

Dynamische Membranbegasung im Bioreaktor zur Intensivierung der Sauerstoffversorgung empfindlicher Zelllinien

Björn Frahm, Stephan Kirchner, Jörg Kauling, Helmut Brod*,
Uwe Langer und Berthold Bödeker

Zur Produktion pharmazeutischer Proteinwirkstoffe werden heute vielfach tierische Zelllinien eingesetzt. Während robuste Zelllinien trotz fehlender Zellwand eine Sauerstoffversorgung über Blasenbegasung tolerieren, ist zur Kultivierung von empfindlichen Zelllinien eine blasenfreie Sauerstoffversorgung erforderlich, z. B. per Membranbegasung. Ein wesentlicher Nachteil der Membranbegasung ist jedoch die begrenzte Stofftransportkapazität, welche die Zelldichte und damit die Raum-Zeit-Ausbeute im Bioreaktor limitiert. Dies kann sich vor allem für intensivierete Fermentationen mit hohen Zelldichten (Perfusion, ggf. Fed-Batch) nachteilig auswirken. Vorgestellt wird ein konstruktiv einfaches dynamisches Membranbegasungssystem, in dem die Funktionselemente „Rotor“ und „Stator“ in einem rotatorisch oszillierenden Membranträger vereinigt sind.

Schlagwörter: Bioreaktor, Membranen, Stofftransport, Zellen

Eingegangen: 19. April 2007; *akzeptiert:* 30. April 2007

Aufgrund der fehlenden Zellwand sind tierische Zellen im Gegensatz zu Mikroorganismen äußerst schერempfindlich, was ihre Handhabung in technischen Suspensionsreaktoren erheblich erschwert.

1 Problemstellung

Zur Produktion pharmazeutischer Proteinwirkstoffe werden heute vielfach tierische Zelllinien eingesetzt. Aufgrund der fehlenden Zellwand sind tierische Zellen im Gegensatz zu Mikroorganismen äußerst schערempfindlich, was ihre Handhabung in technischen Suspensionsreaktoren erheblich erschwert. Das Sicherstellen der Reaktorhomogenität sowie der Sauerstoffzufuhr und Kohlendioxiddesorption kann bei hoher Zelldichte und großen Reaktormaßstäben eine Herausforderung sein. So führt in manchen Fällen eine Makro- oder Mikro-Blasenbegasung zu inakzeptabler Schädigung der Zellen durch hydrodynamische Effekte wie z. B. hohe Scherkräfte beim Zerplatzen von Gasblasen an der Flüssigkeitsoberfläche. Um diese Effekte auszuschließen, wird bei der Kultivierung von empfindlichen Zellen häufig die sogenannte Membranbegasung angewendet [1]. Die Gase werden hierbei diffusiv über eine zwischen Kulturflüssigkeit und Gasversorgung installierte Membran ausgetauscht. Als Membran verwendet man häufig dünne Schläuche aus gaspermeablem Material, z. B. Siliconkautschuk (oder: -elastomer). Ein Nachteil herkömmlicher Systeme zur Membranbegasung ist jedoch die begrenzte Stofftransportkapazität. Diese limitiert wieder-

um die Zelldichte und damit die Raum-Zeit-Ausbeute eines Bioreaktors. Bezüglich der Stofftransportkapazität limitiert sind, abhängig vom Maßstab, besonders Zellkulturprozesse mit Zelldichten in der Größenordnung von $8 \cdot 10^6$ Zellen mL^{-1} und darüber. Dies betrifft besonders Perfusions- (mit Zellrückhaltung) und Fed-Batch-Prozesse, bei denen entsprechende Zelldichten erreicht werden.

Es wird ein dynamisches Membranbegasungssystem vorgestellt, das die Intensivierung der Sauerstoffversorgung tierischer Zellkulturen bei gleichzeitig einfachem Aufbau ermöglicht. Konventionelle Systeme bestehen aus einem Rotor (Rührer) und einem Membranstator. Dieser ist z. B. ein zylindrisches Gestell, auf dem Membranschläuche aufgewickelt werden, vorzugsweise in vertikaler Richtung. Der Rotor, z. B. ein schערarmer Ankerrührer, dreht sich im Innern dieses Membranstators. Dadurch wird eine Umströmung der Membranschläuche bei jedem Vorbeiziehen eines Rotorblattes erzeugt. Im neuen System sind die Funktionselemente „Rotor“ und „Stator“ in einem rotatorisch oszillierenden Membranträger vereinigt, wie in Abb. 1 veranschaulicht ist.

