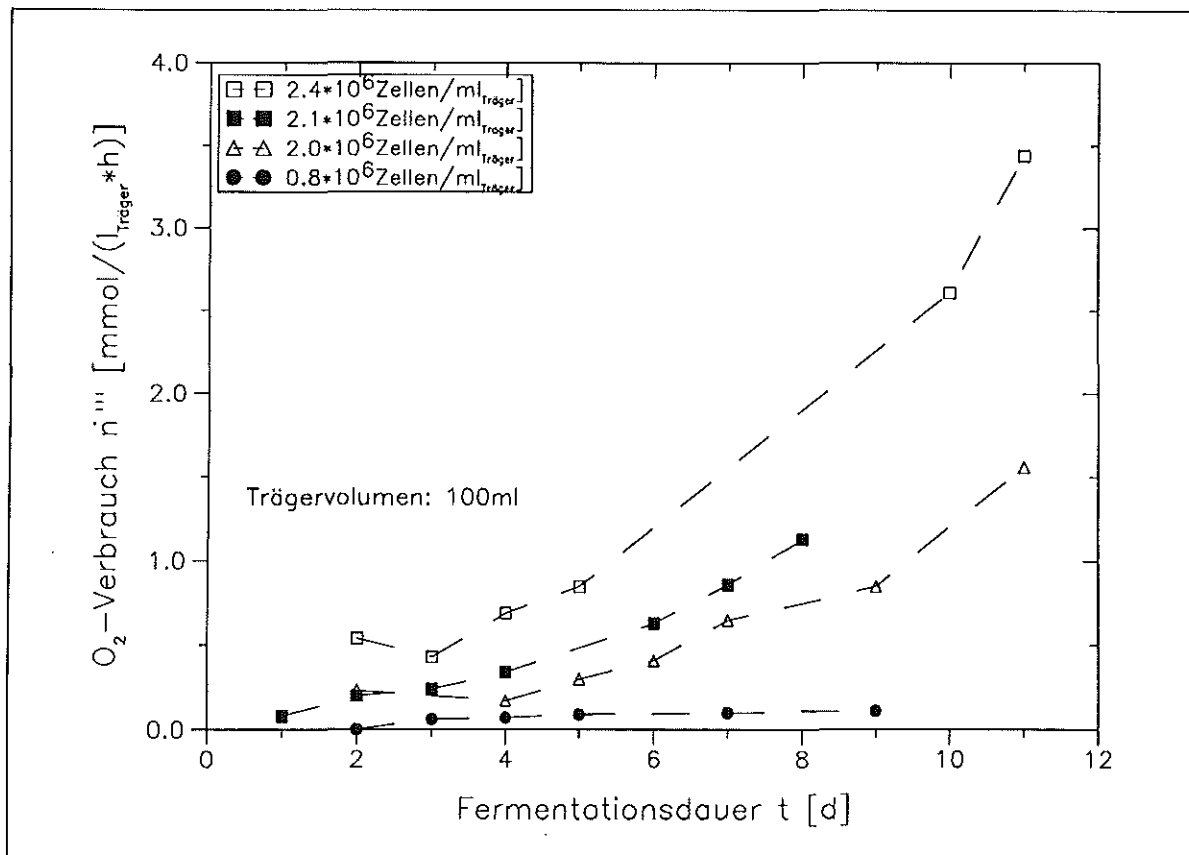


Abbildung 7.1: Anwachsverhalten bei einer Variation der Animpfdichte

Anwachsverhalten Das Animpfen eines Zellkulturreaktors kann einerseits mit bereits vorbewachsenen Trägern geschehen; somit werden die Zellen von Beginn an nicht den Strömungsbedingungen in der Flüssigphase ausgesetzt. Zum Inokulieren eines großen Fermenters müssen dann jedoch mehrere kleinere Systeme vorab in Betrieb genommen werden, um das notwendige Trägervolumen zu erhalten. Daher wurde hier das Ziel verfolgt, suspendierte Zellen nach dem Wirbelgut in das Reaktionsgefäß einzubringen.

Neben den Medienbestandteilen, die den Säugerzellen durch das Zellkulturmedium vor allem in der Anwachsphase zur Verfügung gestellt werden (z. B. Serum), kann für jeden Fermenter eine Mindest-Dichte festgestellt werden, um den Vorgang der Trägerbesiedelung in Gang zu bringen. Hierdurch wird auch der Zeitraum bis zum vollständigen Bewachsen der Träger beeinflusst, der aus ökonomischen Gründen möglichst kurz zu halten ist. Es wird der Tatsache Rechnung getragen, daß

1. bei frei suspendierten Zellen in der Flüssigphase ein erhöhter Zellverlust zu Beginn der Fermentation bis zum Einspülen der Zellen in den Träger auftritt und
2. die Zellen eine Minstdichte (zu benachbarten Zellen) benötigen, um bestmöglich zu wachsen.

Abb. 7.1 zeigt das Anwachsverhalten in einem Wirbelschichtreaktor. Die vier hier dargestellten Fermentationen werden mit der CHO K1-Zelllinie (vgl. Kap. 6.3, S. 78) im gleichen Zellkulturmedium durchgeführt (vgl. Anh. B, S. 122 ff.). Zur Zell-Kolonisierung wird poröses Collagenmaterial verwendet, die Versuchstemperatur beträgt 37° C. Variable ist in diesem Fall die Zell-Ausgangskonzentration.

Deutlich ist eine Verbesserung der Anwachs geschwindigkeit durch eine um das dreifache angehobene Animpfdichte zu erkennen. In gleicher Weise wird sichtbar, daß bei einer Unterschreitung der Mindest-Zelldichte im Reaktor die Kultur in dem Ausgangszustand verharzt, ohne daß die Zellen anwachsen oder absterben. Dieses Phänomen konnte in einem Fall über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet werden. In diesem Fall führte ein „Nachimpfen“ des Reaktors mit höherer Zelldichte bei sonst gleichen Bedingungen zu einem verbesserten Fermentationsstart.

Der Erfolg einer Fermentation basiert wesentlich auf ihrem erfolgreichen Beginn. Hierbei sind die Bedingungen für die Zellen nach dem Einfüllen in den Reaktor von zentraler Bedeutung. Diese Tatsache muß für die Wirbelschichttechnik mit ihren *rauen* Bedingungen für die Zellen beim Animpfen in besonderer Weise berücksichtigt werden. Das Einbringen des Inokulums nach dem Zentrifugieren von Suspensionszellen oder dem *abtrypsinieren*⁵ von adhären ten Zellen muß äußerst rasch geschehen, da Zellen in hoher Dichte nur in einem wohlversorgten System wie einem Reaktor (also nicht in einem Inokulumsgefäß) keine Schädigungen davontragen. Desgleichen wurde eine besondere Sensibilität von Zellen bei der Anwesenheit von Kleinstblasen im Reaktor beobachtet, die durch ein zu rasches Aufwärmen des Zellkulturmediums kurz vor der Fermentation (zur Vermeidung des chemischen Glutaminzerfalls) entstanden.

Häufig wird kontrovers diskutiert, ob es einen Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf die Vitalität der Zellen kurz nach ihrem Einbringen in den Reaktor gibt, und ob vor dem Perfusionsbetrieb ein sogenannter *Batchbetrieb*, also eine geschlossene Fahrweise des Systems, zur Vermeidung eines Zellaustrags, vorausgehen sollte. Die Erfahrung aus diversen Anfahrvorgängen zeigt, daß bereits unmittelbar (etwa 1 Stunde) nach dem Einbringen der Zellen Frischmedium zugeführt werden sollte. Die hierbei beobachteten positiven Effekte auf den Anfahrvorgang dürften weniger auf das Austragen von Inhibitoren als vielmehr auf das Zuführen von essentiellen Medienbestandteilen zurückzuführen sein. Eine Akkumulation eines (nicht vorab bekannten) Stoffes im Reaktor bei einer relativ geringen Gesamtzellzahl ist weniger wahrscheinlich als das Aufbrauchen einer Komponente. Hier müssen Untersuchungen zur Medienzusammensetzung in Zukunft weiteren Aufschluß geben.

Letztendlich konnte bisher auch bei unmittelbarer Verwendung von Zellkulturmedium ohne Serumzusatz im Falle der CHO-Zelle auf eine Vorbehandlung der porösen Träger mit Serum nicht verzichtet werden. Im Serum liegen folglich essentielle Faktoren für den Zell-Träger-Kontakt vor.

Entgasen Das Entgasen der Träger vor dem Inokulieren der Zellen übt einen Einfluß sowohl auf das Anwachsen der Zellen als auch auf ihr Fluidisierungsverhalten aus. Diese von der Firma Verax Corporation übernommene Prozedur erweist sich auch für das eingesetzte poröse Glasmaterial als notwendige Maßnahme zur erfolgreichen Kolonisierung der Zellen. Hierbei geht es nicht um den vollständigen Gasaustrag aus dem Medium im Träger, sondern in erster Linie um das Ersetzen der Gasphase im *carrier* durch die Flüssigphase. Nach dem Entgasen können die sterilen Träger somit über einen beliebigen Zeitraum an der Umgebung gelagert werden, ohne daß der Entgasungsvorgang wiederholt werden müßte.

⁵Die Zellen werden durch Trypsin von der Gefäßwand der Zellkulturflasche abgelöst.

Beispiel zur Fermentation der CHO-Zelle

An dieser Stelle wird das Verhalten des Reaktors bei ersten Fermentationen mit der CHO-Zelllinie dargestellt. Hierbei sei erwähnt, daß sich das Reaktorsystem bei dem überwiegenden Teil der nachfolgend geschilderten Fermentationen in einem Zustand befand, an dem keinerlei automatisierte Prozeßsteuerung vorlag. Dieser Nachteil betraf insbesondere das Anfahren des Reaktors, das erst nach dem Vorliegen erster Erfahrungswerte verbessert werden konnte.

Die unmittelbar vorangehende Fermentation wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (vgl. [67]).

Für den Fermentationsprozeß sind Kenntnisse um das richtige *Vorlegen* der Leitsubstrate (nutri-statische Fahrweise, siehe auch [173]) und über die Inhibitorkonzentrationen im Zellkulturmedium unter Berücksichtigung ihrer Verweilzeiten im Reaktor von Bedeutung. Hierzu sei das folgende Beispiel angeführt: Bei der Wahl des Glutamins als Leitsubstrat muß bei bekannten zellspezifischen Aufnahmeraten (unter Berücksichtigung des chemischen Zerfalls) dem Reaktor ein entsprechender Massenstrom pro Zeiteinheit zugeführt werden. Theoretisch kann das Nährmedium hierzu stark mit dem Leitsubstrat angereichert sein. In diesem Fall erhöht sich auf Grund der niedrigen Zulaufmenge in den Reaktor und der resultierenden hohen Verweilzeit die Menge an Inhibitoren im Fermenter. Ein Vorverdünnen des Zellkulturmediums hat daher einen ähnlichen Effekt, wie dies auch durch ein Abtrennen dieser Komponente erreicht werden kann. Hiermit sind jedoch die Nachteile verbunden, die im Zusammenhang mit der Aufarbeitung großer Volumenströme einhergehen.

Abb. 7.2 stellt die Konzentrationsverläufe der Substrate Glukose, Glutamin und Sauerstoff während eines Fermentationsverlaufs über 33 Tage dar. Hierbei lag das Hauptaugenmerk darauf, einen stabilen Prozeßverlauf sicherzustellen.

Das System wurde mit einer Ausgangskonzentration an Glukose im Frischmedium von 20 mmol/l angefahren. Dieses Substrat diente im weiteren (besonders im Hinblick auf seine rasch durchzuführende Bestimmung) als Leitsubstrat zur Einstellung der Medienverweilzeit im Reaktor. Es wird ein Wert für die Reaktorkonzentration von 10 mmol/l angestrebt, dieser Wert wird durch tägliche Probenahme überprüft⁶. Als Richtwert zur Einstellung der Verweilzeit wird vorausgesetzt, daß die reaktorspezifische Glukoseverbrauchsrate um 20 Prozent pro Tag zunimmt. Hierbei liegt die Annahme eines exponentiellen Wachstums der Zellen im Träger zu Grunde.

Nach einer Fermentationsdauer von 20 Tagen wird das Glukoseniveau auf etwa 5 mmol/l halbiert, da bekannt ist, daß hohe Werte für die Glukosekonzentration den Anfahrvorgang beschleunigen, danach jedoch bei einer hohen Konzentration erhöhte und in bezug auf die Produktbildung ineffiziente Glukoseverbrauchsrate der Zellen auftreten. Ein wesentlicher Vorteil für den Prozeß oder die Zellproduktivität ist hiermit nicht verbunden. Ferner lassen sich die bereits hohen Durchflußraten etwas absenken, die Dimensionen der Vorlage- und Abfallgefäße können so vergleichsweise gering gehalten werden. Bei dieser Prozeß-Fahrweise reichte bei der CHO-Zelle eine Glutamin-Frischmedienkonzentration von 2.8 mmol/l aus, damit der Wert im Reaktor nicht wesentlich unter 1 mmol/l abfiel.

Interessant sind im vorliegenden Fall auch die Konzentrationsverläufe für die Inhibitoren Ammonium und Laktat: Durch die kurzen Verweilzeiten im Reaktor (vgl. Abb. 7.3) sind weitere Maßnahmen zur Inhibitorabtrennung nicht notwendig. Insbesondere die Ammoniumkonzentration überschreitet den Wert von 1 mmol/l nicht. Sie bleibt somit von den üblicherweise inhibierenden Werten ausreichend entfernt.

⁶Der Bilanzierungsansatz zur Berechnung aller Verbrauchsrate sowie zur Ermittlung der Verweilzeit wird im Anhang, S. 132 verdeutlicht.

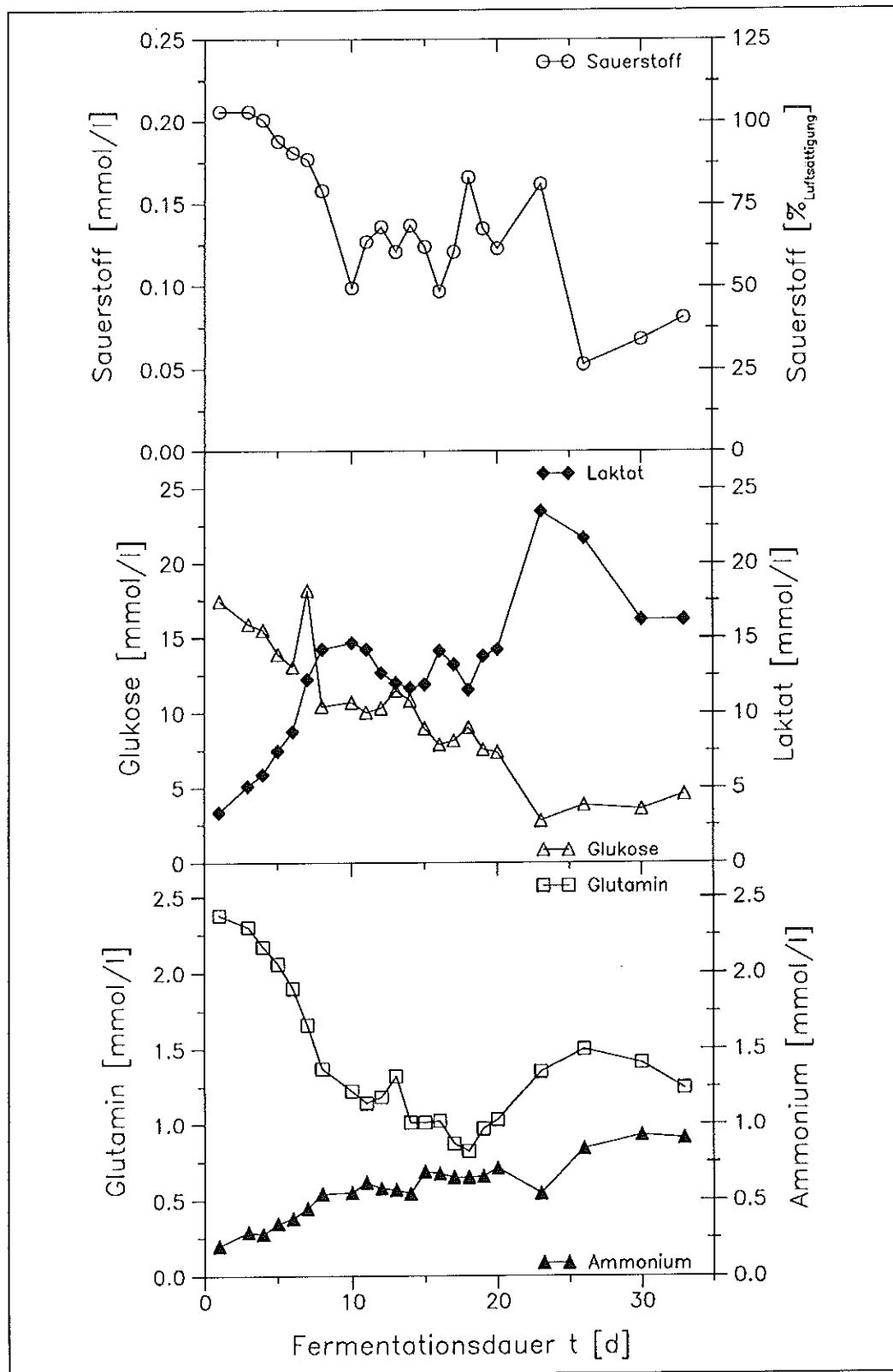


Abbildung 7.2: Konzentrationen von Leitsubstraten und Inhibitoren (kontinuierliche Fermentation)

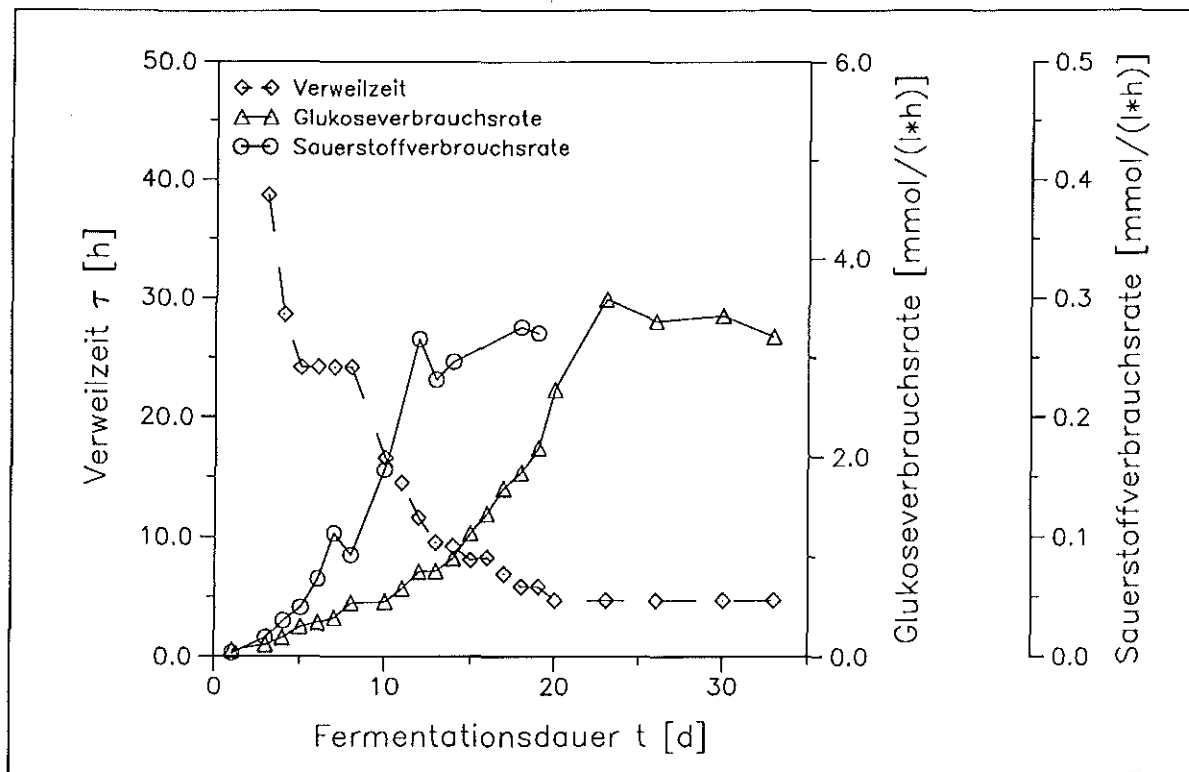


Abbildung 7.3: Reaktorspezifische Verbrauchsrate und Verweilzeit

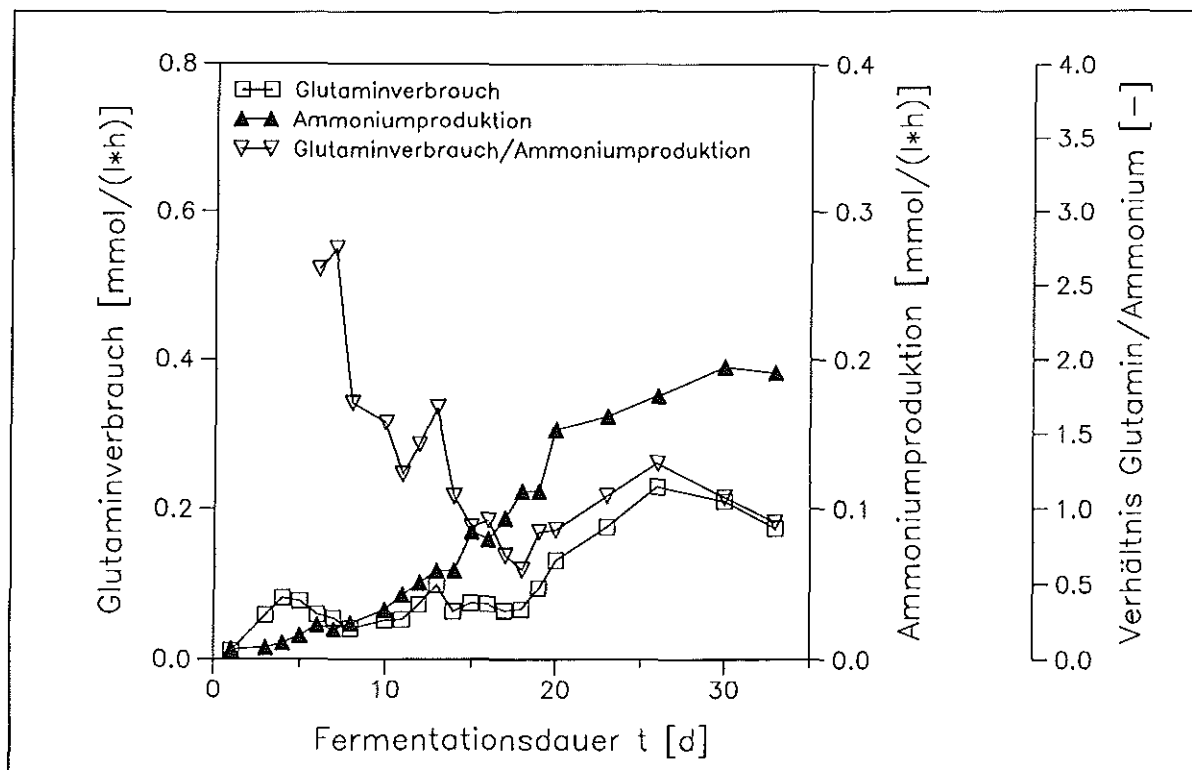


Abbildung 7.4: Glutaminverbrauch und Ammoniumproduktion

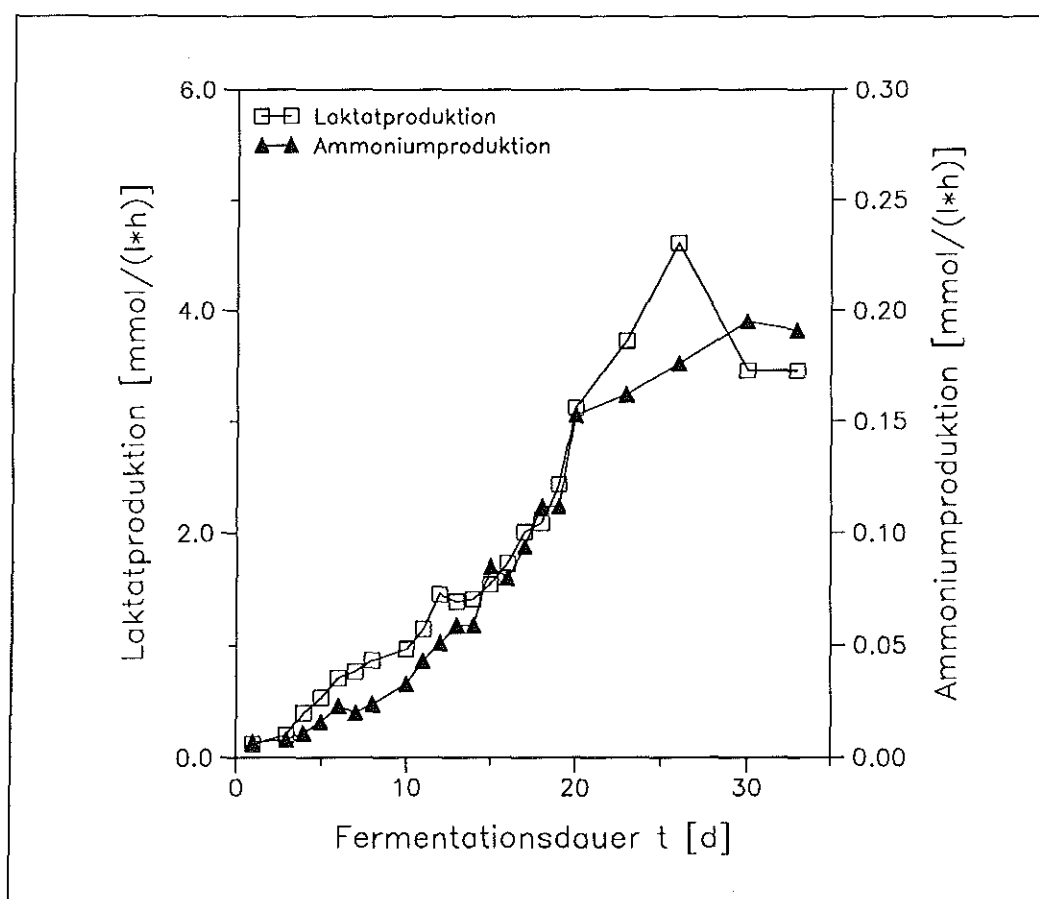


Abbildung 7.5: Produktion von Inhibitoren

Der Verlauf für die Sauerstoffkonzentration im Zellkulturmedium wurde, ähnlich der Glukosekonzentration, während der Fermentation nach etwa 25 Tagen abgesenkt. Die Konzentration von 0.05 mmol/l stellt für diverse Zelllinien die Schranke zu einer Sauerstofflimitierung dar. Ein Einfluß auf die Produktbildung kann bei dem gewählten Zelltyp nicht verfolgt werden. Jedoch muß bei den bekannten Gradienten im Träger bei hohen Zelldichten⁷ zumindest im Trägerinnern mit einer Limitierung gerechnet werden. Die Abbildungen 7.2 bis 7.5 zeigen im Zusammenhang, daß der Reaktor nach etwa 22 Tagen einen stabilen Zustand erreicht hat, bis zu diesem Zeitpunkt kann eine erkennbare Zunahme der reaktorspezifischen Verbrauchs- und Produktionsraten (Abb. 7.3, Abb. 7.4) noch festgestellt werden. Dieser recht lange Zeitraum ist durch das stetige, jedoch langsame Hochwachsen der Zellen auf Grund der nicht optimalen Anfahrstrategie bedingt.

