

ENTWICKLUNG EINES MIKROFLUIDISCHEN BIOREAKTORS FÜR DIE KULTIVIERUNG VON PFLANZENZELLEN

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)
von der KIT-Fakultät für Maschinenbau des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
angenommene

DISSERTATION

von

M.Sc. Tim Finkbeiner

Tag der mündlichen Prüfung:

03.07.2019

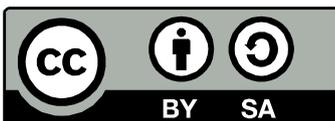
Hauptreferent:

Prof. Dr. Andreas E. Guber

Korreferenten:

Prof. Dr. Jan G. Korvink

Prof. Dr. Peter Nick



Dieses Werk ist unter einer Creative Commons Lizenz vom Typ Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International zugänglich. Um eine Kopie dieser Lizenz einzusehen, konsultieren Sie <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/> oder wenden Sie sich brieflich an Creative Commons, Postfach 1866, Mountain View, California, 94042, USA.

Für meine Frau und meine Familie

I Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 2016 und Mai 2019 während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der Gruppe BioMEMS, Biosensorik, Mikrofluidik unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas E. Guber. Da diese Arbeit nicht ohne Unterstützung möglich gewesen wäre, möchte ich mich bei allen bedanken, die auf unterschiedliche Weise dazu beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas E. Guber. Er gab mir die einmalige Gelegenheit, meine Arbeit zu diesem Thema in seiner Gruppe durchführen zu dürfen, unterstützte mich stetig und ermöglichte mir das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten am IMT.

Prof. Dr. Jan G. Korvink danke ich für die Übernahme des ersten Korreferats.

Prof. Dr. Peter Nick möchte ich für die anregenden Gespräche, die Zusammenarbeit verbunden mit den zahlreichen Experimenten in seiner Gruppe und die Übernahme des zweiten Korreferats danken.

Für Fragen in allen Bereichen, für die Betreuung und die kompetente Unterstützung möchte ich Dr. Ralf Ahrens danken. Ohne seinen fachlichen Rat und seine Tat hätte diese Arbeit so nicht entstehen können.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Tala, Sebastian, Daniela, Ruben, Patrick und Helena danke ich für die tolle Atmosphäre und die vielen anregenden Diskussionen sowie Gespräche über mehr als nur Mikrostrukturtechnik.

Ida Humbert danke ich für die anfängliche Einführung in die Herstellung der ersten mikrofluidischen Chips.

Den von mir betreuten Studierenden Bahman Moradi, Hannah Soergel, Martin Bailly, Timo Reuter, Moritz Koschitzky, Maximilian Müller, Na Shen, Yijie Xiang und Yunshen Xia danke ich sehr für ihren motivierten Einsatz, ihre kreativen Ideen und netten Gespräche bei ihren Hiwi-Jobs, Bachelor- und Masterarbeiten.

Für die Antworten auf viele Fragen über die Botanik und die Zusammenarbeit verbunden mit zahlreichen Experimenten möchte Dr. Jan Maisch, Dr. Manish Raorane und Christina Manz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Nick vom Botanischen Institut I danken. Zudem halfen mir Melanie Ochs und Christian Metzger bei der Erprobung des pH-Sensors.

Weiterhin möchte ich mich beim Team von Phyton Biotech GmbH mit Dr. Gilbert Gorr, Dr. David Ullisch und Jan Lenke für die Erprobung der Prototypen und die vielen Anregungen für weitere Optimierungen bedanken.

Einige Mitarbeiter am IMT sind durch ihre freundliche Unterstützung zu nennen: Daniel Münch für die Hilfe bei der Konstruktion der Formeinsätze sowie den einen oder anderen technischen Tipp, Marc Schneider und Andreas Striegel für die Hilfe beim Heißprägen, Nina Giraud für den reibungslosen Ablauf aller Bestellungen, Richard Thelen für die geduldigen Messungen, Ulrich Klein, Karin Klein und Siegfried Roth für Angelegenheiten rund um Computer und Bürokratie, Dr. Neil MacKinnon für die NMR-Messungen, Paul Abaffy für spektroskopische Messungen, Dieter Gutjahr und Achim Voigt für die Wartung und den Aufbau elektrischer Schaltungen, Alexandra Moritz und ihrem Team für die Fertigung der vielen Halterungen.

Dr. Christof Megnin, Bahman Moradi und Lea Menken von memetis GmbH möchte ich für die Möglichkeit und ihr Engagement zum erfolgreichen Laserdurchstrahlschweißen meiner Chips danken.

Meiner ehemaligen Kommilitonin Anke Steier vom Institut für Funktionelle Grenzflächen danke ich für die Vermessungen und die mühevollen Strukturierung der Membranen.

Dr. Daniela Obermaier von PreSens Precision Sensing GmbH stellte freundlicherweise die pH-Sensorik bereit und gab hilfreiche Auskünfte über deren Implementierung.

Zudem möchte ich allen bei den Tischkicker-Runden und anderen wissenschaftlichen Unternehmungen beteiligten Doktoranden am IMT danken.

Meinen Eltern Yvonne und Jörg, meinen Schwestern Silvie, Nadine und Madeleine, meinen Schwiegereltern Ursula und Wolfgang mit Magnus und Joana danke ich für ihre Ermutigung und Auflockerung. Sie haben stets an mich geglaubt und mir so Vieles ermöglicht.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Lena. Sie machte sich mit mir auf den Weg nach Karlsruhe und wir hatten eine wundervolle Zeit. Vor allem für die Liebe, die ununterbrochene Unterstützung, die unendliche Geduld, Kraft, Motivation - besonders in den letzten stressigen Wochen - und das jederzeit offene Ohr danke ich ihr von ganzem Herzen. Ohne sie an meiner Seite wäre ich wohl nie zur Promotion gekommen.

II Kurzfassung

Die direkte Herstellung pflanzlicher Sekundärstoffe mithilfe von Pflanzenzellkulturen, die in klassischen Produktionsverfahren, wie z. B. im Batch-Fermenter, durchgeführt werden kann, ist für einige Produkte gut beschrieben. Das bekannteste Produkt ist sicherlich Paclitaxel [1]. Daneben gibt es in Pflanzen wertvolle Verbindungen, die durch die Zusammenarbeit unterschiedlich differenzierter Zelltypen biosynthetisiert werden. Die Differenzierung der Pflanzenzelltypen und somit die Produktion dieser Verbindungen werden jedoch unter den Bedingungen im Batch-Fermenter beeinträchtigt. Da auch eine alternative Herstellung vieler dieser komplexen Verbindungen über die chemische Syntheseroute bis heute nicht möglich ist, müssen diese pflanzlichen Sekundärstoffe direkt aus den Pflanzen extrahiert werden.

Die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit neu entwickelten, modularen mikrofluidischen Bioreaktoren ermöglichen die technische Nachbildung von Pflanzengewebe, indem zwischen verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen metabolischen Leistungen ein Fluss hergestellt wird. Das synthetisierte Produkt kann im Durchfluss aufgefangen und extrahiert werden. Durch den modularen Aufbau lassen sich flexible Kombinationen erzeugen. Überdies sind zwei Ansätze realisierbar: die Parallelisierung zum optimierten Vorscreening geeigneter Pflanzenzelltypen mit geringer Zellzahl in einem 100 µl-Bioreaktor und die Modularisierung zur fluidischen Koppelung ausgewählter Pflanzenzelltypen mit höherer Zellzahl in einem 800 µl-Bioreaktor.

Zur Herstellung dieser mikrofluidischen Bioreaktoren aus biokompatiblen und transparenten Bauteilen erfolgte das Heißprägen aus Polycarbonat (PC) und Polyethylenterephthalat (PET). Das anschließende Ultraschallschweißen dieser Bauteile und die gleichzeitige Integration einer Membran sowie anwenderfreundlichen Schlauchanschlüssen stellt eine geeignete und für die Massenfertigung kompatible Fügetechnologie dar. Dazu wurde ein zweistufiger Ultraschallschweißprozess entwickelt, bei welchem im ersten Schritt eine PET-Membran mit einem PET-Gewebe direkt auf eine Bauteilhälfte ultraschallgeschweißt werden konnte. Im zweiten Schritt wurden die fluidischen Kontaktierungen durch Schlauchanschlüsse in der Bauteilebene realisiert und die zweite Bauteilhälfte gefügt. Dadurch sind die mikrofluidischen Bioreaktoren 3,6-4,2 mm hoch und die Pflanzenzellen können während der Kultivierung direkt unter einem Mikroskop beobachtet werden.

Der Betrieb der mikrofluidischen Bioreaktoren wurde unter sterilen Bedingungen mit den Pflanzenzelllinien *Nicotiana tabacum*, *Catharanthus roseus* und *Taxus chinensis* durchgeführt und belegte in ersten Ansätzen das modulare Prinzip. Dabei war die Überwachung wichtiger Parameter bezüglich Physiologie, Morphologie, Viabilität und Teilungsaktivität der Zellen möglich und konnte außerdem durch einen pH-Sensor erweitert werden.

Durch einen Messeinsatz für die NMR-Spektroskopie und eine numerische Strömungssimulation wurde verifiziert, dass die Pflanzenzellen sicher mit Nährstoffen versorgt werden. Abschließend wurde eine Kostenanalyse für eine Umsetzung für größere Stückzahlen durchgeführt.

III Abstract

Secondary plant metabolites can be synthesized directly with plant cell cultures. For many products, the standard production processes, e. g. batch-fermentation, are well described. The best known product is certainly Paclitaxel [1]. In addition, there are valuable components in plants that are biosynthesized through the collaboration of various differentiated cell types. However, many of these complex components cannot be produced by chemical synthesis. But since the differentiation of plant cell types and thus the production of these components is suppressed under conditions in batch-fermenters, these secondary plant metabolites must be extracted directly from plants.

The new modular microfluidic bioreactors developed within this work enable the technical imitation of plant tissue and generate a common flow between various cell types with different metabolic performances. The synthesized product can be collected in the flow and then be extracted. The modular setup allows flexible combinations to be realized. In addition, two approaches are possible: parallelization for optimized pre-screening of suitable plant cell lines with small cell numbers in 100 μl bioreactors and modularization for fluidic connection of selected plant cell types in higher cell numbers in 800 μl bioreactors.

The microfluidic bioreactors are fabricated from biocompatible and transparent housings by hot embossing of polycarbonate (PC) and polyethylene terephthalate (PET). This is followed by ultrasonic welding and the simultaneous integration of membrane and user-friendly hose fittings, which represent a joining technology that is feasible for mass production. For this purpose, a two-step ultrasonic process was developed. First, the PET membrane was welded directly with a PET mesh on one housing. Second, the fluidic connection has been realized in-plane and the second housing joined. As a result, the microfluidic bioreactors were 3,6-4,2 mm high and the plant cells can be observed directly under a microscope during their cultivation.

The operation of the microfluidic bioreactors was carried out under sterile conditions with the plant cell lines *Nicotiana tabacum*, *Catharanthus roseus* and *Taxus chinensis*. Thereby, the modular principle was proved in first approaches. Controlling important parameters such as cell physiology, morphology, viability and division activity was possible, and the range was extended by a pH sensor.

A supply of nutrient solution to the plant cells was verified by a special inlet for NMR spectroscopy and a numerical flow simulation. Finally, a cost analysis was carried out to implement a production process with higher quantities of microfluidic bioreactors.

IV Symbole und Variablen

| Formelzeichen | Einheit | Bedeutung |
|-----------------|-------------------------|--|
| a | - | Aktivität |
| A | μm | Amplitude |
| A | mm^2 | Querschnittsfläche |
| b | mm | Kanaltiefe |
| B_0 | T | Magnetische Flussdichte, Magnetfeld |
| c_i | mol/m^3 | Konzentration der Komponente i |
| d | mm | (Rohr-)Durchmesser, Dicke |
| d_h | mm | Hydraulischer Durchmesser |
| $D_{i,j}$ | cm^2/s | Diffusionskoeffizient der Komponente i in der Komponente j |
| D | m^2/s | Geschätzter Diffusionskoeffizient |
| E | J | Energie |
| ΔE | J | Energiedifferenz |
| f | Hz | Frequenz |
| F | N | Kraft |
| F_h | N | Haltekraft |
| F_s | N | Schweißkraft |
| \dot{F} | ml/min | Flussrate |
| h | mm | Kanalhöhe |
| h | J s | Plancksches Wirkungsquantum ($6,63 \cdot 10^{-34}$ J s) |
| i | - | Index |
| I | W/m^2 | Lichtintensität |
| I_0 | W/m^2 | Initiale Lichtintensität |
| j | - | Index |
| \mathcal{J}_i | mol/s | Diffusionsstromdichte |
| k_B | J/K | Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K) |
| K_s | - | Säurekonstante |
| L_{p-p} | mm | Porendistanz |
| m | - | Orientierungsquantenzahl |
| \tilde{M}_j | g/mol | Molmasse der Komponente j |
| n | - | Anzahl |
| p | bar | Druck |

IV Symbole und Variablen

| Formelzeichen | Einheit | Bedeutung |
|---------------|---|--|
| P | $\text{kg m}^2 \text{s}^{-1} \text{rad}^{-1}$ | Eigendrehimpuls |
| P | W | Leistung |
| Q | J | Wärme |
| r | μm | Porenradius |
| R_i, R_j | \AA | Charakteristische Molekülradien der Komponenten i und j ($1 \text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$) |
| Re | - | Reynoldszahl |
| s_f | mm | Fügeweg |
| t_0 | s | Startzeitpunkt |
| t_h | s | Haltezeit |
| t_s | s | Schweißzeit |
| T | $^{\circ}\text{C}, \text{K}$ | Temperatur |
| T_g | $^{\circ}\text{C}$ | Glasübergangstemperatur |
| T_P | $^{\circ}\text{C}$ | Prägetemperatur |
| T_0 | $^{\circ}\text{C}, \text{K}$ | Raumtemperatur von $21 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $294,15 \text{ K}$ |
| U | mm | Umfang |
| v | m/s | Strömungsgeschwindigkeit |
| \bar{v} | m/s | Mittlere Strömungsgeschwindigkeit |
| ν_0 | Hz | Larmor-Frequenz |
| \bar{V}_i | cm^3/mol | Molvolumen der Komponente i |
| x, y, z | - | Raumrichtungen |
| γ | N/m | Grenzflächenspannung |
| γ | Hz/T | Gyromagnetisches Verhältnis |
| δ | ppm | Chemische Verschiebung |
| ε | - | Membranporosität |
| η | $\text{N s}/\text{m}^2, \text{Pa s}$ | Viskosität |
| θ_w | $^{\circ}$ | Kontaktwinkel |
| κ | 1/mm | Absorptionskonstante |
| λ | $\mu\text{m}, \text{nm}$ | Wellenlänge |
| μ | A m^2 | Magnetisches Moment |
| ρ | g/cm^3 | Dichte |
| τ | N/m^2 | Schubspannung |
| φ | - | Empirischer Parameter |

V Abkürzungen

| Abkürzung | Bedeutung |
|--------------------|---|
| μTAS | Micro Total Analysis System (deutsch: Mikrototalanalysensystem) |
| 3D | Dreidimensional |
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| BY-2 | <i>Nicotiana tabacum</i> Cultivar Bright Yellow 2 |
| <i>C. roseus</i> | <i>Catharanthus roseus</i> |
| CNC | Computerized Numerical Control (deutsch: rechnergestützte numerische Steuerung) |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| COC | Cycloolefin-Copolymere |
| D ₂ O | Deuteriumoxid |
| DI | Deionisiert |
| ERG | Energierichtungsgeber |
| FDM | Fused Deposition Molding (deutsch: Schmelzschichtung) |
| HDT | Heat Deflection Temperature (deutsch: Wärmeformbeständigkeitstemperatur) |
| HeLa-Zellen | Henrietta Lacks-Zellen |
| HPLC | High-Performance Liquid Chromatography (deutsch: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| HPTS | 8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure |
| ID | Innendurchmesser |
| IMT | Institut für Mikrostrukturtechnik |
| LabVIEW | Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench |
| LOC | Lab-on-a-Chip |
| MBR | Mikrofluidischer Bioreaktor |
| Nd:YAG | Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat |
| PC | Polycarbonat |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |
| PET | Polyethylenterephthalat |
| PET-A | Amorphes Polyethylenterephthalat |
| PET-C | Teilkristallines Polyethylenterephthalat |
| PET-G | Mit Glykol zähigkeitsoptimiertes Polyethylenterephthalat |
| PLGA | Poly(lactic-co-glycolic acid) (deutsch: Polylactid-co-Glycolid) |

V Abkürzungen

| Abkürzung | Bedeutung |
|----------------------|--|
| PMMA | P olym eth yl meth acrylat |
| PS | P olystyrol |
| REM | R asterelektronen m ikroskop |
| <i>T. baccata</i> | <i>Taxus baccata</i> |
| <i>T. brevifolia</i> | <i>Taxus brevifolia</i> |
| <i>T. chinensis</i> | <i>Taxus chinensis</i> |
| TPU | Thermoplastisches P olyurethan |
| TMS | T etramethylsilan |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumenanteil (v olumen/ v olume, deutsch: Volumen/Volumen in l/l) |
| Vis | V isible |
| w/v | Massenkonzentration (w eight/ v olume, deutsch: Gewicht/Volumen in g/l) |
| WUM | W ärme u mform m aschine |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|------------|
| I | Danksagungen | i |
| II | Kurzfassung | iii |
| III | Abstract | v |
| IV | Symbole und Variablen | vii |
| V | Abkürzungen | ix |
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Grundlagen | 5 |
| 2.1 | Biologische Grundlagen | 5 |
| 2.1.1 | Pflanzenzellen | 5 |
| 2.1.2 | Metabolic Engineering | 6 |
| 2.1.3 | Tabakpflanze | 7 |
| 2.1.4 | Madagaskar-Immergrün (<i>Catharanthus roseus</i>)..... | 7 |
| 2.1.5 | Eibe (<i>Taxus</i>) | 8 |
| 2.2 | Mikrofluidik | 9 |
| 2.2.1 | Strömungsmechanik | 9 |
| 2.2.2 | Diffusion..... | 10 |
| 2.3 | Stand der Technik mikrofluidischer Chips | 11 |
| 2.3.1 | Mikrofluidische Systeme für die Zellkultivierung..... | 12 |
| 2.3.2 | Mikrofluidische Systeme für Pflanzenzellen..... | 13 |
| 2.4 | Materialien | 15 |
| 2.4.1 | Polycarbonat (PC) | 16 |
| 2.4.2 | Polyethylenterephthalat (PET)..... | 17 |
| 2.5 | Replikationsmethoden | 18 |
| 2.5.1 | Mikrofräsen | 18 |
| 2.5.2 | Spritzguss | 18 |
| 2.5.3 | Heißprägeprozess..... | 19 |
| 2.5.4 | 3D-Druck..... | 21 |
| 2.6 | Fügetechnologien..... | 22 |
| 2.6.1 | Ultraschallschweißen | 23 |
| 2.6.2 | Laserdurchstrahlschweißen..... | 29 |
| 2.6.3 | Anschlusstechnik | 30 |
| 2.7 | Sterilisation | 31 |
| 2.8 | Charakterisierungsmethoden | 32 |
| 2.8.1 | NMR-Spektroskopie..... | 32 |
| 2.8.2 | pH-Messung | 34 |
| 2.8.3 | Leckagetests..... | 35 |
| 2.8.4 | Kennlinie Flussrate-Druck | 36 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | Anforderungen, Zielsetzung und Konzeption | 39 |
| 3.1 | Ausgangslage | 39 |
| 3.2 | Materialauswahl..... | 40 |
| 3.3 | Optimierung eines bestehenden Formeinsatzes | 41 |
| 3.4 | Maßnahmen zur Reduzierung der Faltenbildung der Membran | 41 |
| 3.5 | Gestaltung der Strukturen für das Ultraschallschweißen | 42 |
| 3.5.1 | Strukturen auf der Sonotrode..... | 43 |
| 3.5.2 | Energierichtungsgeber | 43 |
| 3.6 | (Mikro-)Fluidische Kontaktierung | 44 |
| 3.7 | Reversibler Verschluss der Zellkammer | 46 |
| 3.8 | Mikrofluidischer Bioreaktor mit 100 µl Kammervolumen für das Vorscreening | 47 |
| 3.9 | Mikrofluidischer Bioreaktor mit 800 µl Kammervolumen zur Modularisierung..... | 48 |
| 3.10 | Betriebsmodi | 49 |
| 3.11 | Strukturierung der Membran..... | 50 |
| 4 | Fertigung und Charakterisierung der mikrofluidischen Bioreaktoren | 51 |
| 4.1 | Fluidische Kontaktierung..... | 51 |
| 4.2 | Modifizierung des 200 µl-MBR | 56 |
| 4.3 | Herstellung und Charakterisierung der Formeinsätze..... | 58 |
| 4.4 | Heißprägen..... | 62 |
| 4.4.1 | Optimierung der Betriebsparameter | 62 |
| 4.4.2 | Charakterisierung der abgeformten Chiphälften | 64 |
| 4.5 | Ultraschallschweißen | 70 |
| 4.5.1 | Membranintegration..... | 70 |
| 4.5.2 | Fügen der Chiphälften | 76 |
| 4.5.3 | Reversibler Verschluss der Zellkammer | 80 |
| 4.5.4 | Charakterisierung der fluidischen Eigenschaften | 80 |
| 4.6 | Laserdurchstrahlschweißen..... | 83 |
| 4.7 | Strukturierung der Membran..... | 86 |
| 5 | Untersuchung des Diffusionsverhaltens an der Membran..... | 89 |
| 5.1 | NMR-Analyse | 89 |
| 5.2 | Simulation von Strömung und Diffusion im MBR..... | 93 |
| 5.2.1 | Erstellung der Geometrie | 93 |
| 5.2.2 | Auswählen des physikalischen Modells | 94 |
| 5.2.3 | Vernetzung und Lösung des Modells | 95 |
| 5.2.4 | Simulation der Strömung | 96 |
| 5.2.5 | Simulation der Diffusion durch die Membranporen..... | 97 |
| 5.3 | Simulation von Strömung und Diffusion im NMR-Messeinsatz | 101 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 6 | Biologische Experimente | 103 |
| 6.1 | Verpackung und Sterilisation | 103 |
| 6.2 | Zellversuche..... | 103 |
| 6.2.1 | Versuche mit BY-2 | 104 |
| 6.2.2 | Versuche mit <i>C. roseus</i> | 106 |
| 6.2.3 | Versuche mit <i>T. chinensis</i> | 107 |
| 6.2.4 | pH-Messung | 108 |
| 7 | Kostenanalyse | 111 |
| 7.1 | Kosten für die Materialien | 111 |
| 7.2 | Werkzeugkosten für Replikation und Fügen | 111 |
| 7.3 | Fertigungskosten für Replikation und Fügen..... | 112 |
| 7.4 | Kosten für Verpackung und Sterilisation..... | 113 |
| 8 | Zusammenfassung | 115 |
| 9 | Ausblick | 119 |
| A | Literaturverzeichnis | 121 |
| B | Abbildungsverzeichnis | 133 |
| C | Tabellenverzeichnis | 137 |
| D | Publikationen, Vorträge, Patentanmeldung, Lehrtätigkeit | 138 |
| E | Betreute Abschlussarbeiten | 139 |
| F | Anhang | 141 |

1 Einleitung

Die Produktion von Arzneistoffen mithilfe gentechnisch veränderter Organismen, sogenanntes „Molecular Pharming“, ist insbesondere in der Biotechnologie von wachsender Bedeutung. Die Verwendung von pflanzlichen Organismen bietet dabei gegenüber Mikroorganismen oder Zelllinien von Säugetieren viele Vorteile in Hinblick auf den Aufwand der Kultivierung sowie auf die Gefahr der Kontamination mit Pathogenen. Bisher war dieser Ansatz vor allem in der Produktion von Proteinen, welche im Primärstoffwechsel von Pflanzen synthetisiert werden, als Biopharmazeutika erfolgreich [1].

Darüber hinaus produzieren Pflanzen auch in ihrem Sekundärstoffwechsel pharmazeutisch aktive Substanzen. Hierbei handelt es sich nach Schätzungen um bis zu einer Million verschiedene Stoffe [2]. Einige dieser Metaboliten besitzen die Funktion, in Wechselwirkung mit anderen Organismen zu treten - sei es durch Anlocken mittels Duftstoffe oder durch Schutz gegen Mikroorganismen mithilfe von Giften [3]. Ein Teil dieser Stoffe ist auch pharmazeutisch aktiv und dadurch sehr interessant für die Medizin, was sie äußerst kostbar und teuer machen kann. Bekannte Beispiele stellen die Krebstherapeutika Vinblastin aus dem Madagaskar-Immergrün *Catharanthus roseus* (*C. roseus*) und Paclitaxel aus der Chinesischen Eibe *Taxus chinensis* (*T. chinensis*) dar [3-6]. Der therapeutische Effekt beider Wirkstoffe beruht auf der Hemmung der Zellteilung [7]. Da sich v. a. Krebszellen besonders schnell teilen, ist die Wirkung dieser Krebstherapeutika in diesen Zellen effektiver.

Oftmals können diese komplexen Verbindungen bis heute noch nicht über die chemische Syntheseroute hergestellt werden, weshalb eine direkte Extraktion aus der Pflanze und eine nachfolgende Aufreinigung notwendig ist. Da diese Pflanzen aber zum Teil schwer kultivierbar oder vom Aussterben bedroht sind, ist eine biotechnologische Gewinnung dieser Verbindungen von hohem Interesse. Am Beispiel des Paclitaxels müssten für die Wirkstoffmenge zur Behandlung eines einzelnen Patienten sechs 100 Jahre alte Bäume gefällt werden [8].

Zur biotechnologischen Herstellung dieser Wirkstoffe muss allerdings der Stoffwechselfad in der Pflanze verstanden werden. Doch selbst bis zum heutigen Zeitpunkt sind die gesamten Stoffwechselwege dieser Metaboliten nicht vollständig erforscht, da mehrere verschiedene Zelltypen in komplexer Interaktion stehen [3, 9] und diese Stoffe analog zu einem „Fließbandprozess“ nach und nach produzieren. Hinzu kommt, dass die notwendige Differenzierung unterschiedlicher Pflanzenzelltypen und somit die Gewinnung dieser Sekundärmetaboliten unter den Bedingungen der biotechnologischen Synthese im Batch-Fermenter kaum darstellbar ist. Die Zelltypen können sich in manchen Fällen im selben Fermenter gegenseitig beeinträchtigen [10].

