

1 Einleitung und Zielsetzung

Durch den steigenden Bedarf maßgeschneiderter Medikamente werden heutzutage vielfach Laborgeräte zur schnellen Erforschung neuer und auch oft personalisierter Pharmazeutika benötigt. Aufgrund ihrer hohen Parallelisier- und Automatisierbarkeit durch Liquid Handling Systeme (LHS), dem hohen Einsparpotenzial bei Kosten für Medien und Testsubstanzen sowie der Möglichkeit der Prozesscharakterisierung durch immer zuverlässiger arbeitende Sensoren eignen sich besonders Mikrosysteme wie Mikrobioreaktoren (MBR) für diese Aufgabe. MBR sind Kultivierungsplattformen für bakterielle Systeme oder Zellkulturen mit einem Volumen von weniger als einem Milliliter, wobei die Vorteile besonders bei kleinskaligen MBR im einstelligen Mikroliterbereich zum Tragen kommen. MBR werden in der biopharmazeutischen Forschung hauptsächlich in der Prozessentwicklung von Biopharmazeutika wie Antikörpern eingesetzt, wobei beispielsweise beim Scale-down einzelne Bedingungen eines existierenden Produktionsprozesses im MBR nachgestellt werden. Beim Scale-up hingegen werden Prozessbedingungen für einen in der Entwicklung befindlichen Produktionsprozess im Mikrolitermaßstab erforscht. Außerdem können MBR zum Screening von Produktionsstämmen verwendet werden. Eine weitere wichtige und in dieser Arbeit beschriebene Anwendung ist die Anwendung von MBR für zellbasierte Assays und Zellanalysen, wobei zum Beispiel die Toxizität von Metaboliten oder Testsubstanzen auf tierische Zellkulturen untersucht wird. Eine spezielle Art zellbasierten Assays stellen Phagogramme in der Phagentherapie dar [1–4].

Bei der Phagentherapie werden Bakteriophagen (kurz: Phagen), bei denen es sich um Viren handelt, die hochspezifisch Bakterien infizieren, genutzt, um Infektionen mit pathogenen Bakterien zu bekämpfen. Damit stellen Phagen eine alternative Behandlungsstrategie gegenüber Antibiotika dar. Durch die steigende Zahl antibiotikaresistenter, pathogener Bakterien bedingt durch übermäßigen Einsatz von Antibiotika, werden dringend Alternativen zu etablierten Antibiotika benötigt. Im Jahr 2019 führten Infektionen mit multiresistenten Bakterien beispielsweise zu 1,27 Millionen Toten weltweit, wobei die Tendenz weiter steigend ist [5]. Hier kann die Phagentherapie eine sinnvolle Behandlungsalternative darstellen, falls der alleinige Einsatz von Antibiotika als Therapie fehlschlägt [6–9]. Durch ihre hohe Spezifität ist vor der Anwendung von Phagen für eine Phagentherapie ein Screening nach passenden Phagen notwendig, das als Phagogramm bezeichnet wird. Dabei wird der bakterielle Erreger *in vitro* kultiviert und verschiedene Phagen aus einer Phagenbibliothek werden hinzugegeben. Eine lytische Aktivität und damit generelle Einsetzbarkeit der Phagen für eine Phagentherapie ist gegeben, wenn die Zellkonzentration im Phagogramm durch die Lyse sinkt. Phagogramme

1 Einleitung und Zielsetzung

werden heute vielfach mit sogenannten Plaque-Assays durchgeführt, wobei die bakterielle Lyse durch Phagen mittels Plaques in bakteriellen Rasen auf einer Double-Layer-Agarplatte untersucht wird [7, 10–12]. Da dieser Screen wenig parallelisierbar und automatisierbar ist und keine Informationen über die Lysekinetik generiert werden können, sind alternative Techniken zur Bereitstellung dieser Phagogramme notwendig. Eine Möglichkeit hierfür sind sogenannte *growth kinetic assays*. Dabei wird der bakterielle Erreger gemeinsam mit Phagen aus einer Phagenbibliothek in Suspension kultiviert. Die lytische Aktivität der Phagen zeichnet sich bei *growth kinetic assays* durch eine Abnahme der optischen Dichte aus. Meist werden diese in Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt, die jedoch einige Nachteile mit sich bringen [10, 11, 13, 14]. Zum einen sind auf dem Markt erhältliche MTP-Reader in der Regel entweder bezüglich ihrer Parallelisierbarkeit eingeschränkt oder verfügen über eine eingeschränkte Durchmischung und online-Sensorik. Zum anderen bestehen MTP in der Regel aus hydrophoben Kunststoffen mit hohen adhäsiven Eigenschaften für Phagen [15].