Nach Tag 22 wurde die Verweilzeit bei einem Wert von etwa 5 Stunden gehalten und es konnten nur wenige Probenahmen erfolgen. Ebenso wurde während dieser Zeit die Sauerstoffkonzentration im Medium abgesenkt. Dies bewirkt einen vorübergehenden leichten Anstieg der Laktatproduktion. In bezug auf eine rein apparatetechnische Beurteilung ist anzumerken, daß der Reaktor während der Fermentation 13 Tage nahezu ohne jeden Eingriff ein stabiles Prozeßverhalten zeigte.

Es wird erkennbar, daß der Reaktor einen Gleichgewichtszustand erreicht hat, bei dem unter konstanten Bedingungen fermentiert wird. Dies ist besonders in bezug auf die Forderung nach reproduzierbaren Zuständen und somit unter dem Gesichtspunkt der Validierung für ein kontinuierliches System von Bedeutung.

⁷Runstadler ([67], discussion) berichtet von einem Partialdruckgefälle von 40 Torr.

Nach dieser phänomenologischen Beschreibung einer Fermentation mit einer CHO-Zelllinie können aus verfahrenstechnischer Sicht Rückschlüsse zur Verbesserung von Fermentationen im Wirbelschichtreaktor gezogen werden. Hierbei kann zunächst der Feststellung entgegengetreten werden, daß die Verwendung von Antibiotika in Zellkulturmedien zur „üblichen Praxis“ gerechnet werden muß [5]. Diese Aussage beinhaltet, daß das Auftreten von Kontaminationen in Zellkulturfermentationen als häufiges Ereignis eingestuft wird.

Es hat sich jedoch bei allen hier vorgestellten Fermentationen gezeigt, daß das Kontaminationsproblem bei entsprechender Dokumentation der Sterilisierungsprozeduren und bei konsequenter Auslegung eines Reaktionssystems beseitigt wird (Der in Abb. C.5, S.128 dargestellte Reaktor wurde nach seiner Fertigung ohne Antibiotika sofort und kontaminationsfrei durch eine Langzeitfermentation in Betrieb genommen.). Hierdurch wird auch für die Produktaufarbeitung eine Erleichterung geschaffen, da die Abtrennung jeder Komponente vom eigentlichen Produkt sowohl durchgeführt als auch überwacht werden muß. Zur Fermentation von immobilisierten Zellkulturen erhält eine gesichert kontaminationsfreie Produktion besonderes Gewicht, weil Kontaminationsherde in bewachsenen porösen Trägern faktisch gleichermaßen geschützt sind wie die Säugerzelle selbst und somit nur schwer behandelt werden können.

Von besonderer Bedeutung ist die Feststellung, daß bei den hier durchgeführten Fermentationen selbst ohne eine entsprechende Regelungstechnik mit dem System eine Vermeidung von inhibierenden und limitierenden Zuständen erreicht wird. Hieraus geht hervor, daß ein Zellkulturprozeß auf Grund seiner charakteristisch langsamen zeitlichen Änderungen mit wenig analytischem Aufwand gefahren werden kann. Zur Verwirklichung einer nutristatischen Fahrweise (Fermentation mit konstanten Substratkonzentrationen) sowie einer für den Produktionsbetrieb notwendigen Prozeßkontrolle bietet eine kontinuierliche Prozeßanalytik jedoch eindeutige Vorteile [178].

Aus ökonomischer Sicht wie auch unter Beachtung der Validierungsproblematik für einen kontinuierlichen Prozeß muß besonders das Anfahren von Zellkultur-Wirbelschichtreaktoren weiter optimiert werden. Dies gilt insbesondere für einen zeitlich eng kalkulierten Produktionsbetrieb. Die hier durchgeführten Versuche zur Variation der Animpfdicht können hierfür jedoch nur einen Aspekt zum raschen Erzielen einer hohen Produktausbeute darstellen. Aus verfahrenstechnischer Sicht muß auch hier die verbesserte Steuerung aller wesentlicher Prozeßparameter (Konzentrationen, Temperatur etc.) angestrebt werden.

Bei der Fermentation speziell von adhärenenten Zellen ist der Tatsache Rechnung zu tragen, daß bei den hier bereitgestellten Prozeßbedingungen (homogene Fluidisierung, gute Sauerstoffversorgung) adhärenente Zellen auch auf der Trägeraußenseite aufwachsen können. Dies macht eine Verminderung der Anströmgeschwindigkeit notwendig, um einen Trägeraustrag zu vermeiden. An dieser Stelle müssen in Zukunft vorsorgliche Maßnahmen getroffen werden, um die Prozeßstabilität nicht zu gefährden.

Letztlich zu erwähnen bleibt, daß durch Inhomogenitäten bei der Trägeranströmung im Wirbelbett bei Langzeitfermentationen von adhärenenten Zellen Verblockungen an der Reaktorwand auftreten können. Dies führt zu einer Verminderung an nutzbarem Trägervolumen und somit zu einer Absenkung der Reaktorproduktivität, da nur die fluidisierten Träger ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden können. Solche Verblockungen können durch eine rechtzeitige kurzfristige Steigerung der Leerrohrgeschwindigkeit vermieden werden. Im fortgeschrittenem Stadium der Verblockung ist dies nachweislich nicht mehr möglich.

7.2 Suspensionszellen

Die hier erörterten Ergebnisse geben die Daten aus der Fermentation einer Hybridom-Zelle in der Wirbelschicht wieder. Verglichen mit den zuvor genannten Daten hebt sich der Verlauf dieser Fermentation nicht nur auf Grund des unterschiedlichen Adhärenzverhaltens der Zellen ab. Bei den Experimenten bestand die Zielsetzung vor allem darin, trotz der noch fehlenden online-Analytik einen Prozeß mit einer guten Stabilität der zellspezifischen Raten sowie einer annähernden Konstanz der unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchzuführen. Des weiteren sollte beispielhaft das Verhalten einer typischen Suspensionszelle in einem Wirbelschichtreaktor mit integrierter blasenfreier Begasung untersucht werden. Der zuvor verwendete Reaktor (580 ml) wurde im vorliegenden Fall auf ein Gesamtvolumen von einem Liter aufgestockt, daß Trägervolumen betrug 100 ml im abgesetzten Zustand.

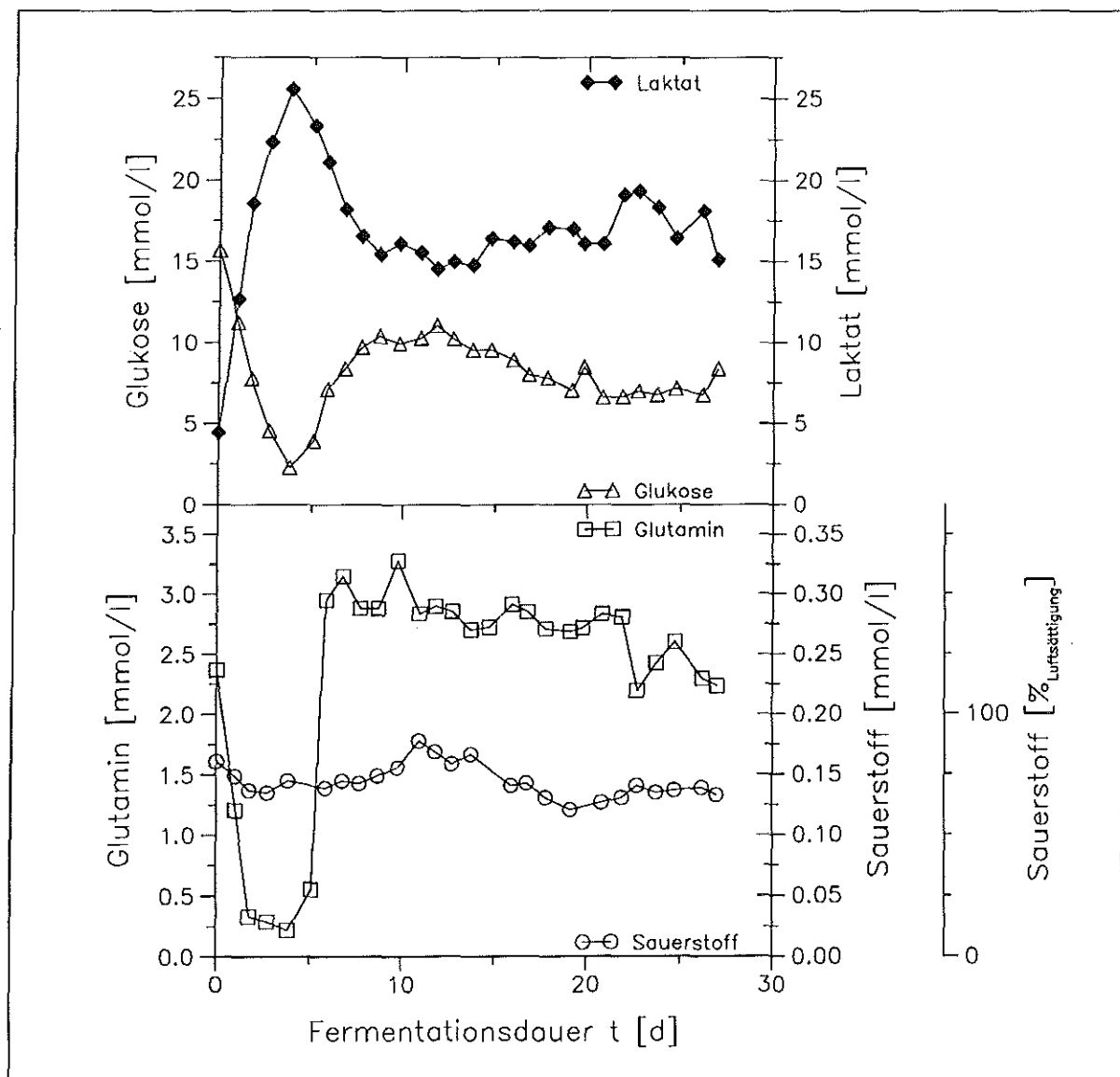


Abbildung 7.6: Konzentrationen von Leitsubstraten und Laktat (kontinuierliche Fermentation)

Wie bereits im vorangehenden Kapitel dargestellt, unterscheiden sich die Vorbereitungen zum eigentlichen Prozeß bei Suspensionszellen wesentlich von denen bei der adhärenenten Zelle. Die Hybridom-Zellen werden in sogenannten "Spinner"-Gefäßen in einer gerührten Suspension vorkultiviert, so daß sie durch Zentrifugation auf das gewünschte Inokulumsvolumen gebracht werden können. Hingegen werden die adhärenenten Zellen abtrypsiniert, d. h., sie werden mit Trypsin von der Wand der Zellkulturflaschen gelöst und dann pipettiert.

Zur Fermentation der Hybridome wurden Siran-Träger der Fa. Schott verwendet. Sie werden auf 500 - 560 μm fraktioniert und dann mit Gelatine modifiziert⁸ [120].

Beispiel zur Fermentation einer Hybridomzelle

Wie bereits zuvor erwähnt konnte bei der Fermentation zu den hier vorgestellten Ergebnissen bereits auf umfangreiche Erfahrungen mit dem System zur reaktorintegrierten blasenfreien Begasung zurückgegriffen werden. Dies wird aus Abb. 7.6 durch die sehr gleichmäßige Führung der Konzentration einiger wichtiger Medien-Inhaltsstoffe deutlich. Besonders im Vergleich zur zuvor vorgestellten Fermentation (vgl. Abb. 7.2) kann von einem äußerst stabilen und kontrollierten Prozeßzustand gesprochen werden.

Ein für diesen Zelltyp wesentlicher Effekt kann zu Beginn des Prozesses, etwa ab dem zweiten Tag, beobachtet werden. Hier zeigt sich, daß die Glutaminkonzentration des Frischmediums bei der dort vorliegenden hohen Verweilzeit (vgl. Abb. 7.7) nicht ausreichte, um das Konzentrationsniveau im Reaktor über der Limitierung zu halten. Als Folge kann ein für diesen Prozeßzustand untypischer, kurzzeitig stagnierender Sauerstoffverbrauch beobachtet werden (vgl. Abb. 7.7). Der Grund ist in der vergleichsweise hohen Glutaminaufnahme der Hybridomzellen zu suchen (vgl. Abb. 7.8 mit Abb. 7.4)

Nach 5 Tagen wird die Glutaminkonzentration des Frischmediums auf 5 mmol/l angehoben. Dieser Wert reicht dann in Verbindung mit einer stark verkürzten Medienverweilzeit im Reaktor aus, um einen stabilen Zustand für das Glutaminniveau und somit auch für den Glutaminverbrauch einzustellen.

Abb. 7.7 verdeutlicht die für diesen Zelltyp recht *defensive Anfahrstrategie*, d. h., die Verweilzeit wird über einen relativ langen Zeitraum (fünf Tage) von 24 Stunden auf 2 Stunden reduziert. Als Leitsubstrat zur Ermittlung der jeweils eingestellten Verweilzeit diente im vorliegenden Fall die Konzentration an Glukose im Reaktor. Hier wurde ein Niveau zwischen 8 und 10 mmol/l angestrebt. An dieser Stelle sei angemerkt, daß die Wahl der Glukosekonzentration lediglich auf Grund ihrer sehr einfachen und schnellen Bestimmung vorgenommen wurde, aus zellphysiologischer Sicht hingegen sollte eher die Glutaminkonzentration zur Einstellung der Frischmediendosierung herangezogen werden [173]. Die Glukoseverbrauchsrate (Abb. 7.7) erreicht bei den Hybridomzellen mit der geringeren Zelldichte in den Trägern höhere Werte als bei der vorher beschriebenen CHO-Zelle (Abb. 7.3).

Der Sauerstoffverbrauch (Abb. 7.7) wurde durch eine stationäre Meßmethode täglich ermittelt. Auffällig ist auch bei diesem Parameter die Konstanz der Meßergebnisse, die im vorliegenden Fall nahe dem Wert 2.4 $\text{mmol}/(l_{\text{Trägersvolumen}} \cdot h)$ liegen.

Abb. 7.8 spiegelt die wesentlichen Aussagen zur Produktbildung wieder. Das *Überschwingen* der IgG-Konzentration ist auf die zunächst konstant gehaltene Verweilzeit zurückzuführen, durch die starke Reduzierung der Verweilzeit wird das Produkt gewissermaßen verdünnt.

Bezogen auf das Festbett kann eine Produktionsrate von etwa 1.2 $\text{g}/(l \cdot d)$ ermittelt werden. Über den gesamten Fermentationszeitraum wurden somit 3 g Antikörper erzeugt. Dieser Wert ist im wesentlichen durch die zellspezifische Produktivität festgelegt. Das Maß der Produktkonzentration wird direkt von der Verweilzeit des Zellkultumediums im Reaktor beeinflusst, der Wert von 10 $\text{mg}/(l \cdot h)$ kann daher nur bedingt als Maß für die Leistungsfähigkeit des Systems herangezogen werden.

⁸Mit Gelatine wird in der Fachliteratur denaturiertes Kollagen bezeichnet.

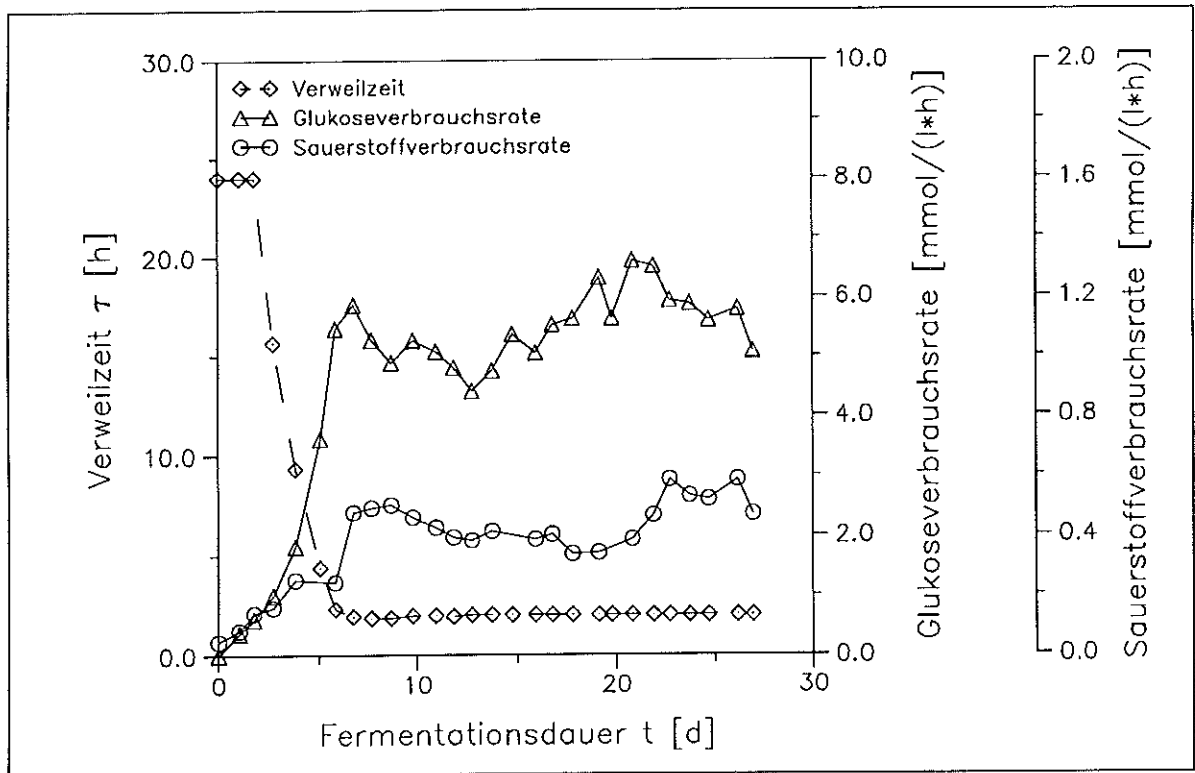


Abbildung 7.7: Reaktorspezifische Verbrauchsrate und Verweilzeit (Hybridomzellen)

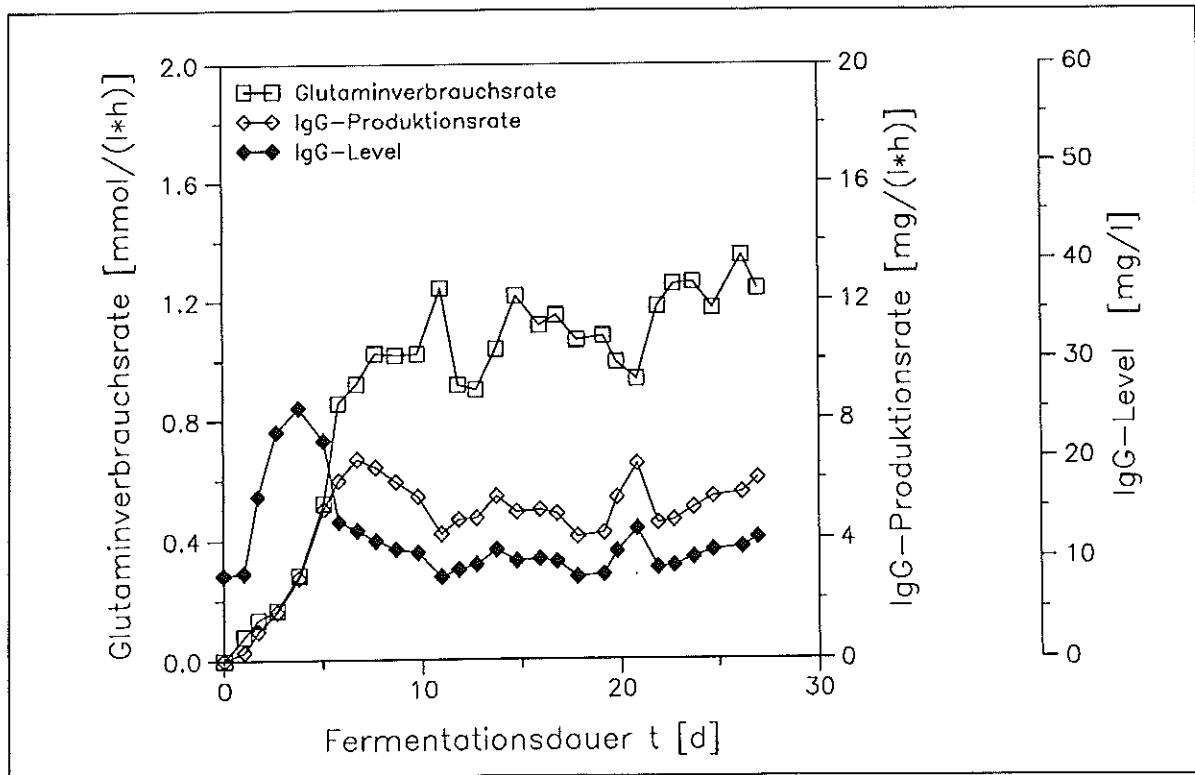


Abbildung 7.8: Glutaminverbrauch und Produktdaten (Hybridomzellen)

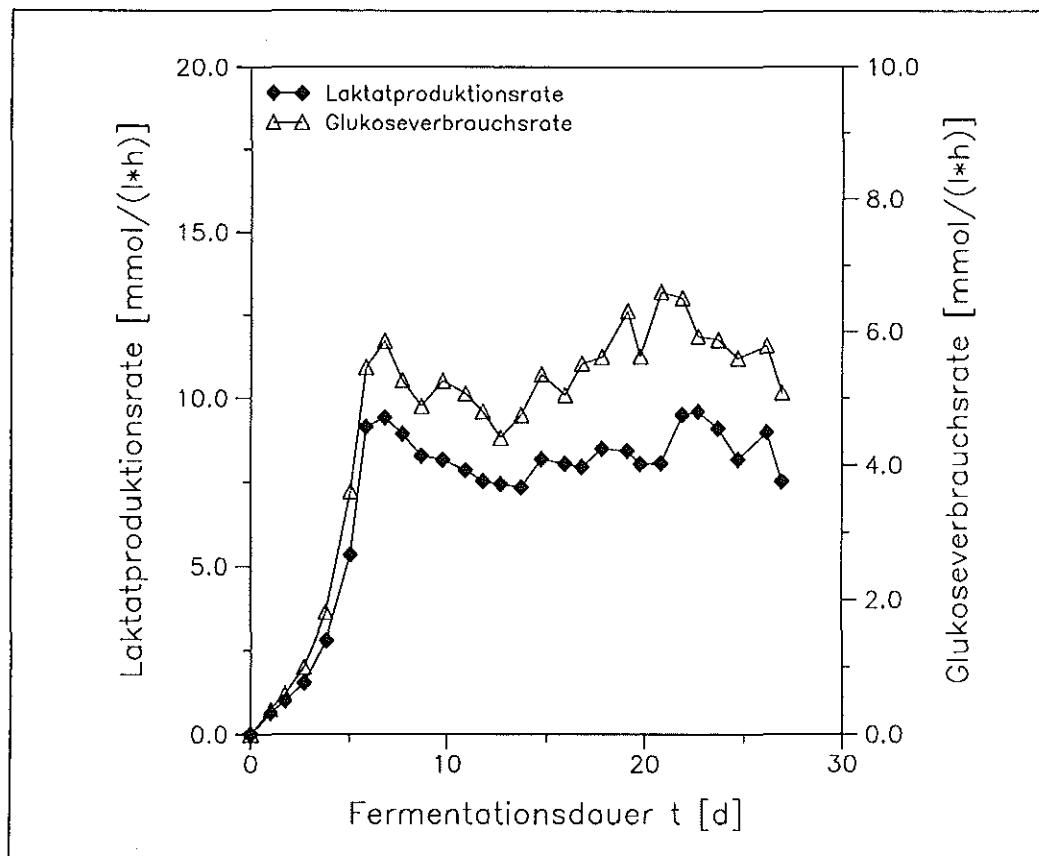


Abbildung 7.9: Laktatproduktion und Glukoseverbrauch (Hybridomzellen)

Zusammenfassend kann man den Fermentationsdaten entnehmen, daß eine kontinuierliche Fermentation im Wirbelschichtreaktor stabil bezüglich der hier untersuchten Parameter durchgeführt werden kann. Die hier durchgeführte Fermentation wurde nach 28 Tagen bei Konstanz der Prozeßparameter abgebrochen. Befürchtungen, daß die Fermentation von Hybridomen in der Wirbelschicht mit Siran-Trägern unvorteilhaft ist, wurden somit durch diese Fermentation sowie durch zahlreiche Prozesse in Reaktoren der Größe 150 ml (vgl. S. 124) widerlegt. Vielmehr läßt sich feststellen, daß durch das Fehlen eines Bewuchses auf der Trägeraußenseite Prozesse mit Suspensionszellen auch nach Wochen nicht durch instationäre Transportlimitierungen behindert werden.

Sauerstoffeintrag Im Verlaufe einer Fermentation wurden die der Abb. 7.3 entnehmbaren Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen durch instationäre Messungen erfaßt. Durch die Zuordnung zu den bereits vorgenommenen theoretischen Überlegungen (vgl. Kap. 4.4) sowie den begleitenden Messungen an einer Versuchsanlage ist nun ein Vergleich mit dem Realsystem, also dem Zellkulturfermenter, möglich. Hierzu werden

1. die theoretischen Verbrauchswerte einer Zellkultur mit hoher zellspezifischer Sauerstoffaufnahme mit der erzielten Eintragsleistung verglichen und
2. Die tatsächlich erzielte Eintragsleistung mit der berechneten Sauerstoffzufuhr verglichen.

Einen solchen Vergleich verdeutlicht Abb. 7.10. Mit dem in Kap. 4.3.2, S. 48 ermittelten Hohlraumanteil wird zusätzlich ein hoher Verbrauchswert bezüglich des Sauerstoffs für die Kultur angenommen.