Die Gasversorgung des Membranträgers vom Reaktordeckel her erfolgt über flexible Schläuche. Durch die oszillierende Drehbewegung wird zum einen die Umströmung der

Membranschläuche verbessert. Zum anderen entfallen drehende Dichtungen für die Gasversorgung, und es ergeben sich Vorteile für das hygienische Design und die Systemstandzeit. Durch die funktionelle Vereinfachung entsteht Raum für die Installation zusätzlicher Membranfläche. Zudem wird die Maßstabsvergrößerung erleichtert.

Es werden Forschungsergebnisse an einem hydrodynamischen Reaktormodell exemplarisch im 100-L-Maßstab vorgestellt. Vermessen wurden ferner der 12-L-, 20-L- und 200-L-Maßstab (nicht dargestellt). Der volumenspezifische Stofftransportkoeffizient konnte bei gleichem volumenspezifischem Leistungseintrag – dies bedeutet annähernd gleiche Scherbelastung der Zellen – gegenüber dem konventionellen System mehr als verdoppelt werden. Diese Verbesserung geht je nach Maßstab einerseits auf die Erhöhung des Stofftransportkoeffizienten (d. h. auf die Verbesserung der Membranumströmung) zurück. Andererseits resultiert die Verbesserung auch aus der Vergrößerung der spezifischen Stoffaustauschfläche. Hier ist anzumerken, dass dies bei einem Membranstatorsystem i. Allg. kaum möglich ist. Dort geht eine Vergrößerung der Membranfläche (z. B. durch Ineinanderschichtung von zwei Membranstatoren) in der Regel mit einer Abnahme des Stofftransportkoeffizienten einher.

Das Reaktordesign bei der dynamischen Membranbegasung (Dynamic Membrane Aeration [DMA]) ist so zu gestalten, dass auch der Aspekt der Vermischung berücksichtigt und entsprechend optimiert wird. Der Einfluss verschiedener geometrischer Konfigurationen auf das Mischverhalten wird in diesem Beitrag diskutiert.

1.1 Hintergrund der Dynamic Membrane Aeration

Nachteil der bisherigen Systeme zur Membranbegasung wie der oben erwähnte Membranstator ist der vergleichsweise geringe Stofftransportkoeffizient [1]. Um hohe Stofftransportraten zu erreichen, ist es erforderlich, entsprechend viel Membranfläche im Bioreaktor zu installieren. Dies ist jedoch bezüglich Konstruktion und Handhabung aufwendig (Montage, Sterilisation, Reinigung, Erzeugung von unzureichend durchmischten Bereichen etc.). Des Weiteren kann der Leistungseintrag erhöht werden. Da der Stofftransportkoeffizient vom Leistungseintrag abhängig ist, kann hierdurch eine Steigerung des Stofftransportkoeffizienten erzielt werden. Das Potenzial ist jedoch durch die resultierende Scherbelastung

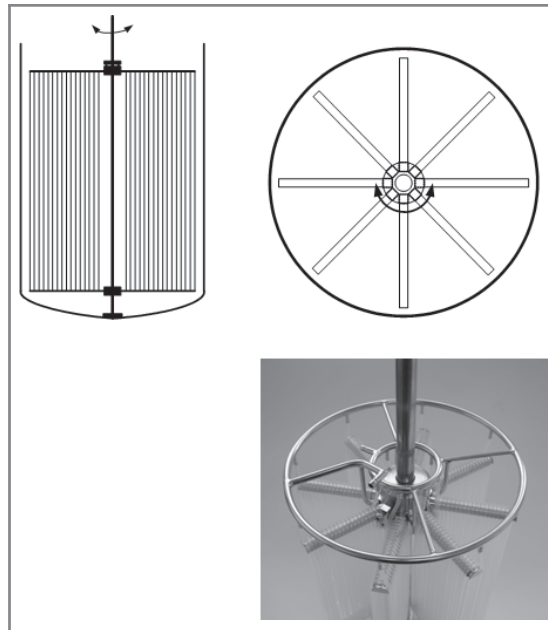


Abbildung 1. Schematischer Aufbau des Dynamic Membrane Aeration (DMA)-Konzepts im Querschnitt oben links und in der Draufsicht oben rechts: Die Membranschläuche sind auf die Rotorarme aufgewickelt, die sternförmig auf einer Welle angeordnet sind und sich im oberen und unteren Bereich des Reaktors befinden. Die Welle ist mittig im Reaktor angeordnet und wird durch einen Motor außerhalb des Reaktors angetrieben. Die Membranschläuche sind auf diese Weise quer zur Bewegungsrichtung ausgerichtet. Die Anströmung der Membranschläuche resultiert aus der Relativbewegung zwischen Schläuchen und Flüssigkeit. Das Foto unten zeigt einen DMA-Rotor für den 12-L-Maßstab von schräg oben: Die beiden konzentrischen Ringe dienen der Gaszufuhr und Gasabfuhr für die Membranschläuche auf den einzelnen Rotorarmen. Diese sind parallel geschaltet.

der Zellen aufgrund des höheren Leistungseintrages begrenzt.