Aus diesem Grund stellen hochparallelisierbare MBR mit online-Sensorik eine vielversprechende Alternative für *growth kinetic assays* dar. Durch sein geringes Volumen von lediglich 7 µL und der damit verbundenen hohen Parallelisierbarkeit ist der sogenannte Kapillarwellen-Mikrobioreaktor (engl. *capillary-wave microbioreactor*, cwMBR) eine besonders geeignete MBR-Plattform, um zukünftig parallelisiert große Phagenbibliotheken screenen zu können. Beim cwMBR handelt es sich um einen MBR, der im Wesentlichen aus einem Glaschip mit interner Kavität besteht, in der in einem Tropfen eine vollständige Kultivierung durchgeführt werden kann. Der cwMBR wurde von Frey et al. (2020) [16] und Meinen et al. (2019) [17] entwickelt und verfügt im Gegensatz zu vielen anderen tropfenbasierten MBR über eine aktive Durchmischung, die auf einer vertikalen Oszillation mit einstellbaren Frequenzen und Amplituden beruht. Durch das Einstellen der Resonanzfrequenz des Tropfens im cwMBR entstehen auf der Oberfläche des cwMBR Kapillarwellen, die für die Durchmischung des Tropfens im cwMBR sorgen. Die hydrophile Glasoberfläche des cwMBR weist phagenabweisende Eigenschaften auf, was für die Aufnahme von Phagogrammen sinnvoll ist [15]. Weiterhin wurde bereits online-Sensorik in den cwMBR integriert. Dabei kann das Biomassewachstum über Streulichtmessung im cwMBR und die Gelöstsauerstoffsättigung über einen chemisch-optischen Sensor auf dem Boden des cwMBRs bestimmt werden [16–18].

Trotz des hohen Potentials des cwMBRs für die Anfertigung von Phagogrammen und anderen zellbasierte Assays bestehen weiterhin technische Einschränkungen des Systems für diese Anwendungen. Um eine große Anzahl von Phagen screenen zu können, ist eine Parallelisierung des cwMBRs notwendig. Eine besondere Herausforderung ist hierbei die

1 Einleitung und Zielsetzung

Parallelisierung der optischen Sensorik zur Biomassebestimmung. Zusätzlich muss auch eine homogene Temperaturverteilung zwischen den einzelnen cwMBR-Kavitäten gegeben sein, wobei eine kurze Aufheizdauer gewährleistet werden muss. Um Phagogramme und Assays mit möglichst geringem Personaleinsatz durchführen zu können, muss außerdem eine Automatisierung des Systems mit automatischer Flüssigkeitszugabe von beispielsweise Phagen gegeben sein. Durch das geringe Volumen von lediglich 7 µL und die offene Tropfenbauweise des cwMBRs stellt die Verdunstung des Kultivierungsvolumens über die Kultivierungszeit eine besondere Herausforderung dar, die minimiert und im besten Fall durch Wasserzugabe ausgeglichen werden muss.