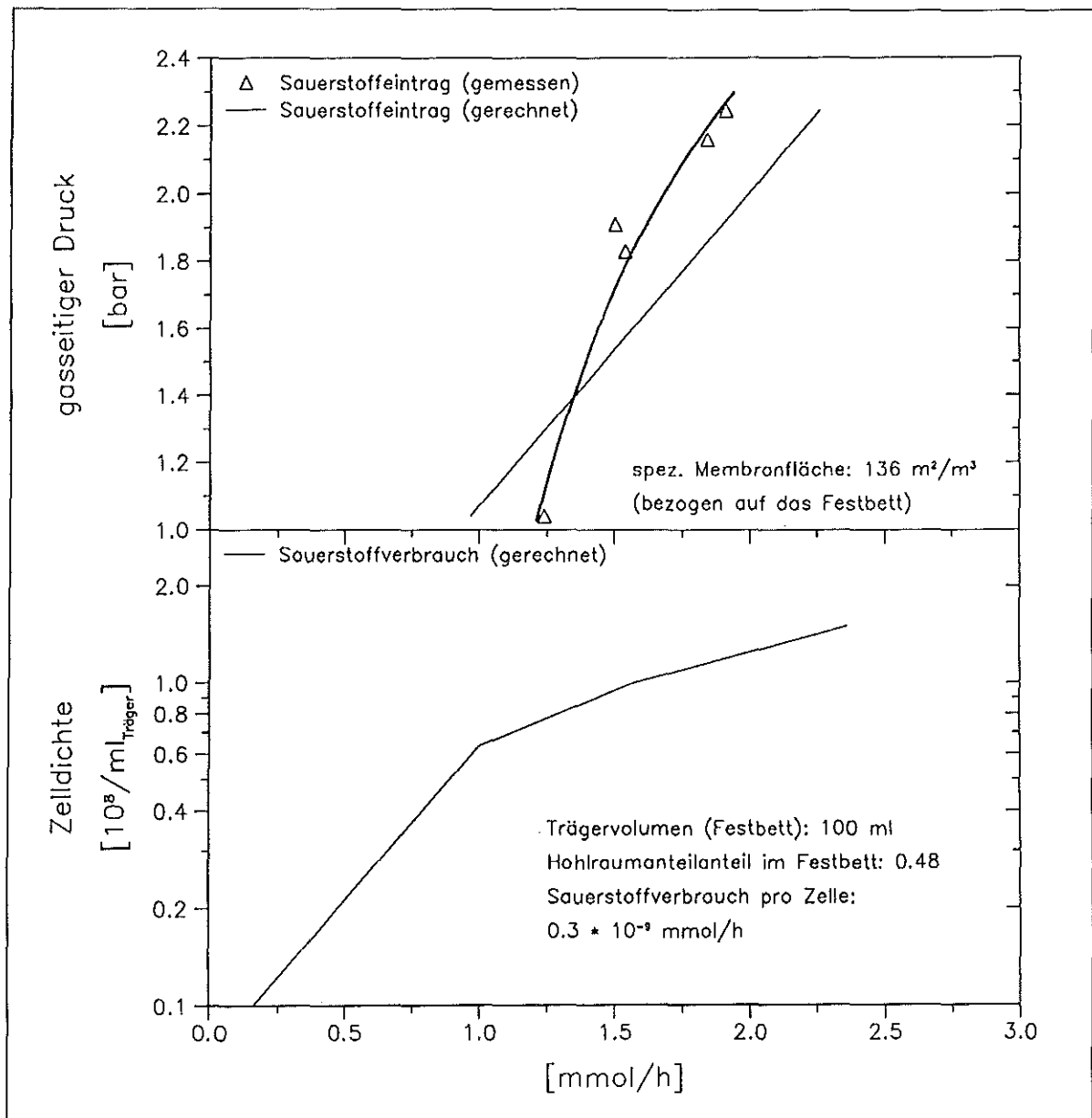


Abbildung 7.10: Vergleich einer Sauerstoff-Eintragsmessung mit theoretisch ermittelten Werten

Als weitere Vorgabe wird die tatsächlich im Reaktor installierte volumenbezogene Membranfläche von $136 \text{ m}^2/\text{m}^3$ in die Betrachtung einbezogen. Dieser Wert wurde mit dem Schlauchaußendurchmesser gebildet.

Aus der Verknüpfung der gemessenen Eintragswerte mit den gerechneten Verbrauchswerten läßt sich zunächst die auf das Trägervolumen bezogene Zelldichte nach unten abschätzen. Hierbei kann der Wert von $10^8 \text{ Zellen}/\text{ml}_{\text{Träger}}$ bestätigt werden.

Bei dem Vergleich der Eintragswerte wird eine recht gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen Ergebnissen und den Werten gemäß den Stofftransportgleichungen festgestellt. Somit kann durch eine entsprechende Berechnung die eingetragene Stoffmenge vorhergesagt werden (im vorliegenden Fall wurde mit den Werten $10.5 \cdot 10^{-6} \text{ m/s}$ für den Durchgangskoeffizienten und einer

Sättigungskonzentration von 0.2 mmol/l für den Sauerstoff im Kulturmedium gerechnet). Bei der Messung des Sauerstoffeintrags durch die instationäre Methode mußte berücksichtigt werden, daß der nach dem Abschalten des Überdrucks in der Membran noch vorhandene Sauerstoff am Stoffaustausch beteiligt ist. Die hierdurch eingetragene Menge kann ebenfalls durch die in Kap. 4.4 eingeführten Berechnungen erfaßt werden.

Eine endgültige Klärung der Frage, warum die Näherungskurve der Meßwerte die (berechnete) Gerade für den Sauerstoffeintrag schneidet, kann an dieser Stelle nicht erbracht werden. Diese Unstimmigkeit ist unter anderem auf die instationäre Meßmethodik zurückzuführen, die genauere bzw. häufigere Messungen verhinderte. Ein Grund für den Abfall der Meßwerte hinter die theoretisch ermittelte Kurve könnte jedoch durch einen im Verlauf der Fermentation auftretenden zusätzlichen flüssigseitigen Stofftransportwiderstand begründet sein. Hierbei muß zum besseren Verständnis angemerkt werden, daß das Anheben des gaseitigen Drucks bei fortschreitender Prozeßdauer stattfand, daß die einzelnen Meßpunkte also mit einem Abstand von einigen Tagen ermittelt wurden.

Aus der Tatsache, daß die Meßpunkte in Abb. 7.10 nahe bei den theoretisch ermittelten Daten wiederzufinden sind und die Daten für den gaseitigen Druck gleichzeitig einer realen Fermentation entstammen, ist zu folgern, daß die Auslegung der installierten Membranfläche dem verwendeten Trägervolumen und somit der Gesamtzellzahl sehr gut entspricht. So mußte im Fall der Fermentation von CHO-Zellen auf Collagenträgern ein gaseitiges Druckpotential von über 2 bar in Anspruch genommen werden, um die Versorgung der Kultur zu gewährleisten. Dies ist bei Membranwandstärken, die einen ausreichenden Gaseintrag zulassen, nur mit einem verstärktem Silikonmaterial zu erreichen. Die verwendete adhärente Zelllinie vereint jedoch die Eigenschaften eines hohen zellspezifischen Sauerstoffverbrauchs bei gleichzeitiger hoher Besiedelungsdichte; höhere volumenspezifische Membranflächen brauchen und sollten auf Grund der hiermit verbundenen Verminderung des nutzbaren Reaktorvolumens daher nicht installiert werden.

Die Membran wurde bei dieser Fermentation unter anderem auf eine Belagbildung hin untersucht, Ablagerungen oder ein Zellbewuchs konnten jedoch nicht festgestellt werden. Abschließend bleibt festzuhalten, daß die theoretische Betrachtung zum Stofftransport ein gut verwendbares Werkzeug zur Auslegung von Reaktoren darstellt. Die hier ermittelten Abweichungen zwischen den Messungen am Zellkulturfermenter und den gerechneten Werten erhärten die Notwendigkeit, eine Auslegung mit einem entsprechenden Sicherheitszuschlag bei der Membranfläche vorzusehen, um unter einem Druckniveau von zwei bar zu begasen. Höhere Werte (bis 7 bar) sind möglich, für einen Zellkulturfermenter aus Sicherheitsüberlegungen jedoch auszuschließen.

7.3 Vergleich verschiedener Trägergrößen

In Kapitel 4.4.2 wurde bereits darauf hingewiesen, daß neben dem transmembranen Transport aus der Gasphase in die Flüssigphase gleichermaßen der Stoffübergang flüssig-fest, also der Stofftransport zwischen der Flüssigphase und der Trägeroberfläche, Beachtung finden muß. Während über die nichtporöse Silikonmembran nur gasförmige Komponenten (Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxyd und Ammonium) durch ein System mit bekannten und konstanten Stoffwerten transportiert werden, stellt der zweite hier genannte Transportschritt eine Akkumulation aus instationären Schritten in einem Vielstoffsystem dar. Ansätze zur mathematischen Beschreibung zu dieser Stofftransportproblematik sind in der Literatur homogener und heterogener chemischer Reaktionen vielfach beschrieben (zum Beispiel [38]). Auch für biotechnologische Anwendungen wurden durch die Einführung entsprechender Vereinfachungen im Einzelfall Lösungen für die Differentialgleichungssysteme gefunden [94, 44]. Für den vorliegenden Fall sind die entsprechenden Berechnungen prinzipiell anwendbar.

Die Schwierigkeiten dieser Vorgehensweise bei ihrer Anwendung auf inhomogen bewachsene Träger in der Zellkulturtechnik können jedoch leicht veranschaulicht werden. Dies geschieht vorteilhaft anhand einer Abschätzung, die die Größe einer Zelle vorhersagt, welche im Zellmittelpunkt gerade noch ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden kann [123].

An dieser Stelle wird als Ansatz der Wahl die Bilanz für den Transport einer Stoffart mittels Diffusion in einer Kugel bei gleichzeitiger Reaktion eingeführt:

$$r_{O_2} = -D_{O_2,effektiv} \left(\frac{2}{r} \frac{\partial c_{O_2}}{\partial r} + \frac{\partial^2 c_{O_2}}{\partial r^2} \right) \quad (7.1)$$

mit

r_{O_2} Reaktionsgeschwindigkeit
 $D_{O_2,effektiv}$ Diffusionskoeffizient in der Kugelschale

Die Reaktionsgeschwindigkeit wird in der Regel durch eine Monod-Kinetik oder aber durch einen konstanten Term beschrieben. Bei der (für die mathematische Lösung der Differentialgleichung einfacheren) Wahl der letzteren Möglichkeit ergibt sich als Lösung für die Abhängigkeit des gesuchten maximalen Radius einer einzelnen Zelle von den übrigen Parametern [123]:

$$r_{a,max} = r_{a,max}(D_i, D_a, \delta, K_s, c_\infty, r_{O_2}) \quad (7.2)$$

mit

$r_{a,max}$ größter Zellradius ohne Mangelversorgung
 D_i Diffusionskoeffizient in der Zelle
 D_a Diffusionskoeffizient außerhalb der Zelle
 δ Wandstärke der Zellmembran
 K_s Nernst'scher Verteilungskoeffizient
 c_∞ Konzentration außerhalb der Zelle

Obwohl die Zahl der Einflußfaktoren hier relativ gering erscheint, ist eine exakte Berechnung des Konzentrationsverlaufs im Träger in Frage zu stellen, da auch mit Hilfe der getroffenen starken Vereinfachungen insbesondere die Verhältnisse in einem porösen Träger nicht mit einer der Ausgangsproblematik entsprechenden Genauigkeit beschrieben werden können⁹. Es verwundert daher

⁹Der Diffusionskoeffizient im Träger hängt von einem Umwegfaktor und dem relativen Lückenvolumen in dem unregelmäßig bewachsenen Träger ab.

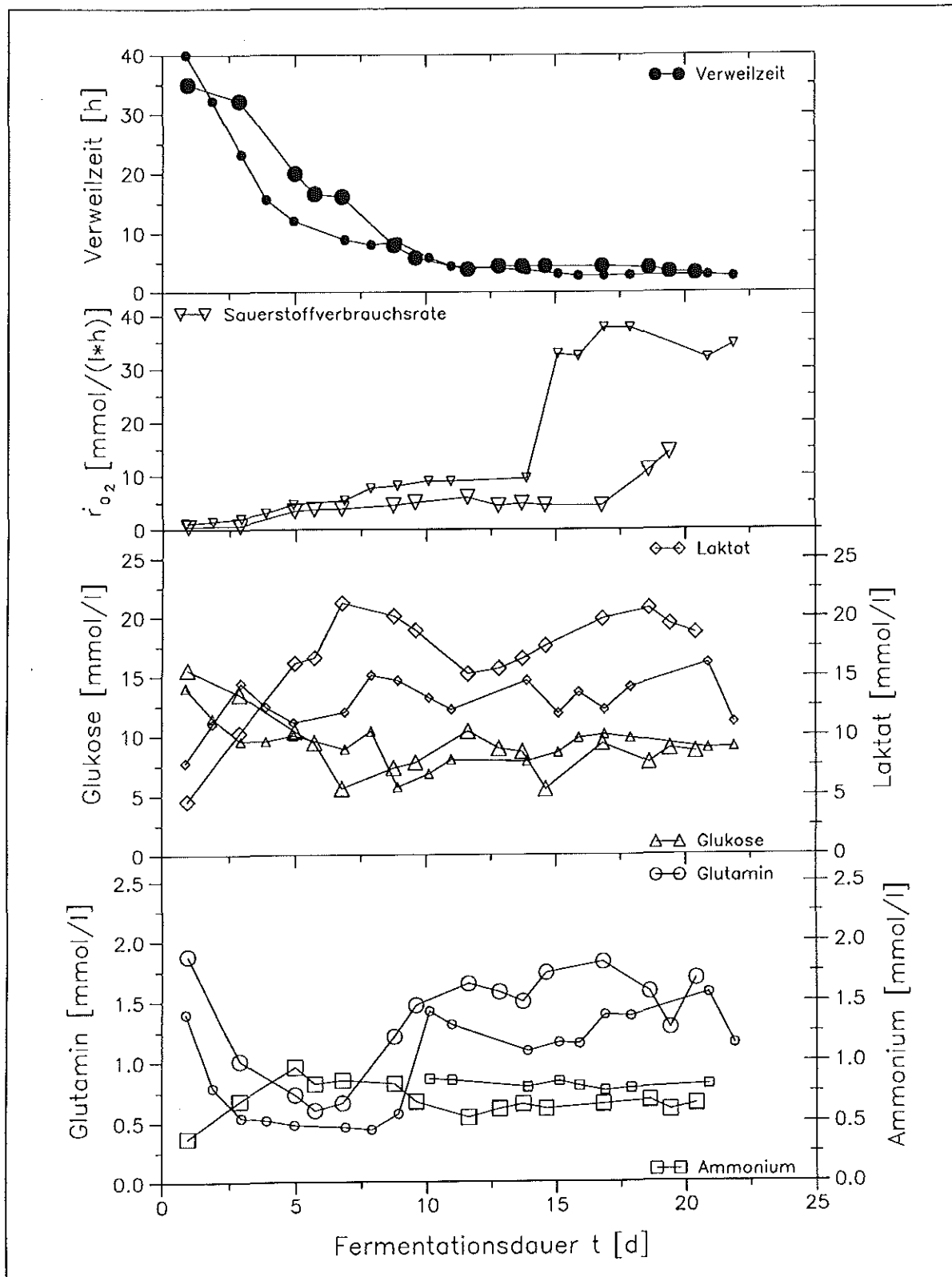


Abbildung 7.11: Konzentrationsverläufe für unterschiedliche Trägerdurchmesser (kleine Symbole: 500 μm , große Symbole 1000 μm)

nicht, daß trotz der häufig durchgeführten Berechnungen durch das Aufsummieren von Fehlern stark voneinander abweichende Ergebnisse resultieren.

Alternativ zu diesen Überlegungen sollte daher ein pragmatischer Weg beschritten werden, bei dem durch die Beobachtung des Prozeßzustands auf Limitierungen im Träger geschlossen werden kann. Hierzu bietet es sich prinzipiell an, Fermentationen unter gleichen Randbedingungen mit unterschiedlichen Trägertypen durchzuführen. Bei gleichem Trägermaterial kann auch dazu übergegangen werden, Träger unterschiedlichen Durchmessers einzusetzen, um so den Einfluß des Transportweges auf die Versorgung der Zellen im Träger bzw. des Abtransportes von Stoffwechselprodukten zu beurteilen. Daher wurde ein erster Ansatz unternommen, durch einen Vergleich von oberflächenmodifizierten Siranträgern mit den Durchmesserfraktionen 500 - 560 μm sowie 1000 - 1120 μm auf die Sauerstoffversorgung der Zellen im Innern des Trägers zu schließen.

Leitsubstrat bei den beiden Experimenten (Fermentationen im 0.58 l-Reaktor über 500 Stunden) ist auch in diesem Fall Glukose, fermentiert wird eine CHO-Zelle. Die Menge an Trägern beträgt im Fall der Träger mit größerem Durchmesser 72.5 ml (bei angenommenen Hohlraumanteil von $\varepsilon = 0.4$ 43.5 ml effektives Trägervolumen), bei den Trägern mit Durchmesser 500 μm hingegen 90 ml (54 ml). Abb. 7.11 zeigt die Konzentrationsverläufe der wesentlichen Komponenten im Reaktorauslauf, sowie die Verweilzeit des Frischmediums im Reaktor. Weiterhin ist die Sauerstoffverbrauchsrate, bezogen auf einen Liter effektiven Trägervolumens (Schüttgutvolumen ohne extrapartikulären Hohlraumanteil) aufgetragen.

Zum Fermentationsablauf wurde die folgende Vorgehensweise gewählt: Bis zum zehnten Tag wurde nach der Glukosekonzentration geregelt, hier wurde ein Niveau zwischen 8 und 10 mmol/l angestrebt. Ab diesem Zeitraum wurde dann die Verweilzeit des Frischmediums gleichgehalten, um so zu erkennen, ob ein abweichendes Fermentationsverhalten bei unterschiedlicher Trägergröße auftritt. Die Verweilzeit im oberen Teil von Abb. 7.11 wurde zu Vergleichszwecken auf ein gleiches effektives Trägervolumen umgerechnet.

Zu Beginn der Fermentationen zeigt sich, daß bei den kleineren Trägern ein besseres Besiedelungsverhalten der Träger vorliegt, hierdurch muß die Verweilzeit bei vergleichbaren Medienbedingungen in stärkerem Maße verkürzt werden. Der Verlauf der zweiten Kohlenstoffquelle, dem Glutamin, weist eine offensichtlich höhere Glutaminaufnahme hin. Ab Tag zehn, also dem Zeitpunkt, an dem die Verweilzeit gleichgehalten wird, stellt sich ein nahezu konstanter Glutamin- und Glukoseverbrauch ein. Die kurze Verweilzeit ermöglicht es, die Konzentration an Ammonium im Reaktor unter der Grenze von 1 mmol/l zu halten. Hierdurch entfällt die Notwendigkeit zur Abtrennung des Ammoniums. Die Laktatbildung bei der Fermentation mit dem großen Träger verursacht eine erhöhte Konzentration an Laktat während des gesamten Fermentationsverlaufs. Hierbei werden Werte erreicht, die an der unteren Grenze zu einer Laktatinhibierung (≥ 20 mmol/l) der Zellen im Reaktor liegen [173]. Diese Ergebnisse sind für eine kontinuierliche Fermentation bei kurzen Verweilzeiten recht hoch und weisen auf eine mangelnde Sauerstoffversorgung der Zellen im Reaktor hin. Eine Inhibierung muß verstärkt bei den Zellen im Trägerinnern angenommen werden.

Der Verlauf der auf das Trägervolumen bezogenen Sauerstoffaufnahme bestätigt diese Vermutung. Bei dieser Fermentation mit dem Träger des Durchmesserbereichs 500 - 560 μm werden bei gleichem Vergleichsvolumen größere Mengen Sauerstoff aufgenommen als mit dem größeren Vergleichsträger. Rechnerisch ergeben sich bei einer angenommenen zellspezifischen Sauerstoffaufnahme von 0.3 mmol/(10^9 Zellen * h) (vgl. Abb. 7.10) maximale trägerbezogene Zelldichten von $1.25 \cdot 10^8$ Zellen/ml_{Träger} (Trägerdurchmesser: 500 - 560 μm) und $4.7 \cdot 10^7$ Zellen/ml_{Träger} (Trägerdurchmesser: 1000 - 1120 μm). Weitere Hinweise auf das Besiedelungsverhalten ergeben sich aus rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Hierzu werden die Träger vor der eigentlichen Präparation für die Mikroskopie derart gebrochen, daß aus dem Innern der Träger Aufnahmen gemacht werden können. Führt man diese Technik in der Mitte des Trägers durch, so kann das Besie-

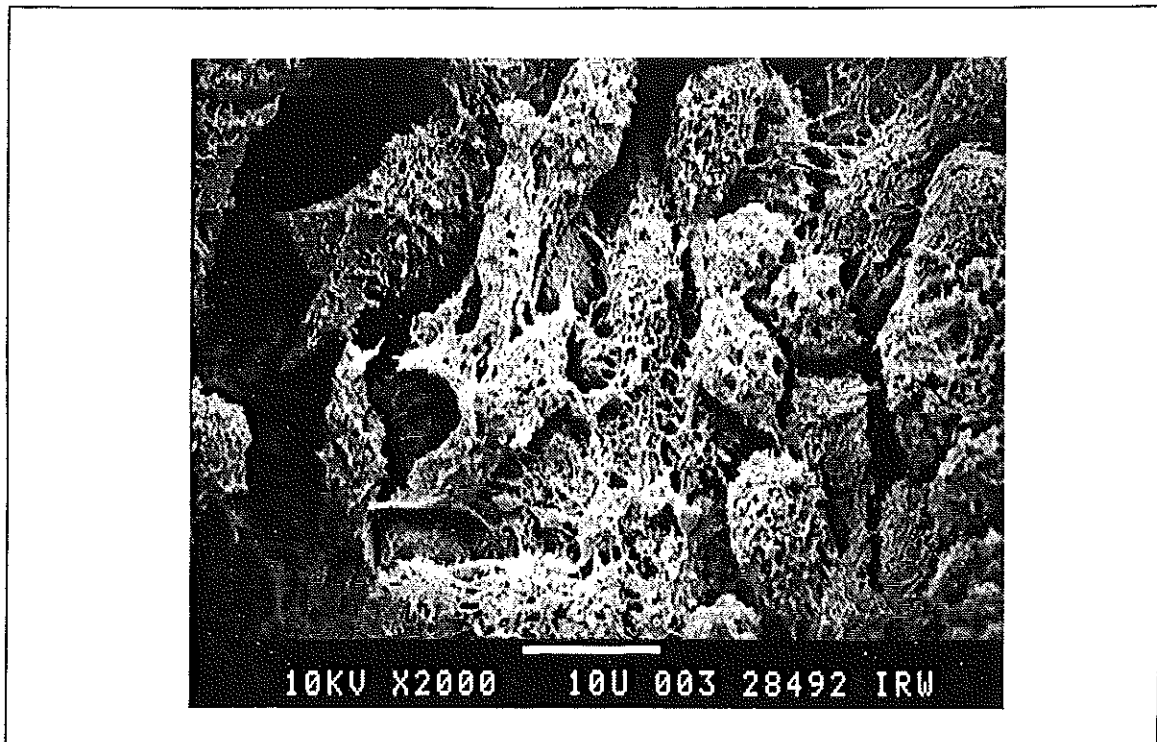


Abbildung 7.12: REM-Aufnahme aus dem Trägerinnern (Durchmesser: 500 - 560 μm)

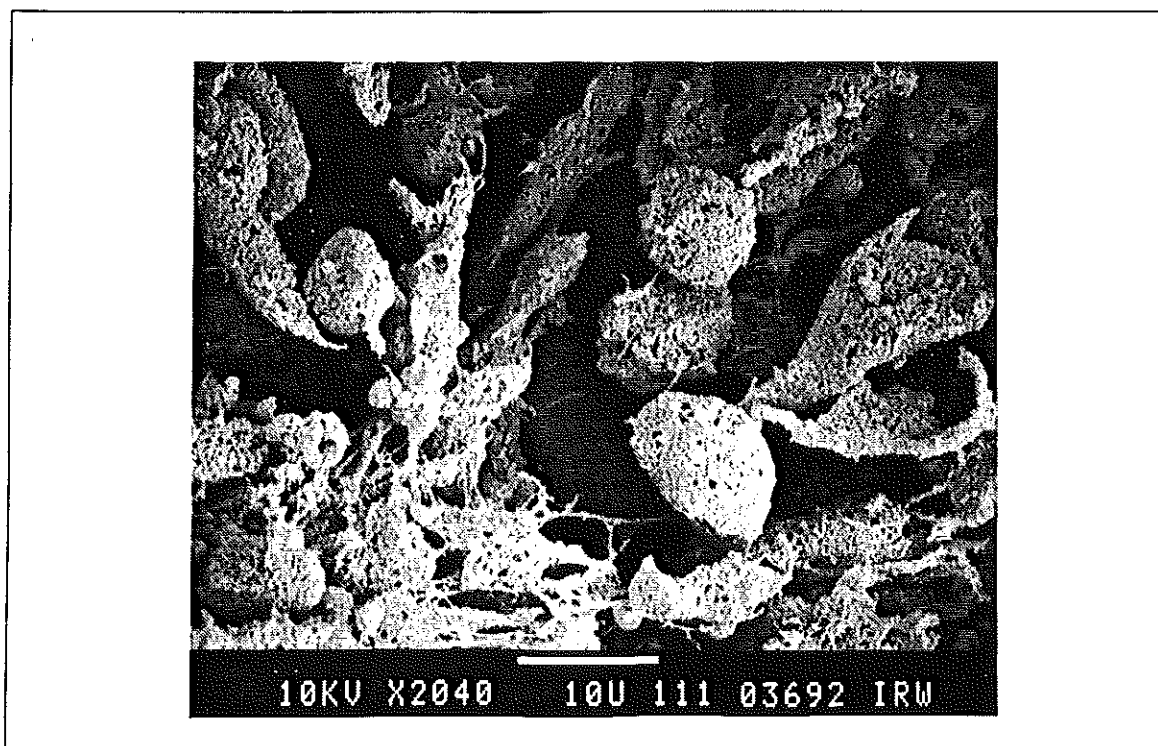


Abbildung 7.13: REM-Aufnahme aus dem Trägerinnern (Durchmesser: 1000 - 1120 μm)

delungsverhalten von der Trägersaußenseite bis in den Kern hin beobachtet werden. Die Abb. 7.12 und 7.13 zeigen Detailaufnahmen aus dem Trägerinnern für die Fermentationen mit unterschiedlichem Trägerdurchmesser. Während bei dem kleinen 500 μm -Träger auch im Innern des porösen Trägers ein dichter Bewuchs mit — dem äußeren Erscheinungsbild nach — vitalen Zellen stattfindet, ist der Bewuchs im Trägerkern bei dem größeren Träger weniger dicht. Zudem ist das Erscheinungsbild der Zellen hier von Bruchstücken und solchen Zellen geprägt, die ihre *normale* runde Form vollständig eingebüßt haben (vgl. Abb. 6.1). Durch die gleiche Vorgehensweise wie die hier dargestellte Technik wurden auch Limitierungen durch die Ausbildung einer 30-100 μm starken Zellschicht auf der Außenseite der Träger beobachtet.

An dieser Stelle sei noch einmal betont, daß die zuvor beschriebenen Untersuchungen einen phänomenologischen Ansatz darstellen, der, sofern die Beobachtungen an einem System mit Realbedingungen durchgeführt werden, einen direkten Zugang zu Aussagen über den Einfluß der Trägergröße auf den Stofftransport ermöglicht. Durch eine Fortführung dieser Experimente können insbesondere in bezug auf andere wesentliche Komponenten (Substratinhaltsstoffe, Produkte) Beiträge zum Auffinden einer optimalen Trägergröße gegeben werden. Hierzu ist es in jedem Falle zwingend notwendig, eine enge Durchmesserfraktion von Trägerpartikeln zu verwenden, da im anderen Fall nur ein Bruchteil des eigentlichen Reaktionsraumes optimal genutzt werden kann.

Kapitel 8

Auswahl und Berechnung von Begasungsmodulen

Die Überlegungen zur Bestückung von Wirbelschichtreaktoren mit einem integrierten Begasungsmodul orientieren sich an der Anforderung, einen blasenfreien und gradientenarmen Betrieb des Reaktors zu gewährleisten. Da das Konzentrationsgefälle für die einzelnen Komponenten im porösen Träger bei vorgegebenem Trägerdurchmesser nur unwesentlich zu beeinflussen ist, muß die Konzentration in der Flüssigphase zur gleichmäßigen Zell-Versorgung konstant gehalten werden.