Aus diesen Rahmenbedingungen resultiert die Anforderung, hohe Stofftransportkoeffizienten mit einer entsprechenden Membranbegasung bei gleichzeitig geringem Leistungseintrag bzw. gleichzeitig geringer Scherbelastung zu erreichen. Eine Nebenbedingung ist, dass die Durchmischung des Reaktorraumes weiterhin in ausreichendem Maße erfolgt. Diese muss einerseits die Sedimentation der Zellen verhindern, andererseits die Vermischung evtl. zugeführter Flüssigkeiten (Nährmedien, Pufferlösung etc.) in ausreichend kurzen Mischzeiten ermöglichen.

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurde z. B. der sogenannte Lehmann-Reaktor entwickelt, auch als sogenannter Diesel-Reaktor bekannt [2, 3]. Dieser konnte sich jedoch in der Praxis bislang nicht durchsetzen. Hierbei handelt es sich um auf eine Halterung aufgewickelte Membranschläuche, die im Inneren des Bioreaktors eine Taumelbewegung (Exzenterbewegung ohne Eigenrotation) ausführen. Die mechanischen Vorrichtungen des Exzenterantriebs müssen zwangsläufig im

Das Reaktordesign bei der dynamischen Membranbegasung ist so zu gestalten, dass auch der Aspekt der Vermischung berücksichtigt und entsprechend optimiert wird. Der Einfluss verschiedener geometrischer Konfigurationen auf das Mischverhalten wird in diesem Beitrag diskutiert.

Reaktor, also innerhalb des Sterilbereiches, vorgesehen werden. Womöglich hat die Komplexität des Lehmann-Reaktors (Sterilisation, Wartung etc.) die Anwendung dieses Patentes verhindert.

Ansatz der verwandten DMA war es folglich, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur konstruktiv einfachen, effektiven, schonenden, leicht zu reinigenden und blasenfreien Begasung von Zellkulturen bereitzustellen.

2 Messprinzip und Versuchsaufbau

2.1 DMAeration-Zellkulturreaktoren und Modellsysteme

Abb. 2 zeigt eine fotografische Ansicht der untersuchten DMA-Zellkulturreaktoren und Modellsysteme in den verschiedenen Maßstäben.

Als Antrieb dient ein Servomotor mit einem Stillstandsmoment von 6 Nm, an den ein Planetengetriebe mit einer Untersetzung von 1:12 angeflanscht ist (Modell Nr. 34S80, Jenaer Antriebstechnik GmbH, Jena). Die Ansteuerung erfolgt über einen zugehörigen Schaltschrank und der auf einen PC aufgespielten ECO2WIN Software. Der Antrieb erlaubt die einfache Variation aller Bewegungsparameter wie Oszillationsamplitude, Frequenz, Beschleunigung, Verzögerung, Haltezeit am Umkehrpunkt usw.

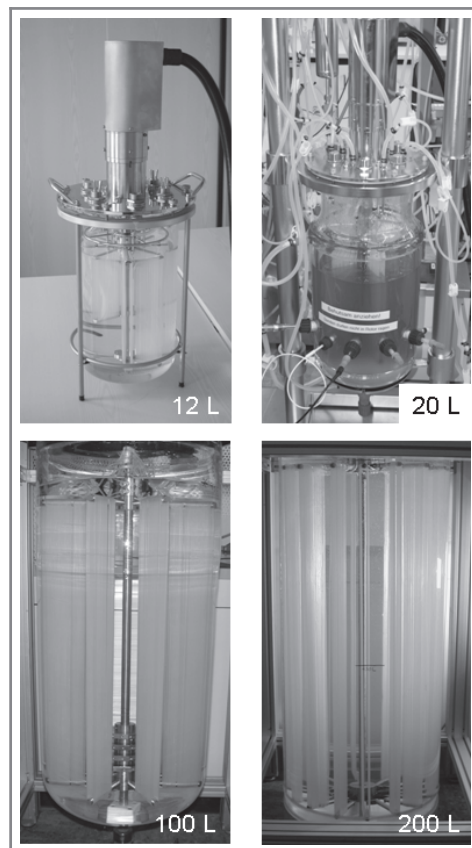


Abbildung 2. Ansicht der untersuchten DMA-Maßstäbe: 12 L, 20 L, 100 L und 200 L (je Füllvolumen). Die Systeme im 12-L- und 20-L-Maßstab sind Zellkulturreaktoren (12 L ohne Reaktorperipherie und 20 L mit Peripherie bei laufender Kultivierung). Die Systeme im 100-L- und 200-L-Maßstab hingegen sind Modellsysteme aus der Entwicklungsphase zur Charakterisierung der Eigenschaften hinsichtlich Stofftransport, Scherbeanspruchung, Leistungseintrag und Mischzeitkennzahl. Für diese beiden Maßstäbe steht die Fertigung von Zellkultursystemen noch an.