Wie lässt sich eine Pflanze durch das Zusammenspiel der in verschiedenen Geweben differenzierten Zelltypen zur Produktion eines Stoffes in einem anderen technischen System umsetzen? Pflanzengewebe mit ihrer Kompartimentierung könnten in Form einzelner Module mit unterschiedlich differenzierten Zelltypen realisiert werden und somit wie in der Pflanze eine gesamte

Syntheseroute für einen bestimmten Stoff auf eine technische Weise nachahmen [11]. Durch die Kultivierung dieser Zelltypen in einzelnen Modulen mit einer Koppelung durch einen gemeinsamen metabolischen Fluss wie in Abbildung 1 sollen die im Zusammenspiel gebildeten Stoffe im Durchfluss aufgefangen werden.

Im Gegensatz zu Systemen für menschliche oder tierische Zellen wurden in der Vergangenheit nur wenige mikrofluidische Bioreaktoren zur Kultivierung und Beobachtung von Pflanzenzellen entwickelt. Die ersten Systeme beschränkten sich auf Protoplasten von Tabakzellen [12, 13]. Bei anderen Pflanzenarten wurde mikrofluidisch das Wachstum der Wurzel- oder Pollenschlauchzellen untersucht [14-18].

Die meisten dieser Systeme wurden aus Polydimethylsiloxan (PDMS) gefertigt, was jedoch nur eine eingeschränkte Kompatibilität mit Zellkulturen besitzt. PDMS kann hydrophobe Moleküle adsorbieren und die daraus gefertigten Systeme sind auf Dauer kaum stabil sowie leakagefrei herzustellen. [19, 20] Damit kann es zwar teilweise im Labormaßstab eingesetzt, nicht jedoch für die Massenfertigung verwendet werden. Hierbei bieten sich neben Glas, welches vergleichsweise schwer zu bearbeiten ist, thermoplastische Polymere an. In Maisch et al. wurde 2016 zum ersten Mal ein am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) von Kreppenhofer entwickeltes mikrofluidisches System aus thermoplastischem Polymer für Pflanzenzellen eingesetzt. Bei diesem System wurden ganze Tabakzellen der Zelllinie *Nicotiana tabacum* Cultivar Bright Yellow 2 (BY-2) über eine Woche kultiviert wurden. Unter dem Ziel des Metabolic Engineering konnten im Zellmedium einzelne Metaboliten analysiert werden. [11, 21]

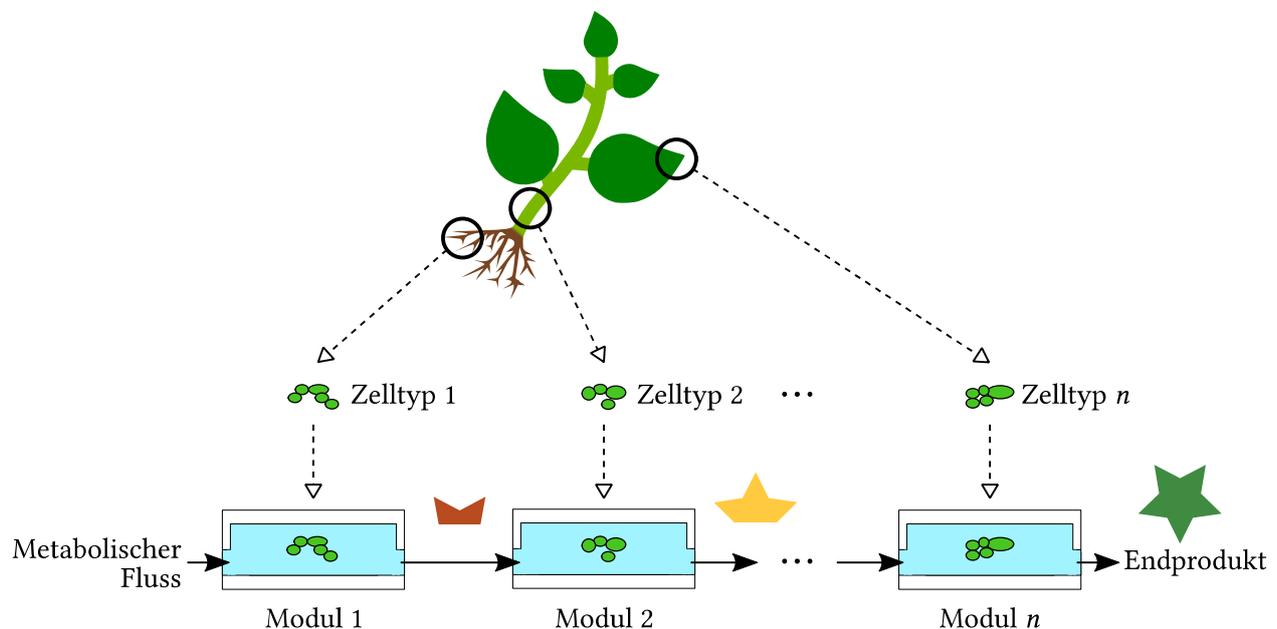


Abbildung 1: Technische Nachahmung von Pflanzengewebe durch Kultivierung unterschiedlich differenzierter Zelltypen in einzelnen Modulen mit einer Koppelung durch einen gemeinsamen metabolischen Fluss.

Da dieses mikrofluidische System jedoch eingeschränkte Anwenderfreundlichkeit zeigte und auch nur im Einzelbetrieb statt modular getestet wurde, sollten neben Optimierungen von Grund auf neue Konzepte entwickelt und umgesetzt werden. Dies erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in einer durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Kooperation mit dem Botanischen Institut I (BOT I) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) und dem externen Partner Phyton Biotech GmbH.

Das neue System eines mikrofluidischen Bioreaktors (MBR) solle dabei zwei Anwendungen bedienen, welche mit verschiedenen Zelltypen der Pflanzenarten Tabak, *C. roseus* und *T. chinensis* getestet werden sollen:

- Ein Fokus soll auf dem parallelisierten Vorscreening geeigneter Zelllinien bzw. Starterkulturen mit einem Volumen für geringe Zellzahlen liegen. Damit kann die Dauer von Vorkulturen verkürzt und folglich Zeit und Kosten bei der Vorbereitungsphase zur biotechnologischen Fermentation eingespart werden.
- Beim zweiten Schwerpunkt soll durch Hintereinanderschaltung einzelner Module die Kompartimentierung im Pflanzengewebe technisch nachgebildet werden. Damit kann es ermöglicht werden, zwischen unterschiedlichen Zelltypen, die jeweils unterschiedliche metabolische Leistungen vollbringen, einen metabolischen Fluss herzustellen. Durch den modularen Aufbau können auch unterschiedliche Kombinationen erzeugt werden, die zu unterschiedlichen Wirkstoffen führen.

Um das modulare Konzept zu realisieren, soll ein mikrofluidischer Bioreaktor entwickelt werden, der aus zwei, durch eine poröse Membran voneinander getrennten, fluidischen Kammern besteht. Beide fluidische Kammern besitzen jeweils einen eigenen Ein- und Auslass, welche bei der oberen Kammer zum Einfügen bzw. Entnehmen der Zellen und bei der unteren Kammer zum Durchströmen von Nährmedium dienen. Zur Replikation und zum Fügen der beiden fluidischen Kammern aus thermoplastischen Polymeren sollen Verfahren zum Einsatz kommen, die eine Fertigung für mehrere 100 Stück sowie eine Übertragung in die Massenfertigung erlauben. Unter diesem Aspekt soll eine anwenderfreundliche fluidische Anschlusstechnik zum Einsatz kommen, welche im selben Fertigungsschritt integriert werden kann. Weiterhin soll der MBR transparent sein und eine geringe Dicke aufweisen, um die Zellvorgänge während der Kultivierung unter dem Mikroskop beobachten zu können. Darüber hinaus sollen verschiedene Wachstumsphasen und Vorgänge auf zellulärer Ebene durch die Messung des pH-Wertes identifizierbar sein.

Zur Überprüfung der entwickelten Systeme können verschiedenen Verfahren eingesetzt werden. Durch Fluidsimulation und Spektroskopie können die entwickelten Geometrien der MBR validiert werden. Zur Prozessoptimierung sollen alle gefertigten Bauteile sowie die Membran auf praktische Weise durch fluidische und spektroskopische Messverfahren charakterisiert werden. Neben den bisher aufgeführten biologischen und technischen Aspekten soll zum Abschluss eine ökonomische Betrachtung des gesamten Fertigungsprozesses durch eine Kostenanalyse erfolgen.

Die Arbeit ist folgendermaßen aufgebaut: In Kapitel 2 wird ausführlich auf die Grundlagen der im Rahmen dieser Arbeit vereinten Disziplinen eingegangen, die neben der Biologie und Mikrofluidik auch die Replikationsmethoden sowie die Füge-technologien bei der Herstellung der mikroflui-

dischen Bioreaktoren beinhalten. Kapitel 3 definiert die Anforderungen an diese Bioreaktoren und die Ziele. In Kapitel 4 wird ausführlich auf die Fertigung und Charakterisierung der mikrofluidischen Bioreaktoren eingegangen. Kapitel 5 befasst sich mit der Untersuchung des Diffusionsverhaltens an der eingesetzten Membran, welche den Stofftransport in beide Richtungen mitbestimmt. Die mit dem mikrofluidischen Bioreaktoren durchgeführten, biologischen Experimente werden in Kapitel 6 vorgestellt. Nachdem die technische und biologische Betrachtung thematisiert wurden, behandelt Kapitel 7 die wirtschaftlichen Aspekte bei der Herstellung der mikrofluidischen Bioreaktoren. Die Zusammenfassung dieser Arbeit und ein Ausblick mit weiterführenden Ideen schließen die Arbeit in Kapitel 8 und Kapitel 9.

2 Grundlagen

Bei der Entwicklung und der Herstellung mikrofluidischer Bioreaktoren (MBR) sowie deren Einsatz zur Kultivierung verschiedener Pflanzenzelltypen treffen viele verschiedene Disziplinen aufeinander. Zum einen spielen Biologie und Mikrofluidik eine tragende Rolle, zum anderen muss eine sorgfältige Auswahl geeigneter Replikationsmethoden und Füge-technologien abhängig von der Materialauswahl erfolgen. Dieses Kapitel verschafft einen Überblick über diese Grundlagen und ihren Zusammenhang.

2.1 Biologische Grundlagen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Pflanzenzellen kultiviert. Wie Pflanzenzellen im Allgemeinen aufgebaut sind und welche Konsequenzen dies auf deren Kultivierung hat, soll in diesem Kapitel erläutert werden. Weiterhin erfolgt die Vorstellung der in dieser Arbeit in den hergestellten MBR kultivierten und untersuchten Pflanzenzelltypen.

2.1.1 Pflanzenzellen

Pflanzenzellen unterscheiden sich in ihrem Aufbau grundlegend von Säugetierzellen. Abbildung 2 zeigt, dass Pflanzenzellen neben einer Plasmamembran auch von einer Zellwand umgeben sind, welche in Zusammenspiel mit dem osmotischen Druck der Zelle Stabilität verleiht. Hinsichtlich der Zellorganellen sind Pflanzenzellen zusätzlich mit Vakuolen ausgestattet, die den Zellinnen- druck aufrechterhalten. Als nächstgrößte Zellorganelle folgen Chloroplasten, mithilfe derer Pflanzen v. a. Photosynthese zur Energiegewinnung betreiben.

Eine Besonderheit von Pflanzenzellen ist überdies, dass sie zahlreiche Sekundärmetaboliten produzieren. Im Gegensatz zu Primärmetaboliten, welche für die Pflanze und ihren Stoffwechsel essenziell sind, weisen Sekundärmetaboliten keine direkt damit gekoppelten Effekte auf. Häufig kommen sie nur in bestimmten Pflanzenarten vor und nehmen dort auch nur bestimmte Funktionen ein, wie beispielsweise das Anlocken von Insekten oder die Abwehr von Tieren. Für den Menschen ist eine Vielzahl dieser pflanzlichen Sekundärmetaboliten aufgrund ihrer biologischen Aktivität im Körper von hohem Interesse (s. Kapitel 2.1.2-2.1.5). Deshalb werden viele Pflanzenarten zu diesem Zweck kultiviert, teilweise auch in speziellen *in-vitro*-Systemen [22].

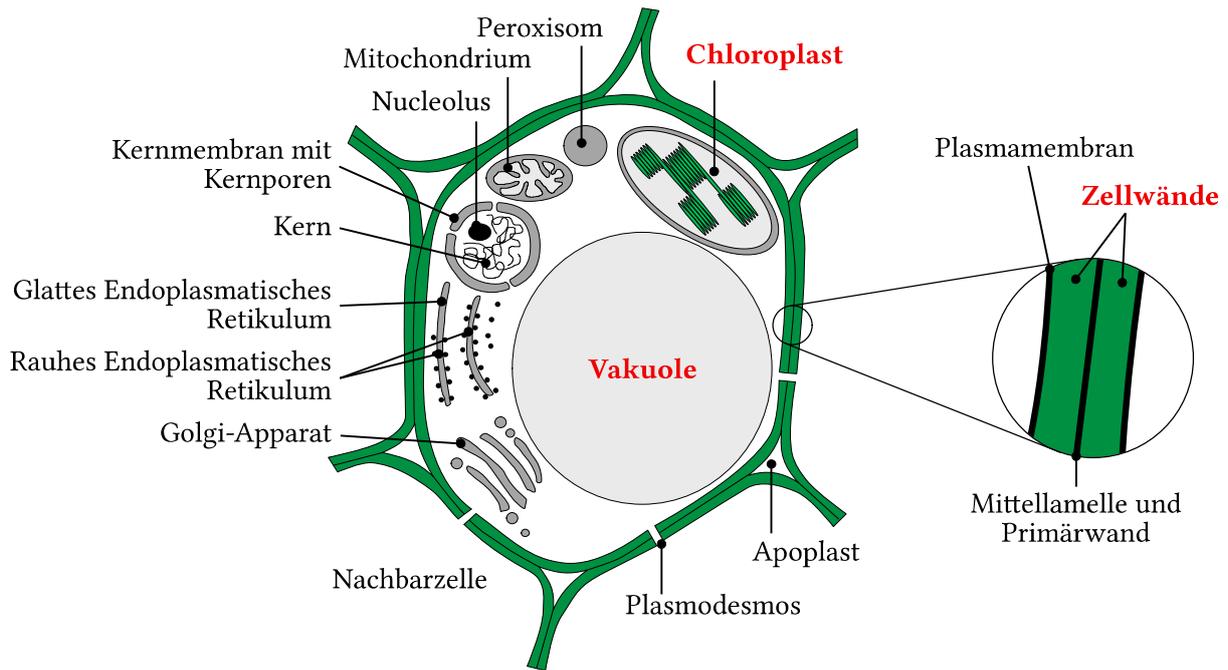


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer Pflanzenzelle, in Anlehnung an [23]. Die wichtigsten Unterschiede zu Säugetierzellen sind rot hervorgehoben.

2.1.2 Metabolic Engineering

Die Bezeichnung des „Metabolic Engineering“ (engl. für Stoffwechseltechnologie) entstand zwischen den späten 1980er- und den frühen 1990er-Jahren [24]. Darunter versteht man die Manipulation der Biochemie eines Organismus [25] auf der Ebene der Proteine, Metaboliten und Gene [8]. Dadurch wird bewirkt, dass die Aktivität eines Organismus in eine für den Menschen nützliche Richtung gelenkt wird. Durch diese Methode können zelluläre Eigenschaften verändert und Produkte synthetisiert werden [25].

Zu den für den Menschen nützlichen, pflanzlichen Produkten gehören zahlreiche Sekundärmetaboliten, welchen in drei Hauptgruppen eingeteilt werden können: Phenole, Terpenoide und Alkaloide [8]. Letztere sind alkalische Metaboliten, welche aus einer heterozyklischen Verbindung mit mindestens einem Stickstoffatom bestehen und oft eine pharmakologische Wirkung besitzen. Pflanzenzellen produzieren diese Stoffe häufig, um sich gegen Mikroorganismen und Tiere zu wehren. Einige dieser Alkaloide werden seit jeher vom Menschen in Form von Genussmitteln (Coffein oder Nicotin, s. Kapitel 2.1.3) oder Rauschmitteln (Cocain, Morphin) konsumiert. Doch auch als Heilmittel kommen bestimmte Alkaloide beim Menschen zum Einsatz (s. Kapitel 2.1.4-2.1.5) [23]. Die Syntheserouten für diese Alkaloide sind meistens sehr komplex und dabei sind häufig mehrere verschiedene Gewebe mit spezifischen Enzymen beteiligt [9]. Alle die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzentypen produzieren spezielle Alkaloide, welche von pharmazeutischem Interesse sind und in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt werden.

2.1.3 Tabakpflanze

Tabak ist eine Pflanzengattung aus der Ordnung der Nachtschattenartigen [5]. Die wirtschaftlich relevanteste Art ist der Virginische Tabak (*Nicotiana tabacum*) [26]. Dazu zählt die Zelllinie *Nicotiana tabacum* Cultivar Bright Yellow 2 (BY-2), welche neben dem bekannten Nicotin unter Stimulation auch andere Alkaloide synthetisiert [27]. BY-2 eignet sich sehr gut als Modellorganismus für höhere Pflanzen zum Untersuchen von Vorgängen auf molekularer sowie zellulärer Ebene [5], da sie sehr kurze Generationszeiten aufweisen und sich ihr Zellzyklus einfach synchronisieren lässt [9, 28]. In der Literatur wird diese Zelllinie gerne mit Henrietta Lacks-Zellen (HeLa-Zellen) verglichen, welche beim Menschen auf gleiche Weise als Modellorganismus für Untersuchungen in der Molekular- und Zellbiologie dienen [27, 29].

2.1.4 Madagaskar-Immergrün (*Catharanthus roseus*)

Das Madagaskar-Immergrün, welches die botanische Bezeichnung *Catharanthus roseus* (*C. roseus*) trägt, gehört zur Ordnung der Enzianartigen (s. Abbildung 4 a) [30]. *C. roseus* produziert eine Vielzahl an pharmazeutisch aktiven Stoffen, darunter auch das Alkaloid Vinblastin, welches ein seit mehreren Jahrzehnten eingesetztes Krebstherapeutikum ist [3, 4]. Der therapeutische Effekt beruht darauf, dass Vinblastin an die an der Zellteilung beteiligten Mikrotubuli bindet, wodurch der Mechanismus gehemmt wird [7]. Zwar sind von dieser Wirkung alle sich teilenden Zellen betroffen, da sich aber v. a. Krebszellen besonders schnell teilen, ist deren Hemmung effektiver [8].

Zur pflanzlichen Synthese von Vinblastin sind im gesamten Organismus von *C. roseus* mehr als 35 Zwischenprodukte und die Zusammenarbeit verschiedener Zelltypen notwendig. Der vollständige Stoffwechselweg ist allerdings noch nicht erforscht [3, 9]. Allein bei dem in Abbildung 3 vereinfacht dargestellten Stoffwechselweg für eine Vorstufe von Vinblastin, dem Vindolin, sind bereits einige Zelltypen involviert. In der Epidermis findet eine mehrstufige enzymatische Umsetzung von Vorstufen statt, woraufhin diese im Palisadengewebe umgewandelt werden und die Zwischenprodukte wiederum an Idioblasten weitergeleitet werden. Diese Idioblasten können einzeln entweder im Palisaden- oder Schwammgewebe liegen oder in Form von Laticifer (Milchröhren) existieren und unterscheiden sich deutlich von ihren Nachbarzellen. In Idioblasten kann aus den Zwischenprodukten Vindolin synthetisiert werden [9, 30].

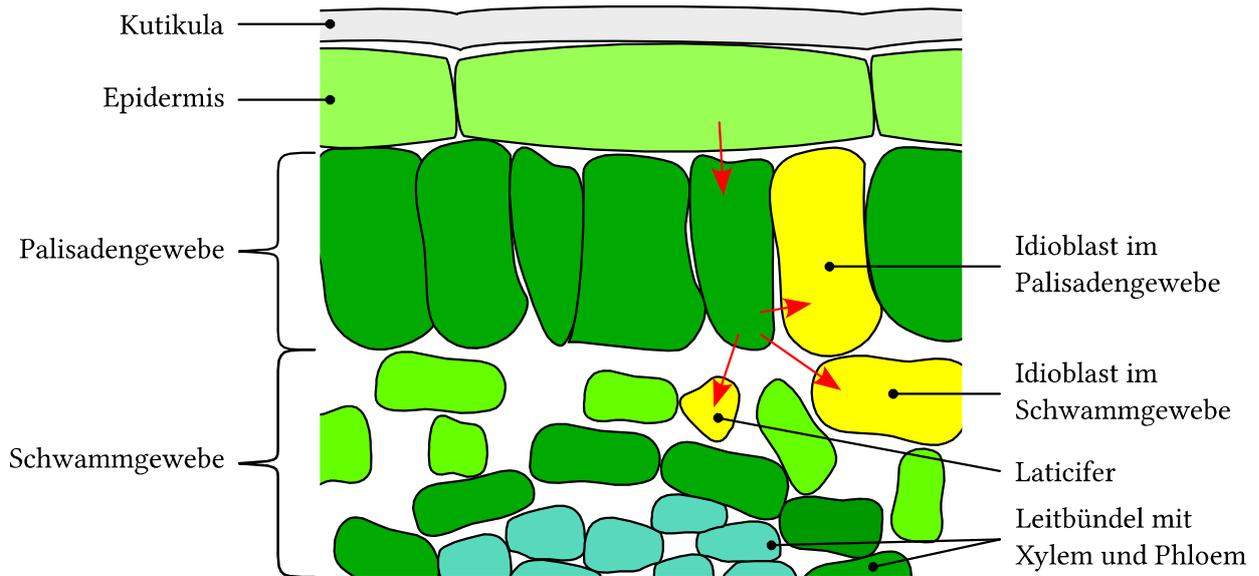


Abbildung 3: Die in *C. roseus* am Stoffwechselweg für Vindolin, der Vorstufe von Vinblastin, beteiligten Zelltypen. Die roten Pfeile zeigen die Richtung des Stoffwechselwegs an, modifiziert nach [9].

2.1.5 Eibe (*Taxus*)

Die Eibe wird in die Ordnung der Koniferen eingeteilt. Es gibt mehrere Eibenarten, darunter die Pazifische Eibe *Taxus brevifolia* (*T. brevifolia*), die Chinesische Eibe *Taxus chinensis* (*T. chinensis*) und die Europäische Eibe *Taxus baccata* (*T. baccata*), welche in Abbildung 4 b dargestellt ist. Wie auch *C. roseus* produzieren diese Eibenarten für die Krebstherapie nutzbare Alkaloide. Bei *T. brevifolia* und *T. chinensis* ist es Paclitaxel, bei *T. baccata* Docetaxel. [5, 6] Der pharmazeutische Effekt dieser Wirkstoffe und damit auch deren therapeutische Anwendung sind mit dem durch *C. roseus* produzierten Vinblastin vergleichbar [8]. Einer der wichtigsten Paclitaxel-Produzenten stellt die Firma Phyton Biotech GmbH dar. Mit Pflanzenzellen in einem 75.000 L-Edelstahlbioreaktor werden dieser Wirkstoff und seine Vorprodukte in großtechnischem Maßstab synthetisiert. [22, 31]



Abbildung 4: Das Madagaskar-Immergrün (*C. roseus*). (a) [32] und die Europäische Eibe (*T. baccata*) (b) [33], mit freundlicher Genehmigung von Karlheinz Knoch, © www.Botanica-Creativa.de, 2013.

2.2 Mikrofluidik

In der Mikrofluidik werden sehr geringe Volumina im Bereich von weniger als einem Milliliter transportiert und manipuliert [34, 35]. Dabei spielen beim Stofffluss und -transport andere physikalische Effekte eine dominanter Rolle als es in der Makrowelt der Fall ist [36]. Während die Gravitationskraft in vielen Fällen vernachlässigbar ist, steigt der Einfluss der Kapillarkraft an. Die zugrunde liegenden Transporteffekte und die Gesetzmäßigkeiten der Mikrofluidik werden in den folgenden Unterkapiteln beleuchtet.

2.2.1 Strömungsmechanik

Die Strömungsmechanik beschreibt die Eigenschaften strömender Fluide. Neben der Zusammensetzung des Fluids sind zwei Parameter relevant für die Transporteigenschaften. Dazu zählt zum einen die dynamische Viskosität η , welche ein Maß für deren Fließfähigkeit darstellt, die von den Wechselwirkungskräften der einzelnen Moleküle abhängt. Zum anderen beschreibt die Schubspannung τ das Maß für die Wechselwirkung zur Grenze, entlang welcher das Fluid strömt. [37]

Bei Abläufen in der Biologie sind die beteiligten Fluide zumeist wässrige Lösungen. Im Gegensatz zu Gasen, deren Dichte ρ vom Druck p abhängt und damit kompressible Fluide sind, kann Wasser unter Normalbedingungen als inkompressibles Fluid betrachtet werden. Bei Fluiden, deren Viskosität η nicht von der Schubspannung τ abhängt, spricht man von Newtonschen Fluiden. Deren Dynamik kann mittels der Navier-Stokes-Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \eta \Delta \vec{v} \quad (2.1)$$

Eine wichtige Kennzahl, mit der das Strömungsverhalten bzw. die Strömungsform charakterisiert werden kann, ist die dimensionslose Reynoldszahl Re . Sie stellt das Verhältnis zwischen Trägheitskraft und Reibungskraft dar und gibt Aufschluss darüber, ob die Strömungsform bei der mittleren Strömungsgeschwindigkeit \bar{v} laminar oder turbulent ist. Für den Fall einer Rohrströmung bei kreisförmigem Rohrquerschnitt mit Rohrdurchmesser d resultiert für die Reynoldszahl

$$Re = \frac{d \bar{v} \rho}{\eta} \quad (2.2)$$

Falls der betrachtete Kanal nicht kreisförmig ist, kann der hydraulische Durchmesser d_h mit der Kanalhöhe h und der Kanalbreite b mittels Querschnittsfläche A und Umfang U des Kanals berechnet werden. [38]

$$d_h = \frac{4A}{U} = \frac{2bh}{b+h} \quad (2.3)$$

Bei einer laminaren Strömung bewegen sich die Fluidteilchen in näherungsweise parallel angeordneten Schichten. Für $Re > 2300$ kommt es in einer Rohrströmung zusätzlich zu einem Impuls- und Energieaustausch zwischen den verschiedenen Schichten, wodurch die Strömung turbulent wird. [37, 38] In der Mikrofluidik liegen in den meisten Fällen streng laminare Strömungen vor, da $Re < 1$ ist.