Aus den genannten Limitierungen ergibt sich die Zielsetzung dieser Arbeit:

- Es wird eine parallelisierte cwMBR-Plattform mit automatischer Flüssigkeitszugabe für die biopharmazeutische Forschung entwickelt.
- Die Verdunstung im cwMBR soll zunächst signifikant minimiert werden und im Anschluss durch Wasserzugabe ausgeglichen werden. Weiterhin soll in der automatisierten cwMBR-Plattform eine homogene Temperaturverteilung erreicht werden.
- Die cwMBR-Plattform wird mit einem hochparallelisierbaren Biomassesensor ausgestattet, um die Zu- oder Abnahme der Biomassekonzentration während einer Kultivierung bzw. eines Phagogramms zu bestimmen.
- Zur vollständigen Charakterisierung einer Kultivierung werden neben dem etablierten Sauerstoffsensor auch chemisch-optische pH- und Glucosesensoren integriert, wobei der neuartige Glucosesensor zunächst charakterisiert wird.
- Mithilfe der mit vollständiger Sensorik ausgestatteten cwMBR-Plattform werden die Kultivierungen von *Escherichia coli* mit denen aus etablierten MTP-Kultivierungssystemen gewonnenen Daten verglichen.
- Die Anwendbarkeit des cwMBRs für toxikologische Analysen wird mit Assays zur Viabilitätsanalyse tierischer Zellen demonstriert.
- Weiterhin wird mit der cwMBR-Plattform als biopharmazeutische Applikation ein Modellsystem zur Aufnahme von Phagogrammen entwickelt und im automatisierten cwMBR eingesetzt, um dessen praktische Eignung aufzuzeigen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Mikrobioreaktoren

2.1.1 Anwendungen und Vorteile von Mikrobioreaktoren

Mikrobioreaktoren (MBR) sind Bioreaktoren mit einem Reaktionsvolumen von weniger als 1 mL [1]. Durch ihr geringes Volumen eignen sich MBR besonders für hochparallelisierte und automatisierte Plattformen, wodurch eine hohe Zahl paralleler Kultivierungen mit minimalem Arbeitsaufwand durchgeführt werden können. Dadurch können viele verschiedene Prozessparameter gleichzeitig untersucht und Hochdurchsatzscreenings ermöglicht werden. Die Automatisierung erfolgt dabei in der Regel durch Pipettierroboter oder mikrofluidische Pumpen, die ohne manuellen Eingriff Flüssigkeiten in den MBR hinzugeben oder aus dem MBR entnehmen können. Zur automatischen Prozesscharakterisierung können verschiedene optische Sensoren in MBR integriert werden, wodurch der Aufwand einer manuellen Probenahme und Analyse entfällt. Außerdem führt das geringe Kultivierungsvolumen zur Einsparung von Kultivierungsmedien und Testsubstanzen, was insbesondere bei hochpreisigen Chemikalien und Medienzusätzen zu einer deutlichen Kostensenkung führen kann. Das reduzierte Volumen führt auch zu einem geringeren Platzbedarf der Systeme und dadurch zur Einsparung von Laborfläche. Weiterhin ergeben sich aufgrund ihres großen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses einige prozesstechnische Veränderungen gegenüber größerer Kultivierungssysteme. Dazu gehören u. a. ein verbesserter Stoff- und Wärmetransport über die MBR-Oberfläche. Allerdings verstärken sich ebenso negative oberflächenassoziierte Phänomene wie die Verdunstung [1–4,19].

Durch die genannten Vorteile ergeben sich verschiedene zellbasierte Anwendungen für MBR. Diese lassen sich hauptsächlich in die drei Bereiche mikrobielles und Zellkulturscreening, Bioprozessentwicklung sowie zellbasierte Assays unterteilen. Im Screening-Bereich können MBR verwendet werden, um zwischen verschiedenen Stämmen oder Klonen diejenigen zu finden, die den geforderten Anforderungen am besten entsprechen. In biotechnologischen Prozessen geht es dabei oft um einen möglichst hohen Titer eines Bioproducts. Dabei kann es sich z. B. um Proteine, Antibiotika oder Biopolymere handeln [20–22]. Da jedes bakterielle System eigene Anforderungen an sein Kultivierungsmedium stellt, können MBR im Anschluss an das Screening verwendet werden, um eine optimale Medienzusammensetzung zu finden [23]. Nachdem für einen Bioprozess ein Stamm ausgewählt wurde, dienen MBR der Beschleunigung der Bioprozessentwicklung. Dies geschieht klassischerweise in einem stufenweise angelegten Scale-up der