Als Membranschläuche für die 100-L- und 200-L-Modellsysteme wurden Siliconschläuche mit einem Außendurchmesser von 3 mm und einem Innendurchmesser von 2 mm verwendet (Kronlab Chromatographie & Labortechnik, Laboflex-Schlauch, SI2,0 NA3,0). Für die 12-L- und 20-L-Zellkulturreaktoren wurde SILASTIC RX 50 Medical Grade Tubing Special, 0,078 in. (1,98 mm) Innendurchmesser \times 0,125 in. (3,18 mm) Außendurchmesser eingesetzt (500 ft Rolle, Dow Corning).

2.2 Bestimmung des (volumenspezifischen) Stofftransportkoeffizienten für Sauerstoff

Der volumenspezifische Stofftransportkoeffizient für Sauerstoff wird mittels einer instationären Methode bestimmt. Aus dem mit Wasser gefüllten Reaktor wird zunächst chemisch sämtlicher Sauerstoff durch Zugabe von Natriumdisulfit verdrängt. Ist die Sauerstoffkonzentration unter 5 % Luftsättigung abgesunken, erfolgt die Begasung durch die Membranschläuche mit Luft. Der Verlauf der Sauerstoffkonzentration wird mittels einer Sauerstoffsonde beobachtet (WTW-Sauerstoffsonde EOT 196, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) und die Messung aufgezeichnet. Die maximale Gelöst-Sauerstoffkonzentration liegt im Bereich von 128 % bis 133 % Luftsättigung (Membraninnendruck $>$ 1 bar). Aus der entsprechenden Auswertung der Gelöst-Sauerstoffkonzentration ergibt sich der volumenspezifische Stofftransportkoeffizient.

Durch den Sauerstoffpartialdruck der umgebenden Luft und die Oberfläche des Reaktors wird ebenfalls Sauerstoff in das Wasser eingetragen. Der bisher gemessene volumenspezifische Stofftransportkoeffizient ist daher der Gesamtstofftransportkoeffizient (Oberfläche + Membran). Daher muss, um den volumenspezifischen Stofftransportkoeffizienten des eigentlichen Membranbegasungssystems zu erhalten, der volumenspezifische Stofftransportkoeffizient der Oberflächenbegasung vom volumenspezifischen Gesamtstofftransportkoeffizienten abgezogen werden. Bei der Messung der Oberflächenbegasung sind die Membranschläuche mit Wasser gefüllt.

2.3 Bestimmung des volumenspezifischen Leistungseintrages

Die in die Flüssigkeit eingetragene Leistung des oszillierenden DMA-Rotors wird aus dem Antriebsdrehmoment an der Welle und der

Winkelgeschwindigkeit ermittelt. Das Drehmoment setzt sich dabei aus dem Last- und dem Leermoment zusammen. Das bedeutet, dass die Messung sowohl im mit Wasser gefüllten Zustand des Reaktors (Lastmoment) als auch im leeren Zustand (Leermoment) durchgeführt wird. Für jeden Messpunkt erfolgt die Subtraktion des Leermoments vom Lastmoment und die Multiplikation des Ergebnisses mit der Winkelgeschwindigkeit. Dies ergibt den zeitlichen Verlauf der Leistung. Eine Mittelung ergibt den mittleren Leistungseintrag, und die Division mit dem Reaktorfüllvolumen liefert den volumenspezifischen Leistungseintrag. Last- und Leermoment werden durch Verwendung eines Drehmomentsensors (DRFL-II-20; ETH-Messtechnik GmbH, Gschwend) erfasst. Die Winkelgeschwindigkeit des Rotors wird durch Aufzeichnung der Ausgaben der Antriebssteuerung gewonnen.

2.4 Bestimmung der Mischzeitkennzahl

Die Mischzeitkennzahl ergibt sich aus der Multiplikation von Rührerdrehzahl und gemessener Makromischzeit. Bei dem DMA-Konzept wird analog zur Rührerdrehzahl die Oszillationsfrequenz verwendet. Bei allen hier dargestellten Ergebnissen überstreicht der Rotor mit der Hin- und Zurückbewegung jeweils einen Gesamtwinkel von 180° . Die Amplitude der Rotorbewegung ist somit 90° . Innerhalb eines Oszillationszyklus überstreicht damit der Rotor einen Gesamtwinkel von 360° , genau wie ein konventioneller Rührer innerhalb einer Umdrehung. Die Oszillationsfrequenz gibt die Anzahl solcher Oszillationszyklen pro Zeiteinheit an.