Aufgrund der kleinen Kanalabmessungen in der Mikrofluidik spielt auch die Grenzflächenspannung γ eine tragende Rolle. Diese charakterisiert die Wechselwirkung zwischen Fluiden und Festkörpern. Abbildung 5 veranschaulicht einen Fall, bei welchem Wasser in einem Kanal mit Gas aufsteigt.

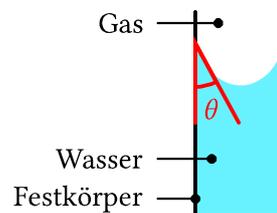


Abbildung 5: Wasser steigt in einem Kanal mit Gas auf. Dabei kann der Kontaktwinkel zwischen den verschiedenen Phasengrenzen bestimmt werden.

Aus dem Gleichgewicht der Grenzflächenspannungen $\gamma_{fest,flüssig}$, $\gamma_{flüssig,gas}$ und $\gamma_{fest,gas}$ an den verschiedenen Phasengrenzen mit Festkörper, Flüssigkeit und Gas kann der Kontaktwinkel θ berechnet werden:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{fest,gas} - \gamma_{fest,flüssig}}{\gamma_{flüssig,gas}} \quad (2.4)$$

Ist bei wässrigen Flüssigkeiten $\theta < 90^\circ$, kann von einer benetzenden Flüssigkeit sowie einer hydrophilen Oberfläche des Festkörpers gesprochen werden. Im umgekehrten Fall ist die Flüssigkeit nicht benetzend und die Oberfläche gilt als hydrophob. [39]

2.2.2 Diffusion

Bei der Strömung von Fluiden kann auch die Diffusion für die Bewegung von Fluiden verantwortlich sein. Diffusion beschreibt die Ausbreitung von Molekülen durch einen Konzentrations-, Temperatur- oder Druckunterschied in Stoffen. In wässrigen Lösungen tritt die Diffusion meistens bedingt durch einen Konzentrationsunterschied auf [38]. Der Weg der einzelnen Moleküle ist dabei völlig zufällig, doch im Laufe der Zeit führt die Diffusion zu einer gleichmäßigen Verteilung dieser Moleküle, bis ein thermodynamisches Gleichgewicht erreicht wird.

Insbesondere in der Biologie finden sich zahlreiche Situationen, in welchen Diffusionseffekte eine tragende Rolle spielen. So bestimmt die Diffusion die Geschwindigkeit einiger biologischen

Reaktionen, in denen die Reaktionspartner erst aufeinandertreffen müssen. [38, 40] Fick stellte die Berechnung der Diffusionsstromdichte J_i der durch eine Komponente j diffundierenden Komponente i auf.

$$J_i = -AD_{i,j} \frac{\partial c_i}{\partial z} \quad (2.5)$$

Hierbei ist A die Fläche, durch welche die Diffusion stattfindet und c_i die Konzentration der Komponente i entlang der räumlichen Richtung z . $D_{i,j}$ ist der Diffusionskoeffizient der Komponente i in der Komponente j . Um den Diffusionskoeffizienten in Flüssigkeiten abzuschätzen, kann die Stokes-Einstein-Gleichung verwendet werden:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_i} \quad (2.6)$$

k_B ist die Boltzmann-Konstante und R_i der charakteristische Radius der diffundierenden Komponente i . Damit ist der Diffusionskoeffizient direkt abhängig von der Temperatur T , der Viskosität η und dem charakteristischen Radius R_i . Hierbei ist zu beachten, dass R_i größer sein muss als der charakteristische Radius R_j der Fluidmoleküle. Falls $R_i \approx R_j$, kann auch die Wilke-Chang-Gleichung als Näherung für den Diffusionskoeffizienten angenommen werden.

$$D = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(\varphi \tilde{M}_j)^{1/2} T}{\eta \bar{V}_i} \quad (2.7)$$

φ ist ein empirischer Parameter, der in wässrigen Lösungen als 2,6 angenommen wird. Die Molmasse des Fluids j ist \tilde{M}_j und \bar{V}_i das Molvolumen der diffundierenden Komponente i . [40, 41]

2.3 Stand der Technik mikrofluidischer Chips

In den letzten Jahrzehnten spezialisierte sich eine Vielzahl neuer Firmen auf die Entwicklung und Herstellung mikrofluidischer Chips [42]. Mikrofluidische Chips finden Anwendung in der chemischen Synthese, Biokatalyse, Analyse, biomedizinischen Systemen, klinischen Diagnostik und Gentechnik [43-45]. Damit erstreckt sich deren Einsatz über das gesamte Spektrum der Life Sciences [46]. Mithilfe von unterschiedlichen Replikationsmethoden (s. Kapitel 2.5) können die dafür notwendigen Bauteile aus Polydimethylsiloxan (PDMS), Glas oder verschiedenen Kunststoffen (s. Kapitel 2.4) im Milli- oder Mikrometermaßstab gefertigt werden [20, 35, 46, 47].

Exemplarische Anwendungen stellen die sogenannten μ TAS (engl. für Micro Total Analysis Systems) oder die Lab-on-a-Chip-Systeme (LOC) dar [45, 48-50]. Im Vergleich zu klassischen Systemen wie Schüttelkolben oder Petrischalen zählen zu den typischen Vorteilen mikrofluidischer Systeme die Kostenreduzierung durch geringeren Verbrauch von Medium, bedingt durch geringeres Volumen, die Möglichkeit für Hochdurchsatz-Screenings, die Anpassung der Mikroumgebung für Zellen und die damit verbundene Möglichkeit zur Untersuchung sowie Manipulation einzelner Zellen [45].

2.3.1 Mikrofluidische Systeme für die Zellkultivierung

Mikrofluidische Chips eignen sich hervorragend zur Kultivierung von Zellen, sei es zum Screening einzelner Zellen bzw. Zelllinien und ihrer Wechselwirkung mit bestimmten Stoffen oder der Produktion bestimmter Wirkstoffe für den Menschen. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden bereits zahlreiche Systeme für unterschiedlichste Anwendungen entwickelt [51]. Je nach Anwendung können als Zellen Mikroorganismen (z. B. Bakterien oder Pilze), menschliche bzw. tierische Zellen (z. B. Blutzellen, Krebszellen) oder Pflanzenzellen (vgl. Kapitel 2.3.2) zum Einsatz kommen. Der Betrieb solcher Systeme ist vom Prinzip her meistens ähnlich. Durch den mikrofluidischen Chip mit Zellen wird Nährmedium gepumpt und in einem Sammelbehälter aufgefangen. Je nach Gegebenheit kann das Nährmedium auch im Kreis geführt werden. Mithilfe verschiedener Mikroskope und integrierter Sensoren können zelluläre Abläufe überwacht und aufgezeichnet werden. [45] Ein typischer Aufbau ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

Die Zellen können abhängig von ihrem Zelltyp und der damit verbundenen Beschaffenheit in mikrofluidischen Systemen frei in Suspension, auf Oberflächen oder immobilisiert in Gelmatrizen kultiviert werden [52]. Menschliche Zellen bevorzugen die Adhäsion auf funktionalisierten Oberflächen, wohingegen Pflanzenzellen durchaus auch in Suspensionskulturen gehalten werden können.

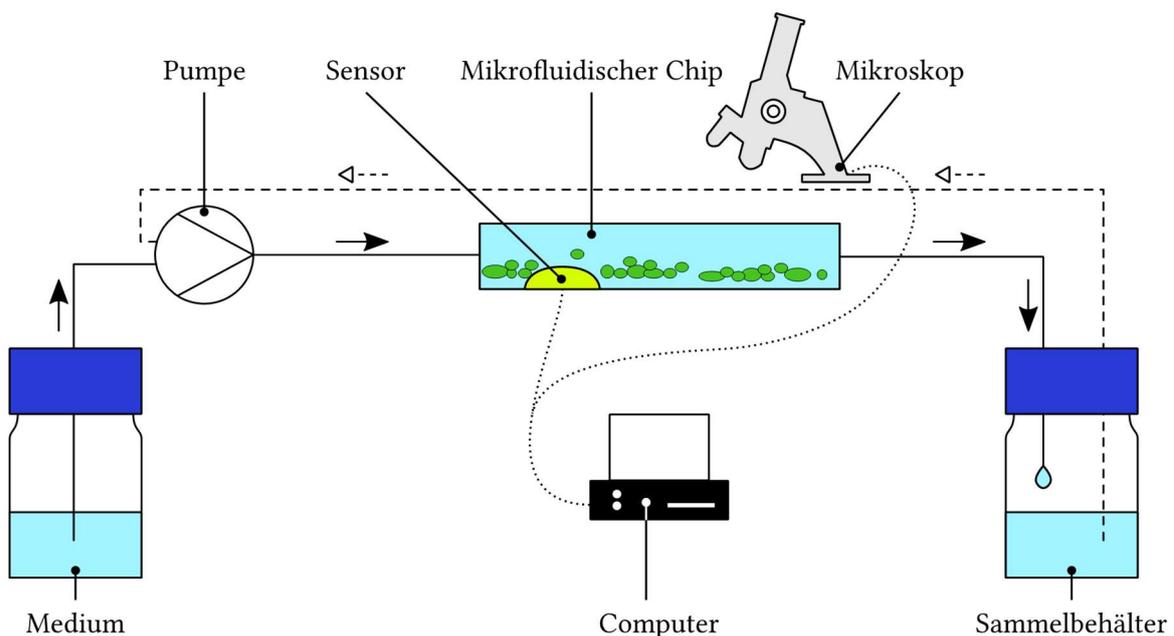


Abbildung 6: Betrieb eines mikrofluidischen Chips für die Zellkultivierung. Durchgezogene Linien stellen die Schläuche dar, durch die das Medium fließt. Die gestrichelte Linie zeigt eine optionale Rückführung des Mediums und die gepunkteten Linien stehen für elektrische Leitungen zwischen Sensoren bzw. Mikroskop und Computer.

2.3.2 Mikrofluidische Systeme für Pflanzenzellen

Obwohl in mikrofluidischen Systemen mit vielen verschiedenen Zelltypen gearbeitet wird, sind kaum Systeme zur Kultivierung von Pflanzenzellen bekannt. 2006 konnte von Ko et al. die erste erfolgreiche Kultivierung von Pflanzenzellen in einem mikrofluidischen System aus PDMS gezeigt werden [12]. Bei diesem System wurde mit Protoplasten von Tabakzellen gearbeitet, bei welchen die Zellwand zuvor entfernt wurde. Die Protoplasten wurden durch Säulenstrukturen in einem „Käfig“ gehalten und dadurch deren Ausspülung verhindert. Über eine Dauer von mehreren Wochen konnte die Zellteilung beobachtet und durch Fluoreszenzmarker deren Viabilität analysiert werden. Erst 2010 folgte das nächste mikrofluidische System von Wu et al., welche gleich fünf mikrofluidische Kammern analog zu Ko et al. in PDMS fertigten [13]. Kultiviert wurden ebenfalls Tabakzellprotoplasten, mit dem Ziel, noch einen Schritt weiter zu gehen und die Zellen durch das Induzieren von Polyethylenglycol zur Fusion zu bringen.

Eine weitere Anwendung wurde 2011 von Grossmann et al. zur Untersuchung des Wurzelwachstums sowie des Zusammenhangs mit dem Zuckergehalt in den Wurzelzellen der Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) aus PDMS hergestellt [15]. Im selben Jahr entwickelten Yetisen et al. ein auf PDMS basierendes System, mit dem das Wachstum von Pollenschlauchzellen zu den Eizellen von *A. thaliana* und den dabei beteiligten Botenstoffen studiert werden konnten [18].

2012 folgte von Busch et al. eine ähnliche Anwendung, bei der gleichzeitig noch mehr *A. thaliana*-Setzlinge auf ihr Wurzelwachstum untersucht und zusätzlich deren Genexpression überwacht werden konnten. Die Herstellung dieser Anwendung erfolgte durch Stereolithographie aus einem transparenten und biokompatiblen Photopolymer. [14]

2013 entwarfen Nezhad et al. verschiedene Systeme aus PDMS, in denen Pollenkörner der Kameilien-Art *Camellia japonica* und die daraus wachsenden Pollenschlauchzellen untersucht wurden. Zum einen wurden die mikrofluidische Positionierung der Pollenkörner und das Wachstum der Pollenschlauchzellen beobachtet [16], zum anderen die Zellbiomechanik der Pollenschlauchzellen analysiert [17].

Massalha et al. entwickelten 2017 ein System, bei dem das Wurzelwachstum von *A. thaliana* unter Einfluss von verschiedenen Bakterienarten in Echtzeit untersucht wurde. Dabei wurde den Fragestellungen nachgegangen, wie schnell die initiale Besiedelung der Wurzeloberfläche mit verschiedenen Bakterienarten erfolgt, welche Botenstoffe dabei eine entscheidende Rolle spielen und welche Bakterienart welchen Wurzelgenotyp bevorzugt befällt.

In einem von Kreppenhof 2013 zum Zweck des sogenannten Metabolic Engineerings (s. Kapitel 2.1.2) entwickelten MBR konnte 2016 von Maisch et al. die erste Kultivierung einzelner Pflanzenzellen mit Zellwand sowie die Analyse ausgewählter Metaboliten im Durchfluss vollzogen werden [11, 21]. Die Pflanzenzellen werden dabei in der Zellkammer in einer oberen Chiphälfte kultiviert. In der unteren Chiphälfte befindet sich eine Versorgungskammer mit Ein- und Auslass, durch die das Nährmedium strömt. Als Zwischenlage ist eine poröse Membran integriert, die sowohl die Diffusion des Nährmediums zu den Pflanzenzellen, als auch umgekehrt die Diffusion von

Metaboliten in den Versorgungsstrom ermöglicht. Eine schematische Darstellung und ein Foto sind in Abbildung 7 a-b dargestellt.

Mit diesem Aufbau wurde das Fundament für weitere Durchflussversuche mit verschiedenen, mikrofluidisch gekoppelten Pflanzenzellen und deren gemeinsamer metabolischer Fluss gelegt. Dadurch könnten Produkte synthetisiert werden, die sonst nur durch das Zusammenwirken unterschiedlicher Zelltypen in verschiedenen Gewebeverbänden (vgl. Kapitel 2.1.4) gebildet werden. Die Gewebeverbände werden durch Kompartimentierung der Zelltypen in einzelnen MBR technisch nachgestellt. Erste Untersuchungen zur Co-Kultivierung verschiedener Pflanzenzellen und der Effekt auf den gemeinsamen Metabolismus wurden 2017 von Rajabi et al. in Erlenmeyerkolben durchgeführt [53].

Das erste Konzept von Kreppenhofer 2013 wurde vor Beginn dieser Arbeit im Rahmen einer Masterarbeit weiterentwickelt [54]. Dabei wurden Zell- und Versorgungskammer in elliptischer Form entworfen, um darin die Blasenanhftung zu minimieren und für eine möglichst gleichmäßige Durchströmung zu sorgen. Der MBR bestand dabei nach wie vor aus den beiden Reaktorhälften und einer dazwischenliegenden Membran. Um ein geeignetes Design bezüglich der definierten Anforderungen zu ermitteln, wurde ein erster, in Abbildung 8 dargestellter Prototyp durch Mikrofräsen hergestellt und durch Ultraschallschweißen gefügt.

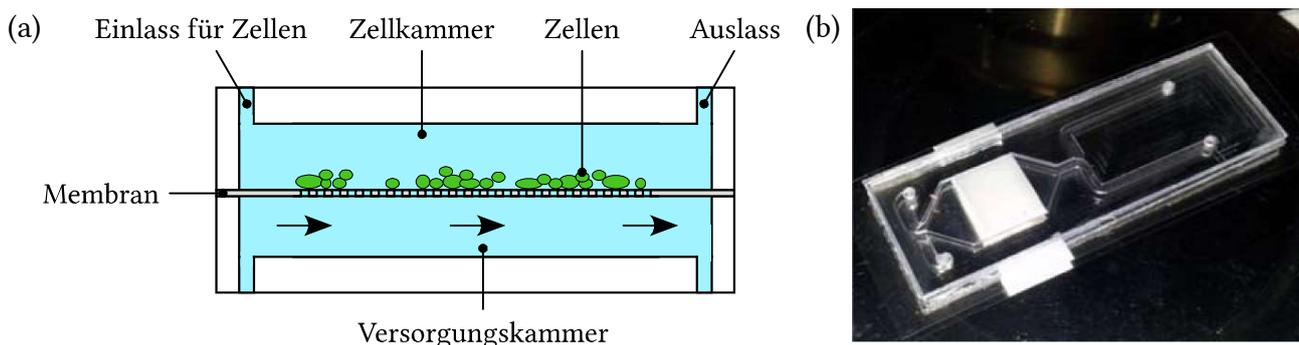


Abbildung 7: MBR zur Kultivierung von Pflanzenzellen mit Zellwand nach Kreppenhofer 2013 [21]. (a) Schematischer Aufbau, (b) aufgebauter MBR, das weiße Rechteck entspricht dem porösen Bereich der Membran.

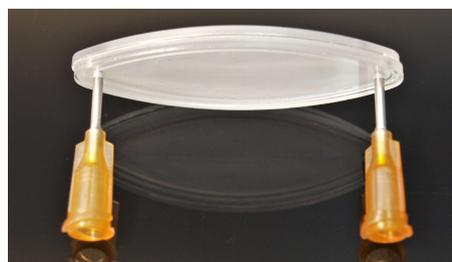


Abbildung 8: Erster durch Mikrofräsen hergestellter und durch Ultraschall verschweißter Prototyp eines mikrofluidischen Bioreaktors mit durch Presspassung befestigte Dosiernadeln für den fluidischen Anschluss.

Ein Nachteil des mikrogefrästen Prototyps bestand in den dabei entstandenen Graten. An diesen zerriss die Membran beim Ultraschallschweißen. Weiterhin war mit diesen Prototypen keine systematische Ermittlung optimaler Parameter für den Ultraschallschweiß-Prozess möglich.

Aufgrund dessen wurde ein erster Formeinsatz gefertigt, mit dem die Chiphälften des Prototyps anstatt durch zeitaufwendiges Mikrofräsen mithilfe dieses Formeinsatzes durch Heißprägen (vgl. Kapitel 2.5.3) abgeformt werden konnten. Dafür wurde das Design des MBR vom ursprünglich ovalen in ein rechteckiges Außenformat von 51 mm · 21 mm überführt. Das Volumen der Zellokammer betrug 200 µl. In Abbildung 9 a sind die einzelnen Lagen des MBR dargestellt und Abbildung 9 b zeigt den gefertigten MBR. Dabei ist zu erkennen, dass die Oberfläche durch das notwendige Entformen mithilfe einer sandgestrahlten Substratplatte opak ist. Anfänglich war bei den Experimenten mit diesem MBR keine Transparenz erforderlich. Um hingegen eine Beobachtung der Zellen zu ermöglichen, war ein anschließendes Polieren der Chiphälfte mit Zellkammer notwendig (s. Abbildung 9 c). Abbildung 9 d zeigt die fluidischen Anschlüsse für das durchströmende Nährmedium. Diese wurden durch eine 2,3 mm lange Presspassung zwischen geraden Dosiernadeln aus Edelstahl mit einem Außendurchmesser von 1,75 mm und den Öffnungen der Versorgungskammer mit einem Innendurchmesser (ID) von 1,7 mm realisiert.

Dieser Forschungsstand ist Ausgangspunkt für diese Arbeit und wird in Kapitel 3 ausführlich definiert. Zuvor werden in den folgenden Kapiteln 2.4-2.8 die dafür verwendeten Materialien, Replikationsmethoden sowie Füge-technologien und die Charakterisierungsmethoden vorgestellt.

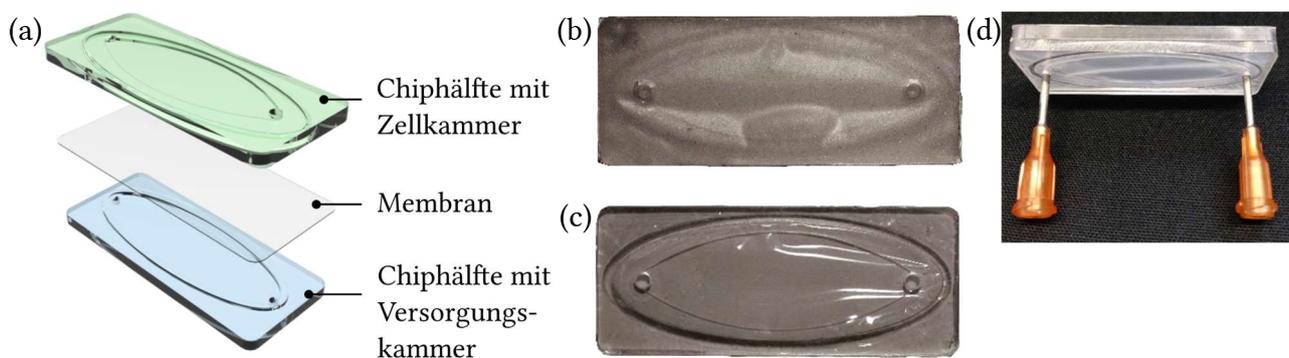


Abbildung 9: Durch Heißprägen der Chiphälften und anschließendes Ultraschallschweißen gefertigter 200 µl-MBR. (a) einzelne Lagen des MBR, (b) opake Oberfläche des MBR, (c) transparent polierte Zellokammerseite, (d) durch Presspassung befestigte Dosiernadeln für den fluidischen Anschluss.

2.4 Materialien

Je nach Anwendungsbereich und Anforderung an einen mikrofluidischen Chip bzw. MBR können bei der Herstellung verschiedene Materialien wie Glas, Stahl, Silikon oder Polymere zum Einsatz kommen. Bei biologischen Anwendungen werden aufgrund der geringen Kosten und vielfältigen Bearbeitungsmethoden überwiegend Polymere verwendet [55]. Ein in der Forschung häufig aufgrund der einfachen Verarbeitung verwendetes Polymer ist PDMS (vgl. Kapitel 2.3.2). PDMS ist allerdings nur eingeschränkt einsetzbar, da es hydrophobe Moleküle adsorbieren kann, auf Dauer

kaum stabil sowie mikrofluidisch dicht zu kontaktieren ist und sich nicht für die Massenfertigung eignet [19, 20].

Die in dieser Arbeit zur Herstellung der MBR verwendeten Materialien lassen sich deshalb auf die Gruppe der thermoplastischen Polymere beschränken und werden in den folgenden Unterkapiteln zusammengefasst. Thermoplaste sind Additions- oder Kondensationspolymerisate aus Molekülen mit hoher Molmasse, die amorph oder teilkristallin sein können. Je nach Art des Polymers und dessen Molmasse sowie der Kristallinität unterscheiden sie sich auch direkt in ihrer Erweichungstemperatur (bei amorphen Thermoplasten) bzw. in der Schmelztemperatur (bei teilkristallinen Thermoplasten). Durch die im Vergleich zu Elastomeren oder Duroplasten nicht ausgeprägte Quervernetzung der einzelnen Polymermoleküle können Thermoplaste reversibel erweicht bzw. aufgeschmolzen werden.

2.4.1 Polycarbonat (PC)

Polycarbonate (PC) zählen zu den amorphen, thermoplastischen Kunststoffen. Der wichtigste und anwendungstechnisch wertvollste Vertreter ist das Bisphenol-A-Polycarbonat (s. Abbildung 10), welches unter den Handelsnamen Makrolon® oder Lexan® bekannt ist und im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.

Im Allgemeinen wird PC in den Bereichen Maschinen- und Fahrzeugbau, Elektrotechnik und Bauwesen eingesetzt, häufig als Abdeckungsmaterial. Im Alltag sind PC vor allem in Form optischer Datenträger (CD, DVD, Blue-ray) geläufig [56-59]. Im Bereich der Medizin werden PC u.a. für die Herstellung von Behältnissen, Schläuchen, Spritzen oder Komponenten für Dialysegeräte eingesetzt [57].

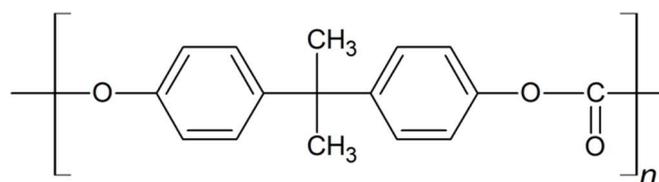


Abbildung 10: Chemische Struktur von Bisphenol-A-Polycarbonat [56, 57, 59].

Die wichtigsten Materialeigenschaften von PC sind:

- amorphe Struktur [56, 59],
- eine Dichte ρ von $1,20 \text{ g/cm}^3$,
- eine hohe Härte, Festigkeit und Steifheit im Temperaturbereich von -150 °C bis $+135 \text{ °C}$,
- eine Glasübergangstemperatur T_g von 148 °C ,
- eine Wärmeformbeständigkeitstemperatur (HDT) A von $125\text{-}140 \text{ °C}$ [56],
- im sichtbaren Bereich des Lichts nahezu vollständig transparent und absorbiert erst bei Wellenlängen unter 290 nm [56, 57, 59], wodurch das Innere mikrofluidischer Chips unter dem Mikroskop beobachtet werden kann,

- eine sehr gute biologische Verträglichkeit bzw. Biokompatibilität [56, 57, 59], was den biologischen Einsatz bei Zellversuchen erlaubt [11, 20, 60],
- lässt sich mit Ultraschall (s. Kapitel 2.6.1) oder Laser (s. Kapitel 2.6.2) verschweißen [61, 62],
- sterilisierbar (s. Kapitel 2.7) [59].

2.4.2 Polyethylenterephthalat (PET)

Wie PC ist auch Polyethylenterephthalat (PET) ein thermoplastischer, allerdings teilkristalliner Kunststoff, der durch Veresterung von Dimethylterephthalat mit Ethylenglykol, bzw. 1,4-Butandiol und anschließender Polykondensation synthetisiert wird. PET besitzt eine teilkristalline Struktur von 30-40 % Kristallinität, welche die Eigenschaften maßgeblich bestimmt [56, 57, 59]. Dadurch kann PET in amorphes PET-A, teilkristallines PET-C und in mit Glykol zähigkeitsoptimiertes PET-G untergliedert werden [56]. Ursprünglich wurde PET nur in der Textilindustrie in Form von Fasern eingesetzt, jedoch erstreckt sich der heutige Einsatz über den Getränkehandel (Flaschen), die Verpackungsindustrie (Folien) und andere Industriezweige (Formteile) [56, 58]. In der Medizin findet PET v. a. als Filtermaterial, Blutgefäßimplantat oder Behältnis Verwendung [57].