Die reaktorintegrierte Permeationsbegasung im Fließbett stellt sich als zuverlässige, konstruktiv jedoch anspruchsvolle Lösung dar. Besonders bei der Übertragung in Reaktoren, die als Produktionssysteme besondere Anforderungen an ihre Zuverlässigkeit, Betriebssicherheit und einfache Handhabung (bzw. Prozeßsteuerung) stellen, sind alternative Bauformen sorgfältig gegeneinander abzuwägen. Weiterhin muß besonders die Auslegung des Begasungssystems daraufhin abzielen, eine ausreichende blasenfreie Sauerstoffversorgung jederzeit zu erreichen bzw. zu gewährleisten. Aus den experimentellen Untersuchungen geht hervor, daß durch die unterschiedlichen Transportwiderstände bei verschiedenartigen Membranen und Strömungsverhältnissen eine Auslegung der Membranoberfläche durch Abschätzungen nicht ausreicht. Hierdurch können - im Einzelfall sehr kostspielige - Fehlkonstruktionen entstehen. Daher wird im folgenden an Hand von Beispielen beschrieben, wie sich eine gezielte Auslegung bei Vorgabe der Randbedingungen (zellspezifische Verbrauchsdaten, Reaktorgröße, Zelldichte usw.) gestaltet. Hierbei sei erwähnt, daß das vorliegende Auslegungsprogramm eine Vielzahl von Parametervariationen zuläßt. An dieser Stelle soll sich die Betrachtung auf wenige, das Verständnis fördernde Beispiele beschränken.

8.1 Bauform

Der Aufbau der Begasungseinheiten aller bislang konstruierten Wirbelschichtreaktoren mit reaktor-integrierter Sauerstoffversorgung ist gleich. Hierbei werden, im Gegensatz zu anderen Schlauchbegasungssystemen, die folgenden Merkmale beibehalten:

- Die Anordnung der Schlauchmembranen im Reaktor erfolgt vertikal. So werden Toträume in der Wirbelschicht, wie diese bei Wicklungen auf der Schlauchrückseite auftreten, vermieden. Kriterien zur gleichmäßigen Anordnung von Membranen in Kreisquerschnitten wurden erstellt [135].
- Die Schlauchmembran wird vom Versorgungsgas kontinuierlich durchströmt. Die Zusammensetzung des Frischgases sowie der gaseitige Stofftransport können konstant gehalten werden.
- Die Membran wird ober- und unterhalb der Wirbelschicht umgelenkt. Nur bei der Installation großer Membranflächen (Membranlängen) erfolgt eine Segmentierung. So wird die Anzahl an Verbindungen (Kontaminationsquellen) gering gehalten.
- Die zylinderförmigen Reaktoren werden mit einem Begasungsmodul bestückt. Die Begasungseinheit kann somit reaktorextern montiert werden. Für unterschiedliche Verbrauchsdaten der Zellen können so Membranmodule mit verschiedenartigen Schlauchtypen vorbereitet werden.

Verteilerplatten/Membranfixierung: Ein wesentlicher Kritikpunkt an Schlauchbegasungen zielt auf die großen Schlauchlängen, die bei den bisher verwendeten Silikonmaterialien für eine ausreichende Gasversorgung benötigt werden. Hiermit eng verknüpft ist die Problematik der Doppelfunktion des Bodens und seiner Komplexität als Fixierung für die Begasungsschläuche sowie als Verteiler (Lochboden, Ringspalt). Verteilerböden sind jedoch bei großen Wirbelschichtreaktoren stets notwendig, auf positive Erfahrungen aus Chemiereaktoren kann hierbei zurückgegriffen werden [155].

Daher wird die zu begründende Wahl zwischen einem vom Gas mit Gleichstromcharakter durchflossenen Membranbündel, selbsttragenden Membranelementen (z.B. Membrankerzen) oder langen Schlauchmembranen mit Umlenkungen erforderlich. Der mögliche Weg, die Fixierung der Schläuche direkt in einen Anströmkonus zu integrieren, wurde untersucht, jedoch aus konstruktiven Gründen wieder verworfen [166].

Für den hier vorliegenden Fall muß die vertikal angeströmte Membraneinheit eine homogen fluidisierte Wirbelschicht aufnehmen, das heißt, bei einer Fixierung der Schlauchmembran am unteren Reaktorende muß in weiterer Funktion die gleichmäßige Anströmung einer Wirbelschicht gewährleistet sein. Gleichzeitig ist eine eindeutige Trennung zwischen Gas- und Flüssigphase (Sterilitätsgründe, Vermeidung von Blaseneintrag) konstruktiv zu verwirklichen. Nach Auskunft eines Herstellers für Spezialartikel aus Silikonmaterial [140] können komplexe Bauteile jeder Art aus Silikon hergestellt werden, im vorliegenden Fall wäre (neben ökonomischen Überlegungen) die Wahrscheinlichkeit für Fertigungsfehler auf Grund der hohen Anzahl an Verbindungen und Durchführungen wesentlicher Grund gegen diese Vorgehensweise.

Selbsttragende Membrankerzen gewinnen gegenüber einer Schlauchbegasung nur dann einen Vorteil, wenn sie lediglich am oberen Reaktorende fixiert werden müssen. In diesem Fall kann zur Fluidisierung der Wirbelschicht ein einfacher, separater Anströmboden verwendet werden. Diese Technik entspricht dann in bezug auf die Begasung einem „dead end“-Modul, was zeitlich gesehen immer mit einer Anreicherung von rückpermeierendem Fremdgas (bzw. Wasserdampf) verbunden ist. Die kommerziell erhältlichen Membrankerzen, die auf Grund ihres großen Durchmessers (geringe volumenspezifische Membranfläche) mit Reinsauerstoff oder mit Druckluft betrieben werden, können eine blasenfreie Begasung nicht zuverlässig gewährleisten.

Aussichtsreich ist der Ansatz der selbsttragenden Membran für den Zellkulturbereich nur dann, wenn die Gasphase druckfrei gefahren werden kann. Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit verfolgt, nachdem entsprechende Membranen (vgl. Kap. 5.1, Membran M2) ermittelt werden konnten. Sie sind für eine Umlenkung der Schlauchmembran selber nicht geeignet, auf Grund der erheblichen Reduzierung der Membranflächen scheint die Anzahl an auszuführenden Verbindungsstellen jedoch vertretbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vorwiegend die Umlenktechnik der Schlauchmembranen eingesetzt. Bei dem zunächst gebauten Wirbelschichtreaktor mit einem Durchmesser von 50 mm werden 16 parallele Schlauchmembranen benötigt, dies entspricht insgesamt 15 Umlenkungen der Membran, sowie zwei Verbindungsstellen im Reaktor. Hierbei sei hervorgehoben, daß sich diese Anzahl bei einer längenmäßigen Erweiterung des Reaktors nicht erhöht, so daß mit dieser einfachen Technik Reaktoren im Maßstab von 1-3 Liter sehr leicht gebaut werden können. In diesem Fall dient die untere Fixierungsplatte gleichzeitig als Anströmboden.

Bei dem neuentwickelten 15-Liter-Reaktor kann diese Technik so nicht übernommen werden. Die zahlreichen Umlenkungen der Schläuche unterhalb der Anströmzone würden in diesem Fall dazu führen, daß die Öffnungen des Flüssigkeitsverteilers häufig von Umlenkungen verdeckt werden. Daher wurde in diesem Fall eine Aufteilung der beiden obengenannten Funktionen auf zwei hintereinanderliegende Platten realisiert [135].

Nach der ungleichförmigen Passage des Kreislaufstromes durch die untere Umlenkplatte (siehe Abb. C.6, S. 129) gelangt die Flüssigkeit in einen Sammelraum des Reaktorbodens (vergleiche Abb. C.7, S. 130, unterer Bildteil). Von diesem Raum wird sie dann entlang der nun parallel geführten und regelmäßig verteilten Schlauchmembranen durch den eigentlichen Verteilerboden (siehe ebenfalls Abb. C.6, S. 129, die großen Öffnungen stellen die Schlauchdurchführungen, die kleineren die Flüssigkeitsöffnungen dar) transportiert. Somit kann eine gleichmäßige Anströmung gewährleistet werden.

Mit dem beschriebenen Reaktor wird mittlerweile erfolgreich fermentiert. Es ist bei einer Betrachtung des Systems offensichtlich, daß es sich hierbei um ein konstruktiv sehr anspruchsvolles System handelt. Hierzu sei jedoch in Erinnerung gerufen, daß für die blasenfreie Begasung von Wirbelschichtfermentern kein Alternativsystem existiert. Jede Verbesserung der Membran führt durch eine Reduzierung der Membranfläche zu einem einfacheren System.

Basierend auf den vorgenannten Überlegungen wurde in dieser Arbeit unter besonderer Berücksichtigung einer späteren Maßstabsvergrößerung die zuvor beschriebene Technik gewählt.

8.2 Zur Auslegung einer reaktorintegrierten blasenfreien Begasung

Im folgenden wird besonders die Auswirkung der Membranparameter auf die Auslegung eines Begasungssystems diskutiert. Die Berechnungen (vgl. Kap. 4.4 und Anh. D) stützen sich dabei auf abgesicherte Werte für die Stoffübertragung, die zuvor in Versuchsreihen ermittelt wurden (vgl. Kap. 5). Für den in Frage kommenden Maßstab zu einer Maßstabsvergrößerung wird bei der Wirbelschichttechnik an Volumina in der Größenordnung von 100 l gedacht. Zu diesem Bereich werden an Hand von Beispielen Auslegungsvorschläge gemacht. Dabei wird von Randbedingungen ausgegangen, die zellkulturverträgliche Bedingungen widerspiegeln. Bei variablen Parametern wird in der Regel von Extrembedingungen ausgegangen (z. B. Zelldichte im Träger).

Bei den anschließenden Überlegungen müssen einige wesentliche Annahmen zu Grunde gelegt werden, um die in Anh. D ausführlich vorgestellten Berechnungen auf den Fall der blasenfreien Permeationsbegasung sinnvoll anzuwenden. Es wurde von den folgenden Voraussetzungen ausgegangen¹:

- Es wird festgelegt, daß durch die Begasung des Reaktors am Kopf der gleiche Sauerstoffpartialdruck vorliegt wie am Reaktorboden. Ein darüber hinausreichender Sauerstoffeintrag führt auf Dauer zu einem Anstieg des Eingangspartialdrucks. In der Praxis wurde genau diese Vorgehensweise realisiert und durch Messungen vor und hinter dem Reaktor bestätigt.
- Der Sauerstoffverbrauch oberhalb der Wirbelschicht durch frei suspendierte Zellen kann bei der Berechnung berücksichtigt werden. Bei den folgenden Beispielen konnte dieser Term nach entsprechenden Prüfungen vernachlässigt werden, da hier stets von einem hohen Befüllungsgrad der Fermenter mit Wirbelkörpern ausgegangen wurde.
- Die Sauerstoffzufuhr über das Frischmedium wird nicht berücksichtigt.
- Für den Durchmischungszustand wurde auf Grund der homogenen Fluidisierung und basierend auf Erfahrungen an einem Teststand zur Messung der Verweilzeit (an einem begasten Reaktor ohne Verbraucher) bezüglich des Sauerstoffs von einer Strömungsrohr-Charakteristik ausgegangen.

Der Berechnungsgang sei mit der Indizierung der Abb. D.1, S. 134 bereits an dieser Stelle wie folgt skizziert: In den Reaktor tritt ein Volumenstrom $\dot{V}$ mit der Konzentration c_{α} in den Bilanzraum

¹Die entsprechenden Annahmen werden bei den Versuchen jeweils kurz wiederholt.

ein. Über die Höhe der Wirbelschicht h wird durch die Schlauchmembran der Sauerstoffstrom $\dot{n}'''_{1\alpha}$ zugeführt, die immobilisierte Kultur verbraucht in der gleichen Zeit die Stoffmenge $\dot{n}'''_{1\omega}$ Sauerstoff. Der Austrittszustand des Flüssigvolumenstroms mit der Konzentration c' gelangt nun in den oberen Teil des Reaktors, die frei suspendierten Zellen entnehmen die Stoffmenge $\dot{n}'''_{2\omega}$. Auch in diesem Bereich wird Sauerstoff (der Menge $\dot{n}'''_{2\alpha}$) zugeführt. Durch eine differentielle Bilanz kann so das lokale Niveau des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb und außerhalb des Reaktors bestimmt werden.

8.2.1 Der Einfluß von Einzelparametern/Modellierung des Sauerstoffgefälles

Variationsparameter: Schlauchdurchmesser In einem ersten Auslegungsbeispiel soll betrachtet werden, welche Anzahl an parallel geführten Schlauchmembranen für unterschiedliche Reaktorvolumina installiert werden müssen (siehe Abb. 8.1). Hierzu werden die Wandstärke ($\delta_M = 0.32$ mm) der Membran und ein maximaler Druck auf der Gasseite von einem bar absolut (also Umgebungsdruck) vorgegeben. Dies begründet sich durch die Tatsache, daß sich bei großen Schlauchdurchmessern und gleichzeitig geringer Wandstärke die Membran aufbläht, bzw. im Fall der glasfasergestützten Membran sich diese vom Stützgewebe ablöst. Variiert wird der Außendurchmesser der Membranschläuche.

Die Abbildung zeigt zunächst, daß mit steigendem Reaktorvolumen bei konstantem Verhältnis von Höhe zu Durchmesser (H/D) die Anzahl an benötigten Schläuchen gleichen Durchmessers relativ abnimmt. Dies ist leicht einzusehen, da der Durchmesser im Vergleich zum Volumen unterproportional zunimmt, eine größere Reaktorlänge jedoch keine Erhöhung der Schlauchzahlen benötigt. Je größer der Schlauchdurchmesser gewählt wird, desto stärker macht sich dieser Effekt bei großen Reaktoren bemerkbar. Zur Anzahl der Schläuche läßt sich feststellen, daß bei den erstmalig getesteten dünnen Membranwänden die Menge an parallelen Schläuchen auch bei großen Reaktoren durchaus handhabbar wird. Hierzu sei erwähnt, daß die hier vorgestellten Wandstärken auch für Schläuche im Durchmesserbereich bis 30 mm erhältlich sind, hierbei also noch erheblich weniger Schläuche benötigt werden.

Im unteren Teil von Abb. 8.1 wird beispielhaft die Auslegung eines Reaktors mit einem Volumen von 30 Litern herausgegriffen, um den Verlauf der Sauerstoffkonzentration über die Reaktorhöhe darzustellen. Hierbei wird von der Randbedingung ausgegangen, daß im Reaktor keine axiale Rückvermischung stattfindet. Diese Vereinfachung trifft in dieser Strenge sicherlich nicht die Realität, sie ermöglicht jedoch die Darstellung des maximalen Gefälles im Wirbelschichtreaktor.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß die Verläufe der Sauerstoffkonzentration für die unterschiedlichen Schlauchzahlen und -durchmesser nicht übereinstimmen. Bereits rein rechnerisch ergeben sich unterschiedliche Oberflächen in und oberhalb der Wirbelschicht für die beiden hier untersuchten Fälle.

Der Grund für die Abweichungen ergibt sich aus einer genaueren Betrachtung von Abb. 5.9, S. 73. Hieraus ist zu entnehmen, daß bei einem größeren Außendurchmesser der Membran in der Wirbelschicht ein geringerer flüssigseitiger Widerstand auftritt als bei der Membran mit dem kleineren Durchmesser. Hierbei handelt es sich um einen Geometrieinfluß. Oberhalb der Wirbelschicht dreht sich dieses Verhalten um, so daß mit den hier gewählten Auslegungsparametern der Eingangszustand in den Reaktor wieder erreicht wird. Die Summe der Gesamtwiderstände ist bei dem Schlauch größeren Durchmessers etwas geringer, hierdurch wird die benötigte Membranfläche etwas reduziert.

Die Bedingung der gleichen Ein- und Austrittszustände wird durch das Auslegungsprogramm berücksichtigt. Sie muß auch bei maximalen Eintragsbedingungen erfüllt sein, da sonst ein stationärer Betrieb des Reaktors nicht gewährleistet werden kann. Diese Aussage impliziert eine Reduzierung der Bilanz für den Sauerstoff auf das Reaktorgefäß, der Kreislauf wird hierbei nicht betrachtet.

Tatsächlich wurde zunächst überprüft, ob bei extrem kurzen Verweilzeiten durch das Frischme-

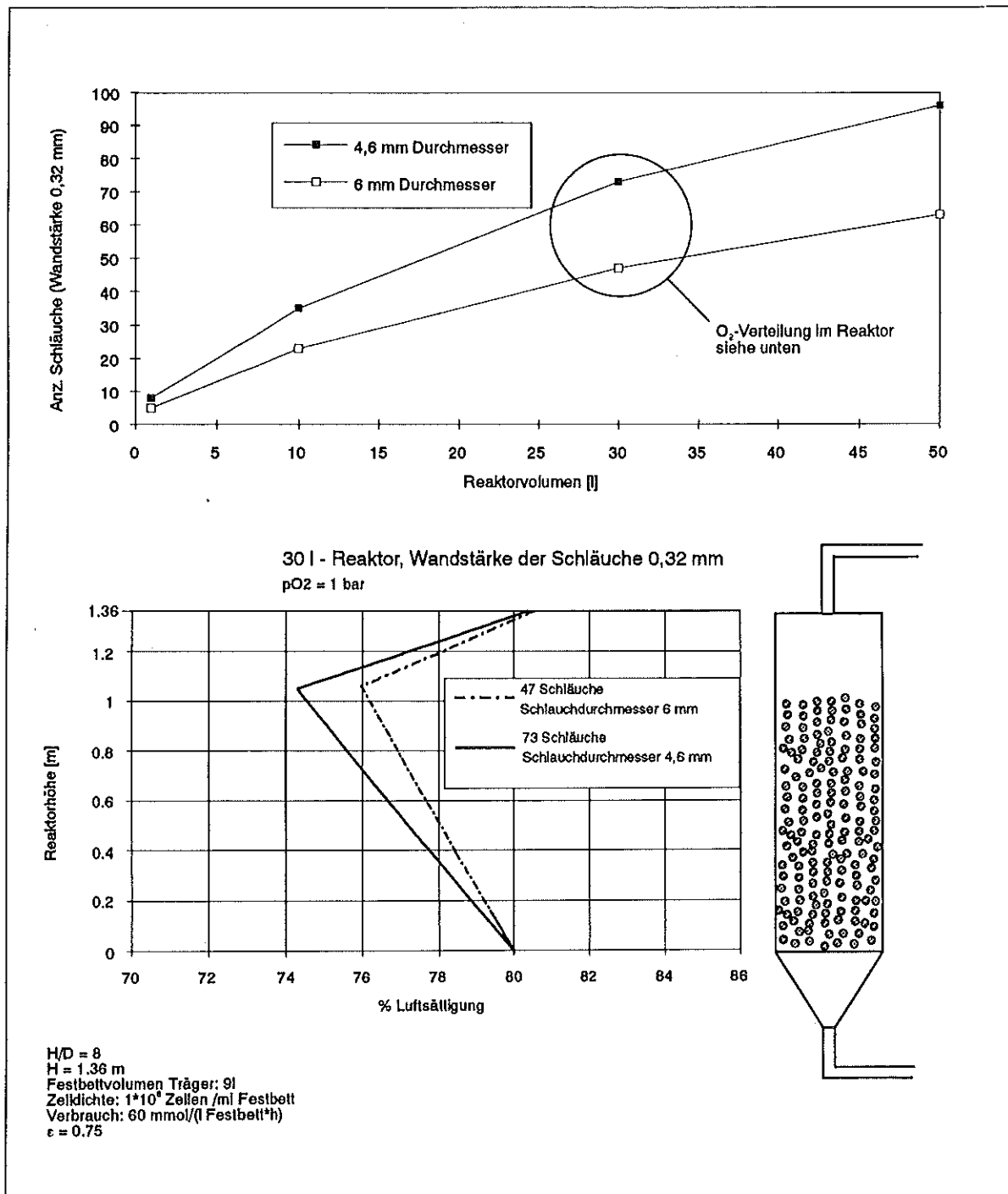


Abbildung 8.1: Benötigte Anzahl an Schläuchen gleicher Wandstärke bei unterschiedlichen Außendurchmessern

dium ebenfalls ein zu beachtender Anteil zur Begasung geleistet wird. Dies ist nicht der Fall, selbst durch Medienkompression kann kein relevanter Anteil an Membranfläche eingespart werden. Hinzu tritt die Aussage, daß in kontinuierlichen Systemen eine **Verlängerung** der Verweilzeit aus Gründen der Handhabbarkeit und der Ökonomie angestrebt wird und nicht die gegenläufige Tendenz.

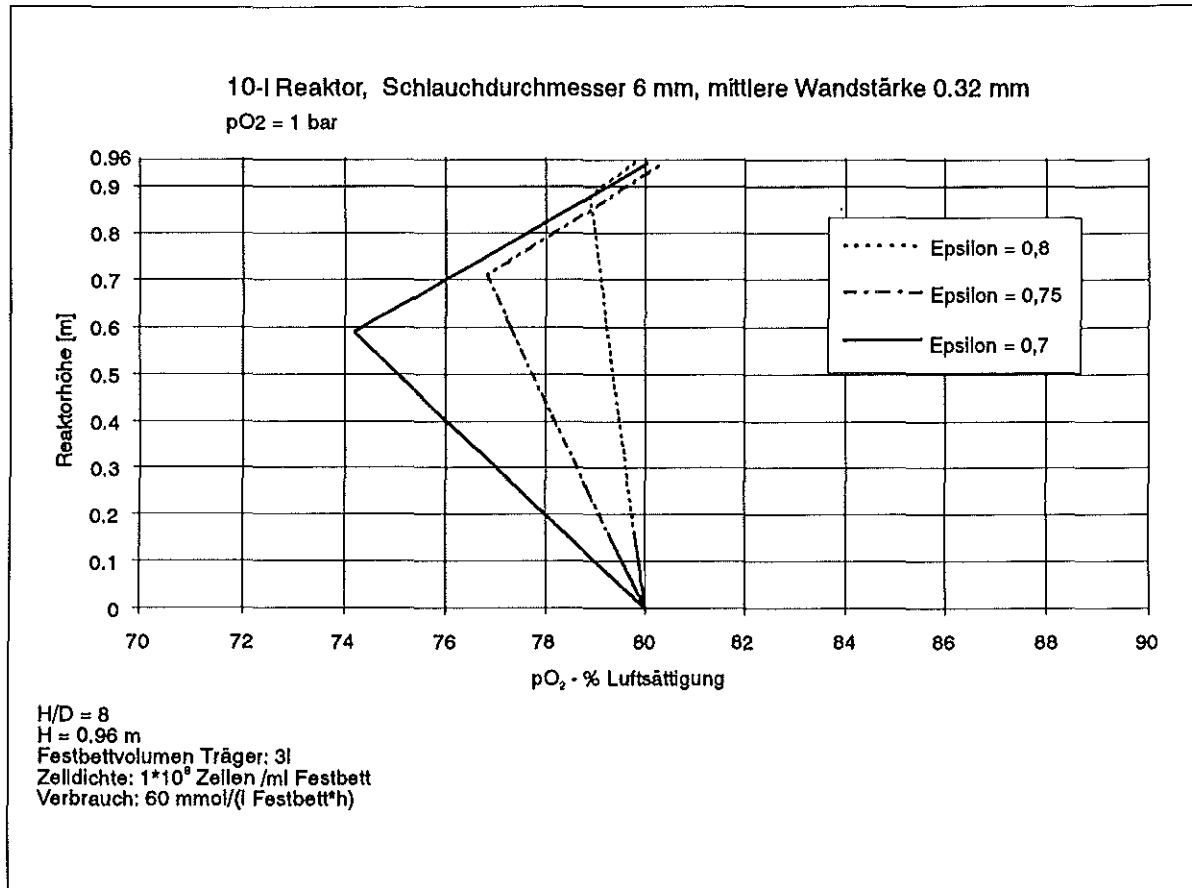


Abbildung 8.2: Variation des Hohlraumanteils in der Wirbelschicht

Variationsparameter: Hohlraumanteil Aus Abb. 8.1 war zu entnehmen, daß am Ende der Wirbelschicht der Verlauf der Konzentration für den Sauerstoff abknickt, bis zum Reaktorkopf also wieder ein Anstieg verzeichnet werden kann. Dies läßt sich dadurch begründen, daß die Zelldichte in der Flüssigphase über der Wirbelschicht wesentlich geringer ist als die Besiedlungsdichte im Träger. Da, wie zuvor bereits beschrieben, über der Wirbelschicht jedoch Gas in den Reaktor eingetragen wird und der ein- und austretende Volumenstrom die gleiche Sauerstoffkonzentration aufweisen muß, ist das Gefälle im Reaktor also im wesentlichen nur durch den trägerfreien Raum im Reaktorkopf bedingt.

Abb. 8.2 veranschaulicht diesen Sachverhalt. Hier wird für unterschiedliche Expansionsgrade des Fließbettes bei sonst gleichen Randbedingungen das Gefälle für die Sauerstoffkonzentration gezeigt. Ähnliche Effekte sind durch verschiedene Füllungsgrade eines Reaktors zu beobachten. Bei der Befüllung eines 100-Liter Reaktor mit nur 10 Liter Wirbelgut muß also überprüft werden, ob das installierte Begasungsmodul hierzu geeignet ist.

Auch in dieser Darstellung wurde als Basisniveau für die Sauerstoffsättigung ein Wert zu 80 %

des Sättigungswertes festgelegt. Es ist ersichtlich, daß bei einer nahezu vollständigen Füllung des Reaktors (hiermit ist gemeint, daß das expandierte Wirbelbett den Reaktor vollständig ausfüllt) bei entsprechender Auslegung ein gradientenfreier Betrieb erreicht wird. Hierbei wurde vereinfachend angenommen, daß sich die flüssigseitigen Übergangswiderstände in dem untersuchten Intervall durch den Hohlraumanteil in der Wirbelschicht nicht signifikant ändern.

Variationsparameter: Wandstärke Zeitlich vor der Bestückung eines Moduls mit Membranen eines festen Durchmessers ist sicherlich die Frage zu behandeln, welche Wandstärke geeignet ist, um einen ausreichenden Gaseintrag bei blasenfreier Begasung zu gewährleisten. Nach der Auswahl des Membranwerkstoffs und der Klärung der Verfügbarkeit müssen gerade für eine begründete Auswahl der Membranen die Voruntersuchungen zum Widerstandsverhalten der einzelnen Transportphasen mit in die Überlegungen einbezogen werden.

Abb. 8.3 zeigt im oberen Bildteil exemplarisch die Ergebnisse der Auslegungsrechnungen für einen Außendurchmesser der Membran von 4.6 mm. Die Randbedingungen wurden zur Erleichterung des Vergleichs zum Einfluß einzelner Parametervariationen gegenüber Abb. 8.1 nicht verändert.

Die abnehmende Steigung der Kurven begründet sich erneut darin, daß die mit einer Volumenvergrößerung zunehmende Reaktorlänge bei konstantem H/D-Verhältnis keine Erhöhung der Schlauchdichte über den Reaktorquerschnitt bewirkt. Desweiteren wird deutlich, daß, solange der Stofftransport über und in der Wirbelschicht membrankontrolliert bleibt, die Anzahl der Schläuche erheblich zu reduzieren ist, indem eine dünnere Membran gewählt wird. Im vorliegenden Fall kann bei einem 30-Liter-Reaktor eine effektive Einsparung an Reaktorvolumen von etwa 2 Litern durch die Wahl einer günstigeren Membran erreicht werden. Die hohe Anzahl von Schlauchmembranen, die in dem Auslegungsbeispiel berechnet wird, muß in diesem Fall dahingehend genutzt werden, einen größeren Membrandurchmesser als den hier gewählten zu erwägen, da die Bestückung eines Begasungsmoduls mit Schlauchzahlen größer als 50 spezielle Montierhilfen erfordert.

Auch für dieses Auslegungsbeispiel wurde im unteren Bildteil von Abb. 8.3 der Verlauf der Sauerstoffkonzentration für den Fall eines 30-Liter-Reaktors dargestellt. Die berechneten Gefälle liegen in der grafischen Darstellung nahezu aufeinander. Die Abweichung bei dem Umschlagpunkt zum Anstieg des Sauerstoffs ist dadurch zu erklären, daß durch das größere Schlauchvolumen bei gleichem Expansionsgrad bei der größeren Schlauchanzahl die Höhe der Wirbelschicht geringfügig ansteigt.