Die Bestimmung der Makromischzeit erfolgt mit einer optischen Entfärbungsmethode, einer Jod- und Thiosulfatreaktion mit einem Jod-Stärke-Komplex als Farbgeber. Das Jod färbt das Wasser braun. Nach der Zugabe von Natriumthiosulfat auf die freie Flüssigkeitsoberfläche entspricht die Makromischzeit der Zeit zur vollständigen Entfärbung.

3 Ergebnisse

Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit des DMA-Konzeptes werden im Vergleich zu einem herkömmlichen Membranstator vier Kriterien herangezogen:

- der Stofftransportkoeffizient (für Sauerstoff), um zu beurteilen, wie viel höher der Stofftransportkoeffizient durch die bessere Umströmung der Membranschläuche beim DMA ist;

- der volumenspezifische Stofftransportkoeffizient (für Sauerstoff), um zu vergleichen, wie viel höher der Stofftransport insgesamt ist. Hier ist jedes System mit der maximal sinnvollen Membranfläche belegt, und es wird das Produkt aus Stofftransportkoeffizient und volumenspezifischer Membranfläche verglichen;
- der volumenspezifische Leistungseintrag in die Flüssigkeit;
- die Scherbeanspruchung. Als Vergleichskriterium ist die Scherbeanspruchung in der Zellkultur relevanter als der mittlere Leistungseintrag, da die Zellen durch lokale Spitzen in der hydrodynamischen Beanspruchung geschädigt werden. Unterschiedliche Reaktorkonfigurationen können bei gleichem mittlerem Leistungseintrag unterschiedliche Scherbeanspruchungen aufweisen [4].

Abb. 3 zeigt den Stofftransportkoeffizienten k für Sauerstoff in Abhängigkeit vom volumenspezifischen Leistungseintrag mit der DMA im 100-L-Maßstab im Vergleich zu einem herkömmlichen Membranstator.

Es zeigt sich bei einem zellkulturelevanten Leistungseintrag von 6 W m^{-3} ein um 35 % höherer Stofftransportkoeffizient bei der DMA. Dies verdeutlicht den Vorteil, der dadurch entsteht, dass alle Membranschläuche zugleich gezielt durch die Flüssigkeit bewegt werden, anstatt sie nur mit einem Rührer bei jeder Umdrehung anzuströmen.

Abb. 4 veranschaulicht einen weiteren Vorteil der DMA, dass auch eine Vergrößerung der installierten Membranfläche möglich ist. Bei Membranstatoren geht eine Vergrößerung der Membranfläche, wie in der Einleitung erwähnt, in der Regel mit einer solchen Abnahme des Stofftransportkoeffizienten einher, dass der Verlust im Stofftransportkoeffizienten

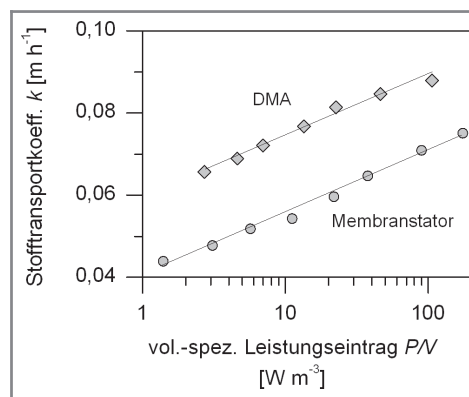


Abbildung 3. Stofftransportkoeffizient k für Sauerstoff in Abhängigkeit vom volumenspezifischen Leistungseintrag P/V mit der DMA im 100-L-Maßstab im Vergleich zu einem herkömmlichen Membranstator.

Im membranbe-gasten Zellkultur-reaktor können die maximale Zellzahl-dichte, die Raum-Zeit-Ausbeute und somit die Produk-tausbeute deutlich gesteigert werden.