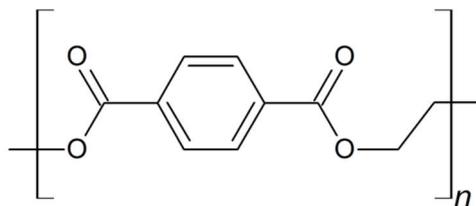


Abbildung 11: Chemische Struktur von Polyethylenterephthalat [56, 57].

Die wichtigsten Materialeigenschaften von PET sind:

- eine Dichte ρ von 1,35-1,38 g/cm³,
- eine hohe Härte, Festigkeit, Steifheit und Zähigkeit im Temperaturbereich von -150 °C bis +135 °C,
- eine Glasübergangstemperatur T_g zwischen 78-98 °C bei amorphem PET-A bis hin zu über 150 °C bei kristallinem PET-C,
- HDT A von 70-80 °C [56],
- im sichtbaren Bereich des Lichts sehr transparent und absorbiert abhängig vom PET-Typ im Bereich von Wellenlängen unter 320 nm [56, 57, 59], wodurch das Innere mikrofluidischer Chips unter dem Mikroskop beobachtet werden kann ,
- eine sehr gute biologische Verträglichkeit bzw. Biokompatibilität [56, 57, 59], die den biologischen Einsatz bei Zellversuchen erlaubt [63, 64],
- lässt sich mit Ultraschall (s. Kapitel 2.6.1) verschweißen,
- sterilisierbar (s. Kapitel 2.7) [56, 59].

2.5 Replikationsmethoden

Im Folgenden werden die verschiedenen Replikationsmethoden vorgestellt, die in dieser Arbeit zur Entwicklung und Herstellung der MBR eingesetzt wurden.

2.5.1 Mikrofräsen

Fräsen ist ein spanabhebender Fertigungsprozess zur Herstellung von Werkstücken mit einer bestimmten geometrischen Form. Das ein- oder mehrzahnige Werkzeug führt eine rotatorische Schnittbewegung aus, welche senkrecht oder schräg zur Drehachse verlaufen kann. Unterschieden wird zwischen Stirn- und Umfangsfräsen. Beim Stirnfräsen steht die Werkzeugachse senkrecht zur Werkstückoberfläche und die Form wird mit der Nebenschneide von der Stirnseite aus erzeugt. Dagegen steht beim Umfangsfräsen die Achse parallel zur Arbeitsfläche, wobei die Form durch Schneiden am Umfang des Fräasers erzeugt wird. Eine andere Einteilung kann mithilfe der Relativbewegung zwischen Werkstück und Werkzeug vorgenommen werden. Somit wird je nach Laufrichtung grundsätzlich zwischen Gegenlauf- und Gleichlaufräsen unterschieden [65].

In der Mikrosystemtechnik wird das Mikrofräsen vielfältig eingesetzt. Dabei kommen mikrometergenaue CNC-Maschinen (Computerized Numerical Control) mit Mikrofräsern zum Einsatz, welche durch eine moderne Steuerungstechnik in der Lage sind, vielfältige und komplexe Formen präzise und automatisiert herzustellen [66]. Zudem eignet sich diese Fertigungstechnik zur Herstellung von Prototypen, da der Prozess schnell und kostengünstig ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Fräse KOSY2 (MAXcomputer GmbH, Deutschland) gearbeitet.

2.5.2 Spritzguss

Ein verbreitetes Verfahren in der industriellen Massenproduktion ist der Spritzguss, bei welchem Elastomere, Duroplaste und Thermoplaste zum Einsatz kommen können. Das Ausgangsmaterial, welches als Granulat oder Pulver vorliegt, wird in einen Trichter gefüllt und durch das Drehen einer Schnecke vor die Schneckenspitze transportiert. Dort wird die Masse gleichmäßig erwärmt, wodurch sie in einen zähflüssigen Zustand aufgeschmolzen wird. Anschließend wird das Material verdichtet und durch eine Spritzdüse in den Formhohlraum injiziert (s. Abbildung 12). Die Schmelze kühlt im Formwerkzeug ab, verfestigt sich und kann als Formteil ausgeworfen werden. Als Replikationsverfahren ermöglicht der Spritzguss die einfache und schnelle Produktion identischer Bauteile in großer Stückzahl aus einem vorher gefertigten Formwerkzeug bzw. Formeinsatz [56, 66]. Beim Spritzguss von Mikrobauteilen, dem Mikrospritzguss, müssen die Formwerkzeuge sehr genau geführt werden. Dies wiederum erhöht die Kosten für solche Werkzeuge. Zudem muss das Verhältnis zwischen Injektions- und Abkühlgeschwindigkeit genau abgestimmt werden, um das vollständige Befüllen des Formwerkzeuges zu gewährleisten und die dabei entstehende Materialschrumpfung zu minimieren. [67]

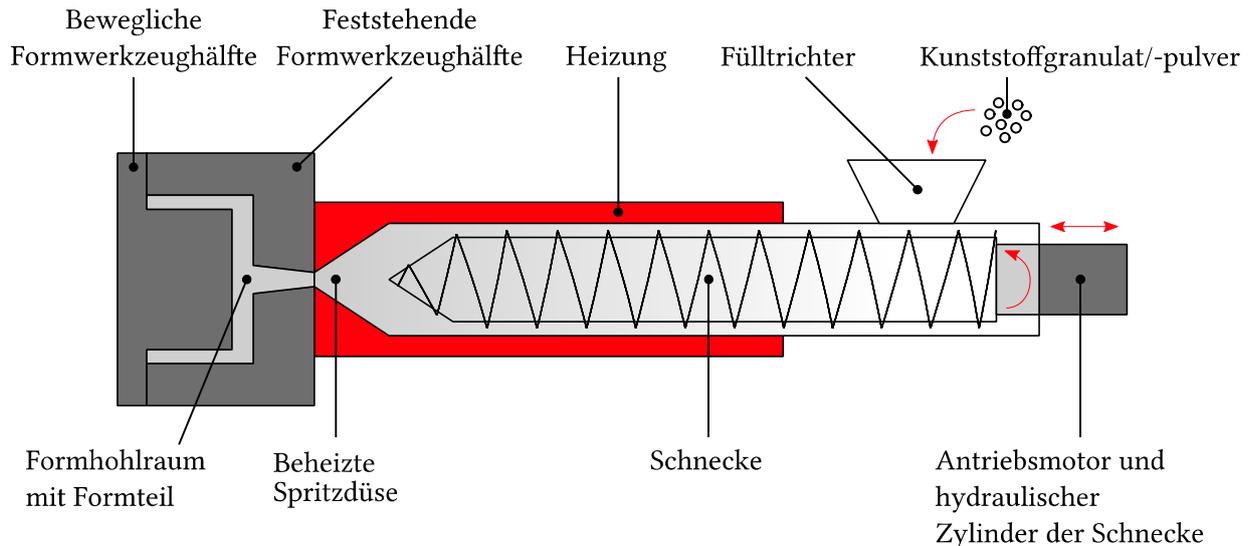


Abbildung 12: Spritzgussmaschine, vereinfacht dargestellt nach [56]. Die roten Pfeile zeigen die Bewegungsrichtungen der einzelnen Komponenten an.

2.5.3 Heißprägeprozess

Ein weiteres Verfahren zur Replikation von thermoplastischen Kunststoffen ist das Heißprägeverfahren, welches in Abbildung 13 schematisch dargestellt wird. Dabei wird eine vorgefertigte Polymerplatte zwischen zwei Werkzeugplatten einer Presse platziert und zunächst über die Glasübergangstemperatur T_g des Kunststoffs erwärmt. Auf einer Werkzeugplatte ist ein metallischer Formeinsatz befestigt, auf der anderen Werkzeugplatte eine Substratplatte. Beide werden im nächsten Schritt mit einer festgelegten Kraft F in den durch die Wärme Q erwärmten viskoelastischen Formstoff gedrückt. In diesem Zustand werden die Werkzeugplatten für eine bestimmte Zeit unter konstanter Kraft F gehalten und anschließend wieder unter die Glasübergangstemperatur T_g abgekühlt, wodurch die Kunststoffstruktur erstarrt. Zum Schluss wird das (mikro-)strukturierte Bauteil durch Öffnen des Werkzeuges entformt. Auf der Substratplatte bleibt eine dünne Kunststoffrestschicht zurück, von welcher das fertige Formteil abgetrennt werden kann.

Um die vollständige Befüllung aller Hohlräume zu gewährleisten und den Einschluss von Luftblasen zu unterbinden, kann im Arbeitsraum während des Vorganges ein Vakuum angelegt werden.

Die Werkzeuge können entweder durch direkte Methoden wie Mikrofräsen oder Laserstrukturierung, durch lithographische Methoden wie beispielsweise Elektronenstrahl-, UV- (Ultraviolett) oder Röntgenlithographie in Kombination mit Ätzen gefertigt werden. Als Substratplatte können eine sandgestrahlte Edelstahlplatte oder eine polierte Chromplatte zum Einsatz kommen. Erstere wird im Fall einer benötigten hohen Entformkraft, letztere bei einer erforderlichen Transparenz eingesetzt. Hohe Entformkräfte entstehen an den senkrechten Seitenwänden durch die Schwindung des Polymers in Richtung der Formnestmitte während des Abkühlens. Durch Entformschrägen können diese Entformkräfte teilweise erheblich gesenkt werden.

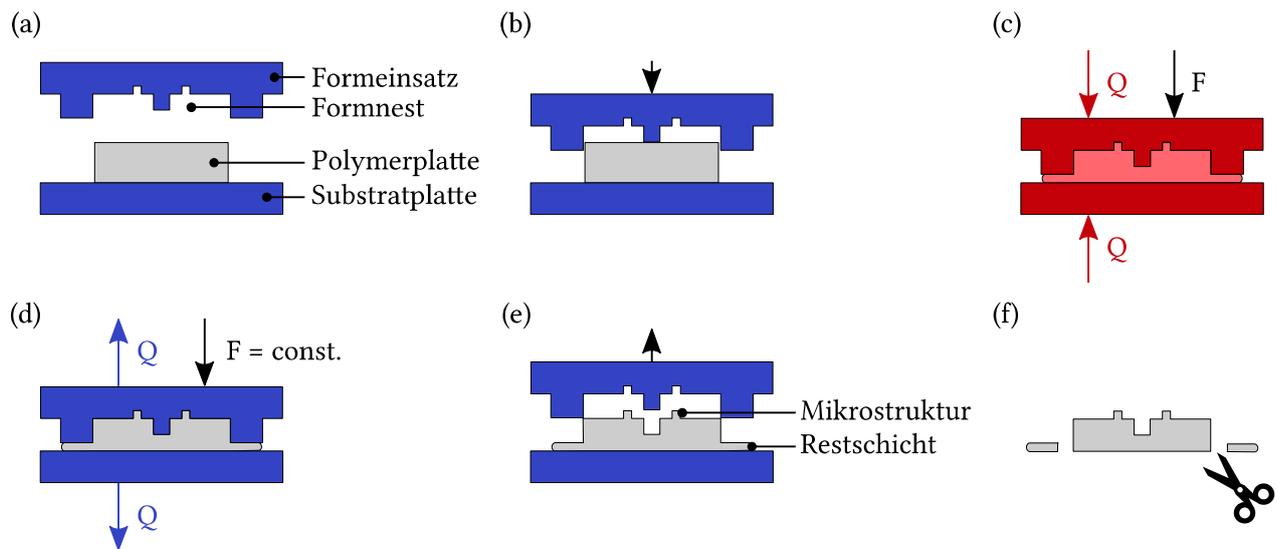


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Heißprägeprozesses. (a) Polymerplatte wird zwischen Formeinsatz und Substratplatte positioniert, (b) Formeinsatz wird kraft- oder weggesteuert auf die Polymerplatte gefahren, (c) Formeinsatz und Substratplatte werden auf Prägetemperatur erwärmt und in die Polymerplatte geprägt, (d) Halten und Abkühlen auf Entformtemperatur, (e) Entformen, (f) Entnahme des Bauteils und Entfernen der Restschicht.

Der Heißprägeprozess eignet sich im Vergleich zum Spritzguss aufgrund längerer Prozesszeiten nur für die Herstellung kleiner Stückzahlen im Laborbetrieb. Hingegen kommen weniger komplexe und daher in der Regel preiswertere Werkzeuge zum Einsatz, welche durch den modularen Aufbau der Anlage flexibel getauscht werden können. Da beim Heißprägen im Gegensatz zum Spritzguss ein bereits auspolymerisiertes Halbzeug verwendet wird, tritt kein Volumenschwund auf. Darüber hinaus legt der Kunststoff bei diesem Prozess deutlich kürzere Fließwege zurück, wodurch spannungsärmere Bauteile entstehen. Weitere Vorteile des Heißprägens gegenüber dem Spritzguss sind der einfachere Materialwechsel und die geringeren Belastungen sehr feiner Strukturen im Formwerkzeug. [66]

Zum Heißprägen der in dieser Arbeit verwendeten Bauteile kamen die Wärmeumformmaschinen (WUM) 01 und 02 (Jenoptik Mikrotechnik, Deutschland) zum Einsatz (Abbildung 14). Beide Maschinen unterscheiden sich in der Erwärmung der Werkzeugplatten. Bei der WUM 01 kann der Formeinsatz und die Substratplatte elektrisch geheizt werden, wodurch die Prägetemperatur T_P schneller erreicht werden kann. Dahingegen muss sich die Temperierung erst einschwingen. Im Vergleich dazu wird bei der WUM 02 durch einen Ölkreislauf geheizt und aufgrund des zusätzlichen Wärmeaustausches die Prägetemperatur erst später erreicht. Dies verlängert die Zykluszeit, dafür kann der Prozess genauer temperiert werden. Gekühlt werden beide Maschinen durch einen Wasserkühlkreislauf. Im Gegensatz zur WUM 01 ist die WUM 02 mit einer Vakuumkammer ausgestattet. Ein exemplarischer Verlauf der Parameter Temperatur, Kraft und Weg beim Heißprägen eines Bauteils aus PC ist in Abbildung 15 dargestellt.



Abbildung 14: Zum Heißprägen verwendete Wärmeumformmaschinen WUM 01 (links) und WUM 02 (rechts).

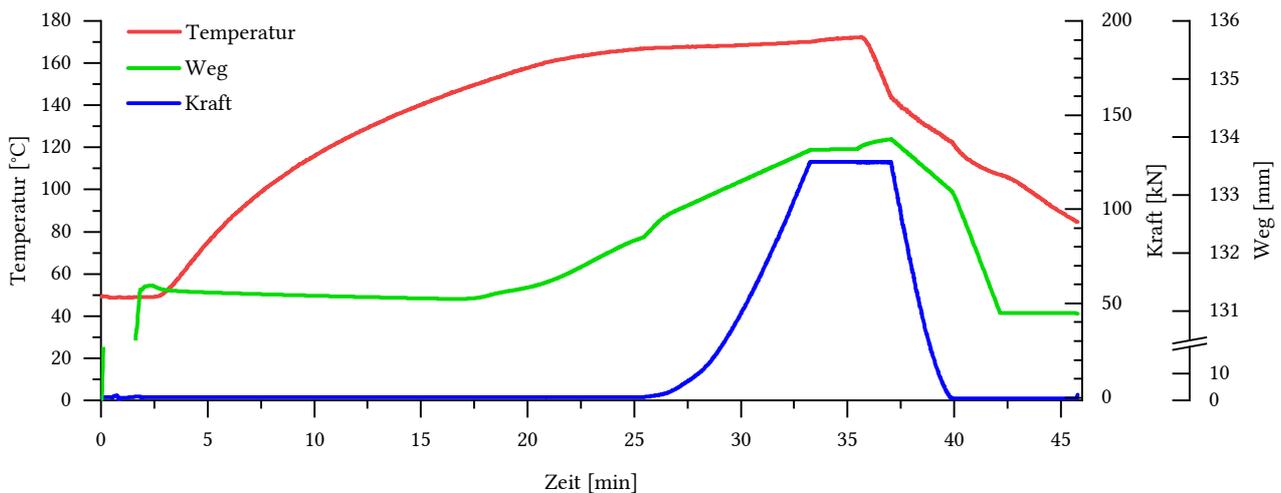


Abbildung 15: Exemplarischer Verlauf der Parameter Temperatur (rot), Weg (grün) und Kraft (blau) beim Heißprägen eines Bauteils aus PC in der WUM 02.

2.5.4 3D-Druck

Dreidimensionale (3D) Werkstücke mit komplexen Strukturen hochaufgelöst herzustellen, ist auch durch 3D-Druck möglich [68]. Dabei kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz, welche sich in ihrem Prinzip stark unterscheiden. Der 3D-Druck begann mit der Stereolithographie, bei der ein flüssiges Photopolymer durch Bestrahlung mit UV-Licht oder einem Laser ausgehärtet wird. Beim selektiven Laserschmelzen dagegen ist das Ausgangsmaterial ein Pulver, welches in passender Form aufgeschmolzen wird. Zudem gibt es die Möglichkeit, Plastiksichten übereinander zu

verkleben und in der gewünschten Form auszuschneiden (Laminated Object Verfahren). Ein weiteres Verfahren funktioniert nach demselben Prinzip wie kommerzielle Tintenstrahldrucker, wobei statt Tinte Photopolymere verwendet werden [69].

Eine bekannte und günstige Methode, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist die sogenannte Schmelzschichtung (engl.: Fused Deposition Molding, FDM). Es handelt sich dabei um ein Extrusionsverfahren, bei welchem ein thermoplastisches Kunststofffilament durch ein Heizelement befördert, aufgeschmolzen und mithilfe einer Düse in zähflüssiger Form linienförmig auf ein Druckbett mit Grundplatte aufgetragen wird. Das aufgetragene Material kühlt ab und verfestigt sich. Der Aufbau eines Bauteils erfolgt, indem der Druckkopf eine Arbeitsebene in x - und y -Richtung abfährt, woraufhin sich die Grundplatte für die nächste Arbeitsebene in z -Richtung bewegt [68]. Dieses Verfahren ermöglicht die Verwendung verschiedener Kunststoffe, wodurch spezifische Ansprüche wie etwa Biokompatibilität erfüllt werden können. Das Schema eines 3D-Druckers sowie eine Frontaufnahme des in dieser Arbeit verwendeten Modells Ultimaker 2+ (Ultimaker B.V., Niederlande) sind in Abbildung 16 dargestellt.

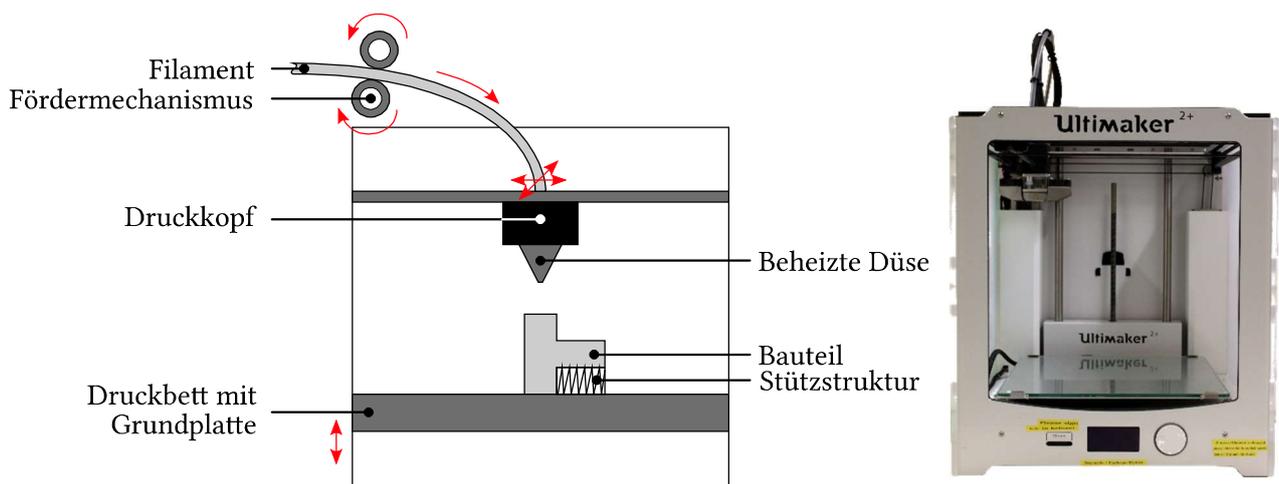


Abbildung 16: Schematische Darstellung des 3D-Drucks durch das Schmelzschichtverfahren (FDM), vereinfacht dargestellt nach [69] (links), rote Pfeile zeigen die Bewegungsrichtungen der einzelnen Komponenten an. Frontaufnahme des in dieser Arbeit eingesetzten 3D-Druckers (rechts).

2.6 Fügetechnologien

Bei der Verwendung von Thermoplasten für mikrofluidische Bauteile stellt die Verbindung der einzelnen Komponenten eine große Herausforderung dar. Das Fügen dieser Bauteile kann allgemein in drei Hauptfügtechnologien eingeteilt werden.

Die mechanischen Verbindungen beinhalten Schraub-, Presssitz- und Schnappverbindungen und damit zusätzliche Elemente, die zwei oder mehrere Bauteile fügen. Diese Verbindungen lassen sich meistens wieder lösen und sind ohne Zuhilfenahme von (thermoplastischen) Elastomeren nicht vollständig dicht [58].

Bei den Klebeverbindungen werden der Bezeichnung entsprechend Klebstoffe oder Klebefolien verwendet [70, 71]. Trotz der aufgrund einfacher Handhabung weit verbreiteten Technik kommt dieses Verfahren für die in dieser Arbeit herzustellenden MBR nicht in Frage, da hierbei ein weiteres Material in das System eingefügt wird, welches u. U. nur beschränkt biokompatibel oder nicht beständig gegenüber Sterilisationsmethoden wie dem Autoklavieren ist. Weitere Möglichkeiten bieten das Lösemittelbunden oder die Oberflächenbehandlung mit UV-Licht oder Plasma [71]. Doch wie auch beim Klebstoff oder bei Klebefolien ist dabei vor dem eigentlichen Fügen noch ein zusätzlicher Prozessschritt notwendig, wodurch die Prozesskette verlängert wird.

Als dritte und damit auch die „direkteste“ Hauptfügetechnologie gilt das Schweißen [70, 71]. Ein Verfahren ist das sogenannte Thermobonden. Bei diesem Prozess werden die Werkstoffe auf Glasübergangstemperatur T_g erwärmt und unter Druck zusammengefügt. Dabei besteht jedoch die Gefahr, dass durch diesen Druck unter hoher Temperatur auch Strukturen außerhalb des gewünschten Bereiches miteinander verschmelzen oder verformt werden. Zudem können verschiedene Materialien mit unterschiedlichen T_g nur eingeschränkt verbunden werden. Eine vielversprechende direkte Füge-Technologie ist das Ultraschallschweißen [70].

2.6.1 Ultraschallschweißen

Das Ultraschallschweißen ist eine Füge-Technologie, die schon seit den 1960er-Jahren erfolgreich Anwendung findet. Heutzutage wird sie hauptsächlich in der Automobil-, Haushaltswaren-, Textil- und Verpackungsindustrie sowie in der Medizintechnik eingesetzt, um thermoplastische Kunststoffe zu fügen. [61, 72] Daneben findet die Technologie auch noch in der Elektronikindustrie Anwendung, um elektronische Bauteile beispielsweise mit Kupferdrähten oder Aluminiumblechen zu kontaktieren [73]. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Füge-Technologien bedarf es beim Ultraschallschweißen keiner zusätzlichen Materialien. Mit nur einem Prozessschritt kann es dabei zur dichten Verbindung der Gehäusehälften sowie der simultanen Integration weiterer Komponenten kommen. Darüber hinaus ist diese Füge-Technologie wegen der sehr kurzen Schweißzeiten von unter einer Sekunde sehr gut für die Serien- und Massenfertigung geeignet. [61, 72]

2.6.1.1 Prinzip und Materialien

Eine Ultraschallschweißmaschine besteht aus Generator mit Steuergerät, Konverter, Transformationsstück, Sonotrode, Halterung, Amboss, Grundplatte und Presse (s. Abbildung 17). Der Generator erzeugt am Ausgang eine Frequenz f von 15-70 kHz, welche im Schallkopf in eine mechanische Schwingung konvertiert wird. [72, 74] Dies kann mittels Wechselfeld induziert werden, welches entweder elektrisch (piezostriktive Keramik) oder magnetisch (magnetostruktives Metall) erzeugt wird [61]. Mit dem Transformationsstück wird die Schwingungsenergie auf die Sonotrode übertragen. Dabei kann die Amplitude A durch entsprechende Querschnittsverjüngung bzw. -aufweitung bis zum Faktor 2,5 verstärkt bzw. zum Faktor 0,5 abgeschwächt werden. [75] Mit der Sonotrode wird die Ausgangsfrequenz und -amplitude direkt in das Werkstück eingekoppelt. Durch eine entsprechende Sonotrodengeometrie kann die Amplitude nochmals vergrößert werden.

Das gesamte Schwinggebilde wird durch die Schweißpresse unter einer definierten Schweißkraft F_s auf das Werkstück gepresst. Halterung und Amboss dienen dazu, das Werkstück während des gesamten Prozesses gegen Verrutschen zu sichern. Der Amboss fungiert als zusätzliche Puffermasse [61, 72, 75] und kann mit der Grundplatte über Schrauben planparallel zur Sonotrode ausgerichtet werden.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Ultraschallschweißmaschine PS DIALOG digital control (Herrmann Ultraschalltechnik GmbH & Co. KG, Deutschland) ist in Abbildung 17 rechts dargestellt. Diese Maschine arbeitet mit einer Ausgangsfrequenz von 35 kHz und einer Ausgangsamplitude von 6,5 μm , welche von 70-100 % elektronisch regelbar ist.