2 Theoretische Grundlagen

Kultivierungssysteme, beginnend mit kleinskaligen Mikrotiterplatten (MTP) über Schüttelkolben und Laborbioreaktoren bis hin zu Produktionsbioreaktoren im Kubikmetermaßstab. Kleinskalige Systeme zeichnen sich hierbei durch eine höhere Parallelisierung aus, wodurch mehr Prozessvariablen untersucht werden können, wohingegen die Prozessbedingungen größerer Bioreaktoren denen des späteren Produktionsprozesses näherkommen. MBR können dabei verschiedene Schritte der frühen Bioprozessentwicklung zusammenfassen und damit beschleunigen, da hier bestimmte Prozessbedingungen bereits im kleinen Maßstab untersucht werden können. Dies können z. B. Feeding- oder Begasungsstrategien sein [2–4,22,24,25]. Neben diesem Scale-up können MBR auch für Scale-down Prozesse verwendet werden, um einen bestehenden Bioprozess in einem kleineren Maßstab abzubilden, diesen ggf. zu optimieren und anschließend unter den optimierten Bedingungen wieder hochzuskalieren [26,27].

Neben der bioverfahrenstechnischen Anwendung können MBR und andere Kultivierungssysteme im Mikromaßstab wie z. B. *Organ-on-a-Chip*-Systeme auch für zellbasierte Assays und Zellanalysen genutzt werden. Dabei kann in parallelisierten Ansätzen z. B. der Einfluss pharmazeutischer Wirkstoffe, Gifte oder Materialien auf die Viabilität tierischer oder bakterieller Zellen untersucht werden. In diesem Fall können Mikrosysteme dazu beitragen, den Einsatz von Tiermodellen zu senken, die mit hohen Kosten verbunden und ethisch sehr umstritten sind. Generell kann die Kultivierung dabei in Suspension oder auch als zwei- oder dreidimensionale Zellkultur erfolgen. Die Analyse dieser Versuche im MBR erfolgt direkt mittels Mikroskopie, aber auch indirekt über kolorimetrische Assays [28–31]. Eine besondere Anwendung zellbasierter Assays kann auch die Untersuchung der Interaktion von Bakteriophagen von Bakterien sein. Hierbei können Phagen Bakterien infizieren und schlussendlich lysieren. Da Phagen aufgrund von Antibiotikaresistenzen eine immer größer werdende Bedeutung als Antibiotikaalternative zukommen, hat diese Anwendung von MBR zukünftig ein großes Potential für weitergehende therapeutische Anwendungen (s. Kap. 2.3) [32–34].

2.1.2 Design verschiedener Mikrobioreaktorsysteme

Mittlerweile gibt es zahlreiche verschiedene MBR-Designs, die sich vor allem im Volumen, der Reaktorgeometrie, Kultivierungsform, Mischtechnik, Sensorintegration oder dem Grad der Parallelisierung unterscheiden. Diese Systeme reichen von mikrofluidischen Durchflusssystemen [35–37] bis hin zu Batch-Systemen wie mikrotiterplattenbasierten MBR [20,38,39], Mikroblasensäulen [40–43] oder miniaturisierten Rührkesseln [25,44,45].

Rührkessel (engl. *stirred-tank reactor*, STR) sind in der Bioverfahrenstechnik eine der am häufigsten verwendeten Bauformen von Bioreaktoren. Aus diesem Grund ist die Miniaturisierung von STR naheliegend. Beim integrierten Rührer handelt es sich meist um einen Magnetrührer. Durch ihre Ähnlichkeit mit Laborbioreaktoren eignen sich miniaturisierte STR besonders zur Bioprozessentwicklung [44,45]. Trotz der äußerlichen Ähnlichkeit ergeben sich beim Scale-up und Scale-down eines Prozesses jedoch zahlreiche Herausforderungen. Ein Beispiel hierfür ist die Betrachtung der Reynoldszahl Re , die das Strömungsverhalten im Bioreaktor wiedergibt. Diese hängt in gerührten Systemen neben der Dichte ρ und der dynamischen Viskosität η des Mediums auch von der Rührerdrehfrequenz n und dem Quadrat des Rührerdurchmessers d ab (**Glg. 1**):