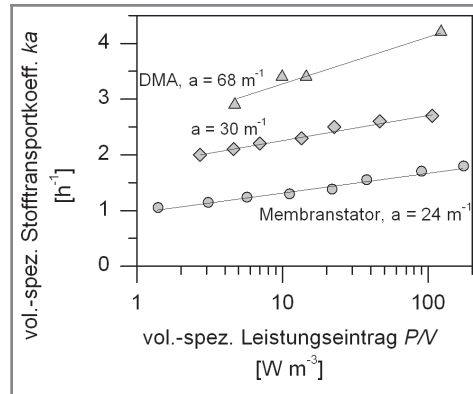


Abbildung 4. Volumenspezifischer Stofftransportkoeffizient k_a für Sauerstoff in Abhängigkeit vom volumenspezifischen Leistungseintrag P/V mit der DMA im 100-L-Maßstab im Vergleich zu einem herkömmlichen Membranstator. Dabei sind zwei DMA-Konfigurationen aufgetragen: Zunächst ist auf die „Standard-Rotorarme“ eine geringe Membranfläche aufgewickelt, welche $30 m^2$ pro m^3 Reaktorflüssigvolumen entspricht. Weiterhin ist eine größere Membranfläche auf Y-förmig verzweigte Rotorarme aufgewickelt, wodurch eine volumenspezifische Stoffaustauschfläche von $68 m^2/m^3$ erreicht wurde.

den Gewinn an Membranfläche fast aufhebt. Dazu ist in Abb. 4 der volumenspezifische Stofftransportkoeffizient für Sauerstoff in Abhängigkeit vom volumenspezifischen Leistungseintrag aufgetragen.

Abb. 4 zeigt Ergebnisse für die beiden Systeme DMA und Membranstator aus Abb. 3. Zu erkennen ist, dass der Membranstator eine geringere Schlauchlänge aufweist als die DMA und trotzdem in Abb. 3 deutlich niedriger liegt (im Umkehrschluss zu „Vergrößerung der Membranfläche → Abnahme des Stofftransportkoeffizienten“ gilt „Verkleinerung der Membranfläche → Zunahme des Stofftransportkoeffizienten“).



Abbildung 5. Fotografische Ansicht einiger untersuchter DMA-Konfigurationen im 100-L-Maßstab: 18° gegenüber der Vertikalen angestellte Membranen links, 12° seitlich ausgeformte Membranen mittig (Profil durch eingezeichnete Linie verdeutlicht) und einseitig abgestützte Membranen rechts.

Außerdem zeigt Abb. 4 eine weitere Konfiguration der DMA mit vergrößerter Membranfläche auf Y-förmig verzweigten Rotorarmen, die $68 m^2$ pro m^3 Reaktorflüssigvolumen entspricht.

Bei einem zellkulturelevanten Leistungseintrag von $6 W m^{-3}$ ist der volumenspezifische Stofftransportkoeffizient beim System DMA nun 140 % höher als beim Membranstator. Es ist natürlich auch eine Abnahme im Stofftransportkoeffizienten zu beobachten, jedoch ist diese so gering, dass sich das Einbringen von zusätzlicher Membranfläche lohnt.

Vergleicht man den Stofftransport als Funktion der Scherbeanspruchung suspendierter Partikel (statt als Funktion des Leistungseintrags), liefert die DMA 125 % mehr Stofftransportkapazität als der Membranstator (Ergebnisse nicht dargestellt). Trotz erhöhter Scherbeanspruchung, die vermutlich auf die zusätzliche Membranfläche zurückzuführen ist, kann per DMA der volumenspezifische Stofftransportkoeffizient und damit der Stofftransport mehr als verdoppelt werden. Die durch die Systeme hervorgerufene Scherbelastung von Zellen wird im hydrodynamischen Modellversuch quantitativ mit Hilfe eines Ton/Polymer Flockensystems ermittelt [4, 5]. So ist die Möglichkeit gegeben, verschiedene Reaktoren, Rührer, Reaktorkonfigurationen etc. miteinander vergleichen zu können.

Eine positive Charakteristik ist bei der DMA auch, dass die eben gezeigten Vorteile bei der Variation von Rotorbewegung (Beschleunigung/Verzögerung, Amplitude) erhalten bleiben, das Systemverhalten also robust ist. Ein mathematisches Modell simuliert ferner die zeitlichen Verläufe von Leistungseintrag, Stofftransport, Drehmoment usw. in verschiedenen Maßstäben.

3.1 Optimierung der Mischeigenschaften des Systems

Schon bei dem oben erwähnten Lehmann-Reaktor zeigte sich, dass die Durchmischung bei einem derartigen System wichtig ist, insbesondere in axialer Richtung. Möglichkeiten, die axiale Durchmischung zu forcieren, sind in Abb. 5 dargestellt.

Eine Möglichkeit ist das Anstellen der Membranfläche gegenüber der Rotorachse. Durch beliebiges Verstellen der relativen Winkelposition der oberen und unteren Rotorarme lässt sich der Anstellwinkel der Membranschläuche verändern. Untersucht wurden die Winkel 0° , 6° und 18° . Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch die Montage von Richtelementen auf der Rotorwelle. Diese Richtelemente be-

stehen aus zwei Stangen und werden innerhalb des Reaktorraums so angeordnet, dass sie die Membranschläuche entsprechend einseitig abstützen oder ausformen.

