



Astrid Edlich (Autor)

Entwicklung eines Mikroreaktors als Screening-Instrument für biologische Prozesse



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/656>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

2 Theorie

2.1 Mikrobioverfahrenstechnik

Die Mikrobioverfahrenstechnik umfasst die Kontrolle und technische Nutzung von dynamischen Wechselwirkungen zwischen komplexen biologischen Systemen (pro- und eukaryotische Zellen, Zellverbände oder Enzyme) und deren definierter Mikroumgebung bei gleichzeitiger Beherrschung von Stofftransportvorgängen mehrphasiger Fluide (Gas- und Flüssigphase sowie feste biologische Phase). Durch das hohe Oberflächen/Volumen-Verhältnis in Mikrostrukturen mit Reaktionsvolumina im μL - und nL -Maßstab spielen Grenzflächen aufgrund von Zell/Oberflächen-Wechselwirkungen eine zunehmende Rolle, wodurch die Adhäsion von Zellen auf den Reaktormaterialien forciert wird. Die zur Charakterisierung eines Mikrobioreaktors auslegungsrelevanten Parameter der Strömungsmechanik, des Stofftransports, des Verweilzeitverhaltens der Flüssigphase sowie des eingesetzten Reaktorwerkstoffs sollen in diesem Kapitel näher erläutert werden.

2.1.1 Strömungsmechanik

Die Physik mikrofluidischer Systeme weicht aufgrund des hohen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses sowie der geringen Abmessungen deutlich von den Fließcharakteristiken im Labormaßstab ab [12, 196]. Unerwünschte Blasenbildung, z. B. durch CO_2 -Bildung aufgrund metabolischer Zellaktivität bzw. durch Verdunstungsphänomene, beeinflusst die stabile, laminare Strömung in den Mikrostrukturen enorm, indem sich u. a. Mikrokanäle komplett zusetzen und somit die Zellvitalität durch stark reduzierte und ungleichmäßige Nährstoffversorgung abnimmt. In der Literatur werden unterschiedliche Methoden zur Blasenvermeidung, u. a. durch Anlegen eines Überdrucks im Mikrosystem [87, 88] oder aktive Blasenfallen [38, 168], beschrieben. Auch eine gute Benetzbarkeit des Reaktormaterials durch geeignete Oberflächenbehandlungen wirkt sich positiv auf den blasenfreien Betrieb aus.

Die geringen Abmessungen des Mikrosystems bedingen eine laminare Strömung mit einer REYNOLDS-Zahl $\ll 1300$ [61, 162, 201]. Die REYNOLDS-Zahl ist definiert als Quotient aus Trägheitskraft zu Reibungskraft

$$\text{Re} \equiv \frac{vL_{hyd}}{\nu} . \tag{2.1}$$

Dabei ist v die charakteristische Fließgeschwindigkeit des Fluids, L_{hyd} der hydraulische Durchmesser des Mikroreaktorsystems (rechteckiger Querschnitt des Fließkanals) und ν die kinematische Fluidviskosität. Aufgrund der geringen Maße mikrofluidischer Systeme nimmt die Re-Zahl Werte der Größenordnung ≤ 1 an, was schleichenden Fließverhältnissen entspricht [27]. Allgemein wird die Fließcharakteristik in Mikrosystemen durch viskose Kräfte, den Fluidwiderstand, die Oberflächenspannung sowie die Diffusion dominiert. Dabei wird angenommen, dass die Flüssigkeit durch Reibung an der Kanalwand haftet. Somit ist die Fließgeschwindigkeit an der Wand Null und bei mittlerer Kanalhöhe maximal. Theoretisch kann die Strömung in Mikrokanälen als COUETTE-POISEUILLE-Strömung zwischen zwei parallelen Platten beschrieben werden [162]. Diese stellt eine exakte Lösung der NAVIER-STOKES-Gleichung bei inkompressiblen, stationär ebenen Strömungen dar und basiert auf den fundamentalen physikalischen Prinzipien der Massen-, Impuls- und Energieerhaltung. Aus der Kontinuitätsgleichung ergibt sich, dass die Geschwindigkeitskomponente v unabhängig von x in Fließrichtung ist, jedoch eine Abhängigkeit $v(y)$ über die Kanalhöhe aufweist. Dieser Zusammenhang wird in **Abb. 2.1** dargestellt.