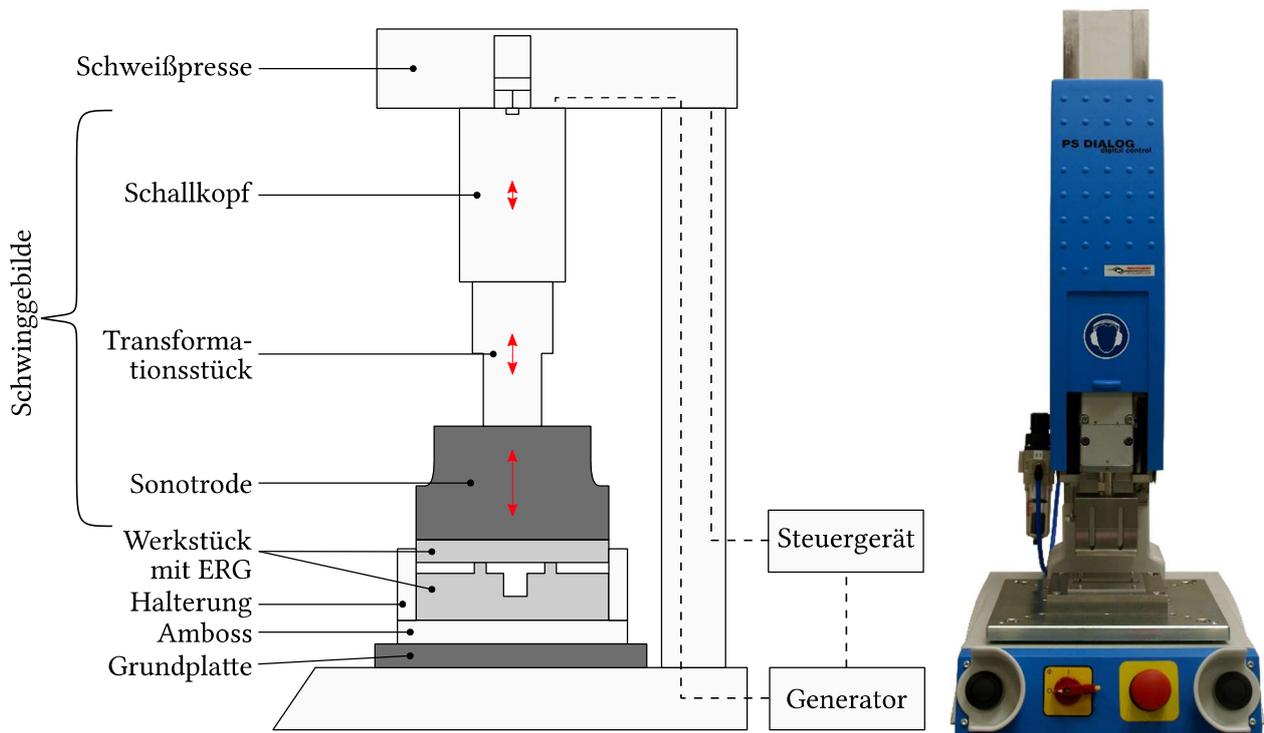


Abbildung 17: Ultraschallschweiß-Maschine. Schematischer Aufbau in Anlehnung an [61, 72, 74] (links), rote Pfeile deuten die Schwingungsrichtung sowie die ihrer Größe entsprechende relative Amplitude an, Frontaufnahme der in dieser Arbeit eingesetzten Ultraschallschweiß-Maschine (rechts).

Beim Ultraschallschweißen führt die eingekoppelte Ultraschallschwingung zwischen den Fügepartnern zu Molekular- und Grenzflächenreibung. Dadurch erzeugen sogenannte Energie- richtungsgeber (ERG) oder eine Quetschnaht eine gezielt lokale Schweißnaht. [61, 72, 75, 76]

Während des Ultraschallschweißens werden formal folgende vier Phasen (s. Abbildung 18) durchlaufen:

- a) Anschmelzen: Durch die Schweißkraft F_s werden die Fügepartner aneinandergespresst und der ERG schmilzt beim ersten Kontakt (Zeitpunkt t_0) durch Grenzflächenreibung an. Aufgrund der breiter werdenden ERG-Front beginnt die Abschmelzgeschwindigkeit abzunehmen. Die Schmelze fließt zur Seite und kühlt dabei ab.
- b) Ankopplung: Die abgekühlte Schmelze des ERG wird erneut aufgeschmolzen und der Aufschmelzprozess breitet sich auf die gesamte benetzte Fläche zwischen ERG und gegenüberliegendem Fügepartner aus. Dabei kommt es zu einer Ankoppelung von Ober- und Unterteil.
- c) Stationäres Abschmelzen: Eine konstante Schmelzschichtdicke entwickelt sich in der Schweißnahtebene und die Schweißzeit endet zum Zeitpunkt t_s .
- d) Haltephase: Die Schallzugabe wird beendet und durch den Wegfall der Schwingungen kommt es daraufhin zu einer Nachsetzbewegung nach unten. Die Struktur der Schweißnaht wird unter bestimmter Haltezeit t_h und Haltekraft F_h eingefroren. [61, 74]

Der in diesen vier Phasen zurückgelegte Fügeweg s_f ist in Abbildung 19 dargestellt. Dieser Verlauf gibt wichtige Aufschlüsse über den Aufschmelzprozess und die Fügegeschwindigkeit, welche stark abhängig von Material und Fügegeometrie sind [61, 72].

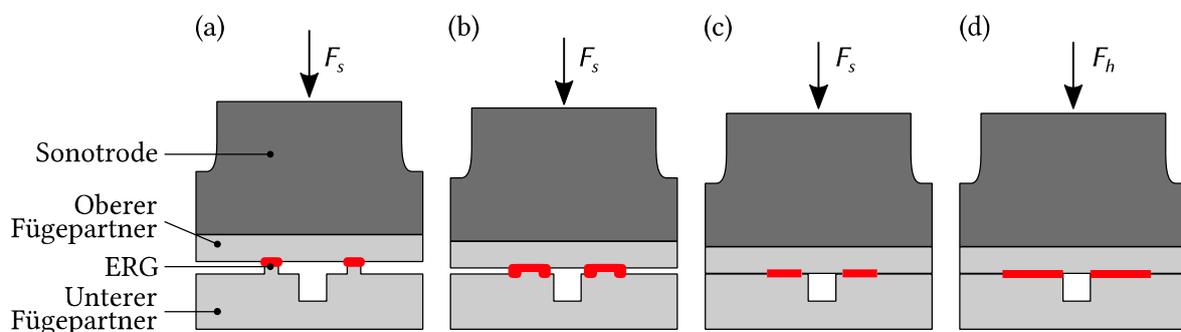


Abbildung 18: Der Prozess des Ultraschallschweißens zweier Fügepartner mit ERG kann in vier Phasen eingeteilt werden, abgewandelt nach [61, 74].

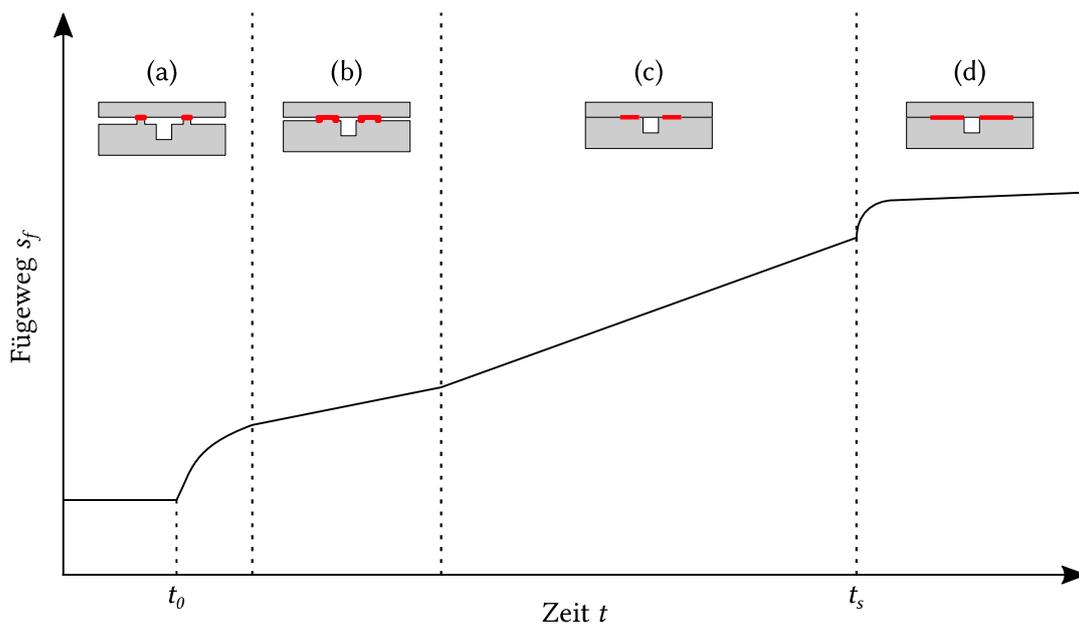


Abbildung 19: Der zeitliche Verlauf des Fügeweges s_f beim Ultraschallschweißen [61, 72, 74].

Zusammenfassend sind - neben der Frequenz und abgesehen von der Füge- und Sonotrodengeometrie (s. Kapitel 2.6.1.2) - folgende Parameter relevant für den Schweißprozess und können entweder am Steuergerät eingegeben oder wie oben beschrieben durch Auswahl des Transformationsstücks bzw. der Sonotrode eingestellt werden:

- Fügeweg s_f ,
- Schweißkraft F_s ,
- Amplitude A ,
- Schweißzeit t_s ,
- Leistung P . [61, 72, 74, 75, 77]

2.6.1.2 Füge- und Sonotrodengeometrie

Ultraschallschweißen kann im Nah- oder im Fernfeld erfolgen. Bei ersterem beträgt die Distanz zwischen Sonotrode und Fügeebene weniger als 6 mm, wohingegen bei zweiterem die Distanz über 6 mm beträgt. Daraus resultiert, dass beim Ultraschallschweißen im Fernfeld höhere Schweißparameter notwendig sind, um die Ultraschallschwingungen durch den oberen Fügepartner zu transportieren. [75, 76, 78] Bei Bauteilen in der Mikrofluidik handelt es sich aufgrund der geringen Schichthöhen um Nahfeldschweißen.

Bauteile können entweder durch eine Quetschnaht oder durch ERG verschweißt werden. Bei einer Quetschnaht muss deren Dimensionierung sowie die Ausrichtung der Bauteile beim Ultraschallschweißen mit sehr kleiner Toleranz von $\pm 50 \mu\text{m}$ vorgenommen werden. Gleichzeitig müssen sich

beide Fügepartner in der Quetschnaht bis zu 500 μm überlagern, was einen hohen Energieeintrag mit sich bringt. [62]

Aufgrund dieser in vielen Fällen überwiegenden Nachteile wird meistens mit ERG verschweißt. Die Fügeebene sollte immer senkrecht zur Bewegungsrichtung der Sonotrode liegen. In dieser Fügeebene muss wie oben beschrieben ein ERG integriert sein, welcher beim Ultraschallschweißen als erstes auf die Oberfläche des Fügepartners trifft und aufschmilzt. Der Querschnitt eines ERG ist meistens dreieckig, wobei dessen Spitze einen Winkel von 60° bis 90° haben sollte. [61, 74, 75] Bei teilkristallinen Thermoplasten kann der ERG i. A. etwas größer dimensioniert und mit einer höheren Leistung verschweißt werden, da mehr Schwingungsenergie als bei amorphen Thermoplasten absorbiert wird [75, 79]. Neben den Materialeigenschaften bestimmen die Dimensionen die Schweißparameter. Die Höhe des ERG korreliert direkt mit dem Fügeweg s_f , wohingegen die Länge des ERG die erforderliche Schweißkraft F_s mitbestimmt. Für die Entstehung einer homogeneren Schweißnaht sollte die Kontur des ERG an den Ecken mit Radien versehen werden.

Neben dem ERG muss im Design auch dessen Schmelzweg berücksichtigt werden. Um vorhandene Strukturen bzw. fluidische Kanäle nicht zu beeinträchtigen oder zu blockieren und zudem kein Restspalt zwischen den gefügten Bauteilen vorhanden bleibt, können zusätzliche Strukturen integriert werden. Einerseits kann mit Anschlägen gearbeitet werden, die den maximalen Schweißweg begrenzen. Andererseits kann überschüssige Schmelze durch Stufen und Drainagen zurückgehalten oder aufgefangen werden. [75]

Die Stirnseite einer Sonotrode kann entweder klassisch flach sein oder auch eine Strukturierung aufweisen. Eine strukturierte Stirnseite kann dazu dienen, ein Bauteil zu schneiden, zu strukturieren oder unter gezielter Einkoppelung von Ultraschall dünnere Lagen (s. Kapitel 2.6.1.3) ohne das Vorhandensein von ERG zu verschweißen [74].

2.6.1.3 Ultraschallschweißen von Membranen und Geweben

Neben dem Fügen von Kunststoffbauteilen eignet sich Ultraschallschweißen, um Membranen in Systeme wie beispielsweise Filter zu integrieren [80]. Hierbei können Membranen und Gewebe zwischen Kunststoffbauteile eingeschweißt und geklemmt (Sterilfilter [81, 82]) werden. Der ERG sollte im Querschnitt stumpfere Winkel oder Verrundungen aufweisen, sodass die Membran nicht nur gestanzt oder geschnitten wird. Daneben können Membran-, Gewebe- oder Folienschichten (Textilien [83]) auch direkt mit Kunststoffbauteilen verschweißt werden, indem mit einer strukturierten Sonotrode gearbeitet wird.

Generell muss bei Geweben und Membranen aufgrund ihrer geringen Dicken besonders stark auf eine planparallele Ausrichtung aller Bauteile in Bezug zur Sonotrode und zum Amboss geachtet werden. Zum Einschweißen in Kunststoffbauteile kann in manchen Fällen eine Art Ring eingesetzt werden, mithilfe dessen die Membran oder das Gewebe auf ein Bauteil geschweißt werden kann und die Membran- bzw. Gewebefläche noch offen gehalten wird [60, 84]. Bei freischwebenden und dünnen Membran- oder Gewebelagen kann der sogenannte Diaphragma-Effekt auftreten, der eine

Beschädigung in der Mitte der Fläche herbeiführt. Bedingt durch den Ultraschall wird die Mitte am stärksten in Schwingung versetzt, wodurch das Material an dieser Stelle aufschmelzen kann. [62]

Beim direkten Verschweißen einzelner Folien miteinander kann auch ein Rolle-zu-Rolle-Verfahren eingesetzt werden, bei dem die Rollen als Amboss dienen [75]. Für das Ultraschallschweißen sind v. a. dicke Folien geeignet, da der Ultraschall an den Grenzflächen in Wärme dissipieren kann [85]. Je dünner hingegen eine Membran bzw. ein Gewebe ist, desto höher ist deren bzw. dessen Schall-durchlässigkeit [86]. Damit einher geht eine pro Volumeneinheit größere Leistung bzw. Energie, welche für eine Verschweißung notwendig wäre [61]. Bei Geweben sind neben Materialeigenschaften auch die Gewebedichte und die einheitliche Gewebedicke wichtige Einflussparameter für das Ultraschallschweißen. Vor allem Polyester wie PC und PET gelten in diesem Zusammenhang als gut mittels Ultraschall verschweißbar. [75]

2.6.1.4 Ultraschallprägen

Durch Ultraschallprägen können ähnlich dem Heißprägen (s. Kapitel 2.5.2) thermoplastische Halbzeuge in Form von Platten oder Folien strukturiert werden. Wie in Abbildung 20 dargestellt koppelt die Sonotrode die Ultraschallschwingungen in das Halbzeug ein, welches gleichzeitig in das Prägewerkzeug gepresst und analog zum Ultraschallschweißen beim Kontakt an den erhabenen Strukturen lokal aufschmilzt [87-94]. Alternativ können auch die Sonotrode oder für beidseitige Strukturierung sowohl Sonotrode als auch das Prägewerkzeug strukturiert sein [87, 91, 93]. Durch das Erwärmen des Prägewerkzeugs analog zum Formeinsatz beim Heißprägen kann der Prozess unterstützt werden.

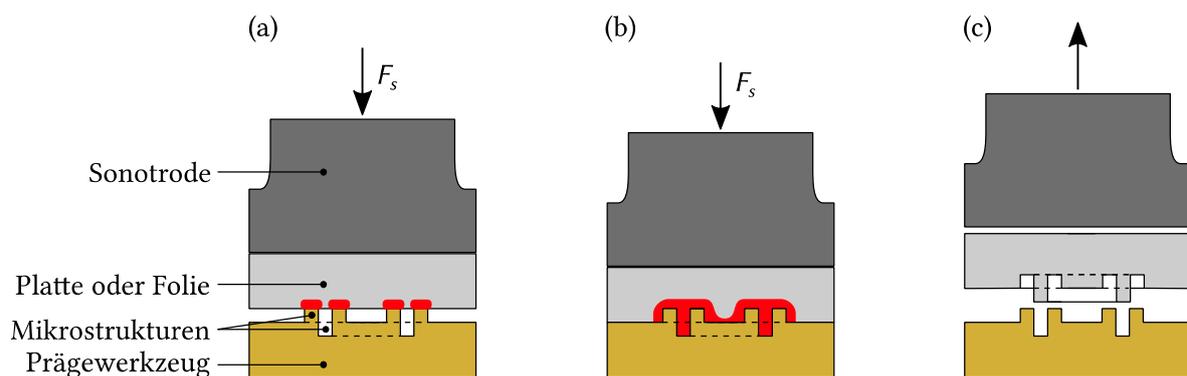


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Ablaufs beim Ultraschallprägen eines thermoplastischen Halbzeugs. (a) Kontaktstellen des Halbzeugs mit den metallischen Mikrostrukturen beginnen aufzuschmelzen (rote Bereiche), (b) Halbzeug ist vollständig ultraschallgeprägt, (c) Entnahme des strukturierten Bauteils, abgewandelt nach [87].

2.6.2 Laserdurchstrahlungsschweißen

Das Laserdurchstrahlungsschweißen ist neben dem Ultraschallschweißen eine weitere geeignete Füge-technologie für Thermoplaste. Zum Einsatz können hierbei hauptsächlich Kohlenstoffdioxid-Laser (CO₂-Laser), Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (Nd:YAG-Laser) und Diodenlaser kommen. Die Lasertypen unterscheiden sich in erster Linie durch die Wellenlänge λ der dabei emittierten Strahlung. Diese beträgt 10,6 μm bei CO₂-Lasern, 1,064 μm bei Nd:YAG-Lasern und 0,8-1,0 μm bei Diodenlasern.

Die Bestandteile dieses Prozesses sind Lasersystem, Komponenten zur Ausrichtung des Lasers und die Fügevorrichtung, welche auch die Fügepartner beinhaltet. Die Fügepartner werden an ihrer Grenzfläche aneinandergedrückt. Anschließend strahlt der Laser durch den bei entsprechender Wellenlänge transparenten Fügepartner und trifft auf die Oberfläche des absorbierenden Fügepartners (s. Abbildung 21). Dort kommt der Effekt zum Tragen, welcher durch das Lambert-Bougersche Absorptionsgesetz charakterisiert werden kann. Dieses beschreibt die Abnahme der Lichtintensität I bzw. die Absorption in Abhängigkeit der Materialdicke d des thermoplastischen Fügepartners:

$$I(d) = I_0 \cdot e^{-\kappa d} \quad (2.8)$$

Gemäß (2.8) sinkt die eintretende, initiale Lichtintensität I_0 mit steigender Absorptionskonstante κ schneller. Daraus resultiert, dass der untere Fügepartner mit vergleichsweise hoher Absorptionskonstante κ an seiner Oberfläche folglich in der Schweißnahtebene absorbiert. Dabei wird die Strahlung in Wärme umgewandelt und plastifiziert das Material. Durch Wärmeleitung in den transparenten Fügepartner plastifiziert dieser ebenfalls an der Grenzfläche und es kommt zu einer Schweißnaht.

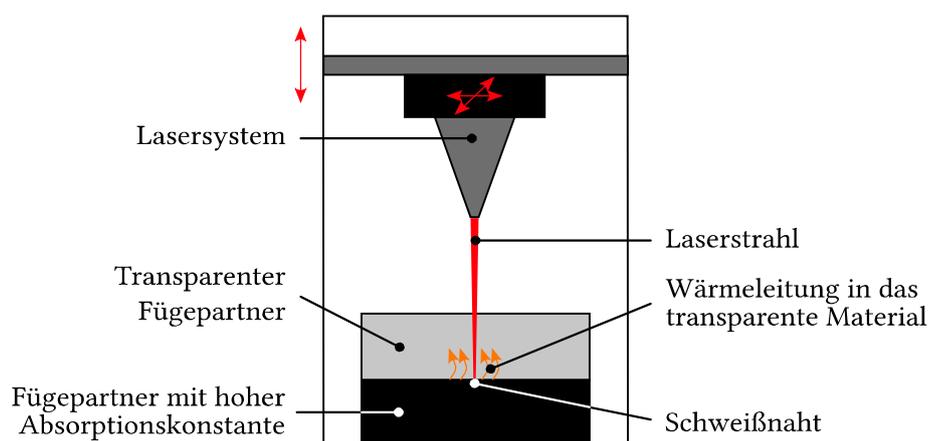


Abbildung 21: Laserdurchstrahlungsschweißen von Thermoplasten, in Anlehnung an [61, 72, 74], rote Pfeile zeigen die Bewegungsrichtungen der einzelnen Komponenten an, orangene Pfeile deuten die Wärmeleitung in das transparente Material an.

Das Laserdurchstrahlschweißen kann in Abhängigkeit der Strahlform und -führung in mehrere Verfahrensprinzipien untergliedert werden. Beim Konturschweißen wird die Fügekontur vom Laserstrahl ein- oder mehrfach abgefahren. Im Gegensatz dazu wird die Schweißnaht beim Quasisimultanschweißen durch sich schnell bewegende Spiegel fast gleichzeitig durch den Laserstrahl abgefahren. Beim Simultanschweißen wird die Schweißnaht gleichzeitig durch mehrere Laserstrahlen angestrahlt. Als viertes Verfahren gilt das Maskenschweißen, bei dem die Schweißnaht durch Masken abgedeckt und noch dünnere Schweißnähte realisiert werden. Die Vorteile dieser Fügetechnologie sind die berührungslose Strahlungserwärmung sowie die punktgenaue Fokussierung und Verschweißung. [61, 72, 74]

2.6.3 Anschlusstechnik

Um mikrofluidische Chips zu kontaktieren, ist eine geeignete Anschlusstechnik unumgänglich. Hiervon existieren heutzutage eine Vielzahl (mikro-)fluidischer Anschlüsse bzw. Konnektorarten [19]. Zu den Steckverbindungen zählen das Luer-System [95, 96], Magnetverbindungen [97] und viele individuell entworfene Steckverbinder [95, 96, 98, 99]. Hinzu kommt ein breites Spektrum von Schraubverbindungen wie beispielsweise das Luer-Lock-System oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Fittings (HPLC-Fittings) (engl.: high-performance liquid chromatography). Gebräuchliche und somit kommerziell erhältliche Konnektorarten sind in Abbildung 22 dargestellt.

Die Abdichtung der fluidischen Anschlüsse erfolgt durch Formschluss mit Schläuchen oder mit dem Gegenstück, häufig durch die Unterstützung von Gummidichtungen oder PDMS. Weiterhin kann jeder fluidische Anschluss in eine der zwei Orientierungen in-plane (in der Ebene) oder out-of-plane (aus der Ebene heraus) eingeteilt werden [19]. Die geeignete Anschlusstechnik für mikrofluidische Chips zeichnet sich aus durch:

- niedriges Totvolumen [100, 101],
- Kompatibilität mit kommerziell erhältlichen Schläuchen und Anschlüssen,
- einfaches Verbinden und Entfernen der Schläuche,
- Druckbeständigkeit,
- Biokompatibilität,
- niedrige Kosten,
- einfache Integration. [19, 69, 98, 99, 102]

Vor allem letzteres bestimmt die Auswahl der Fügetechnologie maßgeblich und ist in erster Linie vom Material des mikrofluidischen Chips abhängig. Im Falle thermoplastischer Kunststoffe (vgl. Kapitel 2.4) kommen wie in Kapitel 2.6 erwähnt Kleben, thermisches Bonden oder Lösemittelbonden, Ultraschall- oder Laserdurchstrahlschweißen in Frage [70]. Generell benötigt das Verwenden zusätzlicher Hilfsstoffe mehr Prozessschritte [19], weshalb in dieser Hinsicht v. a. das Ultraschallschweißen eine vielversprechende Fügetechnologie darstellt [100, 103-105].

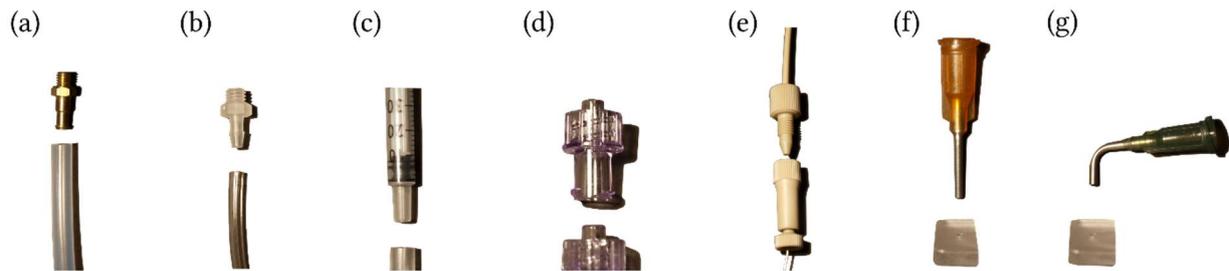


Abbildung 22: Unterschiedliche Konnektortypen und ihre Gegenstücke zur fluidischen Kontaktierung. (a) Stecknippel für Druckluft, (b) Schlauchfitting in der Medizintechnik, (c) Luer-Anschluss für beispielsweise Spritzen, (d) Luer-Lock, welcher Luer-Anschluss mit einem zusätzlichen Schraubgewinde kombiniert, (e) MicroTight® für HPLC, (f) Dosiernadel mit Luer-Lock, gerade, (g) Dosiernadel mit Luer-Lock, 90°.