$$Re = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\eta} \quad (1)$$

Turbulente Strömung wird dabei bei Reynoldszahlen größer als 10.000 erreicht. Bei einer Miniaturisierung des STR verkleinert sich auch der Rührerdurchmesser, wodurch nach **Glg. 1** die Rührerdrehfrequenz umso mehr erhöht werden muss, um eine konstante Re zu erreichen. Ab einem gewissen Grad der Miniaturisierung ist dies nicht mehr umsetzbar, ohne die Zellen durch die hohe Rührerspitzengeschwindigkeit zu schädigen [46]. Trotzdem können miniaturisierte STR zum Scale-down von Labor- oder Produktionsbioreaktoren genutzt werden. Hierbei wurden bereits verschiedene kommerzielle Systeme entwickelt und vermarktet. Dazu gehören u. a. Ambr 15 (Sartorius, Göttingen, Deutschland) und bioREACTOR 48 (2mag, München, Deutschland), die Kultivierungsvolumina zwischen 8 und 15 mL bieten und mit optischen Sensoren zur Bestimmung des pH-Werts und Gelöstsauerstoffkonzentration (engl. *dissolved oxygen*, DO) ausgestattet sind. Beide Systeme können auf bis zu 48 Bioreaktoren parallelisiert werden. Durch die individuell einstellbare Begasung eignet sich Ambr 15 besonders für Zellkultkultivierungen, jedoch sind auch bakterielle Kultivierungen möglich. Ambr 15 verfügt über ein pipettenbasiertes Liquid Handling System (LHS), das automatisch Proben aus den Bioreaktoren entnehmen und zur weiteren Analyse transferieren kann [25,47]. Im Gegensatz zu Ambr 15 wird bioREACTOR 48 vorwiegend für aerobe oder anaerobe bakterielle Kultivierungen genutzt. Dies wird durch den hohen volumenbezogenen Stoffübergangskoeffizienten (k_{La}) von bis zu 1440 h⁻¹ und die flexible Begasung begünstigt. Die Automatisierung kann bei diesem System durch einen Pipettierroboter wie den Freedom EVO (Tecan, Männedorf, Schweiz) erfolgen [48–51].

Ein weiteres Beispiel von miniaturisierten Labor- oder Produktionsbioreaktoren sind Mikroblasensäulen (engl. *microbubble column bioreactor*, μ BC). Dabei wird das

2 Theoretische Grundlagen

Kultivierungsvolumen durch aufsteigende Gasblasen durchmischt. Ein Beispiel für μ BC wurde von Llado Maldonado et al. (2019) [40] entwickelt. Dabei handelt es sich um eine μ BC, die vorwiegend aus einer Halbmikroküvette und einem Mikroskopslide gefertigt wurde und ein Kultivierungsvolumen von 550 μ L aufweist. Die Begasung erfolgt über eine Düse am Boden der μ BC und führte zu k_{La} -Werten von bis zu 204 h^{-1} . Durch optische und elektrochemische Sensoren in der μ BC können die optische Dichte (OD), die DO-Konzentration, der pH-Wert sowie die Glucosekonzentration bestimmt werden. In der μ BC konnten erfolgreich Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt werden [40]. Eine optimierte Version der μ BC wurde von Frey et al. (2020) [43] entwickelt, wobei diese 3D-gedruckt wurde (**Abb. 1A**). Dadurch können zügig neue MBR-Designs entwickelt werden, bei denen das Strömungsverhalten mittels *Computational Fluid Dynamics* (CFD) untersucht wurde. Die 3D-gedruckte μ BC verfügt über einen hohen k_{La} -Wert von bis zu 788 h^{-1} und wurde ebenfalls erfolgreich für Kultivierungen von *S. cerevisiae* eingesetzt [43].