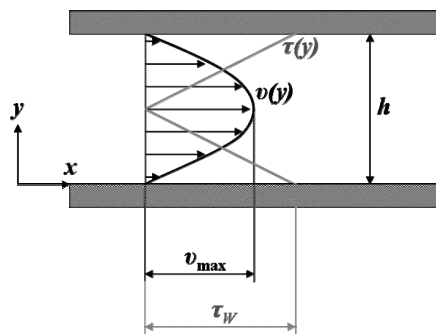


Abb. 2.1: Laminare Geschwindigkeits- (v) und Schubspannungsprofil (τ) in Abhängigkeit von y

Da der Druck p durch die Konvektion ausschließlich von x abhängig ist, ergibt sich aus der NAVIER-STOKES-Gleichung die mathematische Verknüpfung

$$\frac{dp}{dx} = \eta \frac{d^2 v}{dy^2}. \quad (2.2)$$

Dabei stellt η die dynamische Viskosität des Fluids dar. Die parabolische Geschwindigkeitsverteilung ergibt sich in einem Mikrokanal der Höhe h zu

$$v(y) = \frac{h^2}{2\eta} \frac{dp}{dx} \frac{y}{h} \left(1 - \frac{y}{h}\right). \quad (2.3)$$

Die mittlere Geschwindigkeit des Fluids im Strömungskanal weist den folgenden mathematischen Zusammenhang auf [27, 69]

$$\bar{v} = \frac{Q}{hb} = -\frac{h^2}{12\eta} \frac{dp}{dx} = \frac{2}{3} v_{\max}, \quad (2.4)$$

wobei Q dem Volumenstrom, b der Kanalbreite und v_{\max} der Maximalgeschwindigkeit entspricht. Nach dem NEWTON'schen Schubspannungsgesetz wird die Wandschubspannung τ_W durch Ableitung der **Gl. 2.3** nach y und Einsetzen der **Gl. 2.4** folgendermaßen berechnet

$$\tau_W = -\eta \frac{dv}{dy} = \frac{6\eta Q}{h^2 b}. \quad (2.5)$$

Die Wandschubspannung τ_W beeinflusst das Adhäsionsverhalten der Zellen an die Materialoberflächen des Mikrobioreaktors. Die erforderliche Wandschubspannung $\tau_{W,50\%}$ (definitionsgemäß zur Abscherung von 50 % der ursprünglich adhärierten Zellen) liegt für den in dieser Arbeit verwendeten Modellorganismus *S. cerevisiae* für unterschiedliche, meist hydrophobe Oberflächen bei ca. 2 Pa [29, 65, 128, 178] und ist stark abhängig von den Oberflächeneigenschaften des Reaktormaterials und der Zellen.

2.1.2 Stofftransport

Durch die geringen Abmessungen in Mikrosystemen kann der Hauptanteil des Stofftransports mit dem ersten FICK'schen Gesetz resultierend aus der BROWN'schen Molekularbewegung beschrieben werden [12, 196, 202, 210]

$$J = -D_{eff} \frac{dc}{dx}, \quad (2.6)$$

wobei J der Massenstrom, D_{eff} der Diffusionskoeffizient, c die Stoffkonzentration und x die zurückgelegte Weglänge des diffundierenden Moleküls ist. Zur Vereinfachung des Stofftransports im Mikroreaktorsystem wird die eindimensionale Konvektion vernachlässigt, wodurch die SHERWOOD-Zahl für die Konfiguration zweier paralleler Platten in stagnierender Umgebung bestimmt werden kann [114]. Die SHERWOOD-Zahl ist definiert als Verhältnis aus effektiv übergehender Stoffmenge zu durch Diffusion transportierter Stoffmenge

$$Sh = \frac{k_{Medium} x}{D_{eff}} = \frac{x^2}{D_{eff} t} \equiv 2,556\sqrt{Re} \approx 2, \quad (2.7)$$