2.7 Sterilisation

Für eine ungestörte Kultivierung von Zellen muss sichergestellt werden, dass im System keine fremden Organismen vorhanden sind, die die Kultivierung beeinflussen oder durch Konkurrenz beeinträchtigen [106]. Bakterien, Sporen, Viren und Prionen müssen zuvor inaktiviert werden. Alle dafür notwendigen Maßnahmen werden vor Beginn der Kultivierung getroffen und können unter dem Begriff der Sterilisation zusammengefasst werden. [107] Die Hauptverfahren zur Sterilisation sind:

- Hitzesterilisation durch Heißluft oder feuchte Hitze (z. B. Autoklavieren),
- Bestrahlung durch Gamma-, UV- oder Elektronenstrahlung,
- Gassterilisation (z. B. Ethylenoxid),
- Sterilisation mit flüssigen Medien wie beispielsweise Wasserstoffperoxid,
- Sterilfiltration. [57, 106, 107]

Welche Sterilisationsmethode ausgewählt wird, hängt primär vom Material der eingesetzten Komponenten wie MBR, Schläuchen und Medium ab. Bei auf thermoplastischen Polymeren basierenden Komponenten kann eine zu hohe Temperatur bei der Hitzesterilisation zur Deformierung führen. Manche Bestrahlungsmethoden sind nur auf Oberflächen wirksam und tiefer eindringende Strahlung kann je nach Polymertyp physikalische oder chemische Beeinträchtigungen mit sich bringen. Bei der Sterilisation mit Gasen oder flüssigen Medien können Rückstände im Polymer bleiben, welche u. U. nur langsam ausgasen. [57] Aufgrund dessen ist die Sterilisationsmethode sorgfältig auszuwählen und muss bereits in die Entwicklung eines Fertigungsprozesses einbezogen werden.

Die für den Laboreinsatz gebräuchlichste Methode ist das Autoklavieren, die Hitzesterilisation durch feuchte Hitze [107]. Hierbei wird das zu sterilisierende Gut für 5-20 min bei einem Temperaturbereich zwischen 121-134 °C und einem Druck von 2-3 bar mit der feuchten Hitze in Kontakt gebracht [57].

2.8 Charakterisierungsmethoden

Neben der Fertigung der MBR werden verschiedene Methoden eingesetzt, die die MBR charakterisieren sollen. Dazu zählt die Untersuchung von Transportvorgängen wie Diffusion (s. Kapitel 2.8.1), die Aufzeichnung des pH-Verlaufs im MBR (s. Kapitel 2.8.2) oder die Ermittlung der Dichtheit und der Flussraten (s. Kapitel 2.8.3-2.8.4).

2.8.1 NMR-Spektroskopie

Durch die Wechselwirkung zwischen Materie und elektromagnetischer Strahlung können bestimmte physikalische und chemische Eigenschaften von Materie analysiert werden. Auf diesem Prinzip basierende Methoden werden als spektroskopische Methoden bezeichnet. Dabei kommen überwiegend UV/Vis- (engl. für visible, sichtbar), Infrarot-, Fluoreszenz-, Massen- und Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (kurz NMR-Spektroskopie) zum Einsatz. Die NMR-Spektroskopie ist eine der wichtigsten Spektroskopiemethoden, um Moleküle und biologische Systeme zu analysieren [108, 109]. Speziell für wässrige Lösungen und die darin gelösten Stoffe ist die NMR-Spektroskopie geeignet [108, 110].

Die NMR-Spektroskopie ist auf das magnetische Moment der Atomkerne - bedingt durch eine ungerade Anzahl an Protonen und bzw. oder Neutronen - angewiesen. Die am häufigsten vorkommenden und damit wichtigsten Atomkerne für die NMR-Spektroskopie sind die Atomkerne der Isotope ^1H und ^{13}C . [109] Solche Atomkerne weisen einen Spin auf, der mit der Kernspinquantenzahl I beziffert wird und einen halb- oder ganzzahligen Wert zwischen 0-6 annehmen kann. Damit kann der Eigendrehimpuls P berechnet werden.

$$P = \frac{h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)} \quad (2.9)$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum. Um mit einem statischen Magnetfeld in Wechselwirkung treten zu können, müssen die Atomkerne ein magnetisches Moment μ besitzen. Dieses kann als Produkt von Eigendrehimpuls P und gyromagnetischem Verhältnis γ , welches ein von der Atomart abhängiger Parameter ist, direkt ermittelt werden.

$$\mu = \gamma P = \frac{\gamma h}{2\pi} \sqrt{I(I+1)} \quad (2.10)$$

Die Energie E ist das Produkt des magnetischen Moments μ und des Magnetfelds B_0 . Im einfachsten Fall eines isolierten Kerns mit Kernspinquantenzahl $I = \frac{1}{2}$ bildet sich ein Zwei-Niveau-System (Zeeman-Effekt) aus. Dessen Orientierungsquantenzahlen $m = I, I-1, \dots, -I$ können dabei die Werte $+\frac{1}{2}$ und $-\frac{1}{2}$ annehmen. Daraus ergeben sich im statischen Magnetfeld B_0 zwei gequantelte Energieniveaus $E_{-1/2}$ und $E_{+1/2}$, welche mit den Gleichungen (2.11) und (2.12) berechnet werden.

$$E_{-1/2} = \frac{\gamma h}{2\pi} B_0 \quad (2.11)$$

$$E_{+1/2} = -\frac{\gamma h}{2\pi} B_0 \quad (2.12)$$

Für die Energiedifferenz ΔE folgt aus den Gleichungen (2.11) und (2.12):

$$\Delta E = \frac{\gamma h}{2\pi} B_0 = h\nu_0 \quad (2.13)$$

Diese hängt direkt mit der Absorptions- und Emissionsfrequenz des Atomkerns zusammen und wird Larmor-Frequenz genannt. Durch Umstellen der Gleichung resultiert folgender Zusammenhang für die Frequenz ν_0 :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.14)$$

Durch einen Impuls kann die Magnetisierung des Spinsystems ausgelenkt werden. Anschließend springt das Spinsystem wieder in den Gleichgewichtszustand zurück. Dieser Vorgang wird als Relaxation bezeichnet. Die Dauer von Auslenkung bis zur ursprünglichen Magnetisierung wird als longitudinale Relaxationszeit T_1 , und die Abnahmedauer der Quermagnetisierung als transversale Relaxationszeit T_2 bezeichnet. Diese Relaxationszeiten sind charakteristisch für die sich im Magnetfeld befindende Kernart. [110, 111]

Die Resonanzfrequenz eines Atomkerns ν_{Substanz} hängt von seinem lokalen Magnetfeld ab. Die Elektronenhülle wirkt abschirmend, was die Resonanzfrequenz verschiebt. Diese Verschiebung der Spektrallinie wird chemische Verschiebung δ genannt. Der Nullpunkt dieser Spektrallinie wird durch die Resonanzfrequenz ν_{Standard} eines Standards kalibriert, wofür in vielen Fällen Tetramethylsilan (TMS) gewählt wird.

$$\delta = 10^6 \cdot \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Standard}}}{\nu_{\text{Standard}}} \quad (2.15)$$

In Abbildung 23 ist ein schematischer Aufbau eines NMR-Spektrometers dargestellt. Die zu analysierende Probe wird in einem Probenröhrchen in den Probenraum eingesetzt, in welchem ein Magnetfeld angelegt ist. Ausgestattet mit Hochfrequenzsender und -empfänger können die Resonanzsignale der Probe registriert und nach Verstärkung an einen PC weitergeleitet sowie als Spektrum dargestellt werden.

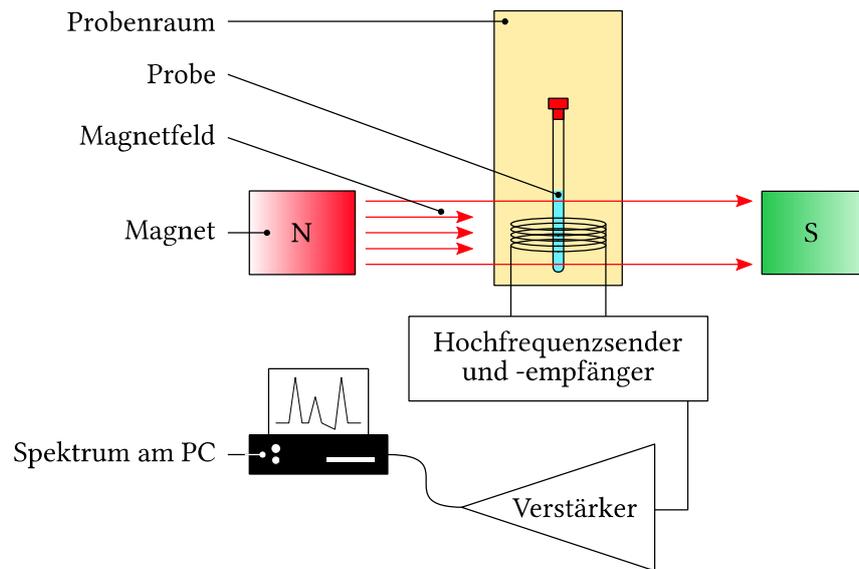


Abbildung 23: Schematischer Aufbau eines NMR-Spektrometers, in Anlehnung an [109].

2.8.2 pH-Messung

Zellen reichern abhängig von ihrer Wachstumsphase unterschiedliche Stoffe wie z. B. Lactat oder Kohlenstoffdioxid an, wodurch sich der pH-Wert sowohl inner- als auch außerhalb der Zellen ändern kann. Diese Änderung im pH-Wert gibt damit indirekt Aufschluss darüber, in welcher Phase sich die zu kultivierenden Zellen befinden. [107]

Aufgrund dessen ist die Messung des pH-Wertes bei jedem biologischen Prozess sehr wichtig, da jeder Organismus bei einem individuellen pH-Wert sein Optimum an Wachstum und Produktion besitzt [106]. Definiert wird der pH-Wert entweder über die Aktivität a der Wasserstoffionen (H^+) in Gleichung (2.16) oder in verdünnten Lösungen auch über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung (2.17).

$$pH = -\log_{10} a(H^+) \quad (2.16)$$

$$pH = pK_s + \log_{10} \frac{c(A^-)}{c(HA)} \quad (2.17)$$

Dabei ist K_s die Säurekonstante, $c(A^-)$ die Konzentration der korrespondierenden Base A^- und $c(HA)$ die Konzentration der Säure HA . [108]

Die Messung des pH-Werts kann entweder elektrochemisch oder optisch erfolgen [112]. Elektrochemisch geschieht dies direkt über die H_3O^+ -Aktivität der wässrigen Lösung. Dabei treten H_3O^+ -Moleküle mit der Sensorschicht durch eine Redoxreaktion in Wechselwirkung, wodurch es konzentrationsabhängig zu einer Spannungsänderung oder einem Stromfluss kommt [113].

Bei einer optischen Messung ist ein pH-Indikator notwendig, mit dem H^+ -Ionen reversibel reagieren. Der Indikator kann in einer festen Matrix immobilisiert sein, die für Protonen permeabel ist.

Als Indikatormolekül können abhängig von der Anwendung und dem zu messenden pH-Bereich verschiedene Stoffe in Frage kommen. Als Beispiele für Indikatoren seien an dieser Stelle Fluorescein oder 8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure (HPTS) genannt. [107, 112, 114] Diese Stoffe müssen wie in Abbildung 24 gezeigt auf eine pH-Wert-Änderung entweder über Farbumschlag oder Fluoreszenz reagieren. Bei der Fluoreszenz ist überdies eine deutliche Stokes-Verschiebung zwischen Absorption und Emission notwendig. [112, 114]

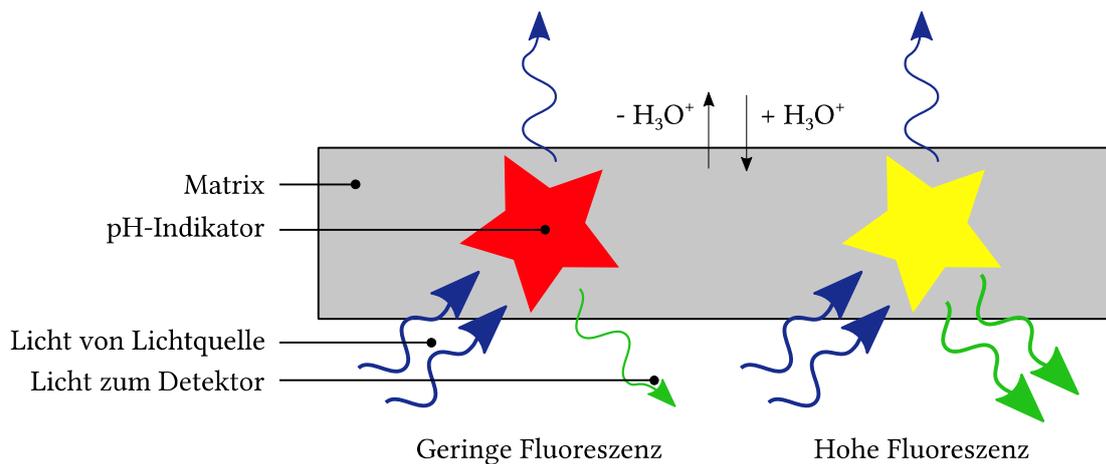


Abbildung 24: Funktionsweise der optischen pH-Messung durch Fluoreszenz in Anlehnung an [112].

Die meisten dieser pH-Indikatoren werden aber auch durch andere gelöste Ionen beeinflusst. Dieser Einfluss kann entweder durch entsprechende Kalibrierung ausgeglichen werden oder eine Einschränkung des Messbereichs bedeuten, weshalb die meisten pH-Indikatoren von vornherein nur einen bestimmten pH-Bereich abdecken [112, 114]. Um die Lebensdauer der Sensoren zu erhöhen und Schwankungen der Lichtintensität ausgleichen zu können, werden in neueren Sensoren neben dem pH-Indikator weitere Lumineszenzstoffe als Referenz integriert [112].

2.8.3 Leckagetests

Für die zuverlässige Funktion eines mikrofluidischen Chips ist die Dichtheit des Systems unerlässlich. Sowohl das Austreten von Flüssigkeit als auch das Eindringen von Stoffen aus der Umgebung sollte verhindert werden. Durch Leckagetests können undichte Stellen der Schweißnaht der MBR lokalisiert und gleichzeitig der Maximaldruck gemessen werden, dem die Schweißnaht widersteht. Hierfür wird ein MBR über einen Druckminderer an die Stickstoffleitung angeschlossen und in ein mit deionisiertem Wasser (DI-Wasser) gefülltes Becherglas getaucht. Der Druck p wird stufenweise bis zum Maximaldruck der internen Stickstoffleitung von 3,75 bar erhöht. Hierfür wurde Stickstoffgas anstelle einer Farblösung auf Wasserbasis verwendet, da sich durch die um ein Vielfaches niedrigere Viskosität des Stickstoffes Leckagen schneller und besser sichtbar in Form von Blasenbildung bemerkbar machen.

Der Druckverlauf wird kontinuierlich mithilfe eines Drucksensors Modell A-10 (WIKA, Deutschland) ausgelesen. Durch den I/O-Anschlussblock NI SCB-68 (National Instruments, USA) wurde das elektrische Signal des Drucksensors in ein digitales Signal gewandelt. Am Computer wird dieser digitale Druckverlauf mittels LabVIEW (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench) (National Instruments, USA) aufgezeichnet. Der schematische Aufbau des in LabVIEW geschriebenen Programmes ist in Abbildung 89 in Anhang F abgebildet. Die Messgenauigkeit der Drucksensoren liegt bei $\leq \pm 0,5\%$ der Messspanne und gemessen wird der Relativdruck. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 25 dargestellt und wird in Anlehnung an Perozziello et al. durchgeführt [95, 115].

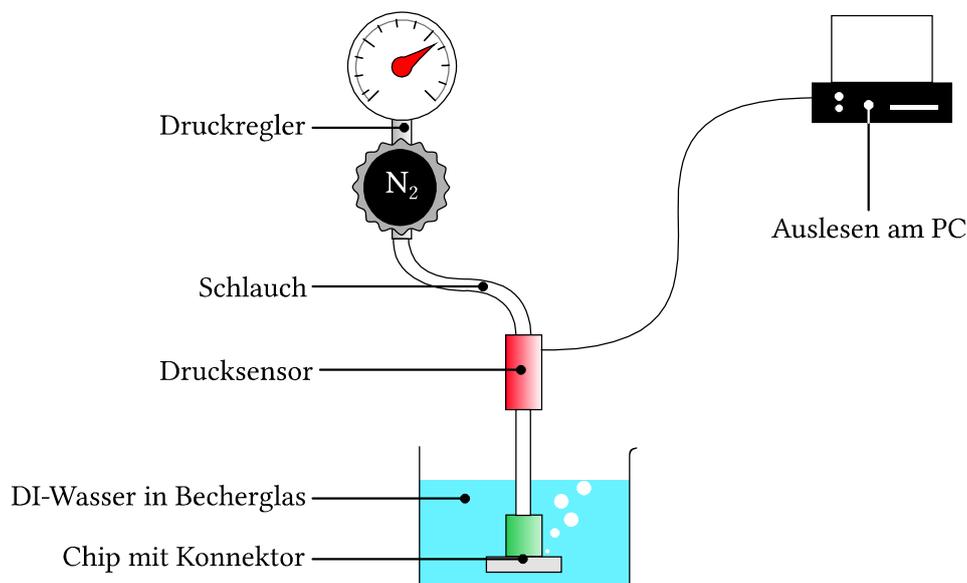


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Messung der Dichtheit der Schweißnaht bzw. des Maximaldrucks, dem der MBR widersteht, in Anlehnung an Perozziello et al. [95].

2.8.4 Kennlinie Flussrate-Druck

Neben den Dichtheitsmessungen wird die Kennlinie des Drucks p über die Flussrate \dot{F} für jeden MBR aufgenommen, indem der mit steigender Flussrate korrelierende Druckanstieg gemessen wird. Damit kann die Auslegung eines solchen Systems getestet werden, um Defekte zu vermeiden.

Dabei wird eine beliebige Anzahl an MBR in Reihen- oder Parallelschaltung an eine Spritzenpumpe PHD ULTRA™ (Harvard Apparatus, USA) mit einer mit DI-Wasser gefüllten 10 ml-Spritze angeschlossen. Die Spritzenpumpe sorgt für eine definierte Flussrate \dot{F} durch das gesamte System bis zum Freistrahlfeld am Auslass. Die jeweilige Flussrate \dot{F} wird für eine Dauer von ca. 10 s betrieben, da sich schlagartig ein konstanter Druck aufbaut. Der Druck p wird vor dem Einlass zum MBR wie bei den Leckagetests in Kapitel 2.8.3 mittels Drucksensor gemessen und am Computer mit LabVIEW aufgezeichnet. In Abbildung 26 ist der schematische Versuchsaufbau dargestellt.

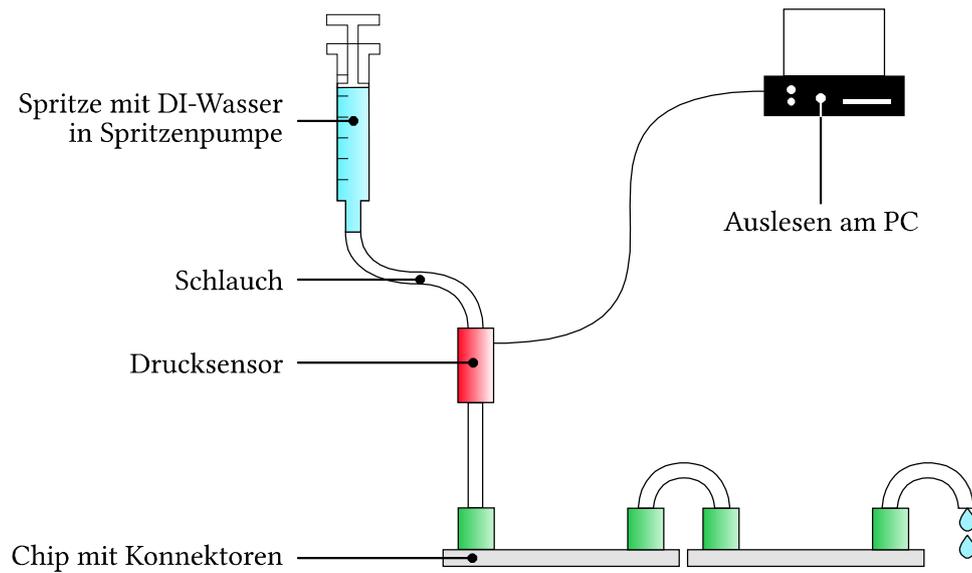


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Messung der Kennlinie Druck-Flussrate durch einen oder mehrere MBR.

3 Anforderungen, Zielsetzung und Konzeption

Dieses Kapitel definiert die Anforderungen, die an die MBR sowohl aus technischer als auch aus biologischer Sicht gestellt werden. Die Anforderungen werden in den Unterkapiteln als praktische Zielsetzung formuliert und daraus die konkrete Konzeption abgeleitet.

Generell sind möglichst alle der folgenden Aspekte für ein mikrofluidisches System umzusetzen:

- Biokompatibilität,
- Anwenderfreundlichkeit,
- Dichtheit,
- Gängiger Anschlusstyp bei der mikrofluidischen Kontaktierung,
- Stabilität,
- Geringer Fertigungsaufwand,
- Transparenz,
- Sterilisierbarkeit.

Unter Beachtung dieser Aspekte wurden konkrete Anforderungen an die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten MBR definiert, welche umgesetzt werden sollen. Diese Anforderungen sind im Folgenden aufgelistet und werden in den nächsten Kapiteln ausführlich konkretisiert:

- Flexible und modulare Koppelung für Parallelisierung und Modularisierung,
- Optische Transparenz für die Beobachtung der Pflanzenzellen unter dem Mikroskop,
- Optimierung der Membran für
 - eine ausreichende Versorgung der Pflanzenzellen mit Nährstoffen und den Transport der Sekundärmetaboliten,
 - eine reduzierte Faltenbildung bei der Fertigung des MBR,
- Materialien sollen eine dichte und inerte Herstellung für einen sterilen Betrieb des MBR erlauben,
- Gewährleistung der Sterilisierbarkeit und der sterilen Entnahme der Pflanzenzellen,
- Optimierung der Herstellung hinsichtlich größerer Stückzahlen,
- Durchführung einer Kostenanalyse (vgl. Kapitel 7).

3.1 Ausgangslage

Die Ausgangslage für die Optimierung und Weiterentwicklung bildet der in Kapitel 2.3.2 vorgestellte 200 μ l-MBR. Primär sollte dieser direkt modifiziert und optimiert werden, um die daraus gewonnenen Erkenntnisse in ein neues Gesamtkonzept zu überführen.

Zum direkten Modifizieren des 200 μ l-MBR kann Mikrofräsen eingesetzt werden. Überdies können von Grund auf neue Prototypen durch dieselbe Methode gefertigt werden. Neben den fluidischen Strukturen der Zell- und Versorgungskammer können dadurch auf das Design abgestimmte ERG- und Drainagestrukturen getestet sowie ermittelt werden. Unter diesem Aspekt soll die faltenreduzierte Integration der Membran und der fluidischen Anschlüsse berücksichtigt werden.

3.2 Materialauswahl

Aufgrund der Anforderungen und der in Kapitel 2.3-2.6 definierten Herstellungsverfahren wird zum einen nach wie vor das thermoplastische Polymer PC als Werkstoff verwendet. Daneben soll PET als Alternative eingesetzt und evaluiert werden. Beide Werkstoffe erfüllen die Anforderungen der Biokompatibilität, der Transparenz und der Sterilisierbarkeit (vgl. Kapitel 2.4). Zudem sind beide Polymere für das Heißprägen und das Ultraschallschweißen geeignet. Alle in der Arbeit verwendeten Halbzeuge, Membranen und fluidischen Anschlüsse aus diesen Materialien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Als Halbzeuge für das Heißprägen der Chipteile werden PC in Form von 2 mm und 3 mm dicken Platten und PET-G in Form von 0,6 mm dicker Thermoformfolie vorgesehen.

Zum Fügen mit Ultraschallschweißen müssen Membranen und Anschlüsse auf das Material der Chiphälften abgestimmt werden und deshalb möglichst aus denselben Materialien bestehen. Unter diesem Aspekt werden sowohl PC- als auch PET-Membranen getestet. Diese Membranen haben mit 0,4 µm bei der PC-Membran und 5,0 µm bei der PET-Membran zum einen eine unterschiedliche Porengröße. Zum anderen unterscheiden sich beide Membranen in ihrer Transparenz.

Als Anschlüsse, welche in Kapitel 3.6 näher vorgestellt werden, wurden zum einen kommerziell erhältliche Komponenten aus PC untersucht. Vergleichbare Komponenten aus PET waren hingegen nicht verfügbar. Zum anderen sollen individuell gestaltete Anschlüsse durch 3D-Druck aus PC- und PET-Filamenten gefertigt und integriert werden.

Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit zur Herstellung der MBR getesteten und verwendeten Materialien.

| | | PC | PET |
|------------------------------|--------------------|--|---|
| <i>Chipteile</i> | <i>Bezeichnung</i> | Makrolon® GP clear 099 [116] | MEDPETG 6763 Medical Standard [117] |
| | <i>Hersteller</i> | Covestro AG, Deutschland | MEDIPACK AG, Schweiz |
| <i>Membran</i> | <i>Bezeichnung</i> | Isopore™ Membrane Filter HTPP, Porendurchmesser 0,4 µm [118] | PET5020030 Membrane Filter, Porendurchmesser 5,0 µm [119] |
| | <i>Hersteller</i> | Merck KGaA, Deutschland | Sterlitech Corporation, USA |
| <i>Anschlüsse</i> | <i>Bezeichnung</i> | N210-9 [120] und FTLLP-9002 [121] | - |
| | <i>Hersteller</i> | Value Plastics dba Nordson MEDICAL, USA | - |
| <i>Filament 3D-Druck</i> | <i>Bezeichnung</i> | PC-Plus™ [122] | EPR InnoPET Natural [123] |
| | <i>Hersteller</i> | Polymaker, China | Innofil3D BV, Niederlande |

3.3 Optimierung eines bestehenden Formeinsatzes

Um eine Entformung der Teile mittels Chromplatte zu ermöglichen und dadurch den zusätzlichen Polierschritt (vgl. Kapitel 2.3.2) einsparen zu können, sollen in alle folgenden Formeinsätze Entformschrägen integriert werden. Für eine genauere Ausrichtung der Chiphälften zueinander sowie eine Vorfixierung der Membran beim Ultraschallschweißen werden Passtifte und Passungen vorgesehen. Weiterhin muss der Formeinsatz mit seiner Höhe zusammen mit der Chromplatte als Substratplatte in alle am IMT vorhandenen WUM eingebaut werden können.