Die absolute Differenz zwischen Eintrittskonzentration und der Konzentration am Umschlagpunkt beträgt etwa 6% Luftsättigung. Dieser Wert stellt bereits die Grenze dar, bei deren Erreichen an eine neue Auslegungsrechnung mit verändertem Parametersatz gedacht werden sollte.

Vorgabe eines maximalen Drucks auf der Gasseite Hier muß – wie bereits zuvor erwähnt – beachtet werden, daß sich die Geometrie der Begasungsmembran während der Druckbelastung nicht relevant ändert. In diesem Fall verkleinert sich der eigentliche Reaktionsraum, die Höhe der Wirbelschicht nimmt zu und der Prozeß wird ungeplant gestört. Daher müssen die verwendeten Membranen unter Realbedingungen² auf ihre Druckstabilität getestet werden.

Weiterhin sei vorab darauf hingewiesen, daß eine Permeationsbegasung in einem Wirbelschichtreaktor für die Zellkulturtechnik auf Grund der sonst zusätzlich anfallenden Sicherheitsvorkehrungen nicht mit einem Druckniveau größer als 2 bar beaufschlagt werden sollte.

Auch dieses Beispiel stellt nur für einen Satz ausgewählter Randbedingungen den gefragten Sachverhalt dar. Hierbei wurde eine bereits unnötig starke Membran ausgewählt, um den gewünschten Effekt bis zu einem Überdruck von 1.0 bar sichtbar zu machen. Abb. 8.4 zeigt für einen Reaktor

²Hierbei wird bei verstärkten oder mehrschichtigen Membranen insbesondere an den Zustand nach der Heißdampfbehandlung gedacht.

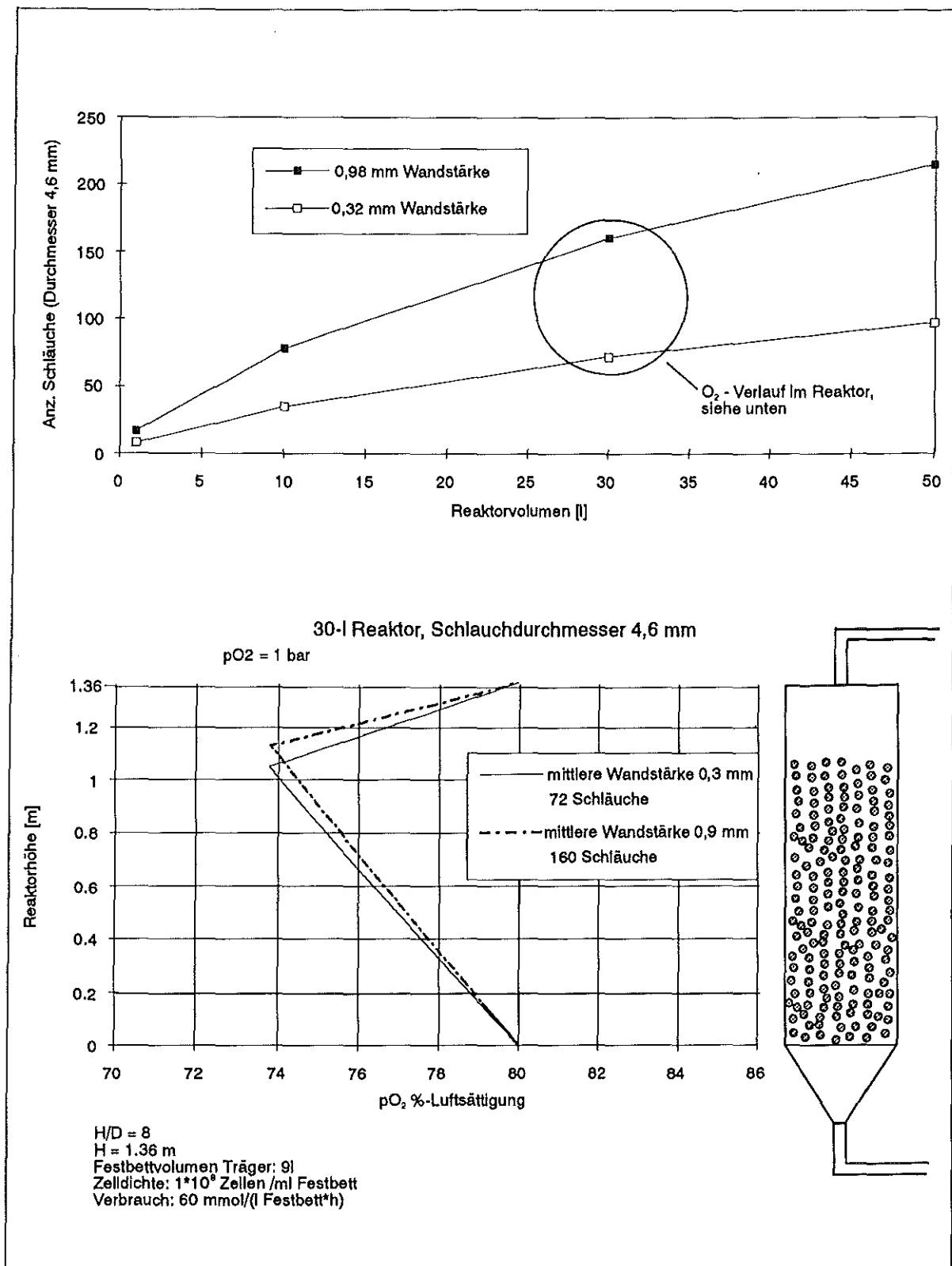


Abbildung 8.3: Benötigte Anzahl an Schläuchen gleichen Durchmessers bei verschiedenen Wandstärken

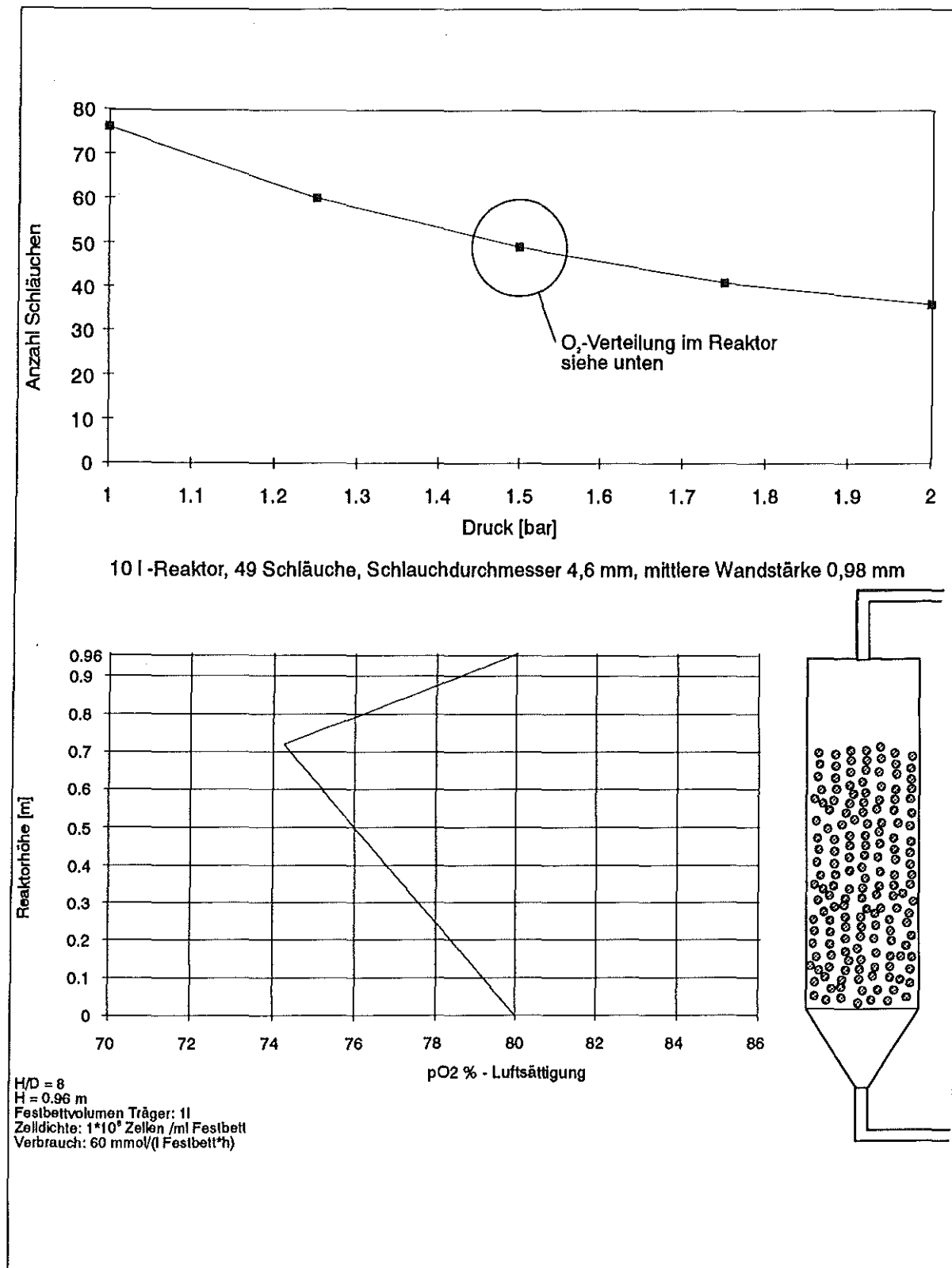


Abbildung 8.4: Benötigte Anzahl an Begasungsschläuchen bei Vorgabe eines Maximaldrucks

mit 10 Liter Gesamtvolumen, daß sich bei Vorgabe des doppelten Sauerstoffdrucks als Auslegungsparameter die Anzahl der zu installierenden Schlauchmembranen um die Hälfte verringern läßt. In diesem Fall muß gemäß der Ausführungen in Kap. 5.2.4, S. 74 zusätzlich überprüft werden, ob ein blasenfreier Betrieb bei Überdruck gewährleistet werden kann, oder ob der eingetragene Stoffstrom auf eine größere Membranfläche zu verteilen ist.

Der untere Bereich von Abb. 8.4 zeigt auch für diesen Fall den Verlauf der Sauerstoffkonzentration über den Reaktor in Fließrichtung. Es wird wiederum deutlich, daß zum bestmöglichen Betrieb des Fermenters die Wirbelschicht den Reaktor weitgehend ausfüllen sollte, wenn über den Bereich der Membran oberhalb der Wirbelschicht Sauerstoff eingetragen werden kann. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß dieser Effekt prinzipiell vermieden werden kann, die Membran hierzu jedoch in ökonomisch nicht vertretbarer Weise modifiziert werden muß.

Die vorangehenden Beispiele verdeutlichen, daß zur Konstruktion einer Begasungseinheit für die reaktorintegrierte blasenfreie Sauerstoffversorgung von Wirbelschichtfermentern eine Bandbreite an Möglichkeiten zur Verfügung steht, um ein System sicher und zuverlässig auszulegen. Die notwendigen Übergangs- und Durchgangskoeffizienten für den Stofftransport stehen zur Verfügung. Durch die Bereitstellung eines Auslegungsprogramms können sowohl Begasungssysteme neu entworfen als auch Zustände während der Fermentationen oder das Verhalten neuer Begasungsmembranen simuliert werden.

Kapitel 9

Zusammenfassung & Ausblick

Zweiphasige Wirbelschichtreaktoren können in der Zellkulturtechnik für zahlreiche Zelllinien vorteilhaft eingesetzt werden. Diese — im Vergleich zu den traditionellen Verfahren — neue Technologie unterstützt die anspruchsvolle Fermentation von Säugerzellen, indem sie den Organismen eine geeignete Umgebung zur Produktion bereitstellt. Bestmögliche Ergebnisse liefert das Verfahren dann, wenn vertiefte Kenntnisse über den Stoffwechsel der Zellen und ihr Besiedelungsverhalten auf und in der porösen Festphase vorliegen. Das Verfahren ist in der Lage, auch bei hohen Zelldichten eine bestmögliche Versorgung der Zellen zu gewährleisten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von Wirbelschichtfermentern und ihrer verfahrenstechnischen Auslegung. Es wurden hierzu u. a. umfassende Experimente zur Charakterisierung der Systeme, zur Überprüfung ihrer Leistungsfähigkeit und zur Gewährleistung einer möglichen Maßstabsübertragung durchgeführt. Die wichtigsten Resultate der vorliegenden Arbeit können den folgenden Bereichen zugeordnet werden:

Erarbeiten der Grundlagen

- Aus der Betrachtung der Entmischungsmechanismen für die Träger im Reaktor werden Maßnahmen zur homogenen Verteilung der Träger abgeleitet.
- Es wird gezeigt, daß zu einer genauen Beschreibung der Flüssigphase die Löslichkeit des Sauerstoffs im Kulturmedium bekannt sein muß. Die Partialdruckmessung gibt keinen direkten Aufschluß auf die Konzentration.
- Der Stofftransport des Sauerstoffs über die Begasungsmembran wird durch eine einfache Transportgleichung beschrieben. Alle notwendigen Parameter zur Berechnung des Stoffdurchgangs sind ermittelt oder durch die Literatur zugänglich.

Experimente zum Stofftransport

- Es wird nachgewiesen, daß für Stoffeintragsmessungen Wasser als Modellflüssigkeit an Stelle des Zellkulturmediums verwendet werden kann.
- Im vollständig fluidisierten Fließbett ($u_l = 0.01 - 0.02 \text{ m/s}$) besitzt die Leerrohrgeschwindigkeit keinen Einfluß auf den Stoffdurchgang.
- In der Wirbelschicht wird durch eine Reduzierung der Membranstärke von 0.98 mm auf 0.32 mm eine Minderung des Stofftransportwiderstands um 59 % erreicht. Der Anteil des Membranwiderstands fällt hierbei von 63 % auf 32 %.

- Das Einbringen einer Wirbelschicht in eine Ringspaltströmung mindert den Gesamtwiderstand für den Stoffdurchgang um 62 % ($\delta_M = 0.32 \text{ mm}$) bzw. 32 % ($\delta_M = 0.98 \text{ mm}$).
- Bei einem gasseitigen Überdruck muß das Widerstandsverhalten der Transportphasen bekannt sein, um einen blasenfreien Betrieb zu gewährleisten.
- Der gemessene Sauerstoffeintrag kann durch die Transportgleichungen zufriedenstellend beschrieben bzw. angenähert werden.

Zellkulturfermentationen

- Es können sowohl adhärenzte Zellen als auch Suspensionszellen mit den getesteten Trägertypen (Glas, Kollagen) fermentiert werden.
- In einem Fermenter mit reaktorintegrierter blasenfreier Begasung wurden 8 Fermentationen (300 – 1100 Stunden) durchgeführt. Bei der Kultivierung der CHO-Zelle kann auf die Zugabe von Serum während der Fermentation verzichtet werden.
- Die Animpfdichte und der Anfahrvorgang beeinflussen wesentlich die Zeit, nach der ein Reaktor einen stabilen Prozeßzustand erreicht.
- Die Trägergröße bestimmt die Gesamtzellzahl in einem Reaktor. Die Verwendung großer Träger birgt die Gefahr, daß im Trägerinnern auf Grund von Transportlimitierungen nekrotische Bereiche entstehen.

Berechnungen zur Auslegung

- Es wurde ein Auslegungsprogramm entwickelt, mit dem Systeme zur reaktorintegrierten Permeationsbegasung berechnet werden können.
- Beispiele zu den wichtigsten Parametervariationen veranschaulichen auf der Basis gesicherter Meßwerte den Einfluß der Einzelparameter.
- Gradienten, die bei einer Teilnutzung des Reaktorraums auftreten (unvollständige Füllung mit Wirbelgut), können im voraus ermittelt werden.

Es wurden Wirbelschichtreaktoren in drei Maßstäben gebaut (0.15 l, 0.6 l, 15 l). Hierbei bleibt festzustellen, daß sich die Leistungsfähigkeit der Fermenter auch im Langzeitbetrieb gezeigt hat. Eine reaktorintegrierte Begasung bedeutet aus ökonomischer Sicht stets einen zusätzlichen Kostenfaktor und sollte erst in einem Maßstab eingesetzt werden, bei dem eine externe Begasung die Versorgung der Zellen nicht mehr gewährleisten kann. Dies ist jedoch häufig bereits bei Kleinfermentern über 0.5 Liter Reaktorvolumen der Fall.

Ausblick

Die hier vorgelegte Arbeit kann auf breitem Gebiet ihre mögliche Fortführung und Erweiterung erfahren. Im Mittelpunkt steht hierbei zunächst die Intensivierung der Untersuchungen zur bereits begonnenen Maßstabsvergrößerung der Reaktoren, da die Übertragung von Regeln aus verwandten Bereichen der Biotechnologie auf Grund der Besonderheiten des Systems *Säugerzelle* nur bedingt möglich ist. Nur auf diesem Wege kann die Akzeptanz für dieses Verfahren in Zukunft gesteigert und der Skepsis, die der Kombination von Wirbelschichttechnik und biologischen Systemen im allgemeinen entgegengebracht wird, begegnet werden. Im Zentrum der Untersuchungen sollte sicherlich zunächst der Begasungsaspekt stehen, der das Fließbettverfahren gerade im größeren Maßstab prägt.

Die Frage nach der Auswahl des bestmöglichen Trägers (sowie der Trägergröße) deutet sich bereits auch in dieser Arbeit an. Sie ist auf Grund des unterschiedlichen Verhaltens der Zelllinien nicht global zu beantworten. Für diesen Aspekt ist neben der reinen Stofftransportfrage im Träger (Substratzufuhr, Produkt- und Inhibitorausschleusung) zu thematisieren, ob die Produktqualität (Glykosilierung) durch eine mögliche Veränderung der Zellen im Trägerinnern beeinflusst wird. Einen weiteren Einfluß übt die Trägersauswahl sicherlich auf die Optimierung der Biomassekonzentration aus. An dieser Stelle besteht ein Bedarf an weiterführenden Untersuchungen.

Nachdem die zentrale Bedeutung der Substrate Glutamin, Sauerstoff und Glukose erkannt ist, bleibt zu untersuchen, in welchen Bereichen ihre Konzentrationen in Hinblick auf die Produktbildung angesiedelt werden müssen. Es wurde bereits beschrieben, daß auch ein Überschuß bei den Kohlenstoffquellen die Energieumwandlung der Zelle in eine Richtung lenkt, die dem Ziel einer hohen Produktbildung nicht dient. Weiterhin wird im Anschluß daran von Interesse sein, welche Komponente bei einer bestmöglichen Versorgung mit den Leitsubstraten limitierend wird. Die genannten Untersuchungen sind dem Bereich Medienoptimierung zuzurechnen.

Einen weiteren Schritt in Richtung der Prozeßoptimierung kann die online-Bestimmung der unterschiedlichen Kinetiken darstellen. Die auf anderen Gebieten unternommenen Ansätze [11] können durch die Verwendung einer zuverlässigen online-Bestimmung der Medienkomponenten aufgegriffen und fortgeführt werden.

Die Resultate dieser Arbeit unterstreichen, daß Fermentationen im Wirbelschichtreaktoren für die Zellkulturtechnik handhabbar sind. Die Möglichkeiten zu nachfolgenden Schritten, die im wesentlichen der Prozeßoptimierung dienen, sind, wie dies von anderen biotechnischen Verfahren bekannt ist, nahezu unbegrenzt.

Anhang A

Verwendete Formelzeichen und Abkürzungen

lateinische Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
a	Aktivität	–
a	Phasengrenzfläche	m^{21}
a	volumenspezifische Oberfläche	$\frac{1}{m}$
A_0	Querschnittsfläche	m^2
$\partial c_{O_2,M}$	Konzentration des Sauerstoffs in der Membranphase	$\frac{mol}{m^3}$
c_i	Molkonzentration der Komponente i	$\frac{mol}{m^3}$
d, D	Durchmesser	m
$D_{O_2,M}$	Diffusionskoeffizient für den Sauerstoff in der Membranphase	$\frac{cm^2}{s}$
E_d	Aktivierungsenergie	$\frac{J}{mol}$
f_i	Fugazität der Komponente i	Pa
g	Erdbeschleunigung	$\frac{kg \cdot m}{s^2}$
$g_i^{rein}(T, P^o)$	Gibbssche Enthalpie des reinen Stoffes bei Systemtemperatur und frei wählbarem Standarddruck	$\frac{J}{mol}$
h	Höhe der Flüssigkeitssäule	m
h	Fließbetthöhe	m
H	Parameter zur Bestimmung von Löslichkeiten	–
$H_{i,j}$	Henrysche Konstante des gelösten Stoffes i im Lösungsmittel j	Pa
H	Höhe	m
I	Parameter zur Bewertung der Ionenstärke	–
K	Stoffdurchgangskoeffizient	$\frac{m}{h}$

Symbol	Bedeutung	Einheit
K	Experimentell bestimmte Konstante zur Bestimmung von Löslichkeiten	$\frac{l}{g}$
k	Stofftransportkoeffizient	$\frac{m}{h}$
k	Bildungsrate/Zerfallskonstante	$\frac{1}{h}$
M	molare Masse	g/mol
n	Exponent	—
n	Lastvielfaches	—
n	Stoffmenge	mol
P	Permeabilität	$\frac{g \cdot mm}{cm^2 \cdot s \cdot bar}$
P	Gesamtdruck	Pa
P_j^s	Sättigungsdampfdruck des Gases im Lösungsmittel bei unendlicher Verdünnung	Pa
r	volumenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit	$\frac{mol}{m^3 \cdot h}$
r_a	Innenradius	m
r_i	Außenradius	m
r_m	Radius für den Stoffdurchtritt	m
$\mathcal{R}$	allgemeine Gaskonstante ($\mathcal{R} = 8,314 \frac{J}{mol \cdot K}$)	
R	Quell-/Senkenterm	$\frac{mol}{h \cdot l}$
T	Temperatur	K
u	Fluidgeschwindigkeit im Fließbett	$\frac{m}{s}$
u_l	Anströmgeschwindigkeit (Leerrohrgeschwindigkeit)	$\frac{m}{s}$
u_s	Sinkgeschwindigkeit des Einzelteilchens	$\frac{m}{s}$
$\tilde{V}_i$	Molvolumen	$\frac{m^3}{mol}$
$\bar{v}_i^\infty$	Partiell molares Volumen des gelösten Gases im Lösungsmittel bei unendlicher Verdünnung	$\frac{m^3}{mol}$
V	Volumen	m^3
w	Massenkonzentration	$\frac{g}{l}$
x	Molanteil in der flüssigen Phase	—
y	Molanteil in der Gasphase	—
Z	Partikelzahl	—
z	z-Koordinate	m

griechische Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
α^o	Bunsenkoeffizient	—
γ	Aktivitätskoeffizient	abhängig von ζ
δ_M	Charakteristische Dicke einer Schlauchmembran	m
δ	Membrandicke	m
Δc	Konzentrationsdifferenz	$\frac{\text{mol}}{\text{l}}$
ε	Hohlraumanteil	—
ζ	frei wählbares Konzentrationsmaß	nach Wahl
ϑ	Temperatur	^oC
μ_i^m	chemisches Potential	$\frac{\text{J}}{\text{mol}}$
μ^m	chemisches Potential der Komponente i in Phase m	$\frac{\text{J}}{\text{mol}}$
ν	kinematische Viskosität der Flüssigkeit	$\frac{\text{m}^2}{\text{s}}$
ω	azentrischer Faktor	—
ρ	Dichte	$\frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$
$\bar{\tau}$	mittlere Verweilzeit	s
v_z	Geschwindigkeitsanteil in Strömungsrichtung	$\frac{\text{m}}{\text{s}}$
φ	Fugazitätskoeffizient	—
Δp	Druckverlust der Schüttung	Pa

Ähnlichkeitskennzahlen

Symbol	Bedeutung	Definition
Ar	Archimedeszahl	$\frac{d_s^3 \cdot g \cdot (\rho_s - \rho_l)}{\nu^2 \cdot \rho_l}$
Fr	Froudezahl	$\frac{u_l}{\sqrt{d_s \cdot g}}$
Re_l	Partikelreynoldszahl	$\frac{u_l \cdot d_s}{\nu}$
Re_s	Reynoldszahl, gebildet mit der Sinkgeschwindigkeit der Partikel	$\frac{u_s \cdot d_s}{\nu}$
Sh	Sherwoodzahl	$\frac{k \cdot d_s}{D}$
Sc	Schmidtzahl	$\frac{\nu}{D}$
Ω	Strömungskennzahl	$\frac{u_l^3}{g \cdot \nu} \cdot \frac{\rho_l}{(\rho_s - \rho_l)}$

Indizes

Symbol	Bedeutung
.	Bezogen auf Zeit
"	Bezogen auf eine Fläche
'''	Bezogen auf ein Volumen
°	als Index: frei wählbarer Bezugszustand
<i>c</i>	kritische Größen
<i>i</i>	Komponente <i>i</i>
<i>i</i>	Bei der Löslichkeitsbestimmung: Salzkomponenten
<i>j</i>	Bei der Löslichkeitsbestimmung: organische Komponenten
<i>l</i>	Flüssigphase
<i>g</i>	Gasphase
<i>M</i>	Membranphase
<i>s</i>	Festphase (Wirbelteilchen)
<i>r</i>	Koordinatenrichtung
<i>r</i>	reduzierte Größen
<i>R</i>	Reaktor
<i>rein</i>	Reinstoff
<i>z</i>	Koordinatenrichtung
Θ	Koordinatenrichtung

Umrechnungsfaktoren

$$1 \text{ barrer} = 10^{-10} \cdot \frac{\text{cm}^3(STP) \cdot \text{cm}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{cmHg}} = 1.072 \cdot 10^{-10} \cdot \frac{\text{g} \cdot \text{mm}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{bar}}$$

[142], S.863-872

Anhang B

Geräte- und Chemikalienliste

FERMENTATIONSANLAGEN

Anlagenkomponente	Bezeichnung	Hersteller & Lieferant
Begasungseinheit		
Membran	Best. Nr. 22 805 752	BIW, Wuppertal
nylonummantelt, beschichtet		
Membran	Bezeichnung: GL, Si	BIW, Wuppertal
Stützelement: Glasfaser	5.4 +/- 0.1, 0.3 +/- 0.05	
Membranmodul	Eigenbau	Forschungszentrum Jülich
pH-Messung		
pH-Einstabmeßkette	Typ 465-20-K9	Ingold, Steinbach
pH-Wert-Meßverstärker	Typ PW Ri 2	Conducta, Gerlingen
und -regler		
Einbaugeber	InFit 767-19	Conducta, Gerlingen
Sauerstoffmessung		
Sauerstoffelektroden	Best.-Nr. 322 756 800	Ingold, Steinbach
Typ 70 mm		
O ₂ -Meßverstärker	Modell 170 air	Ingold, Steinbach
Filter		
Luftfilter	Typ 4210	Gelman Sciences, Dreieich
Medienfilter	Best. Nr. 523 13 07 H8P 00	Sartorius, Göttingen
Pumpentypen		
Membranpumpe	Typ MZ 2	Vacuubrand, Wertheim
Schlauchpumpe	Typ 101 U/R, 501 U/R	Verder, Düsseldorf
	Typ 604 U/R	