Besonders kommerzielle MBR basieren häufig auf einem MTP-Format, wobei die Platten orbital geschüttelt werden. Beispiele hierfür sind die Systeme micro-Matrix (Applikon/Getinge, Delft, Niederlande), BioLector (m2p-labs/Beckman Coulter, Aachen, Deutschland), sowie die automatisierte BioLector-Variante RoboLector (m2p-labs/Beckman Coulter, Aachen, Deutschland). Beim RoboLector und BioLector erfolgt die Kultivierung entweder in konventionellen MTPs mit runden Wells oder in sogenannten FlowerPlates, bei denen die Wells eine Blütenform aufweisen, wodurch der Sauerstoffeintrag und die Durchmischung verbessert werden können (**Abb. 1B**). In einer FlowerPlate können k_{La} -Werte von bis zu 600 h^{-1} erreicht werden, wodurch das System besonders gut für bakterielle Systeme geeignet ist. Die Kultivierung erfolgt dabei in Volumina zwischen 800 und 1900 μ L und kann in bis zu 48 parallelen Ansätzen erfolgen. Sowohl in MTP mit runden Wells als auch in FlowerPlates kann die Biomassekonzentration mittels Streulichtmessung bestimmt werden. Auch Fluoreszenzbestimmungen im Medium sind möglich. Optische DO- und pH-Sensoren ermöglichen eine weitere Prozesscharakterisierung. Die automatisierte Flüssigkeitszugabe im RoboLector kann durch mikrofluidische Pumpen oder automatische Pipetten erfolgen [25,38,52,53]. Im Gegensatz zu BioLector/RoboLector erfolgt die Kultivierung in micro-Matrix in Volumina zwischen 3 und 5 mL, was zu einem größeren Platzbedarf und dadurch lediglich zu einer maximalen Parallelisierung von 24 führt. Ähnlich wie die vorher genannten Systeme verfügt auch micro-Matrix über optische Sensoren zur pH- und DO-Bestimmung. Des Weiteren verfügen die in micro-Matrix verwendeten MTP über optische Temperatursensoren. Die automatische Flüssigkeitszugabe erfolgt in diesem System hauptsächlich über mikrofluidische Pumpen, die auch zur Zugabe von Säuren und Laugen zur pH-Regulierung genutzt werden

können. Alternativ kann die pH-Regulierung auch mittels individueller Ammoniak- oder CO₂-Begasung erfolgen. micro-Matrix kann sowohl für bakterielle Kultivierungen als auch für tierische Zellkulturen genutzt werden [22,54].

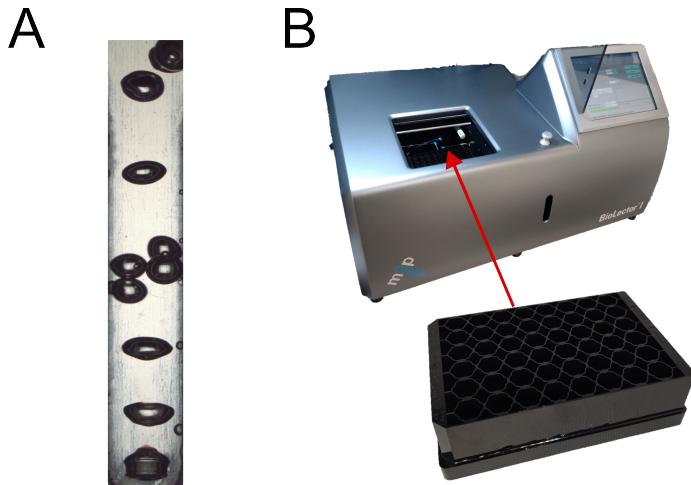


Abbildung 1: (A) Blasen in einer 3D-gedruckten Mikroblasensäule zur Bioprozessentwicklung. (B) BioLector mit FlowerPlate als Beispiel eines kommerziell verfügbaren MBR.