Durch die Ausformung wird eine Asymmetrie der Strömungsbilder in beiden Bewegungsphasen des Rotors geschaffen. Diskutiert werden Ergebnisse einer Ausformung, bei welcher der Winkel oben und unten 12° gegenüber der Vertikalen beträgt.

Bei dem einseitigen Abstützen wird die Durchmischung dadurch beeinflusst, dass die durch den Strömungswiderstand bedingte Auslenkung der Membranschläuche in einer Rotationsrichtung begrenzt wird. Dadurch ist die Auslenkung in einer Rotationsrichtung stärker als in der entgegengesetzten Richtung, was in einer schwächeren Förderung der Flüssigkeit in dieser Richtung resultiert. Die ungleiche Förderung in die beiden Bewegungsrichtungen des drehend oszillierenden Rotors führt zu einer Netto-Förderwirkung in einer Richtung und damit zu einer besseren Durchmischung. Die Richtelemente, mit denen die Auslenkung der Membranschläuche in einer Drehrichtung begrenzt wird, können gleichmäßig oder ungleichmäßig über die Länge der Membranschläuche verteilt sein. In der untersuchten Konfiguration waren vier Richtelemente gleichmäßig in der unteren Reaktorhälfte angeordnet. Hierdurch ist ferner der Strömungswiderstand in der unteren und oberen Reaktorhälfte unterschiedlich, und es ergibt sich bei der oszillierenden Drehbewegung ein zusätzlicher axialer Mischeffekt.

Abb. 6 zeigt hierzu die Mischzeitkennzahl in Abhängigkeit vom volumenspezifischen Leistungseintrag im 100-L-Maßstab für die Standardkonfiguration, die 18° gegenüber der Vertikalen angestellten Membranen, die 12° seitlich ausgeformten Membranen und die einseitig abgestützten Membranen.

Zunächst zeigt Abb. 6 eine weitgehende Unabhängigkeit der Mischzeitkennzahl vom volumenspezifischen Leistungseintrag. Die mit der Oszillationsfrequenz gebildete Reynolds-Zahl liegt bei den gezeigten Versuchen zwischen 13 000 und 43 000, sodass von ausgebildeter Turbulenz ausgegangen werden kann. Demnach ist die beobachtete Unabhängigkeit der Mischzeitkennzahl vom Leistungseintrag auch zu erwarten. Weiterhin zeigt Abb. 6 eine drastische Verringerung der Mischzeitkennzahl von im Mittel 78 bei der Standardkonfiguration auf 32 und 33 (42 %) für 18° angestellte Membranen und einseitig abgestützte Membranen. Die 12° seitlich ausgeformten Membranen erlauben eine Reduktion auf 47 (60 %). Die dargestellten einfachen Variationen im DMA-Aufbau erweisen sich als sehr ef-

ektiv. Jedoch müssen auch auftretende Änderungen im Stofftransportkoeffizienten und in der Scherbeanspruchung betrachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Werden diese in die Bewertung einbezogen, so sind die 12° seitlich ausgeformten Membranen die beste Möglichkeit, die Mischkennzahl zu verbessern, ohne deutliche Verringerungen in den anderen Parametern hinnehmen zu müssen.

Bei der Dynamic Membrane Aeration gibt es zahlreiche weitere Möglichkeiten, Einfluss auf die Durchmischung zu nehmen, wie z. B. Variation der Schlauchspannung, Membranschlauchwicklungsmuster (Abstände zwischen bestimmten Schläuchen), Rotor ohne Rotationsasymmetrie bzw. mit Strömungsführungs- und Durchmischungselementen. Es zeigte sich in der Zellkulturfermentation im 20-L-Maßstab (s. u.), dass auch in der Standardkonfiguration die für eine erfolgreiche Zellkultivierung notwendigen Bedingungen im DMA-Reaktor vorliegen.

4 Schlussfolgerung

Das vorgestellte Konzept der Dynamic Membrane Aeration weist gegenüber dem konventionellen Rotor-Membranator-System im 100-L- und 200-L-Maßstab eine verdoppelte Sauerstofftransportkapazität bei gleicher Scherbeanspruchung auf (Ergebnisse aus dem 200-L-Maßstab nicht dargestellt). Damit können im membranbegasten Zellkulturreaktor die maximale Zellzahldichte, die Raum-Zeit-Ausbeute und somit die Produktausbeute deutlich gesteigert werden.