FERMENTATIONSANLAGEN

<u>Anlagenkomponente</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller & Lieferant</u>
Dosiersystem		
Präzisionswaage	Typ 4100 S	Sartorius, Göttingen
Dosierstrecke	Typ YFC 027	Sartorius, Göttingen
Temperierung		
Kompaktthermostat	Typ CS 20	Meßgerätewerk Lauda, Lauda
Kompaktthermostat	Typ KS 6D	
Externregler	R 22	Ahlborn Meß- und Regeltechnik, Holzkirchen
Temperaturfühler	PT 100-70	
Temperaturregler	Therm 4226-1	
Temperaturfühler	W 511 S	Winkler, Heidelberg
Heizband	WB 201/50/0160	
Durchflußmessung		
thermische Massendurch- flußmesser & -regler	Modell 5850 E	Brooks, Veenendaal, NL
Elektronik	Modell 5878 A2	Brooks, Veenendaal, NL
Analysesiebe	ø200	Fa. Retsch, Haan
Glasträger	Typ 521162987	Schott, Mainz
Borosilikatglas		
Statische Mischer	Typ SMV-2, DN 15 (PVDF)	Fa. Sulzer , Winterthur, Schweiz
Sterilkupplungen		Fa. Verax, Lebanon, USA
alle Fermentationsgefäße,	(eigene Konstruktionen)	Mech. Werkstatt, Forschungszentrum Jülich
Begasungsgefäße, Sondenhalterungen, Trägerprobenahmen, Medienprobenahme-Module		

FERMENTATIONSANLAGEN

<u>Anlagenkomponente</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller & Lieferant</u>
Druckmessung		
Druckaufnehmer	Schaevitz P 1041	Althen Mess- und Datentechnik, Kelkheim
Meßverstärker	ADG 3	
Druckaufnehmer	T 4043 A 10	Kistler Instruments, Schweiz
Meßverstärker	Typ 4601	
Druckregler	Modell 5866	Brooks, Veenendaal, NL
Meßdatenerfassung und Auswertung		
Personal Computer	IBM AT-3	CAE Electronics, Stolberg
Dateninterface	SMP SYS 51	Siemens, Düsseldorf
Meßdatenerfassung	MEAS	Forschungszentrum Jülich
Programmiersprache	Turbo Pascal 5.0	Borland Corp., USA
Betriebssysteme:	Concurrent DOS	Digital Research, USA
	DOS 5.0	Microsoft Corp., USA
alle Verrohrungen:		Dockweiler, Oststeinbek

ANALYTIK

Zentrifuge	GPKR	SmithKline Beckman, München
Glukose/Lakatanalysator	YSI 2000	Yellow Springs, USA
Gefrierpunkt-Osmometer	Osmomat 030	Gonotec, Berlin
Photometer	UV 160A	Shimadzu, Japan
Labormikroskop	Mikroplot	Nikon
Analysenwaage	AE 240	Mettler, Schweiz
HPLC	LCC 2252	Pharmacia, Schweden

VERSUCHSREAKTOREN

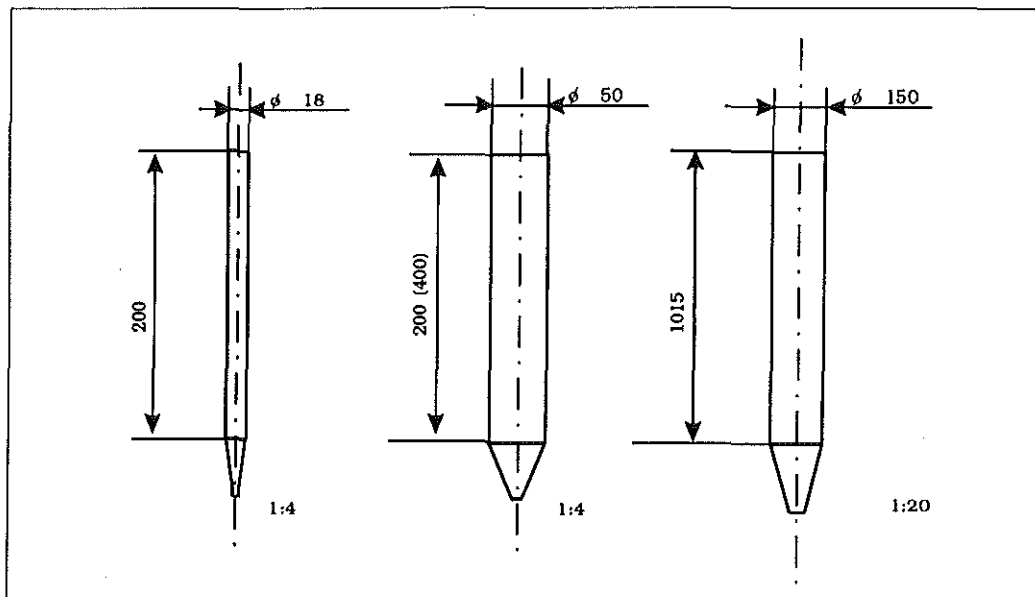


Abbildung B.1: Baugrößen der neuentwickelten Wirbelschichtreaktoren

BESTANDTEILE DES ZELLKULTURMEDIUMS

Medienkomponente	Menge [mg/l]	Medienkomponente	Menge [mg/l]
NaHCO ₃	2400	BSA	100
Ethanolamine	6.1	Fettsäuren	0.61
Na ₂ Se O ₃	$7.9 \cdot 10^{-5}$	Insulin	0.5
Hepes	2.4	Transferrin	0.5
Vitamine	32.6		

Tabelle B.1: Medienbestandteile (Teil 1)

BESTANDTEILE DES ZELLKULTURMEDIUMS

Medienkomponenten	Menge [mg/l]	Medienkomponenten	Menge [mg/l]
Aminosäuren		anorganische. Salze	
L-Alanin	2.23	CaCl ₂ (anhyd.)	158.31
L-Arginin * HCl	115.75	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	$7.5 \cdot 10^{-4}$
L-Asparagin * H ₂ O	3.75	Fe(NO ₃) ₃ * 9 H ₂ O	0.08
L-Asparaginsäure	3.73	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0.21
L-Cystein * H ₂ O * HCl	8.78	KCl	355.9
L-Cystin * 2 HCl	46.93	MgCl ₂ (anhyd.)	14.31
L-Glutaminsäure	3.68	MgSO ₄ (anhyd.)	73.25
L-Glutamin	474.50	NaCl	6700
Glycin	24.38	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	53.75
L-Histidin * H ₂ O * HCl	36.74	Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	35.51
L-Isoleucin	79.74	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0.22
L-Leucin	82.03		
L-Lysin * HCl	118.63	weitere Komponenten	Menge [mg/l]
L-Methionin	23.62	D-Glukose	3825
L-Phenylalanin	50.74	Liponsäure	0.05
L-Prolin	8.63	Phenolrot	11.55
L-Serin	34.13	Putrescin * 2 HCl	0.04
L-Threonin	74.23	Natriumpyruvat	27.5
L-Tryptophan	12.51	Hypoxanthin (Natriumsalz)	1.19
L-Tyrosin (Di-Natrium-Salz)	80.10	Linosäure	0.02
L-Valin	74.43	Thymidin	0.18

Tabelle B.2: Medienbestandteile (Teil 2)

Anhang C

Konstruktionszeichnungen und Photographien der Fermentersysteme

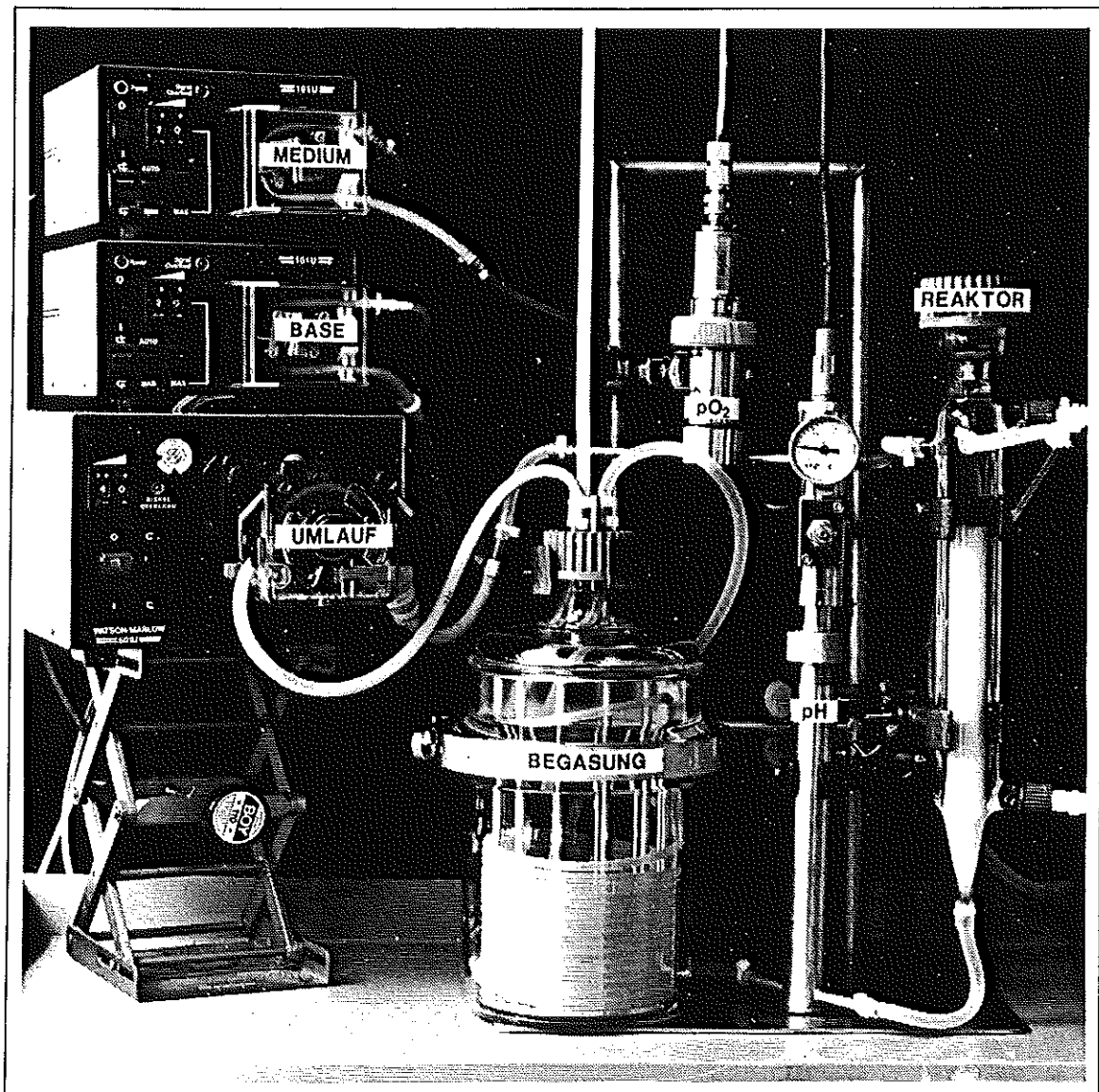


Abbildung C.1: Photo des 150-Milliliter-Wirbelschichtreaktors für die Zellkultur (externe Begasung)

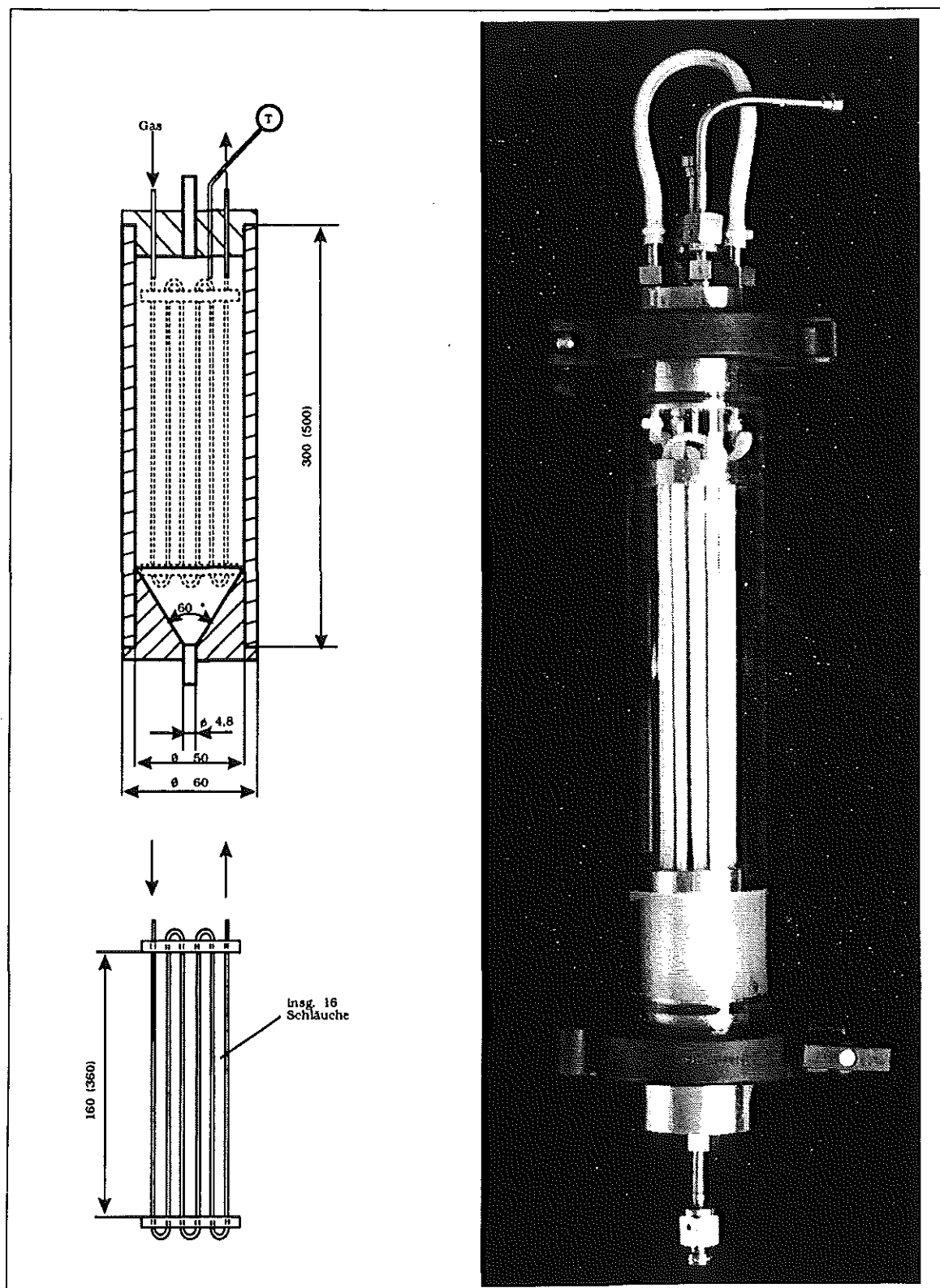


Abbildung C.2: Zusammenstellungszeichnung (links) und Photographie (rechts) des 0.5l/1l-Fermenters mit reaktorintegrierter Begasung

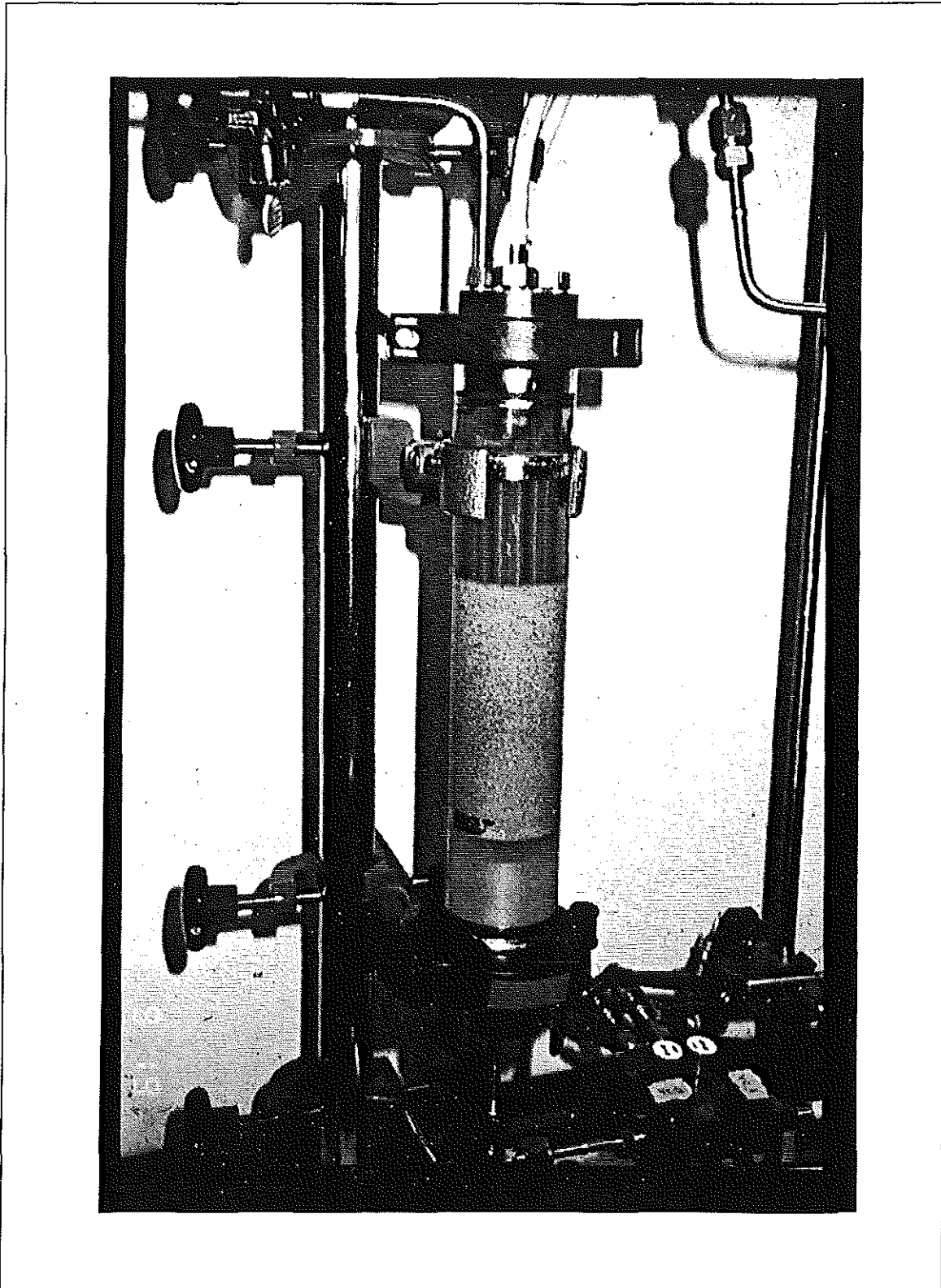


Abbildung C.3: Photographie der Versuchsanlage (0.5l/1l) mit reaktorintegrierter Begasung

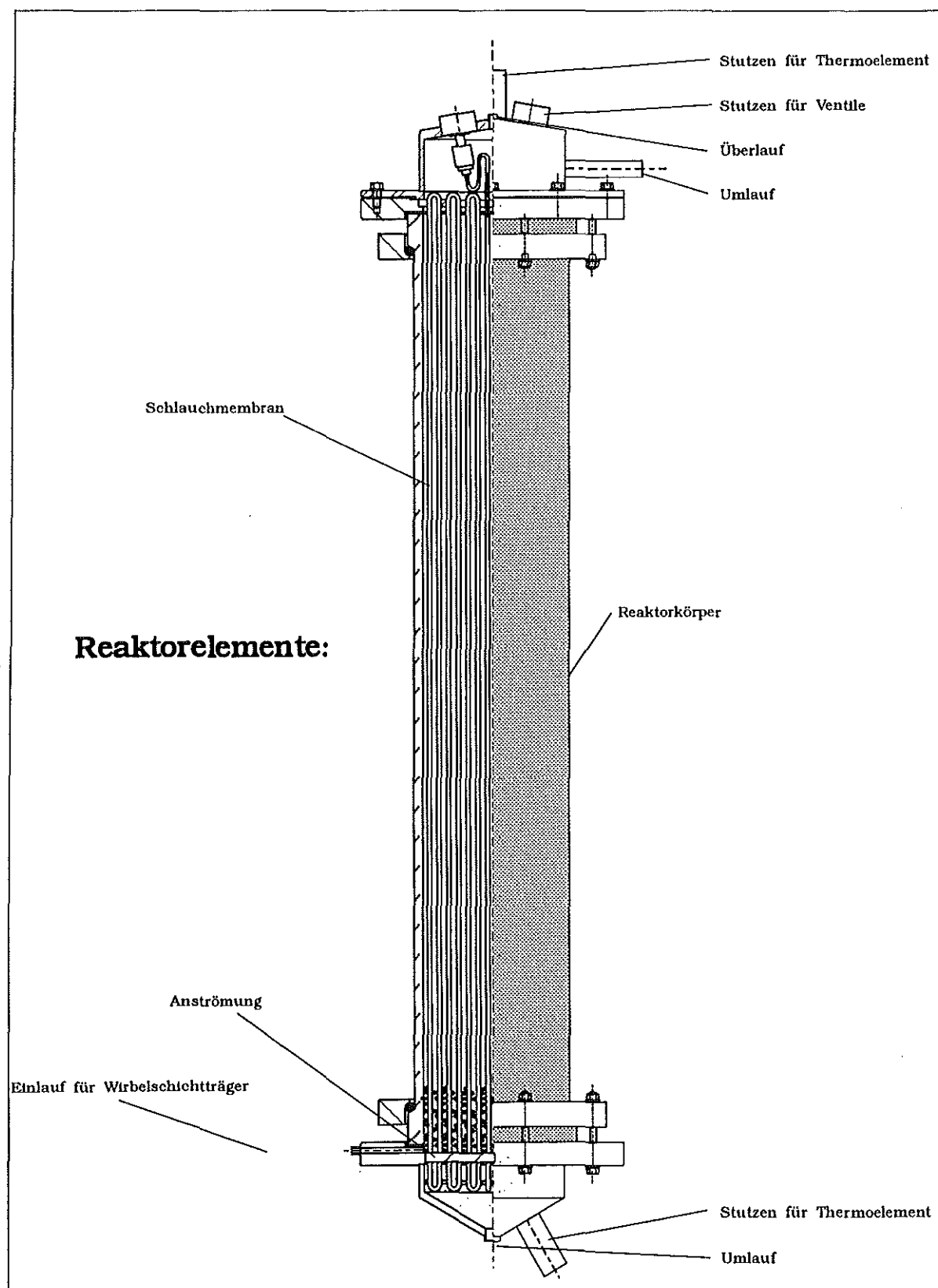


Abbildung C.4: Zusammenstellungszeichnung des 15-Liter-Wirbelschichtreaktors mit reaktorintegrierter Begasung

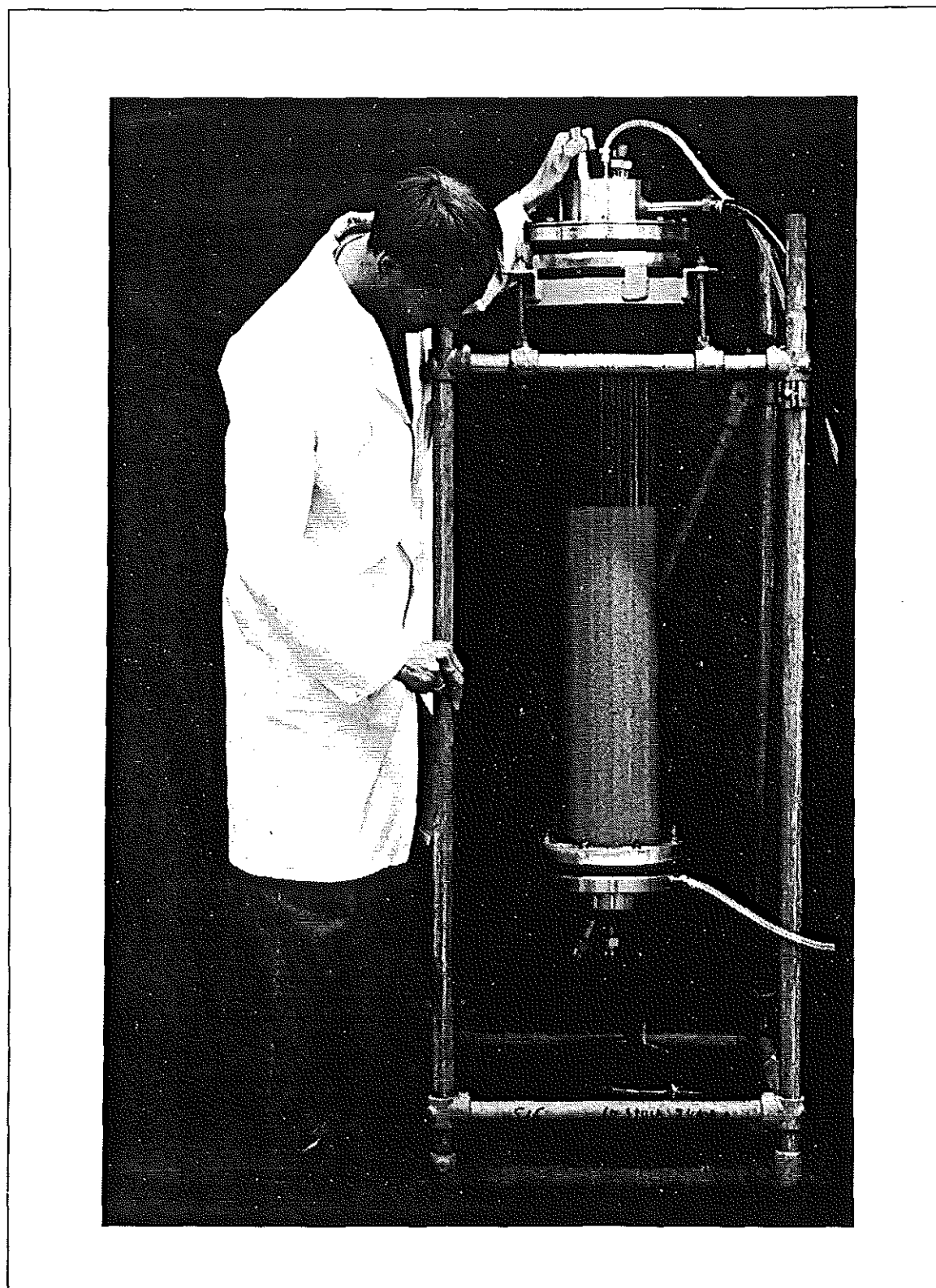


Abbildung C.5: Photo des 15-Liter-Wirbelschichtreaktors für die Zellkultur

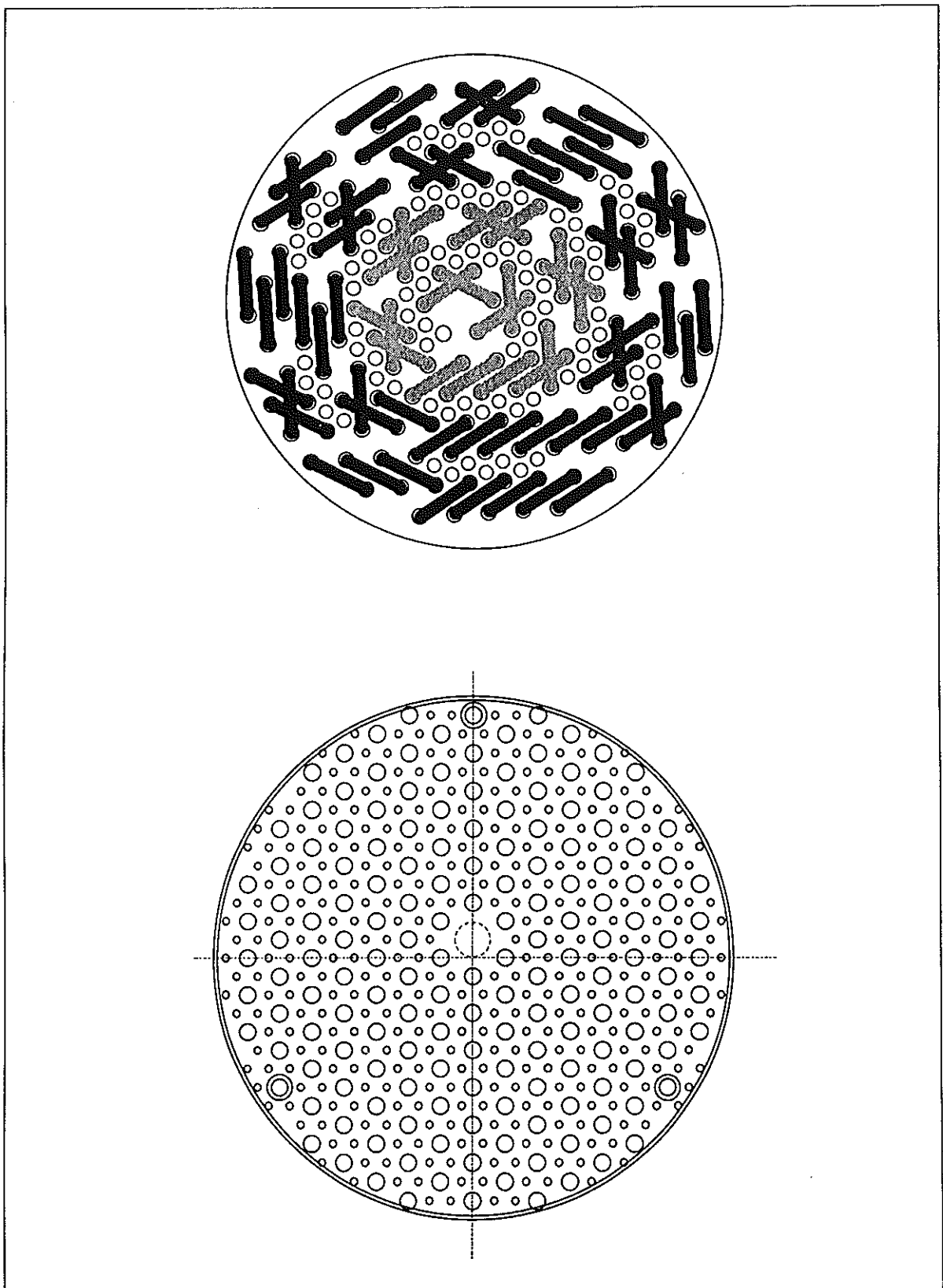


Abbildung C.6: Umlenkplatte (oben) und Verteilerboden (unten) des 15-Liter-Wirbelschichtreaktors