Ein Hauptnachteil MTP-basierter Systeme ist die Gefahr inhomogener Temperaturverteilungen innerhalb der MTP. Dadurch, dass MTP meist über die Umgebungsluft beheizt werden, werden in den Ecken und am Rand liegende Wells oft schneller erwärmt als zentral gelegene Wells. Dieser Effekt ist auch als Edge-Effekt bekannt und kann zu Temperaturgradienten von über 2 °C innerhalb einer MTP führen. Der Edge-Effekt kann einen direkten Einfluss auf die Kultivierung haben, da in äußeren Wells zelluläre Prozesse schneller oder langsamer ablaufen als in zentralen Wells. Damit ist die Vergleichbarkeit innerhalb einer MTP nur noch eingeschränkt gegeben. Ein weiteres Problem der ungleichen Temperaturverteilung ist die ungleiche Verdunstung zwischen zentralen und außen liegenden Wells. So ist die Verdunstung aus den außen liegenden wärmeren Wells höher als aus den zentral gelegenen Wells, was neben Temperatur- auch zu Konzentrationsgradienten innerhalb der MTP führen kann und die Vergleichbarkeit innerhalb einer MTP weiter verschlechtert. Durch den schlechten Wärmeübergang des in MTP verwendeten Kunststoffmaterials ist die Aufheizdauer in der Regel sehr hoch, was ein Vorheizen der Flüssigkeiten erfordert [55–58].

Eine Alternative zu typischen MBR- und MTP-basierten System sind tropfenbasierte Kultivierungssysteme. Hierbei wird eine große Anzahl paralleler Tropfen erzeugt, wobei jeder Tropfen als eigene Kultivierung betrachtet werden kann. Bei diesen Systemen kann zwischen *sessile droplet*- und *segmented flow*-Systemen unterschieden werden. In *sessile droplet*-Systemen werden einzelne Tropfen auf eine Oberfläche gesetzt und dort inkubiert. Gegebenenfalls können diese mit einer Ölschicht gegen Verdunstung geschützt werden [59–63]. Im Gegensatz dazu bestehen *segmented flow*-Systeme aus zwei voneinander getrennten flüssigen Phasen. Dabei werden Tropfen mit Kultivierungsmedium und Zellen erzeugt, die durch eine wasserunlösliche Flüssigkeit voneinander getrennt werden. Auch hier dient jeder Tropfen als einzelnes Kultivierungsvolumen [32,64–66]. Anders als etablierte MBR-Systeme zeichnen sich tropfenbasierte Systeme durch eine höhere Parallelisierbarkeit aus und verbrauchen durch ihr geringes Volumen sehr wenig Medium und Testsubstanzen. Allerdings mangelt es diesen Systemen häufig an aktiver Durchmischung und Sensorsystemen zur Prozesscharakterisierung. Häufig ist lediglich eine Bestimmung der Fluoreszenz des Tropfens oder eine Endpunktbestimmung von Produkt- oder Eduktkonzentrationen möglich. Außerdem sind besonders in *segmented flow*-Systemen die Tropfen oft für eine nachträgliche Flüssigkeitszugabe mittels LHS unzugänglich.

2.1.3 Kapillarwellen-Mikrobioreaktor

Eine Alternative zu herkömmlichen MBR stellt der cwMBR dar, der eine hohe Automatisierbarkeit und Parallelisierbarkeit durch sein geringes Volumen mit aktiver Durchmischung und integrierten optischen Sensoren verbindet. Damit kombiniert der cwMBR die Vorteile von herkömmlichen MBR mit denen von tropfenbasierten Kultivierungssystemen.

Der cwMBR besteht im Wesentlichen aus einem Glaschip mit einer zentralen Kavität, in der ein Tropfen Kultivierungsmedium mit einem Volumen von 7 μL gesetzt werden kann (Abb. 2A). Dabei werden die Glaschips mittels *femtosecond Laser Direct Writing* (fs-LDW) aus fotosensitivem Foturan®-Glas gefertigt. Dieser Prozess zeichnet sich durch eine hohe Genauigkeit bei der Bearbeitung von Glas aus. Glas ist als Substrat vorteilhaft, da es optisch transparent ist und somit die Integration optischer Sensoren ermöglicht sowie chemisch inert ist und eine hydrophile Oberfläche aufweist. Beim fs-LDW werden zunächst die zu entfernenden Bereiche eines Foturan®-Wafers mit einem Femtosekundenlaser selektiv belichtet. Nachdem der Wafer in definierten Schritten auf 600 °C erhitzt wurde, können im Anschluss die laserbestrahlten Bereiche mit Flusssäure entfernt werden, sodass nach weiteren Reinigungsschritten fertige cwMBR-Chips entstehen [17].