Die Formeinsätze werden durch Mikrofräsen hergestellt, da das Design mehrere Ebenen, z. T. auch großflächige Ebenen sowie 3D-Formen besitzen wird. Zudem können beim Mikrofräsen im Gegensatz zur Fertigung durch Lithographie mit konischen Fräsworkzeugen einfach Entformschrägen integriert werden. Als Material soll weiterhin Messing verwendet werden, da dies eine hohe Steifigkeit und eine gute Wärmeleitung besitzt. [67] Eine geeignete Messing-Legierung in diesem Zusammenhang stellt $\text{CuZn}_{40}\text{Pb}_2$ dar [124], was von Rajabi bereits 2014 zum Heißprägen mikrofluidischer Bauteile erprobt wurde [125].

3.4 Maßnahmen zur Reduzierung der Faltenbildung der Membran

Beim Integrieren der Membran in den 200 μl -MBR durch Ultraschallschweißen kam es bei vorangehenden Designs und den dabei verwendeten Schweißparametern zu starken Verspannungen mit Faltenbildung, teilweise sogar zur Beschädigung der Membran (s. Kapitel 2.6.1.3). Eine zu starke Faltenbildung verhindert eine homogene Verteilung der Pflanzenzellen über die gesamte Membranfläche. Eine Beschädigung der Membran kann zum Austritt der Zellen in die Versorgungskammer führen, in der sie ausgespült werden. Beide Mängel müssen folglich minimiert werden.

Selbst die in Abbildung 27 a-b gezeigte, sogenannte Niederdruckstruktur, welche die Membran während des Integrierens durch Ultraschallschweißen spannen und fixieren sollte, zeigte keinen Effekt. Darüber hinaus konnte bei einer faltigen Membran ein Totvolumen zwischen der Niederdruckstruktur und der Zellkammer entstehen. In dieses wuchsen die Pflanzenzellen während Experimenten ein (vgl. Abbildung 27 d-e) und konnten anschließend nicht wieder entfernt werden [126].

Aufgrund dessen soll die Membran in einem ersten Schritt separat mit einer strukturierten Sonotrode auf die Chiphälften mit Zellkammer aufgeschweißt werden, bevor die beiden Chiphälften der MBR verschweißt werden. Dabei können zum einen die Schweißparameter gezielt an diesen Schritt angepasst werden, zum anderen kann eine speziell dafür geeignete Sonotrode verwendet werden.

Wie in Kapitel 2.6.1.3 beschrieben, können Polymerfolien bzw. Membranen mit abnehmender Dicke schwieriger ultraschallgeschweißt werden. Als Untergrenze nennt Potente 50 μm [61] und Rotheiser 13 μm [75]. Die in Kapitel 3.2 aufgeführte 10 μm dicke PC-Membran und die 19 μm PET-Membran fallen somit beide in einen kritischen Bereich. Deshalb soll eine Strategie entwickelt werden, mit der diese Limitierung umgangen werden kann.

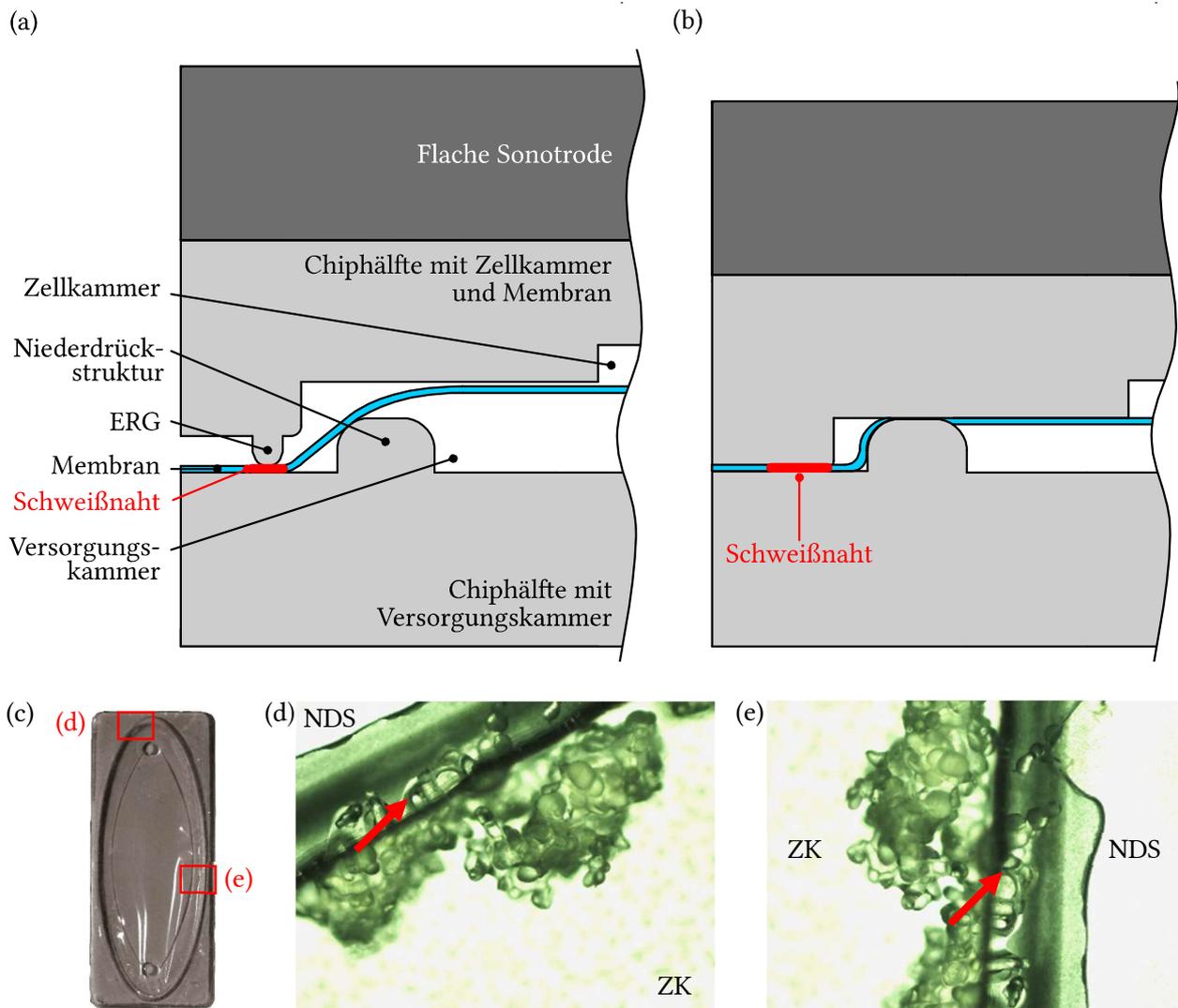


Abbildung 27: (a-b) Querschnitt des 200 µl-MBR vor dem Ultraschallschweißen, eine Niederdruckstruktur dient zum Spannen der Membran während dem Ultraschallschweißen, die entstehende Schweißnaht ist rot markiert, (c) Übersicht des 200 µl-MBR, (d-e) eingewachsene Pflanzenzellen im Restspalt zwischen den Chiphälften des 200 µl-MBR [126], rote Pfeile kennzeichnen eingewachsene Pflanzenzellen an verschiedenen Stellen des MBR zwischen Niederdruckstruktur (NDS) und Zellkammer (ZK), mit freundlicher Genehmigung von Phyton Biotech GmbH, © Phyton Biotech GmbH, 2016.

3.5 Gestaltung der Strukturen für das Ultraschallschweißen

Damit die Bestandteile der neuen MBR wie bisher durch Ultraschallschweißen gefügt werden können, bedarf es mehrerer Komponenten. Im ersten Schritt muss die Membran durch eine strukturierte Sonotrode auf die Chiphälfte mit der Zellkammer aufgebracht werden. Im zweiten Schritt werden die Chiphälften unter Verwendung von ERG gefügt.

3.5.1 Strukturen auf der Sonotrode

Die Sonotrode wurde mit einer Struktur versehen, welche analog zu einem ERG funktioniert und um die Membran mit umlaufender Schweißnaht auf die Chiphälfte mit der Zellkammer ultraschallschweißen zu können. Die daraus resultierende Struktur ist 800 μm hoch und deren ebenes Plateau 300 μm breit. Dabei sind alle Kanten verrundet, um die Membran nicht zu beschädigen bzw. zu stanzen. Diese daraus resultierende Struktur ist in Abbildung 28 im Querschnitt schematisch dargestellt. Die Position dieser Struktur wird so gewählt, dass die entstehende Schweißnaht (Schweißnaht 1) zwischen der Membran und der Chiphälfte mit Zellkammer möglichst direkt an der Seitenwand der Zellkammer gesetzt wird. Dadurch wird Totvolumen minimiert und das Einwachsen von Zellen unterbunden.

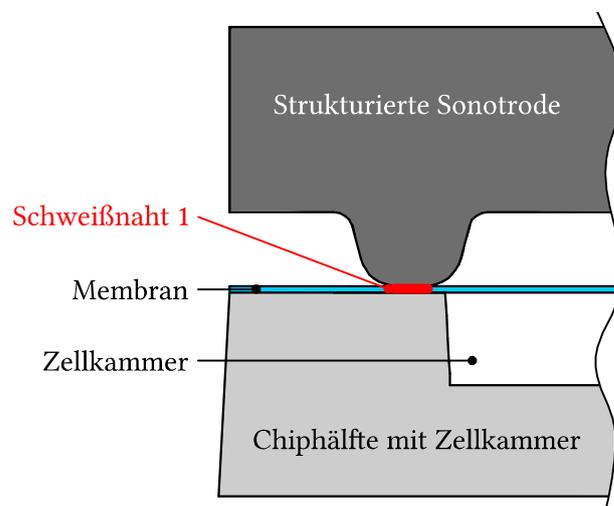


Abbildung 28: Querschnitt der strukturierten Sonotrode und der Chiphälfte mit Zellkammer beim Ultraschallschweißen der Membran. Die dabei entstehende Schweißnaht 1 ist rot gekennzeichnet.

3.5.2 Energierichtungsgeber

Das Querschnittprofil des ERG wurde in Anlehnung an das vorangehende Design beim 200 μl -MBR entworfen. Der ERG umgibt die fluidischen Strukturen auf der Versorgungskammerseite, um diese beim Ultraschallschweißen abzudichten, mit den mikrofluidischen Anschlüssen zu verbinden und gleichzeitig die Chiphälften miteinander zu fügen.

Der ERG besitzt eine Breite und eine Höhe von jeweils 400 μm . An seiner Spitze ist der ERG mit einem Radius von 200 μm verrundet, um die Perforation und die Rissbildung an der Membran beim Ultraschallschweißen zu minimieren. Weiterhin ist der ERG auf beiden Seiten von 300 μm breiten Drainagen mit einer Tiefe von 200 μm umgeben. Dadurch fassen die Drainagen das Volumen des ERG und beide Chiphälften können ohne einen durch überschüssige Schmelze verursachten Restspalt ultraschallgeschweißt werden. Die Position des ERG und der Drainagen wird so gewählt, dass die Schweißnaht 1 (vgl. Abbildung 28) einerseits überlappt wird. Andererseits soll der größere Teil der dabei entstehenden Schweißnaht (Schweißnaht 2) außerhalb platziert werden, um die

Spannung auf die Membran so gering wie möglich zu halten. Abbildung 29 a zeigt den ERG und die Drainagen schematisch im Querschnitt in der Position vor dem Ultraschallschweißen. Abbildung 29 b demonstriert den Querschnitt nach dem Ultraschallschweißen mit beiden nebeneinander gesetzten Schweißnähten.

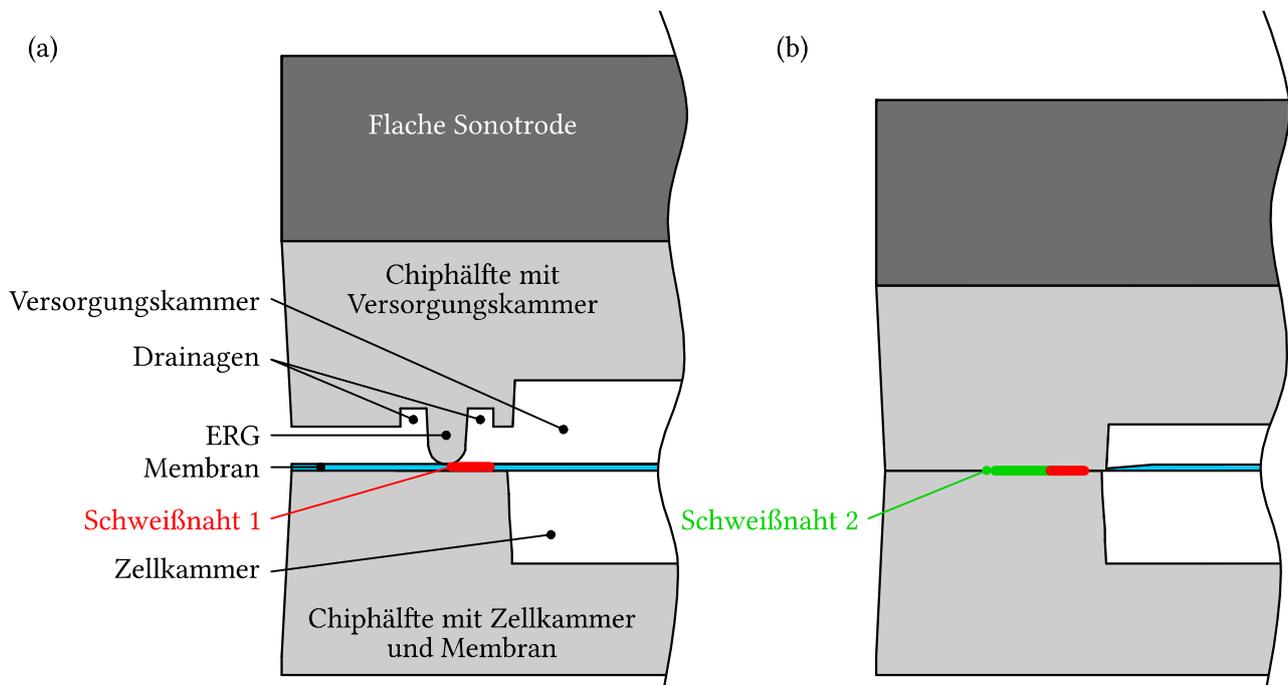


Abbildung 29: Querschnitte der zu verbindenden Komponenten (a) vor und (b) nach dem Ultraschallschweißen. Die Schweißnaht 1 aus dem ersten Schritt ist rot und die Schweißnaht 2 aus dem zweiten Schritt grün gekennzeichnet.

3.6 (Mikro-)Fluidische Kontaktierung

Wie auch die Chiphälften der MBR soll die mikrofluidische Kontaktierung biokompatibel, dicht und anwenderfreundlich sein. Darüber hinaus soll die Höhe der neuen MBR durch die mikrofluidische Kontaktierung flach gehalten werden, um dieses System unter einem Mikroskop auf dem Objektisch mit verschiedenen Objektiven beobachten zu können. Daraus folgt, dass auf die mikrofluidische Kontaktierung durch einen Presssitz von Dosiernadeln aus Edelstahl gänzlich verzichtet werden muss, da hierbei sonst der Objektisch des Mikroskops modifiziert werden müsste. Überdies können sich die Dosiernadeln durch eine Bewegung der Schläuche lösen. Dadurch sind Dichtheit und Anwenderfreundlichkeit nicht sicher gegeben. [127] Aufgrund dessen wurden andere (mikro-)fluidische Kontaktierungsmöglichkeiten bzw. Konnektortypen in Betracht gezogen.

Zum einen sollen kommerziell erhältliche Konnektoren per Ultraschallschweißen in die MBR integriert werden. Dazu werden Dosiernadeln aus Edelstahl mit Luer-Lock-Anschluss (Nordson EFD, USA) wie in Abbildung 30 a mit verschiedenen ID von 1,36 mm und 0,51 mm mit den MBR in-plane

verbunden. Analog dazu werden Schlauchanschlüsse aus Kunststoff (Value Plastics dba Nordson MEDICAL, USA) mit einem ID von 1,6 mm wie in Abbildung 30 b gezeigt integriert. Diese weisen zwei radiale Stege auf, welche als ERG für das Ultraschallschweißen dienen. Out-of-plane werden Konnektoren mit Luer-Lock-Anschluss (Cole-Parmer GmbH, Deutschland) wie in Abbildung 30 c gezeigt und in Koschitzky 2018 ausführlich beschrieben mit Ultraschall aufgeschweißt [128]. Der dazu benötigte ERG wurde zuvor um den Chipeinlass ultraschallgeprägt.

Zum anderen sollen Konnektoren aus PC und PET (vgl. Tabelle 1, Kapitel 3.2) durch 3D-Druck erzeugt werden, die ebenfalls out-of-plane mit Ultraschall aufgeschweißt werden können und entweder einen Luer-Lock-Anschluss oder einen Schlauchanschluss besitzen, wie es in Abbildung 30 d1-d3 gezeigt ist. Durch den 3D-Druck sind individuelle Formen sowie Anschlussarten als Prototypen herstellbar, welche später durch Spritzguss in Serie gefertigt werden könnten.

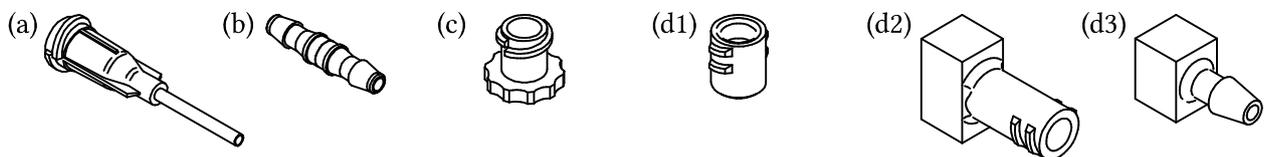
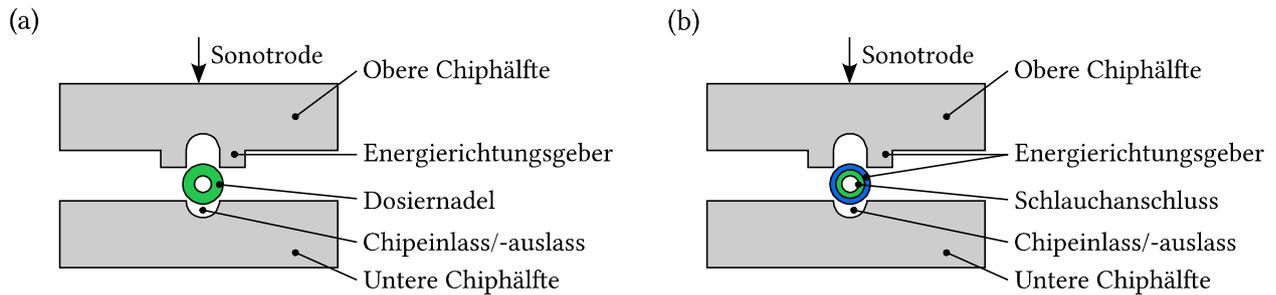


Abbildung 30: Schematische Darstellung der verschiedenen Konnektortypen. (a) Dosiernadel aus Edelstahl, (b) Schlauchanschluss mit zwei radialen Stegstrukturen, (c) Luer-Lock-Anschluss zum Ultraschallschweißen auf einen durch Ultraschallprägen des Chipeinlasses generierten ERG, (d1-d3) verschiedene durch 3D-Druck erzeugte Konnektoren mit Luer-Lock- oder Schlauchanschluss.

Beim Integrieren aller genannten Konnektortypen sind verschiedene Entwürfe der Fügeebene sowie individuelle Fügeprozesse notwendig, welche ausführlich in Finkbeiner et al. 2019 beschrieben sind [115]. Abbildung 31 zeigt eine Übersicht aller Ausgangspositionen dieser Konnektortypen im Querschnitt vor dem Ultraschallschweißen. Bei der Integration in-plane müssen die ERG am Chip angebracht werden, bei der Integration out-of-plane hingegen sind auch ERG am jeweiligen Konnektor möglich.

Integration in-plane



Integration out-of-plane

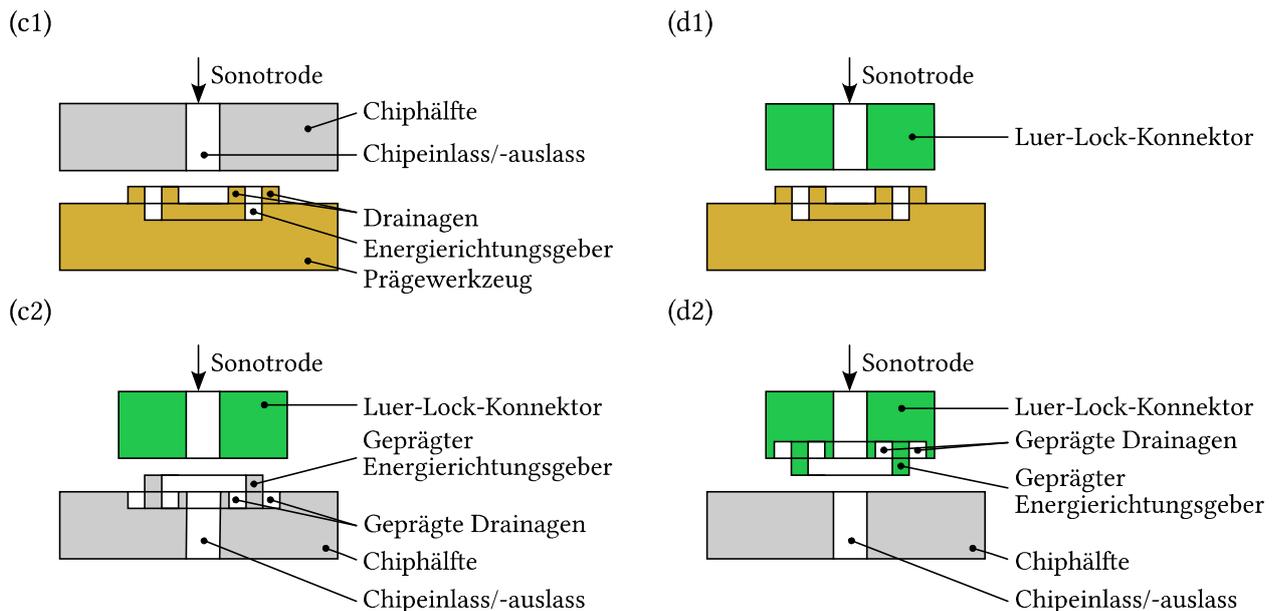


Abbildung 31: Schematische Querschnitte aller Ausgangspositionen, bei denen die verschiedenen Konnektortypen in- oder out-of-plane integriert werden können. (a) Dosiernadel aus Edelstahl, (b) Schlauchanschlüsse, (c1) Ultraschallprägen eines ERG auf den Chip einlass, (c2) Ultraschallschweißen eines Luer-Lock-Anschlusses auf ultraschallgeprägten ERG, (d1-d2) Ultraschallprägen von Konnektoren, damit diese anschließend durch Ultraschallschweißen auf einen Chip einlass angebracht werden können, (d2) durch 3D-Druck erzeugte Konnektoren mit Luer-Lock- oder Schlauchanschluss sowie analogen ERG- und Drainagestrukturen zum direkten Ultraschallschweißen auf einen Chip einlass.

3.7 Reversibler Verschluss der Zellkammer

Die Pflanzenzellen werden vor Versuchsbeginn durch die Öffnungen der Chiphälfte mit Zellkammer pipettiert. Da die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Pflanzenzellen in Form von Zellaggregaten vorkommen, wurde dazu die Pipettenspitzen am Ende abgeschnitten, um deren Öffnung zu erweitern [129]. Aus demselben Grund muss die Öffnung ausreichend groß dimensioniert werden, um die Überführung für die Zellen langsam und ohne große Scherung zu gestalten. Anschließend sollen diese Öffnungen für die Dauer des Versuchs fluidisch dicht verschlossen werden. Überdies dürfen keine fremden Organismen in das System eindringen und der sterile Zustand muss nicht nur vor (vgl. Kapitel 2.7), sondern auch während der Kultivierung gewährleistet sein.

Einerseits soll der Verschluss mit Stöpseln aus PDMS getestet werden. Andererseits soll ein Schraubverschluss mit integriertem Dichtungsring erprobt werden, wobei die Öffnungen der Zellkammer mit Gewinden versehen werden [130, 131]. Wie auch bei der fluidischen Kontaktierung soll der Verschluss die Bauteilhöhe nur insofern vergrößern, dass eine Untersuchung unter Mikroskopen mit Fokusebene im jeweiligen MBR weiterhin ohne Kollision mit den Objektiven möglich ist.

3.8 Mikrofluidischer Bioreaktor mit 100 μl Kammervolumen für das Vorscreening

Bei ersten biologischen Versuchen mit dem 200 μl -MBR wurde festgestellt, dass die Zellkammer im Vergleich zur initialen Zellzahl sehr groß ist und die Zellen nur mühsam unter dem Mikroskop detektiert werden konnten [126]. Aufgrund dessen wurde dieser neue MBR mit einer kleineren, weiterhin elliptischen Zellkammer konstruiert. Aus den Anforderungen aus den Kapiteln 3.1-3.7 ergab sich das Konzept für den Formeinsatz dieses MBR mit 100 μl Zellkammervolumen in Abbildung 32. Sowohl die Chiphälfte mit Zellkammer als auch die Chiphälfte mit Versorgungskammer weisen eine Höhe von 1,8 mm und eine Kammertiefe von 0,5 mm auf. Daraus ergibt sich nach dem Ultraschallschweißen eine Gesamthöhe von 3,6 mm für den 100 μl -MBR. Die Formnester wurden mit möglichst gleichem Gesamtvolumen versehen, um eine gleichmäßige Befüllung mit Polymer beim Heißprägen zu fördern. Das Volumen der Chiphälfte mit Zellkammer beträgt 1 643 mm^3 und das der Chiphälfte mit Versorgungskammer 1 654 mm^3 .