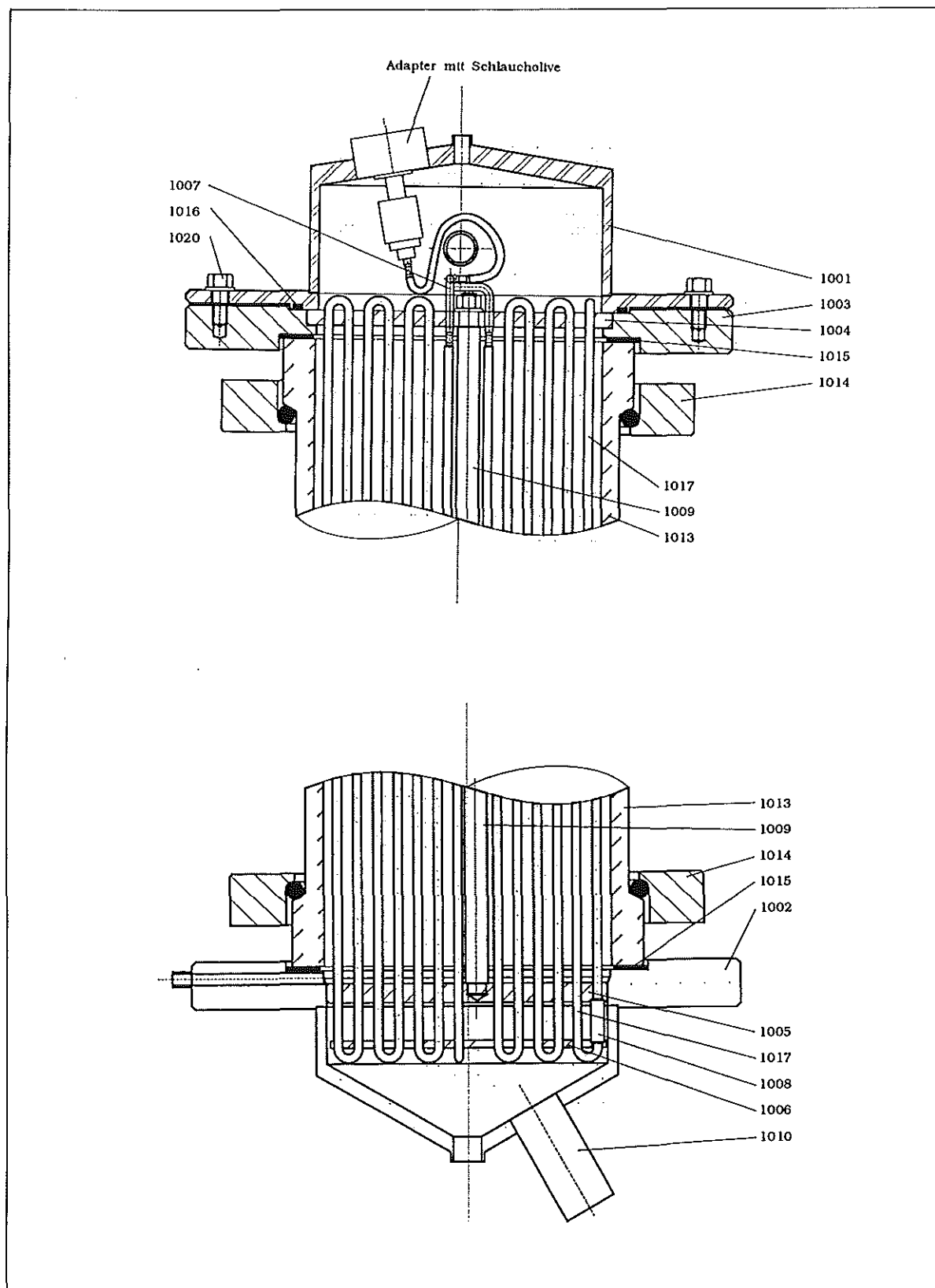


Abbildung C.7: Zusammenstellungszeichnung des Reaktorkopfs und des Reaktorbodens (unten)

Anhang D

Erläuterungen und Herleitungen

Fachbegriffe aus der Wirbelschichtliteratur

expanded bed: leicht ausgedehntes Wirbelbett

fluidized bed: kein kontinuierlicher Feststoffkontakt auf Grund einer Strömung durch das Bett

superficial velocity: Geschwindigkeit bezogen auf die freie Querschnittsfläche

Eine Sinkgeschwindigkeit (**settling velocity**) kleiner als die Strömungsgeschwindigkeit im Fließbett (**superficial velocity**) führt zum Teilchenausstrag (**wash out**).

pariculate fluidization: Einzelanströmung

aggregative fluidization: Abweichung von der idealen Anströmung, Hintereinanderlegen von fluidisierten Partikeln

Fließbett (Fluidatbett): Wirbelschicht geringer und mittlerer Ausdehnung

Glykoproteine: Unter dem Sammelbegriff *Glykoproteine* faßt man eine Gruppe von Eiweißen zusammen, bei denen Oligosaccharide an die Seitenketten der Polypeptide geknüpft werden. Unterschiedliche Verknüpfungsstellen sowie Variationen beim Aufbau der Oligosaccharide führen für die Glykoproteine zu unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften. Bei der Verwendung von Glykoproteinen zu therapeutischen Zwecken kann die Art der Glykosilierung des Proteins zu unerwünschten Reaktionen des Organismus führen [116].

Anfahrvorgang: Unter Anfahrvorgang wird der Betrieb des Zellkulturfermenters bis zum Erreichen des stationären Zustands verstanden.

Stark verdünnte Lösungen: Die Moleküle des gelösten Stoffes haben idealisiert nur Moleküle des Lösungsmittels als Nachbarn, üben also keine gegenseitige Wechselwirkung aus. Die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung zwischen Molekülen des gelösten Stoffes liegt bei einem Molanteil des gelösten Stoffes von 0,01 bei einem Prozent. Die Stärke der Wechselwirkung hängt von den chemischen Eigenschaften von Lösungsmittel und gelöstem Stoff ab ([156], S. 336).

Bilanz für die Stoffart

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \left(v_x \frac{\partial c_i}{\partial x} + v_\Theta \frac{1}{r} \frac{\partial c_i}{\partial \Theta} + v_z \frac{\partial c_i}{\partial z} \right) = D \left(\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 c_i}{\partial \Theta^2} + \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} \right) + R_i \quad (\text{D.1})$$

mit

r, Θ, z Koordinatenrichtungen

Bestimmung des Fugazitätskoeffizienten bei Drücken von $p \leq 10 \text{ bar}$ [182]:

$$\ln \varphi_{i,g}(T, P) = \int_0^P [Z(T, P) - 1] \frac{dp}{p} = \frac{B_{jj}(T)p}{R \cdot T} \quad (\text{D.2})$$

$$\frac{B_{jj}(T)p_c}{R \cdot T_c} = f^0 + \omega f^1 \quad (\text{D.3})$$

$$f^0 = 0.1445 - \frac{0.330}{T_r} - 0.1385T_r^2 - 0.0121T_r^3 - 0.000607T_r^8 \quad (\text{D.4})$$

$$f^1 = 0.00637 + \frac{0.331}{T_r^2} - 0.423T_r^3 - 0.008T_r^8 \quad (\text{D.5})$$

$$T_r = \frac{T}{T_c} \quad (\text{D.6})$$

mit

Index r reduzierte Größen
Index c kritische Größen
 ω azentrischer Faktor

Die Werte der kritischen Größen und des azentrischen Faktors können der Literatur [182] entnommen werden. Für das Stoffsystem Sauerstoff-Wasser ergibt sich ein Wert von $\varphi_{i,g}(T, P) = 0.999460$.

Berechnung der Verbrauchsdaten/Bilanz für die Stoffart

Voraussetzungen:

1. Konstante Dichte
2. Ideale Durchmischung
3. Kein Transport über die Reaktorwand

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{1}{\tau}(c_{i,\alpha} - c_i) + r_i + k \cdot c_i \quad (\text{D.7})$$

mit

r volumenspezifische Reaktionsgeschwindigkeit
 k Zerfallskonstante
 $c_{i,\alpha}$ Eintrittskonzentration
 $c_{i,P}$ letzte zurückliegende Probenahme

Randbedingung:

$$t = 0 : c_i = c_{i,P}$$

Lösung:

$$r_i = A \cdot \frac{c_i - c_{i,P} \cdot \exp(At)}{\exp(At) - 1} - \frac{1}{\tau} \cdot c_\alpha \quad (\text{D.8})$$

mit

$$A = -\frac{1}{\tau} + k$$

Herleitung der Berechnungs- und Auslegungsleichung zu Kap. 8

Zur Berechnung der Konzentrationsprofile in und über der Wirbelschicht bei einer Variation von reaktorspezifischen Parametern müssen die benötigten Gleichungssysteme gelöst werden. Durch diese mathematische Beschreibung wird es dann möglich, bei wahlweiser Vorgabe eines oberen Druckniveaus für die Gasphase, der zellspezifischen Verbrauchsrate oder der Reaktor- und Schüttungsvolumina eine Auslegung mit dem gewünschten Membrantyp sowie der notwendigen Membranfläche vorzunehmen (vgl. Kap. 8).

Die Indizierung erfolgt in Anlehnung an Abb. 4.7.

Der allgemeine Stofftransportansatz lautet:

$$\dot{n}''' = k \cdot a \cdot \Delta c \quad (\text{D.9})$$

mit

a Membranfläche pro Reaktorvolumen

Die Stoffstromdichte berechnet sich nach Gl. D.10 zu:

$$\dot{n}''_{O_2,M} = D \cdot \frac{c_{O_2,M1} - c_{O_2,M2}}{\delta} \quad (\text{D.10})$$

Zur Bilanzierung an einem Reaktorvolumenelement wird die volumenbezogenen Stoffstromdichte eingeführt:

$$\begin{aligned} d\dot{n}'''_{O_2,M} &= \dot{n}''_{O_2,M} \cdot da \\ &= D \cdot \frac{c_{O_2,M1} - c_{O_2,M2}}{\delta} \cdot \frac{n \cdot 8 \cdot \pi \cdot r_m \cdot dx}{(\pi \cdot D^2 - n \cdot \pi \cdot d^2) \cdot dx} \\ &= D \cdot \frac{p_{O_2,g1} - p_{O_2,g2}}{H_{O_2,M} \cdot \delta} \cdot \frac{n \cdot 8 \cdot r_m}{D^2 - n \cdot d^2} \end{aligned} \quad (\text{D.11})$$

Hierbei stellt r_m den Radius für den Stoffdurchtritt dar.

$$r_m := r_a - \frac{\delta_M}{2}$$

In der gleichen Weise werden der flüssigseitige Stoffübergang

$$\begin{aligned} d\dot{n}'''_{O_2,l} &= \dot{n}''_{O_2,l} \cdot da \\ &= \frac{k_L \cdot (p_{O_2,l2} - p_{O_2,l3})}{H_{O_2,l}} \cdot da \end{aligned} \quad (\text{D.12})$$

und der gasseitige Stoffübergang formuliert:

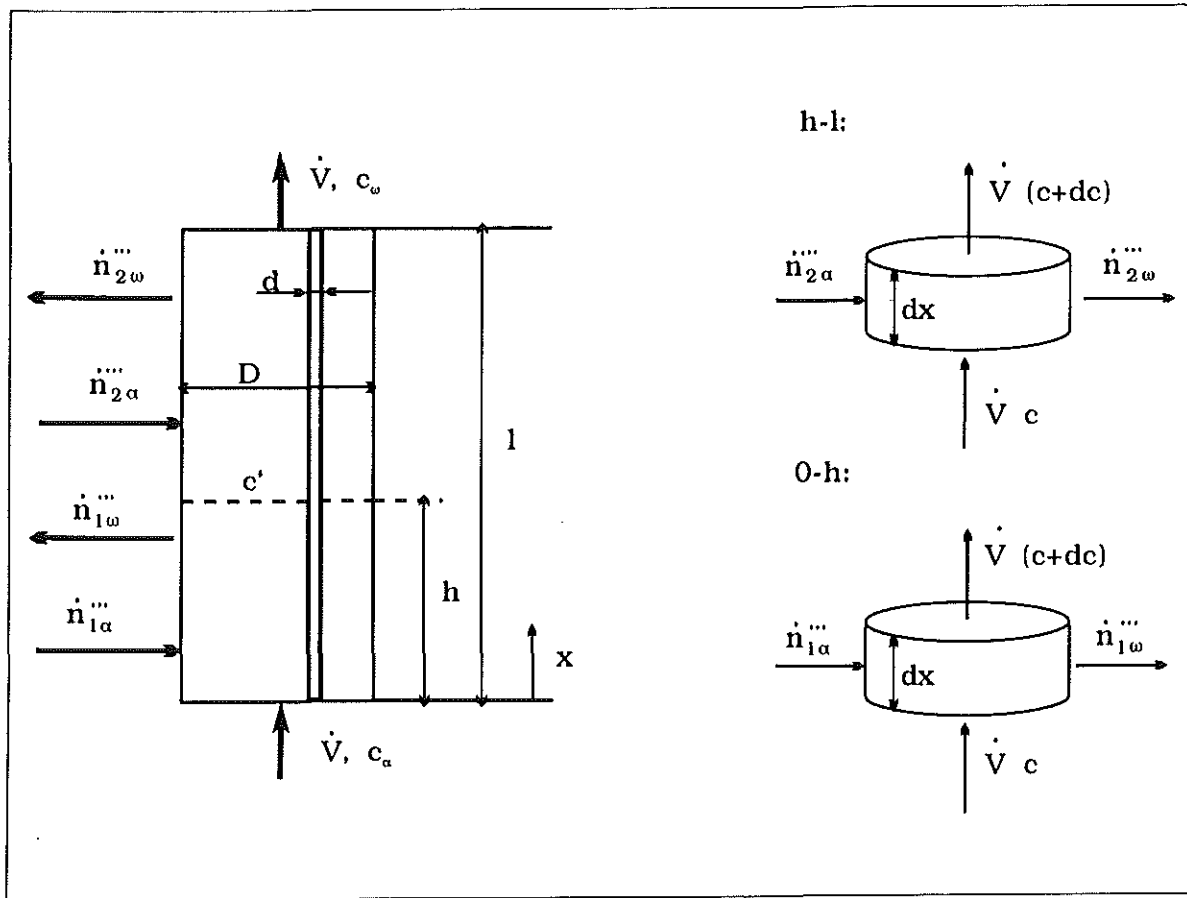


Abbildung D.1: Bilanzierungen an einem Volumenelement im Reaktor

$$\begin{aligned}
 d\dot{n}'''_{O_{2,g}} &= \dot{n}''_{O_{2,g}} \cdot da \\
 &= k_g^* \cdot (p_{O_{2,g0}} - p_{O_{2,g1}}) \cdot da
 \end{aligned} \tag{D.13}$$

Aus den Gleichungen D.11-D.13 folgt:

$$\begin{aligned}
 \dot{n}'''_{O_2} &= \left(\frac{p_{O_{2,g0}} - p_{O_{2,l3}}}{H_{O_{2,l}}} \right) \cdot \frac{1}{\left(\frac{\delta \cdot H_{O_{2,M}}}{D \cdot H_{O_{2,l}}} + \frac{1}{k_g^* \cdot H_{O_{2,l}}} + \frac{1}{k_l} \right)} \cdot da \\
 &=: \frac{p_{O_{2,g0}} - p_{O_{2,l3}}}{T_1}
 \end{aligned} \tag{D.14}$$

Die Konstante T_1 dient lediglich zur erleichterten Darstellung der Berechnung. Weitere Vereinfachungen werden durch die folgenden Definitionen eingeführt:

$$P := \frac{D}{H_{O_2, M}}$$

$$c := c_{O_2, l3}$$

mit

P Permeabilität

c Konzentration in der Hauptströmung

Die in Abbildung D.1 dargestellte Bilanzierung an einem Reaktorvolumenelement führt im stationären Fall auf die Form:

$$(\dot{n}'''_{1\alpha} - \dot{n}'''_{1\omega})dV + \dot{V} \cdot c - \dot{V} \cdot (c + dc) = 0 \quad (D.15)$$

mit

Index α Kennzeichnung der eintretenden Stoffstromdichte

Index ω Kennzeichnung der austretenden Stoffstromdichte

Mit Gleichung D.14 kann nun der Ansatz zur Bestimmung des Konzentrationsprofils formuliert werden:

$$(p_{O_2, g0} - H_{O_2, l} \cdot c - \dot{n}'''_{1\omega} \cdot T_1) \cdot \pi \cdot (R^2 - nr^2) dx - \dot{V} \cdot T_1 \cdot dc = 0 \quad (D.16)$$

$$\int_0^x H_{O_2, l} \pi (R^2 - nr^2) dx_1 = \int_{c_\alpha}^{c(x)} \frac{\dot{V} \cdot T_1}{\frac{p_{O_2, g0} - \dot{n}'''_{1\omega} \cdot T_1}{H_{O_2, l}} - c} dc \quad (D.17)$$

Für die Bereiche 0 bis h sowie h bis l können die Konzentrationsverläufe ermittelt werden.

$$c(x_1) = \frac{p_{O_2, g0} - \dot{n}'''_{1\omega} \cdot T_1}{H_{O_2, l}} - \left\{ \frac{p_{O_2, g0} - \dot{n}'''_{1\omega} \cdot T_1}{H_{O_2, l}} - c_\alpha \right\} \cdot e^{\left(\frac{H_{O_2, l} \pi (R^2 - nr^2) x_1}{\dot{V} \cdot T_1} \right)} \quad (D.18)$$

$$c(x_2) = \frac{p_{O_2, g0} - \dot{n}'''_{2\omega} \cdot T_1}{H_{O_2, l}} - \left\{ \frac{p_{O_2, g0} - \dot{n}'''_{2\omega} \cdot T_1}{H_{O_2, l}} - c' \right\} \cdot e^{\left(\frac{H_{O_2, l} \pi (R^2 - nr^2) x_2}{\dot{V} \cdot T_1} \right)} \quad (D.19)$$

mit

h Fließbetthöhe

l Gesamthöhe des Reaktors

c' Konzentration bei Höhe h

Die zuletzt genannten Gleichungen beschreiben vollständig das transmembrane Transportverhalten aller gasförmigen Komponenten in und über der Wirbelschicht. Durch die Vorgabe des Terms $\dot{n}'''_{2w}$ wird der Verbrauch der Zellen in die Berechnung eingeführt.

Der Ausdruck $\dot{n}'''_{2w}$ wird bei den Auslegungsrechnungen zu Null gesetzt. Damit wird angenommen, daß der volumenspezifische Sauerstoffverbrauch in der Wirbelschicht wesentlich größer ist als der im Bereich über dem Fließbett. Die Lösung des Gleichungssystems erlaubt jedoch auch die Annahme eines Verbrauchers im Bereich h - I.

Zusammensetzung des Borosilikatglas [126]

Komponente	Gewichtsanteil [%]
Si O ₂	≥ 80
Na ₂ O, K ₂ O	4-8
Ca O, Mg O	/
B ₂ O ₃	12-13
Al ₂ O ₃	2-7

Tabelle D.1: Verwendete Glasarten bei der Herstellung von Siran (für die Zellkultur)

Analogie von Wärme- und Stofftransport

Notwendige Bedingung zur physikalisch begründeten Verwendung der Analogiebetrachtung zwischen Wärme- und Stofftransport ist ein formelles Übereinstimmen der den Transport beschreibenden Differentialgleichungen. Bei einer zusätzlichen Ähnlichkeit für die Anfangs- und Randbedingungen bei geometrisch ähnlichen Systemen werden dann im mathematischen Sinne analoge Prozesse abgebildet.

Literaturverzeichnis

- [1] Acton, R.; Lynn, J. D. *Cell culture and its applications*. Academic Press, 1977.
- [2] Alberts, B. et al. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, 1989.
- [3] Andrews, G. F. Fluidized-bed bioreactors. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, 6: 151-177, 1988.
- [4] Andrews, G. F.; Przedziecki, J. Design of fluidized-bed fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, 28: 802-810, 1985.
- [5] Arathoon, W. R.; Birch, J. R. Large-scale cell culture in Biotechnology. *Science*, 232: 1390-1395, 1986.
- [6] ATCC cell lines & hybridomas. American Type Culture Collection, ISBN 0-930009-20-7, ohne Jahresangabe.
- [7] B. Braun Melsungen AG. Züchtung von tierischen Zellen in Suspensions- und Monolayerkulturen in Fermentationsgefäßen. Patentschrift DE 29 40 446 C2, Okt. 1979.
- [8] Backer, M. P. et al. Large-scale production of monoclonal antibodies in suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 32: 993-1000, 1988.
- [9] Bailey, J. E.; Ollis, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Book Company, 1986.
- [10] Balls, M. The development and validation of *in vitro* toxicity tests. In: Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; MacDonald, C., Hrsg., *Animal Cell Technology: Development Processes and Products*, S. 701-712. Butterworth-Heinemann, 1992.
- [11] Baten, R. *Die biologische Reinigung ammoniumreichen Abwassers — Regelung eines mehrstufigen Prozesses*. Dissertation, RWTH-Aachen, 1993.
- [12] Batt, B. C.; Kompala, D. S. A structured kinetic modeling framework for the dynamics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in continuous suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 34: 515-531, 1989.
- [13] Berg, K. C. An integrated system for large scale cell culture. In: *International association of biological standardization*, Hrsg., *Developments in biological standardization*, Band 60, S. 297-303. S. Karger, Basel, 1985.
- [14] Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie. Zellkulturen. In: *Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie*, Hrsg., *Merkblatt B 009*, Band ZH 1/349, S. 2-39. Jedermann-Verlag, 1992.
- [15] Bessler, W. G.; Baron, D. Die Herstellung und Anwendung monoklonaler Antikörper. *Naturwissenschaften*, 75: 496-502, 1988.
- [16] Autoklavierbarer Wirbelschichtfermenter. *Produktinformation*, Bioengineering AG.
- [17] Das Gentechnikgesetz ist weiterhin in der Diskussion. *BioEngineering*, 6 (3): 4, 1990.
- [18] Birch, J. B.; Boraston, R. L.; Wood, L. Bulk production of monoclonal antibodies in fermentors. *Trends in Biotechnology*, 3 (7): 162-166, 1985.
- [19] Bird, R. B.; Stewart, W. E.; Lightfoot, E. N. *Transport Phenomena*. John Wiley & Sons, 1960.
- [20] Bliem, R. F.; Konopitzky, K.; Katinger, H. W. D. Industrial animal cell reactor systems: Aspects of selection and evaluation. In: A. Fiechter, Hrsg., *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Band 44, S. 2-26. Springer-Verlag, 1991.

- [21] Blüml, M. et al. Development of a new type of macroporous carrier. In: **Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; MacDonald, C., Hrsg., *Animal Cell Technology: Development Processes and Products*, S. 501–504. Butterworth-Heinemann, 1992.**
- [22] Boraston, R. et al. Growth and oxygen requirement of antibody producing mouse hybridoma cells in suspension culture. In: **International association of biological standardization, Hrsg., *Developments in biological standardization*, Band 60, S. 103–111. S. Kager, Basel, 1985.**
- [23] Born, C. Charakterisierung des Stofftransportes über eine Membran zur blasenfreien Sauerstoffversorgung von Wirbelschichtreaktoren in der Zellkulturtechnik. Diplomarbeit, RWTH-Aachen — Forschungszentrum Jülich, 1992.
- [24] Born, C. et al. Estimation of disruption of animal cells by laminar shear stress. *Biotechnology and Bioengineering*, **40**: 1004–1010, 1992.
- [25] Braley, S. The chemistry and properties of the medical-grade silicones. *J. Macromol. Sci.-Chem.*, **A4(3)** (5): 529–544, 1970.
- [26] Brauer, H. *Stoffaustausch einschließlich chemischer Reaktionen*. Verlag Sauerländer, 1971.
- [27] Brauer, H. Turbulenz in mehrphasigen Strömungen. *Chem.-Ing.-Tech.*, **51** (10): 934–948, 1979.
- [28] Bräutigam, H.-J. *Untersuchungen zum Einsatz von nichtporösen Kunststoff (Silikonkautschuk)-Membranen als Sauerstoffeintragungssystem*. Dissertation, TU Hamburg-Harburg, 1986.
- [29] Brian, P. L. T.; Hales, H. B.; Sherwood, T. K. Transport of heat and mass between liquids and spherical particles in an agitated tank. *AIChE Journal*, **15** (5): 727–733, 1969.
- [30] Busse, W. Gentechnik und Molekularbiologie in der Arzneimittelforschung. In: **Rheinisch-Westfälische Akademie der Wissenschaften, Hrsg., *Molekulargenetik und Gentechnik in Grundlagenforschung, Medizin und Politik*, S. 41–51. Westdeutscher Verlag, Opladen, 1990.**
- [31] Butler, M. Growth limitations in microcarrier cultures. In: **A. Fiechter, Hrsg., *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, S. 557–584. McGraw-Hill Book Company, 1987.**
- [32] Cahn, F. Biomaterials aspects of porous microcarriers for animal cell culture. *Tibtech*, **8**: 131–136, 1990.
- [33] Clever, H. L. The solubility of gases in liquids. In: **M. R. J. et al. Dack, Hrsg., *Techniques of chemistry*, Band 8 (1), S. 379. John Wiley & Sons, 1975.**
- [34] Clift, R.; Grace, J. R.; Weber, M. E. *Bubbles, drops and particles*. Academic Press, 1978.
- [35] Coté, P.; Bersillon, J.-L.; Huyard, A. Bubble-free aeration using membranes: mass transfer analysis. *Journal of Membrane Science*, **47**: 91–106, 1989.
- [36] Crank, J.; Park, G. S. *Diffusion in Polymers*. Academic Press London New York, 1968.
- [37] Croughan, M. S.; Hamel, J.-F.; Wang, D. I. C. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**: 130–141, 1987.
- [38] Cussler, E. L. *Diffusion - Mass transfer in fluid systems*. Cambridge University Press, 1984.
- [39] Damronglerd, S.; Couderc, J. P.; Angelino, H. Mass transfer in particulate fluidisation. *Trans. Instn Chem. Engrs*, **53**: 175–180, 1975.
- [40] Datar, R. V.; Cartwright, T.; Rosen, C.-G. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: A case study analysis of tissue plasminogen activator. *Bio/Technology*, **11**: 349–357, 1993.
- [41] Davidson, J. F.; Harrison, D. *Fluidization*. Academic Press London New York, 1971.
- [42] Dawkins, R. *Der blinde Uhrmacher*. Deutscher Taschenbuch Verlag, 1990.
- [43] de Bont, J. A. M. et al., Hrsg. *Physiology of immobilized cells*. Elsevier Science Publishers B. V., 1990.