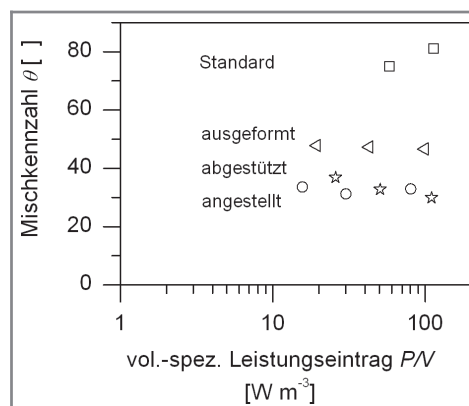


Abbildung 6. Mischzeitkennzahl θ in Abhängigkeit vom volumenspezifischen Leistungseintrag P/V mit der DMA im 100-L-Maßstab für verschiedene DMA-Konfigurationen: 18° gegenüber der Vertikalen angestellte Membranen, 12° seitlich ausgeformte Membranen und einseitig abgestützte Membranen.

Einsatzgebiete des neuen Membranbegasungssystems sind insbesondere die Kultivierungen scherempfindlicher Zelllinien und gleichzeitig Prozesse, die sauerstofftransportlimitiert sind.

Einsatzgebiete des neuen Membranbegasungssystems sind insbesondere:

- die Kultivierungen von scherempfindlichen Zelllinien, die eine Blasenbegasung nicht tolerieren, und gleichzeitig
- Prozesse, die sauerstofftransportlimitiert sind (oder i. Allg. gastransportlimitiert, z. B. hinsichtlich Kohlendioxid). Dies betrifft also besonders Perfusions- (mit Zellrückhaltung) und Fed-Batch-Prozesse, bei denen entsprechend hohe Zelldichten erreicht werden.

Vorgestellt wurden weiterhin Variationen der DMA, mit denen die Mischzeitkennzahl beeinflusst wird.

Das DMA-Konzept wurde im 20-L-Maßstab bereits erfolgreich für die Fed-Batch-Kultivierung tierischer Zellen eingesetzt (nicht dargestellt). 2/3 der Membranfläche mit DMA reichten aus, um die gleiche Zellzahl wie in einem baugleichen Reaktor mit einem klassischen Rotor-Membranstator-System zu erreichen ($8 \cdot 10^6$ Zellen mL^{-1} bei gleichem Antikörpertiter). Bei der DMA kann die Membranfläche jedoch für intensivere Kultivierungen (Perfusion mit Zellrückhaltung) noch verdoppelt werden, während das konventionelle Rotor-Stator-System schon maximal mit Membranfläche belegt war. Die Durchmischung in der Standard-DMA-Konfiguration war auch in der Praxis hinreichend, sodass die Zellen in Suspension blieben.

Dank gilt Herrn Rose für die konstruktive Ausgestaltung des Projektes sowie Bayer Industry Services (BIS) für die Fertigung der Reaktoren (Herr Commer, Herr Schiffzyk, Herr Drinhausen, Herr Kamphusmann und Herr Letzner). Den Abteilungskollegen möchte ich für die Unterstützung sowie die anregenden Diskussionen danken, Herrn Arndt Braun für die Einrichtung der Messtechnik. Den Studenten Andreas Sinthern, Juliane Schröter und Maike Rampe sei für das Engagement im Rahmen ihrer Diplomarbeiten gedankt. Die erwähnte Zellkultivierung mit dem DMA-Bioreaktor wurde bei der Bayer Health Care AG in Wuppertal durchgeführt. Hier gilt besonderer Dank Herrn Wischniewski sowie seinen Kollegen.

Dr.-Ing. B. Frahm,
S. Kirchner,

Dipl.-Ing. J. Kauling,
*Bayer Technology Services (BTS),
Enzyme and Fermentation Technology,
D-51368 Leverkusen, Germany;*

Dr.-Ing. H. Brod,
*(helmut.brod@bayertechnology.com),
Bayer Technology Services (BTS),
Enzyme and Fermentation Technology,
D-51368 Leverkusen, Germany;*

Dr. U. Langer,
Dr. B. Bödeker,
*Bayer HealthCare AG,
Global Biological Development,
D-42096 Wuppertal, Germany.*

Literatur

- [1] H.-J. Henzler et al., *Bioprocess. Eng.* **1993**, 9, 61.
- [2] J. Lehmann, *Europäisches Patent 0172478*, **1989**.
- [3] J. Vorlop et al., *Chem. Eng. Technol.* **1988**, 11 (1), 171. DOI:10.1002/ceat.270110123
- [4] A. Biedermann, Scherbeanspruchung in Bioreaktoren, *Dissertation*, Universität Köln **1994**.
- [5] H.-J. Henzler, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2000**, 67, 35.