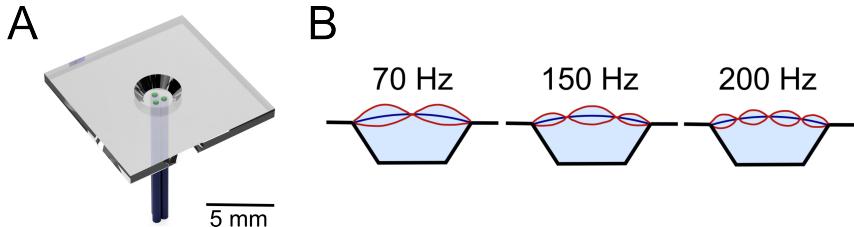


Abbildung 2: (A) cwMBR-Chip mit optischen Sensoren am Boden der Kavität (grün) und LWL (blau). (B) Kapillarwellen (rot) auf der Oberfläche des cwMBR-Tropfens bei unterschiedlichen Resonanzfrequenzen des Tropfens (70, 150 und 200 Hz) verglichen mit der nicht-oszillierten Tropfenoberfläche (blau) (nach Frey (2020) [16]).

Die Durchmischung des Tropfens im cwMBR während der Kultivierung erfolgt durch Kapillarwellen auf der Tropfenoberfläche, die durch vertikale Oszillation induziert werden. Da in diesem Maßstab Kapillarkräfte einen deutlich höheren Einfluss als Gravitationskräfte und Trägheitskräfte aufweisen, kann orbitales Schütteln wie bei MTP im cwMBR nicht mehr eingesetzt werden, sodass die vertikale Oszillation als Alternative entwickelt wurde. Dazu wird der Glas-Chip in einer 3D-gedruckten Halterung befestigt, die auf einer Plattform mit vier Excitern befestigt wird. Wasserreservoirs in der Halterung sorgen für eine Minimierung der Verdunstung aus dem Tropfen. Die Exciter können die darüberliegende Plattform mit definierten und einstellbaren Frequenzen und Amplituden vertikal oszillieren. Durch die Oszillation des Tropfens mit seiner Resonanzfrequenz entstehen auf der Tropfenoberfläche Kapillarwellen mit typischen Strömungsmustern im Tropfen (**Abb. 2B**). Diese sorgen für die Durchmischung des Tropfens. Je nach eingestellter Resonanzfrequenz ändert sich auch die Form der Kapillarwellen bzw. das Schwingungsmuster auf der Tropfenoberfläche. Durch diese Mischtechnik können kurze Mischzeiten von weniger als 2 s und k_{La} -Werte von bis zu 340 h^{-1} erreicht werden. Je nach Anwendungszweck lassen sich durch die Veränderung der Oszillationsfrequenz oder -amplitude jedoch auch niedrigere k_{La} -Werte und Mischzeiten einstellen. Die Resonanzfrequenz f_n des Tropfens lässt sich auch mit **Glg. 2** theoretisch berechnen:

$$f_n = \sqrt{\left(\frac{g \cdot n}{4 \cdot \pi \cdot L} + \frac{\gamma \cdot \pi \cdot n^3}{\rho \cdot 4 \cdot L^3} \right) \cdot \tanh\left(\frac{\pi \cdot n \cdot h}{L}\right)} \quad (2)$$

Dafür benötigt werden die Länge des Oberflächenprofils L , die Oberflächenspannung der Flüssigkeit γ , die Füllstandshöhe h , die Hälfte der Wellenlänge auf der Tropfenoberfläche n , die Dichte der Flüssigkeit ρ sowie die Fallbeschleunigung g .