- [44] de Gooijer, C. D.; Wijfels, R. H.; Tramper, J. Growth and substrate consumption of *nitrobacter agilis* cells immobilized in carrageenan: Part 1. dynamic modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**: 224–231, 1991.
- [45] de Lucia, D. E.; Diller, T. E.; Prager, M., Hrsg. *Bioprocess Engineering Symposium — 1988*. The american society of mechanical engineers, 1988.
- [46] Deckwer, W. D. *Reaktionstechnik in Blasensäulen*. Otto Salle Verlag, 1985.
- [47] Denbigh, K. *The principles of chemical equilibrium*. Cambridge University Press, 1966.
- [48] Rettung für den Rattennerv. *DIE ZEIT*, **47** (40), 1992.
- [49] Toleranz aus der Spritze. *DIE ZEIT*, **48** (4), 1993.
- [50] Dunker, R. Persönliche Mitteilung der Firma Merck, Darmstadt, 1992.
- [51] European Collection of animal cell cultures - Catalogue. PHLS Centre for applied microbiology and research, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, UK, ohne Jahresangabe.
- [52] Eigen, M. *Stufen zum Leben*. Piper Verlag, 1987.
- [53] Ethik und Gentechnologie. Gesellschaft Gesundheit und Forschung e. V., 1988.
- [54] Fan, L.-T.; Yang, Y.-C.; Wen, C.-Y. Mass transfer in semifluidized beds for solid-liquid systems. *AIChE Journal*, **6** (3): 482–487, 1960.
- [55] Fenn, W. O. Partial pressure of gases dissolved at great depth. *Science*, **176**: 1011–1012, 1972.
- [56] Fleischaker, R. J. et al. Progress with computer-coupled mammalian cell culture investigations. In: Moo-Young, M., Hrsg., *Advances in Biotechnology*, S. 425–430. Pergamon Press, 1981.
- [57] Fleischaker, R. J.; Sinskey, A. J. Oxygen demand and supply in cell culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **12**: 193–197, 1981.
- [58] Franke, M. *Auslegung und Optimierung von Pervaporationsanlagen zur Entwässerung von Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen*. Dissertation, R-WTH Aachen, 1990.
- [59] Frankel, N. A.; Acrivos, A. On the viscosity of a concentrated suspension of solid spheres. *Chem. Eng. Sci.*, **22**: 847–853, 1967.
- [60] Gengenbach, R. Oxygenation in the cultivation of anchorage dependent mammalian cells. In: *Zellkulturen in der biotechnischen Produktion*, S. 1–13. 1-Taunustagung Membrantechnologie, 1989.
- [61] Glacken, M. W.; Fleischaker, R. J.; Sinskey, A. J. Mammalian cell culture: engineering principles and scale-up. *Trends in Biotechnology*, **1** (4): 102–108, 1983.
- [62] Gmehling, J.; Kolbe, B. *Thermodynamik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1988.
- [63] Griffiths, B. Scaling up of animal cell cultures. In: Freshney, R. I., Hrsg., *Animal cell culture*, S. 33–69. Irl Press Oxford Washington, 1986.
- [64] Griffiths, B. Overview of cell culture systems and their scale up. In: Spier, R. E.; Griffiths, J.B., Hrsg., *Animal cell biotechnology*, Band 3, S. 179–219. Academic Press, 1988.
- [65] Griffiths, B. Animal cells - the breakthrough to a dominant technology. *Cytotechnology*, **3**: 109–116, 1990.
- [66] Griffiths, B. Closing the culture gap. *Bio/Technology*, **10** (1): 31–32, 1992.
- [67] Hambach, B. et al. Development of a reactor integrated aeration system for cultivation of animal cells in fluidized beds. In: Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; MacDonald, C., Hrsg., *Animal Cell Technology: Development Processes and Products*, S. 381–385. Butterworth-Heinemann, 1992.
- [68] Handa, A. *Gas-liquid interfacial effects on the growth of hybridoma and other suspended cells*. Dissertation, University of Birmingham, 1986.
- [69] Haraya, K.; Hwang, S.-T. Permeation of oxygen, argon and nitrogen through polymer membranes. *Journal of Membrane Science*, **71**: 13–27, 1992.

- [70] Harbour, C.; Barford, J. P.; Low, K.-S. Process development for hybridoma cells. In: *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Band 37, S. 1-39. Springer Verlag, 1988.
- [71] Harms, E.; Wendenburg, J. Large scale perfusion culture of cells growing on surfaces with automatic gas and medium control. *Cytobiology*, **18**: 67-75, 1978.
- [72] Hasskarl, H. *Gentechnikrecht*. Editio Cantor Verlag, 1991.
- [73] Henzler, H. J. Verfahrenstechnische Auslegung von Rührbehältern als Fermenter. *Chem.-Ing.-Tech.*, **54** (5): 461-476, 1982.
- [74] Henzler, H. J.; Kauling, J. Sauerstoffversorgung von Zellkulturen. In: *Bioverfahrenstechnik für die Zellkultur*, S. 45-65. GVC-VDI, 1990.
- [75] Hetsroni, G. *handbook of multiphase systems*. McGraw-Hill Book Company, 1982.
- [76] Hinze, J. O. *Turbulence*. McGraw-Hill Book Company, 1959.
- [77] Hitchman, M. L. *Measurement of dissolved oxygen*. John Wiley & Sons, 1978.
- [78] Ho, C. S.; Baddour, R. F.; Wang, D. I. C. Effective diffusivity of oxygen in microbial pellets. *Biotech. Advs.*, **2**: 21-33, 1984.
- [79] Holland, C. D.; Anthony, G. A. *Fundamentals of Chemical Reaction Engineering*. Prentice-Hall International Series, 1989.
- [80] Hooper, M. L. *Mammalian cell genetics*. John Wiley & Sons, 1985.
- [81] Hu, W.-S. Animal cell reactor engineering. EPFL-Lausanne, Switzerland, 1987.
- [82] Hu, W.-S.; Meier, J.; Wang, D. I. C. Use of surface aerator to improve oxygen transfer in cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**: 122-125, 1986.
- [83] Hwang, S.-T.; Choi, C. K.; Kammermeyer, K. Gaseous transfer coefficients in membranes. *Separation Science*, **9** (6): 461-478, 1974.
- [84] Hwang, S.-T.; Tang, T. E. S.; Kammermeyer, K. Transport of dissolved oxygen through silicone rubber membrane. *J. Macromol. Sci.-Phys.*, **B5**(1): 1-10, 1971.
- [85] Jensen, M. D. Production of anchorage dependent cells - Problems and their possible solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, **23**: 2703-2716, 1981.
- [86] Johnson, M. et al. Oxygen transfer rates in a mammalian cell culture bioreactor equipped with a cell-lift impeller. *Biotechnology and Bioengineering*, **35**: 43-49, 1990.
- [87] Kamihira, M. et al. Effect of oxygen aeration on production of monoclonal antibody in immobilized hybridoma-cell bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **69** (5): 311-312, 1990.
- [88] Karel, S. F.; Libicki, S. B.; Robertson, C. R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, **40** (8): 1321-1354, 1985.
- [89] Karkare, S. B. Persönliche Mitteilung der Verax Corporation, New Lebanon, 1989.
- [90] Kättinger, H. W. D. Animal cell culture: Biological and technical aspects. In: *Proc. 4th European Congress on Biotechnology*, S. 21-42. Elsevier Science Publishers B. V., 1987.
- [91] Kättinger, H. W. D. Technologie mit tierischen Zellen. In: Präve, P. et al., Hrsg., *Jahrbuch Biotechnologie*, S. 171-207. Carl Hanser Verlag, 1992.
- [92] Kättinger, H. W. D.; Scheirer, W. Status and developments of animal cell technology. *Acta Biotechnologica*, **2** (1): 3-41, 1982.
- [93] Keller, J. *Entwicklung und Charakterisierung eines Fließbettreaktors für tierische Zellkulturen*. Dissertation, ETH-Zürich, 1991.
- [94] Kiessler, T.; Oertzen, A.; Bauer, W. Modelling of a fluidized bed bioreactor for immobilized enzymes (Part 1). *Chem. Eng. Technol.*, **13**: 20-26, 1990.

- [95] Kikuchi, K.-I.; Sugawara, T.; Ohashi, H. Correlation of mass transfer coefficient between particles and liquid in liquid fluidized bed. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **16** (5): 1029-1035, 1983.
- [96] Klausner, A. Tissue culture for improved toxicology. *Bio/Technology*, (5): 779-786, 1987.
- [97] Knazek, R. A. et al. Cell culture on artificial capillaries: An approach to tissue growth in vitro. *Science*, **178**: 65-67, 1972.
- [98] Kolmogorov, A. N. Die Energiedissipation für lokal isotrope Turbulenz. In: Goering, H., Hrsg., *Sammelband zur statistischen Theorie der Turbulenz*, S. 77-83. Akademie-Verlag Berlin, 1958.
- [99] Kopp, Th. Blasenfreie Begasung. *Acta Biotechnol.*, **9** (6): 504-511, 1989.
- [100] Kramer, H. W. Experimente zur Erfassung der Scherbelastung von Hybridomazellen. In: *Rheologie und mechanische Beanspruchung biologischer Systeme*, S. 175-187. GVC · VDI - Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, 1987.
- [101] Kramer, H. W. *Der Einfluß von Scherkräften in Bioreaktoren auf Proliferation und Syntheseleistung tierischer Zellen*. Dissertation, ETH-Zürich, 1988.
- [102] Kratje, R. B.; Wagner, R. Evaluation of the production of recombinant human interleukin-2 in a fluidized bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **39**: 233-242, 1992.
- [103] Krause, E. *Strömungsfragen der Medizin*. Vorlesungsunterlagen RWTH-Aachen, 1986.
- [104] Kunii, D.; Levenspiel, O. *Fluidization Engineering*. John Wiley & Sons, 1969.
- [105] Lavery, M.; Nienow, A. W. Oxygen transfer in animal cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **30** (3): 368-373, 1987.
- [106] Lax, E., Hrsg. *Taschenbuch für Chemiker und Physiker*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1967.
- [107] Lehmann, J.; Piehl, G. W.; Schulz, R. Blasenfreie Zellkulturbegasung mit bewegten porösen Membranen. *BTF-Biotech-Forum*, **2** (3): 112-117, 1985.
- [108] Lehmann, J.; Vorlop, J.; Büntemeyer, H. Bubble-free reactors and their development for continuous culture with cell recycle. In: *Animal cell biotechnology*, Band 3, S. 221-237. Academic Press Limited, 1988.
- [109] Leist, C. H.; Meyer, H.-P.; Fiechter, A. Potential and problems of animal cells in suspension culture. *Journal of Biotechnology*, **15**: 1-46, 1990.
- [110] Leva, M. *Fluidization*. McGraw-Hill Book Company, 1959.
- [111] Lewandowski, Z.; Walser, G.; Characklis, W. G. Reaction kinetics in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**: 877-882, 1991.
- [112] Lewis, F. M. The science and technology of silicone rubber. *Rubber chemistry and technology*, **35** (5): 1222-1273, 1962.
- [113] Lewis, G. N.; Randall, M. *Thermodynamics*. McGraw-Hill Book Company, 1923.
- [114] Lin, A.; Agrawal, P. Glutamine decomposition in DMEM: Effect of pH and serum concentration. *Biotechnology Letters*, **10** (10): 695-698, 1988.
- [115] Lindl, T. Monoklonale Antikörper: In vitro- und in-vivo-Produktion sowie tierschutzrelevante Aspekte. *Forum Mikrobiologie*, **7-8**: 310-317, 1988.
- [116] Liu, D. T.-Y. Glycoprotein pharmaceuticals: scientific and regulatory considerations, and the US orphan drug act. *Tibtech*, **10**: 114-120, 1992.
- [117] Looby, D.; Griffiths, B. Immobilisation of animal cells in porous carrier culture. *Tibtech*, **8**: 204-209, 1990.
- [118] Looby, D.; Griffiths, J. B.; Mistler, M. Immobilisation of mammalian cells in fixed and fluidised porous spheres reactors. Internes Arbeitspapier, 1990.

- [119] Lubiniecki, A. et al. Selected strategies for manufacture and control of recombinant tissue plasminogen activator prepared from cell cultures. In: Spier, R. E. et al., Hrsg., *Advances in animal cell biology and technology for bioprocesses*, S. 442–449. Butterworth, Sevenoaks, 1989.
- [120] Lüllau, E. *Immobilisierung von Säugetierzellen auf chemisch modifizierten Sinterglasträgern*. Dissertation, Universität Köln, 1992.
- [121] Marmulla, K. Rekombinante Therapeutika: Eigenschaften - Wirkungen - Anwendungen - Hersteller. In: *Gentec update*, 2, S. 1–20. GBF Braunschweig, 1990.
- [122] Meares, P. Transport through polymer membranes from the liquid phase. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **83**: 342–351, 1979.
- [123] Mersmann, A. *Stoffübertragung*. Springer-Verlag, 1986.
- [124] Milstein, C.; Köhler, G. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495–497, 1975.
- [125] Miltenburger, H. G.; David, P. Mass production of insect cells in suspension. *Dev. Biol. Stand.*, **46**: 183–186, 1980.
- [126] Mistler, M. Persönliche Mitteilung der Schott AG, 1990.
- [127] Mizrahi, A. et al. The effect of dissolved oxygen partial pressure on growth, metabolism and immunoglobulin production in a permanent human lymphocyte cell line culture. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **139**, S. 118–122, 1972.
- [128] Moffat, M. A. J. Cell culture in diagnostic medical virology. *Laboratory Practice*, **17**: 576–582, 1968.
- [129] Molerus, O. *Fluid-Feststoff-Strömungen*. Springer-Verlag, 1982.
- [130] Montagnon, B. J.; Fanget, B.; Vincent-Falquet, J. C. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. *Review of infectious diseases*, **6** (may-june): 341–344, 1984.
- [131] Mueller, J. A.; Boyle, C. B.; Lightfoot, E. N. Oxygen diffusion through zoogloeal flocs. *Biotechnology and Bioengineering*, **X**: 331–358, 1968.
- [132] Mulder, Marcel. *Basic Principles of Membrane Technology*. Kluwer Academic Publisher, 1991.
- [133] Müller, N. *Berechnungsgrundlagen und Anwendungsbeispiele zum Sauerstoffeintrag in Wasser und Abwasser über porenfreie Membranen*. Dissertation, TU Hamburg-Harburg, 1986.
- [134] Mullin, J. W.; Treleaven, C. R. Solid-liquid mass transfer in multi-particulate systems. *Paper Congr. European Fed. Chem. Engrs.*, **3d London B 66**: 203–210, 1962.
- [135] Münzer, J. Beiträge zur Maßstabsvergrößerung eines Wirbelschicht-Bioreaktors mit integriertem Begasungsmodul. Studienarbeit, RWTH-Aachen, 1992.
- [136] Musgrave, S. C. The effect of reduced temperature on α -interferon production by namalwa cells. In: Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; MacDonald, C., Hrsg., *Animal Cell Technology: Development Processes and Products*, S. 189–191. Butterworth-Heinemann, 1992.
- [137] Noé, W. et al. Aspects of continuous culture versus batch mode for animal cells in industrial processes. In: Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; MacDonald, C., Hrsg., *Animal Cell Technology: Development Processes and Products*, S. 354–364. Butterworth-Heinemann, 1992.
- [138] Onken, U.; Liefke, E. Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. In: A. Fiechter, Hrsg., *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, S. 138–169. McGraw-Hill Book Company, 1989.
- [139] Produktkatalog der Fa. Paesel und Lorei. Katalog Nr. 14, 1989.
- [140] Papst, R. Persönliche Mitteilung der Firma BIW, Wuppertal, 1992.
- [141] Perry, S. D.; Wang, D. I. C. Fiber bed reactor design for animal cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **34**: 1–9, 1989.

- [142] Peters, M. S.; Timmerhaus, K. D. *Plant design and economics for chemical engineers*. McGraw-Hill Book Company, 1980.
- [143] Piret, J. M.; Cooney, C. L. Model of oxygen limitations in hollow fiber bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **37**: 80-92, 1991.
- [144] Pirt, S. J. *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications, 1975.
- [145] Pöpel, H. J. *Aeration and gas transfer*. Delft University of technology, 1972.
- [146] Prausnitz, J. M.; Gmehling, J. Thermodynamik der Phasengleichgewichte. *Beilage zu vt Verfahrenstechnik*, **13** (1): I-VII, 1979.
- [147] Präve, P. et al. *Handbuch der Biotechnologie*. R. Oldenbourg Verlag München Wien, 1987.
- [148] Pullen, K. F. et al. Very large scale suspension cultures of mammalian cells. In: *International association of biological standardization*, Hrsg., *Developments in biological standardization*, Band 60, S. 175-177. S. Kager, Basel, 1985.
- [149] Rau, N. Ausgewählte Aspekte in der biotechnischen Produktion von Proteinen. 2. Taunustagung Membrantechnologie, Bad Soden, 1991.
- [150] Rautenbach, R.; Albrecht, R. *Membrane Processes*. John Wiley & Sons, 1989.
- [151] Rautenbach, R. et al. Membranverfahren zur Fraktionierung von Gemischen mit organischen Komponenten. *Chem.-Ing.-Tech.*, **61** (7): 535-544, 1989.
- [152] Rautenbach, R. und Assistenten. *Membranverfahren (Teil 1)*. Vorlesungsumdruck RWTH-Aachen, 1986.
- [153] Reh, L. Strömungs- und Austauschverhalten von Wirbelschichten. *Chem.-Ing.-Tech.*, **46** (5): 180-189, 1974.
- [154] Reh, L. *Mechanische Verfahrenstechnik*. Vorlesungsumdruck des IVUK, ETH Zürich, 1991.
- [155] Reh, L. Persönliche Mitteilung an der ETH Zürich, 1991.
- [156] Reid, R. C., Prausnitz, J. M., Poling, B. E. *The properties of gases and liquids*. McGraw-Hill Book Company, 1986.
- [157] Reiter, M. et al. The use of macroporous gelatin carriers for the cultivation of mammalian cells in fluidised bed reactors. *Cytotechnology*, **3**: 271-277, 1990.
- [158] Reiter, M. et al. Oxygenation in fluidized bed bioreactors using the microsparging technique. In: *Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; MacDonald, C.*, Hrsg., *Animal Cell Technology: Development Processes and Products*, S. 386-392. Butterworth-Heinemann, 1992.
- [159] Reuveny, S. et al. Comparison of cell propagation methods for their effect on monoclonal antibody yield in fermentors. *Journal of Immunological Methods*, **86**: 61-69, 1986.
- [160] Reuveny, S. et al. Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of Immunological Methods*, **86**: 53-59, 1986.
- [161] Richardson, J.-F.; Zaki, W. N. Sedimentation and Fluidisation: Part I. *Trans. Instn Chem. Engrs*, **32**: 35-53, 1954.
- [162] Robb, W. L. Thin silicone membranes - their permeation properties and some applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **146**: 119-137, 1968.
- [163] Runstadler, P. W. Jr. Persönliche Mitteilung der Verax Corporation, New Lebanon, 1991.
- [164] Runstadler, P. W. Jr.; Cernek, S. R. Large-scale fluidized-bed, immobilized cultivation of animal cells at high cell densities. In: *Animal cell biotechnology*, Band 3. Academic Press Limited, 1988.
- [165] Schmidt, M.; Löffler, F. Das Strömungsfeld um eine Kugel bei kleinen und mittleren Reynoldszahlen ($Re < 130$). *Chem.-Ing.-Tech.*, **63** (8): 851-853, 1991.
- [166] Schüler, M. Optimierung und Vermessung eines Wirbelschichtreaktors mit integriertem Membranmodul zum Sauerstoffeintrag durch Gaspermeation. Studienarbeit, RWTH-Aachen, 1992.

- [167] Schumpe, A.; Quicker, G.; Deckwer, W. D. Gas solubilities in microbial culture media. In: *Reaction engineering*, S. 2–36. Springer Verlag, 1982.
- [168] Shirai, Y. et al. Continuous production of monoclonal antibody with immobilized hybridoma cells in an expanded bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**: 495–499, 1987.
- [169] Slininger, P. J. et al. Measurement of oxygen solubility in fermentation media: A colorimetric method. *Biotechnology and Bioengineering*, **33**: 578–583, 1989.
- [170] Spier, R. E.; Griffiths, B. An examination of the data and concepts germane to the oxygenation of cultured animal cells. In: *International association of biological standardization*, Hrsg., *Developments in biological standardization*, Band 55. S. Karger, Basel, 1984.
- [171] Sun, Y.; Furusaki, S. Effect of intraparticle diffusion on the determination of the gas-liquid volumetric oxygen transfer coefficient in a three-phase fluidized bed containing porous particles. *Journal of chemical engineering of Japan*, **22** (5): 556–559, 1989.
- [172] Tennekes, H.; Lumley, J. L. *A first course in turbulence*. The MIT Press, 1972.
- [173] Thömmes, J. *Verfahrensoptimierung in der Säugerzellkultur am Beispiel der Produktion von monoklonalen Antikörpern mit Hybridomazellen*. Dissertation, Forschungszentrum Jülich, 1992.
- [174] Thömmes, J. et al. Integrated detoxification: reduction of ammonia concentration by dialysis with cation exchange membranes. In: Spier, R. E.; Griffiths, J. B.; MacDonald, C., Hrsg., *Animal Cell Technology: Development Processes and Products*, S. 171–175. Butterworth-Heinemann, 1992.
- [175] Tramper, J.; Vlak, J. M. Design parameters for cultivation of insect cells in bubble columns. In: *Rheologie und mechanische Beanspruchung biologischer Systeme*, S. 189–201. GVC · VDI - Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, 1987.
- [176] Tusel, G. F. Persönliche Mitteilung der Firma GFT, Neunkirchen, 1988.
- [177] van Brunt, J. Immobilized mammalian Cells: The gentle way to productivity. *Biotechnology*, **4** (6): 505–510, 1986.
- [178] van der Pol, J.-J. (*In Vorbereitung*). Dissertation, Forschungszentrum Jülich, 1994.
- [179] van Krevelen, D. W. *Properties of Polymers*. Elsevier Scientific Publishing Company, 1976.
- [180] van Wezel, C. Growth of cell strains and primary cells on microcarriers in homogeneous culture. *Nature*, **251**: 64–65, 1967.
- [181] Vauck, W. R. A.; Müller, H. A. *Grundoperationen chemischer Verfahrenstechnik*. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 1989.
- [182] VDI-VERLAG. *VDI-Wärmeatlas: 6. Auflage*. VDI-GVC, 1991.
- [183] Venkatasubramanian, K. et al. New reactors for animal cell culture. In: C. P. Hollenberg, Hrsg., *Biotec 3 (Therapeutics, diagnostics, cell cultures and product isolation)*. Fischer Stuttgart, 1990.
- [184] Verax Corporation. Weighted collagen micro sponge for immobilizing bioactive material. US Patent Number 4,997,753 (4,861,714; 4,863,856), Mar. 1991.
- [185] Wang, H. Y.; Lawless Jr, R. J.; Lin, J.-E. Use of membrane oxygenator to increase oxygen transfer capacity of a bioreactor. *Process Biochemistry*, **2**: 23–27, 1988.
- [186] Wen, C. Y.; Yu, Y. H. Mechanics of Fluidization. *Chem. Eng. Prog. Symp. Ser.* **62**, S. 100–111, 1966.
- [187] Werther, J. Modellierung chemischer Reaktionen in Wirbelschichten. *DECHEMA-Monographien Band 94* Verlag Chemie, 1983.
- [188] WHO Study group on biologicals. *Acceptability of cell substrates for production of biologicals*. World health Organization, 1987.
- [189] Wijfels, R. H. et al. Growth and substrate consumption of *nitrobacter agilis* cells immobilized in carrageenan: Part 2. model evaluation. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**: 232–240, 1991.

- [190] Wilderer, P. A.; Bräutigam, J.; Sekoulov, I. Application of gas permeable membranes for auxiliary oxygenation of sequencing batch reactors. *Conservation & Recycling*, **8** (1/2): 181–192, 1985.
- [191] Zukunft mit Frust. *Wirtschaftswoche*, (39): 84–106, 1992.
- [192] Zahl der Versuchstiere weiter zurückgegangen. *Woche im Bundestag*, **23** (4): 21, 1993.
- [193] Wohlpart, D.; Kirwan, D.; Geiner, J. Effects of cell density and glucose and glutamine levels on the respiration rates of hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, **36**: 630–635, 1990.
- [194] Yasuda, H.; Lamaze, C. E. Transport of gas to dissolved oxygen in water via porous and nonporous polymer membranes. *Journal of applied polymer science*, **16** (4): 595–601, 1972.
- [195] Yasuda, H.; Stone, W. Basic consideration of permeability of polymer membrane to dissolved oxygen. *Journal of polymer science: Part A-1*, **5**: 2952–2956, 1967.
- [196] Young, M. W.; Dean, R. C. Optimization of mammalian cell bioreactors. *Bio/Technology*, **5**: 835–837, 1987.
- [197] Zlokarnik, M. Verfahrenstechnik der aeroben Abwasserreinigung. *Chem.-Ing.-Tech.*, **54** (11): 939–952, 1982.
- [198] Zlokarnik, M. Immobilisierung ganzer Zellen - eine Bestandsaufnahme aus bioverfahrenstechnischer Sicht. *BTF-Biotech-Forum*, **3** (4): 212–218, 1986.

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Biotechnologie 2 (IBT 2) des Forschungszentrums Jülich.

Allen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ch. Wandrey für die wissenschaftliche Betreuung und die gewährte Freiheit bei der Durchführung meiner Arbeit,

Herrn Prof. Dr.-Ing. H. Hartmann für die Übernahme des Korreferates,

allen technischen Assistentinnen und Assistenten, studentischen Hilfskräften sowie Studien- und Diplomarbeitern, die durch Einsatz und besondere Zuverlässigkeit wesentliche Beiträge zu dieser Arbeit geleistet haben

und den Mitarbeitern der Werkstätten, der Sekretariate und des Photolabors für ihre Hilfe und Kooperationsbereitschaft.

JÜI-2886

März 1994

ISSN 0944-2952