wobei k_{Medium} dem Stoffübergangskoeffizienten des Mediums und t der Mischzeit für den molekularen Konzentrationsausgleich entspricht. Da sich der Abstand x quadratisch ändert, ist die Diffusion im Mikromaßstab dominant [27, 83, 116, 195, 196, 215]. Wassermoleküle weisen einen Diffusionskoeffizienten D_{eff} von ca. 10^{-9} m²/s auf. Für eine wässrige Glukoselösung kann mit der WILKE-CHANG-Gleichung

$$D_{eff} = \frac{7,4 \cdot 10^{-12} \sqrt{\Psi} M}{\eta V^{0,6}} T \quad (2.8)$$

bei 30 °C ein Diffusionskoeffizient von $8,796 \cdot 10^{-9}$ m²/s berechnet werden [7, 149]. Für das Fluid entspricht Ψ der Assoziationskonstanten ($\Psi_{Wasser} = 2,6$) und M der molaren Masse bei der Temperatur T . V stellt das molare Volumen des diffundierenden Moleküls dar. Für große Proteine ist D_{eff} hingegen um den Faktor 10 kleiner und für Partikeln, wie z. B. Zellen, mit einem mittleren Durchmesser von 10 µm sogar um den Faktor 10^4 [27].

Die Sauerstoffversorgung der Zellkultur in Mikrobioreaktoren kann blasenfrei mit Hilfe des gaspermeablen Materials Polydimethylsiloxan (PDMS) realisiert werden [16, 217, 221]. Der Mechanismus der Gasdiffusion in Polymeren wird durch Sprünge der penetrierenden Gasmoleküle im Abstand von 8 bis 15 Å zwischen den Mikrokavitäten der Polymermatrix beschrieben. Dabei springen die diffundierenden Moleküle durch Verbindungstunnel zwischen den Mikrokavitäten, die aufgrund kooperativer Bewegungen von Polymerketten entstanden sind [33]. Mikrokavitäten sind in diesem Fall durch Polymerketten begrenzte moleküllere Volumenelemente. Die Häufigkeit der diffusiven Sprünge nimmt mit stärker

2 Theorie

werdender Vernetzung des Polymers ab. Die Beweglichkeit eines Gasmoleküls ist umgekehrt proportional zu dessen Größe.

Zur Bestimmung des flüssigkeitsseitigen Stoffdurchgangskoeffizienten K_{ges} wird die stationäre Entgasungsmethode mit Stickstoff herangezogen. Die allgemeine volumenbezogene Sauerstoffdurchgangsrate dc/dt von der Gasphase durch die Membran in die Flüssigphase ist folgendermaßen definiert

$$\frac{dc}{dt} \equiv K_{ges} a (c_L^* - c_L). \quad (2.9)$$

a ist die auf das Reaktorvolumen bezogene Fläche der PDMS-Membran über der Reaktionskammer, die im Mikrobioreaktor im Gegensatz zu pneumatisch betriebenen Kultivierungen eine Konstante darstellt. c_L^* stellt die Sauerstoffkonzentration des gesättigten Kultivierungsmediums bei maximaler Sauerstofflöslichkeit ($c_L^*(30^\circ\text{C}) = 7,63 \text{ mg/L}$) und $c_{L,i}$ die Gelöstsauerstoffkonzentration im Kultivierungsmedium zum Zeitpunkt t_i dar. Nach Integration der **Gl. 2.9** ergibt sich $K_{ges}a$ zu

$$K_{ges}a = \frac{\ln \frac{c_L^* - c_{L,1}}{c_L^* - c_{L,2}}}{t_2 - t_1}. \quad (2.10)$$

Abb. 2.2 zeigt den globalen Sauerstoffdurchgang über unterschiedliche Diffusionsbarrieren von der Gas- in die Flüssigphase zum im Mikrobioreaktorsystem implementierten Sauerstoffsensoren unter Einbeziehung der unterschiedlichen Diffusionsmaterialien, -koeffizienten und -abstände.