Weiterhin wurde auf beiden Chiphälften jeweils die Hälfte eines fluidischen Kanals integriert, welcher beim Fügen der Chiphälften einen ganzen Kanal ergibt. Nur auf der Chiphälfte mit Versorgungskammer geht dieser fluidische Kanal über eine 90°-Kurve mit Freiformfläche in die Versorgungskammer über. Auf der Chiphälfte mit Zellkammer verschwindet der fluidische Kanal an der 90°-Kurve mit Freiformfläche. Die fluidische Kontaktierung war in-plane vorgesehen, da diese Variante als anwenderfreundlicher beurteilt wurde [126]. Beide fluidischen Kanäle führen auf dieselbe lange Seite des 100 μl -MBR, um eine stabile Auflage des Chips bei Betrieb mit angeschlossenen Schläuchen zu gewährleisten [132].

Für die spätere Ausrichtung der beiden Chiphälften beim Ultraschallschweißen wurden Passstifte auf der einen Chiphälfte und entsprechende Bohrungen auf der anderen Chiphälfte angebracht. Gleichzeitig dienen diese Passstifte als Vorfixierung der Membran beim Ultraschallschweißen.

Die Einlässe der Zellkammer wurden auf 3 mm Durchmesser skaliert. Anhand dieser Einlässe sollte der reversible Verschluss durch Stöpsel aus PDMS getestet werden. Die entsprechenden technischen Zeichnungen dieser Formeinsätze sind in Abbildung 90-92 in Anhang F zu finden.

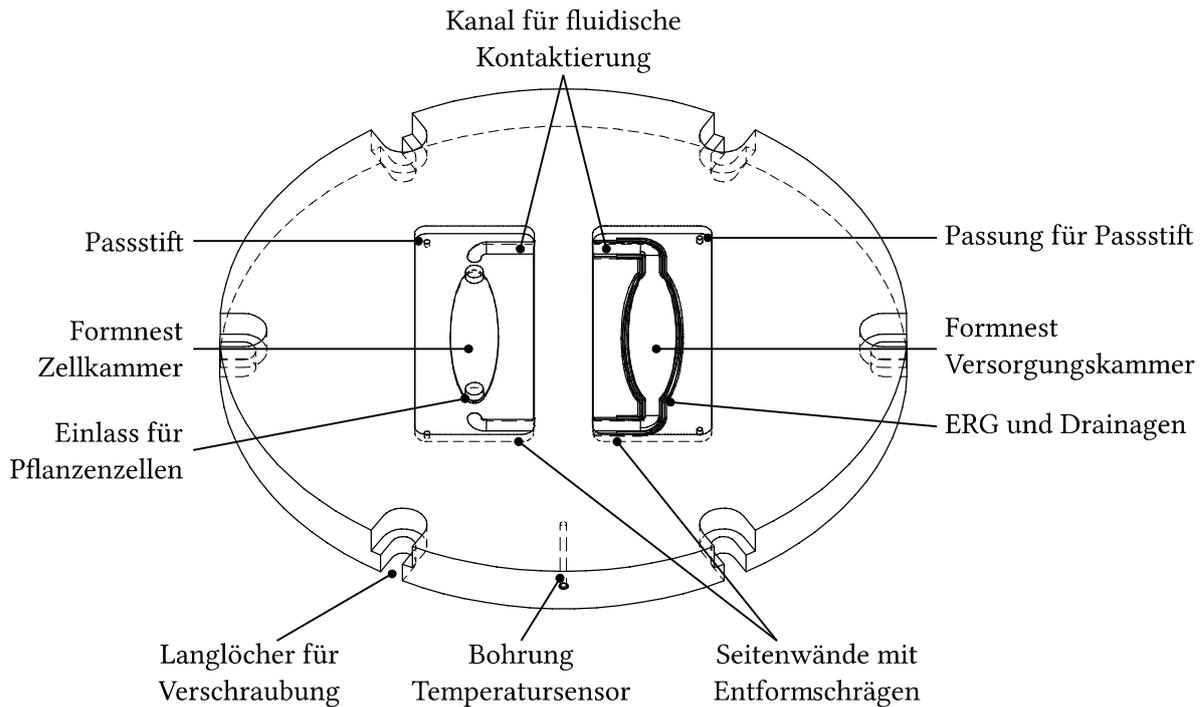


Abbildung 32: Schematische Darstellung des Formeinsatzes zum Heißprägen der Chiphälften des 100 µl-MBR.

3.9 Mikrofluidischer Bioreaktor mit 800 µl Kammervolumen zur Modularisierung

Für den Einsatz des MBR in einem modularen System wurde ein zu dem aus Kapitel 3.8 analoges Design entworfen. Hierbei standen eine hohe Zellzahl und eine damit verbundene höhere Produktausbeute im Vordergrund. Als Orientierung zur Dimensionierung der Zellkammer sollte das Füllvolumen eines Wells in einer Mikrotiterplatte von 800 µl für Vergleichsansätze dienen [133]. Aufgrund der größeren Formnester im Vergleich zum kleinen Formeinsatz 1 wurde die Gesamthöhe dieses Formeinsatzes für eine höhere Stabilität auf 12 mm erhöht. Herstellungs- und Verbindungsverfahren des 100 µl- und des 800 µl-MBR sind dieselben. Ein Formeinsatz für das Heißprägen der Gehäuseteile ist in Abbildung 33 zu sehen.

Im Gegensatz zum Formeinsatz für den 100 µl-MBR weist die Chiphälfte mit Zellkammer eine Höhe von 2,2 mm und eine Zellkammertiefe von 1,0 mm auf. Die Chiphälfte mit Versorgungskammer weist eine Höhe von 2,0 mm und eine Versorgungskammertiefe von 0,5 mm auf. Daraus ergibt sich eine Gesamthöhe von 4,2 mm für den 800 µl-MBR. Wie beim Formeinsatz für den 100 µl-MBR wurden auch hier die Formnester mit möglichst gleichem Gesamtvolumen versehen. Das Volumen der Chiphälfte mit Zellkammer beträgt 3240 mm³ und das der Chiphälfte mit Versorgungskammer 3307 mm³.

Die Einlässe für die Pflanzenzellen konnten hier aufgrund einer größeren Zellkammer noch größer als beim 100 µl-MBR dimensioniert werden. Der Durchmesser dieser Einlässe wurde auf 5 mm gesetzt, um dabei den Verschluss durch Verschraubung mit einer M6-Schraube zu erproben, für die ein entsprechendes Gewinde einzuschneiden ist.

Die entsprechenden technischen Zeichnungen dieser Formeinsätze sind in Abbildung 93-95 in Anhang F zu finden.

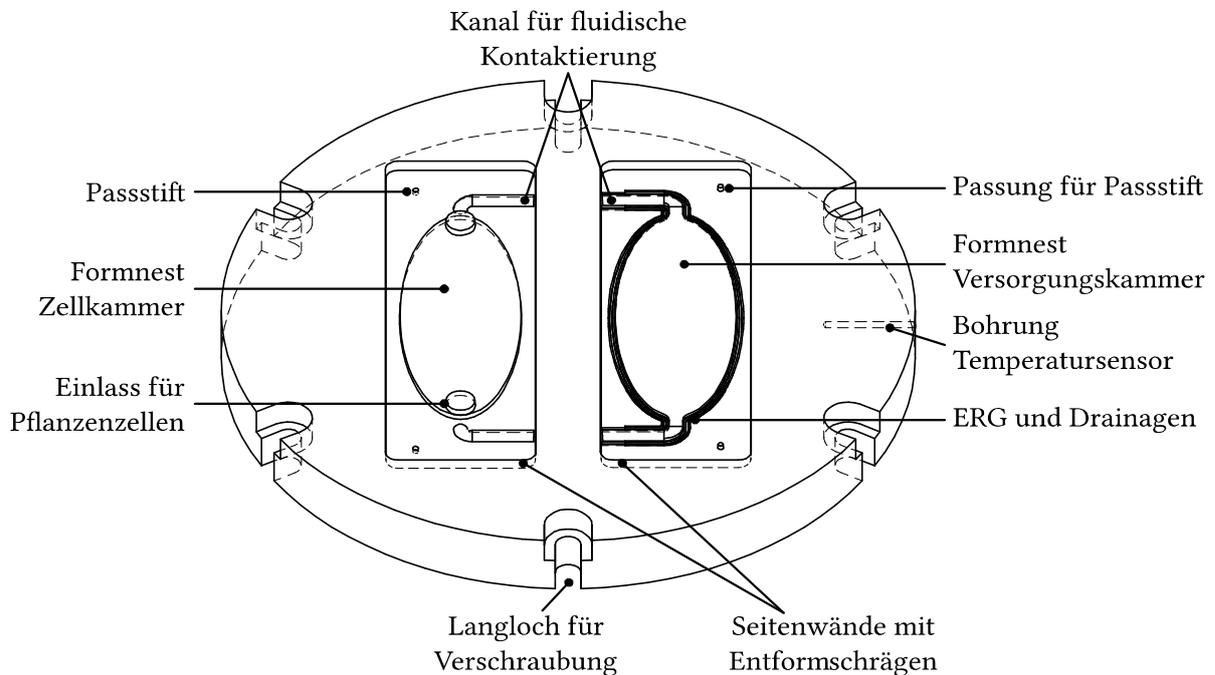


Abbildung 33: Schematische Darstellung des Formeinsatzes zum Heißprägen der Chiphälften des 800 µl-MBR.

3.10 Betriebsmodi

Beide Versionen des MBR bieten die Möglichkeit für unterschiedliche Betriebsmodi. Dabei kann die Art der Durchströmung variiert werden, um Einflüsse auf die Scherempfindlichkeit der Pflanzenzellen zu testen. Für eine Vergleichbarkeit untereinander sollte die Flussrate in allen Versuchen dieselbe sein. Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben dient die in Abbildung 34 a dargestellte Versorgungskammer allein dazu, mit der Nährlösung durchströmt zu werden. Dadurch kommen die Pflanzenzellen nicht in den direkten Kontakt mit der Hauptströmung und die Diffusion ist für den Stofftransport geschwindigkeitsbestimmend. Dieser Betriebsmodus wird als Diffusionsbetrieb bezeichnet.

Als alternativer Betriebsmodus sollten dennoch die direkte Anströmung durch einen Einlass der Zellkammer und die Ausströmung durch die Versorgungskammer getestet werden, wie es in Abbildung 34 b gezeigt ist. Dabei würden die Pflanzenzellen direkt mit der Strömung in Kontakt kommen, hingegen wäre ausschließlich die Strömung statt der Diffusion geschwindigkeitsbestimmend für den Stofftransport. Der umgekehrte Fall dieser Variante kann nicht getestet werden, da die Zellen hierbei ausgespült würden. Dieser Betriebsmodus wird als Durchströmungsbetrieb bezeichnet.

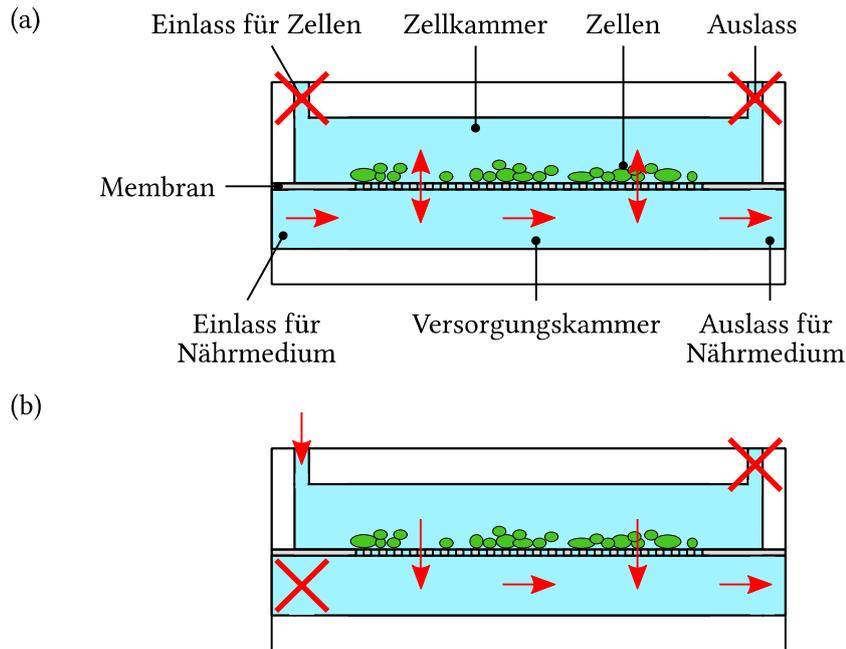


Abbildung 34: Unterschiedliche Betriebsmodi für die MBR. (a) Diffusionsbetrieb, (b) Durchströmungsbetrieb. Die Flussrichtung wird durch die roten Pfeile angezeigt und die verschlossenen Ein- und Auslässe von Zell- und Versorgungskammer durch rote Kreuze.

3.11 Strukturierung der Membran

Ein weiterer Aspekt bei der Zellanalyse ist die Fixierung der Pflanzenzellen während der Kultivierung [127]. Damit die Fixierung nur temporär ist, eignet sich hierfür eine Gitterstruktur auf der Membran, die Mikrowells darstellt. In Abbildung 35 wird schematisch gezeigt, wie die Pflanzenzellen durch eine solche Gitterstruktur während des gesamten Kultivierungszeitraums fixiert werden könnten. Um die Pflanzenzellen nicht in ihrem Wachstum und der Zellteilung zu hindern, müssen diese Gitterstrukturen ausreichend Platz bieten. Ziel der Fertigung ist neben der Umsetzung einer individuellen Gitterstruktur die uneingeschränkte Adhäsion dieser Schicht nach dem Ultraschallschweißen und dem Befüllen eines MBR mit Zellsuspension.

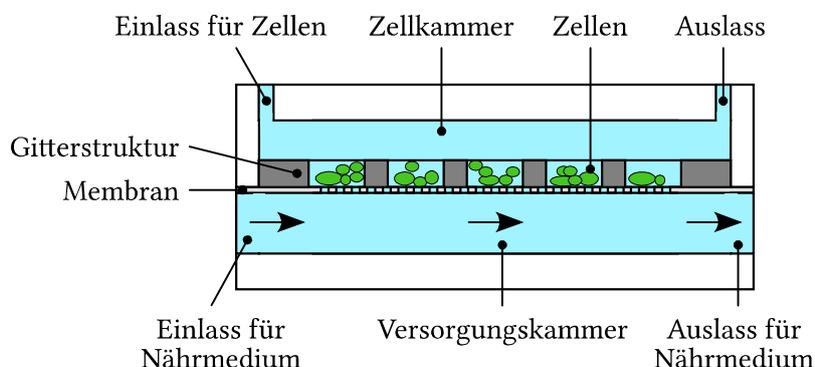


Abbildung 35: Gitterstruktur auf der Membran als Mikrowells für die Pflanzenzellen.

4 Fertigung und Charakterisierung der mikrofluidischen Bioreaktoren

Zu Beginn wurden verschiedene Ansätze getestet. Dabei diente der 200 μl -MBR als Ausgangspunkt. Der Teilschritt der fluidischen Kontaktierung wurde zunächst separat in Vorversuchen untersucht und anschließend bei dem 200 μl -MBR validiert. Im Anschluss daran wurden mit einem weiteren, mikrogefrästen Prototyp die konkreten Machbarkeitsnachweise durchgeführt.

Zum Heißprägen der beiden Chiphälften für den 100 μl - und den 800 μl -MBR wurden entsprechende Formeinsätze gefertigt und charakterisiert. Nach dem Abformen der Chipteile wurde die Membran in einem ersten Schritt durch Ultraschallschweißen integriert. In einem zweiten Schritt wurden die 100 μl - und 800 μl -MBR mit einer neuen fluidischen Kontaktierung versehen. Diese beiden Aspekte bestimmten maßgeblich das gesamte Design und die Vorgehensweise zur Herstellung dieser MBR. Am Ende dieses Kapitels werden die gefertigten MBR charakterisiert und miteinander verglichen. Zum Schluss wird der mit Ultraschallschweißen entwickelte Prozess mit dem Laserdurchstrahlschweißen verglichen und eine Möglichkeit zur Strukturierung der Membran vorgestellt.

4.1 Fluidische Kontaktierung

Bevor die fluidische Kontaktierung mit den verschiedenen Konnektortypen getestet werden konnte, wurde jeder Konnektortyp auf eine andere Art und Weise für das Ultraschallschweißen präpariert. Nach dem Ultraschallschweißen der Konnektoren wurden die Schweißnähte hinsichtlich ihrer Dichtheit durch Drucktests und die Untersuchung der Querschnitte der Schweißnähte analysiert [115].

4.1.1.1 Präparierung der verschiedenen Konnektortypen

Die Dosiernadeln wurden wie in Soergel 2017 beschrieben an der metallischen Spitze durch Sandstrahlen aufgeraut, um das Anhaften der Schmelze der ERG zu verbessern [134]. Die kommerziell erhältlichen Luer-Lock-Kappen wurden noch auf den ID des Luer-Lock-Lumens aufgebohrt. Der Chipeinlass wurde mit Ultraschall geprägt, wobei eine ERG- und Drainagestruktur aufgebracht wurde, die der der 100 μl - und 800 μl -MBR nur ohne Verrundung entspricht (vgl. Kapitel 3.5.2). Die Parameter zum Ultraschallprägen waren ein Prägeweg von 0,4 mm, eine Triggerkraft von 120 N, eine Schweißkraft von 450 N, eine Amplitude von 15,02 μm und eine maximale Schweißzeit von 0,6 s.

Die Konnektoren, die durch 3D-Druck zu fertigen waren, wurden als CAD-Entwürfe in die Software Ultimaker Cura 2.3.1 (Ultimaker B.V., Niederlande) importiert. Als ERG- und Drainagestruktur wurden ebenfalls die Strukturen von den 100 μl - und 800 μl -MBR ohne Verrundungen

übernommen. Mit den Parametern in Tabelle 2 wurden die Konnektoren abhängig vom Material bzw. Filament (vgl. Kapitel 3.2) im 3D-Drucker Ultimaker 2+ (Ultimaker B.V., Niederlande) gedruckt. Um ERG und Drainagen möglichst korrekt zu drucken, wurden die Modelle mit diesen Strukturen räumlich in der x - y -Ebene ausgerichtet.

Tabelle 2: Parameter zum 3D-Druck der Konnektoren aus PC- und PET-Filament.

| | PC-Filament | PET-Filament |
|---------------------------------------|-------------|--------------|
| <i>Druckgeschwindigkeit [mm/s]</i> | 20 | 30 |
| <i>Fahrgeschwindigkeit [mm/s]</i> | 120 | 120 |
| <i>Temperatur der Düse [°C]</i> | 255 | 210 |
| <i>Temperatur des Druckbetts [°C]</i> | 100 | 75 |

4.1.1.2 Ultraschallschweißen der verschiedenen Konnektortypen

Alle in Kapitel 3.6 vorgestellten Konnektortypen wurden wie in Abbildung 31 durch Ultraschallschweißen in-plane oder out-of-plane in bzw. auf einen Einlass eines fluidischen Chips geschweißt. Die Konnektoren wurden in individuellen Halterungen gegen Verrutschen und zur korrekten Führung beim Ultraschallschweißen platziert. Alle Konnektoren konnten reproduzierbar durch Ultraschallschweißen integriert werden. Die Schweißparameter für jeden Konnektortyp sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Parameter für das Ultraschallschweißen der verschiedenen Konnektortypen.

| |  |  |  |  |  |  |  |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Fügeweg s_f [mm]</i> | 0,20 | 0,30 | 0,35 | 0,20 | 0,30 | 0,40 | 0,40 |
| <i>Triggerkraft [N]</i> | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 |
| <i>Schweißkraft F_s [N]</i> | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 | 120 |
| <i>Amplitude A [μm]</i> | 16,01 | 16,01 | 16,01 | 16,01 | 16,01 | 16,01 | 16,01 |
| <i>Max. Schweißzeit [s]</i> | 1,0 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,5 |

Die einzige Ausnahme bildeten die durch 3D-Druck erzeugten Konnektoren aus PC und PET, welche auch auf Chips aus dem jeweils anderen Polymer geschweißt wurden. Dabei wurde die Kompatibilität beider Materialien beim Ultraschallschweißen miteinander getestet. Allerdings brachen diese sofort beim Herausnehmen aus der Halterung. Abgesehen davon konnte kein Unterschied zwischen den PC- und PET-Konnektoren festgestellt werden. Wie in Rotheiser 2009 beschrieben, konnten Konnektoren mit zu langen, frei schwingenden Fortsätzen durch die Ultraschallschwingungen zerbrechen [75]. Dieser Effekt verstärkte sich noch aufgrund des schichtweisen Aufbaus beim 3D-Drucken. [115]

4.1.1.3 Untersuchung der Schweißnähte

Als wichtigstes Kriterium für ein erfolgreiches Ultraschallschweißen der Konnektoren diente der in Kapitel 2.8.3 vorgestellte Leckagetest, dessen Ergebnisse in Abbildung 36 dargestellt sind. Die Dosiernadeln hielten dem geringsten Druck von allen getesteten Konnektoren stand. 0,58 bar war der maximale Druck, dem die Dosiernadeln mit einem ID von 1,36 mm standhielten und 1,14 bar bei den Dosiernadeln mit 0,51 mm ID, bis die ersten Blasen sichtbar waren. Dass die dünneren Dosiernadeln einem höheren Druck widerstanden, wurde auf die in diesem Fall kürzeren Wege des zu schmelzenden ERG zurückgeführt. Die hohe Standardabweichung der Messwerte verdeutlicht zudem die schwankende Passgenauigkeit der Komponenten bedingt durch Fertigungstoleranzen der ERG und der Dosiernadeln. Überdies kann festgehalten werden, dass die Materialkombination von Metall und Polymer beim Ultraschallschweißen nur bedingt für fluidisch dichte Bauteile geeignet ist.

Alle weiteren Konnektoren waren über 1 h bis 3,75 bar dicht, ohne dass eine Blasenbildung oder eine Druckabnahme sichtbar waren. Bei den durch 3D-Druck erzeugten Konnektoren war es nicht möglich, die Luer-Lock-Verbindung fluidisch dicht herzustellen. Aufgrund dessen mussten die Konnektoren mit 90°-Winkel mit dem entsprechenden Gegenstück mit Klebstoff Ultra Light-Weld® 1187-M (Dymax Corporation, USA) und dem Belichtungsgerät DELO® LUX 04 (Delo Industrie Klebstoffe GmbH & Co. KGaA, Schweiz) fixiert werden. Zu Testzwecken konnten dadurch undichte Stellen zwischen Schlauch- bzw. Luer-Lock-Anschluss mit den Gegenstücken beseitigt werden, welche durch den schichtweisen Aufbau beim 3D-Druck entstanden.

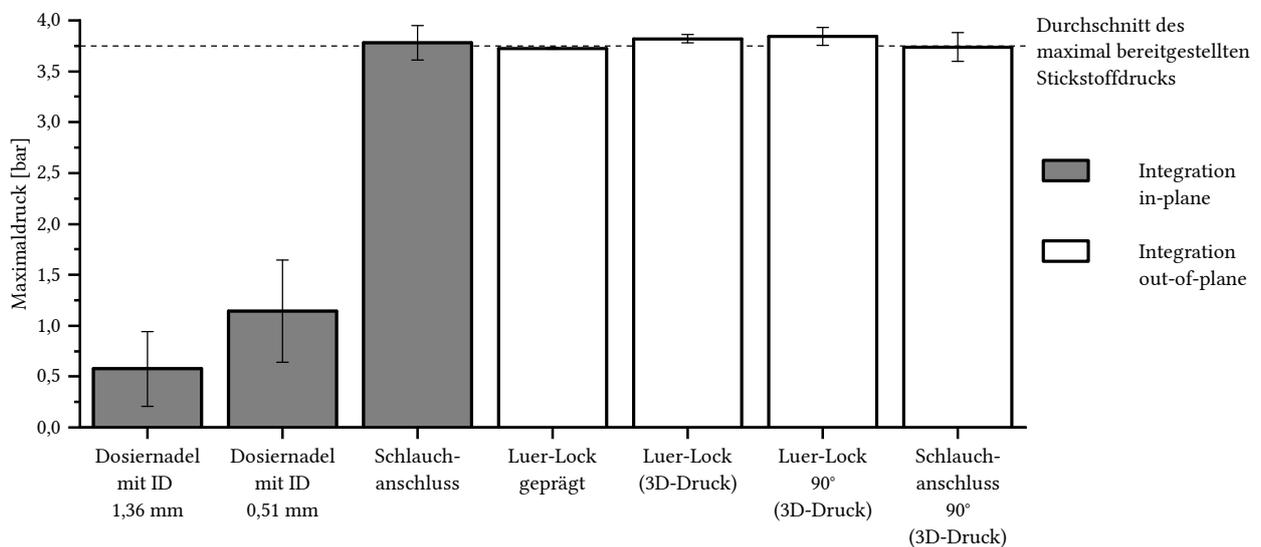


Abbildung 36: Maximaldrücke der durch Ultraschallschweißen gefügten Konnektoren [115].

Darüber hinaus wurde die Qualität der Schweißnähte durch Untersuchung von deren Querschnitte ergänzt. Dazu wurde in folgenden zwei Schritten vorgegangen. Zuerst wurde mit einer Schleifmaschine ECO, 230 V (Reichmann & Sohn GmbH, Deutschland) ein grober Schnitt durch die mit Ultraschall verschweißten Konnektoren mit Chip gesetzt, welche im Einbettmittel DuroCit-3 (Struers, Dänemark) ausgehärtet wurden. Damit auch kleinere Kapillaren mit dem Einbettmittel gefüllt und die Luft verdrängt werden konnten, war das Einspritzen dieser Masse mithilfe einer Spritze notwendig. Anschließend wurden die eingebetteten Konnektoren mit Chip vorsichtig und langsam mit Siliziumkarbid-Schleifpapier (Struers, Dänemark) unterschiedlicher Korngrößen (P400-2500) auf der Schleif- und Poliermaschine Saphir 350E (ATM GmbH, Germany) bis zum gewünschten Querschnitt geschliffen. Damit keine Verunreinigungen der verschiedenen Schleifpapiere übertragen werden konnten, wurden die Proben zwischen den einzelnen Polierschritten gründlich mit DI-Wasser gespült.

Für die Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop (REM) Supra 60VP (Zeiss, Deutschland) wurden die Querschnitte aller Proben an der Bedampfungsanlage K575X (Quorum Technologies Ltd, Großbritannien) mit Gold/Palladium bedampft.

Die Querschnitte aller Konnektoren sind exemplarisch in Abbildung 37 gezeigt. Sichtbar ist bei allen Konnektoren, dass die Einlässe nicht durch Schmelze des ERG verstopft wurden. Bei den Dosiernadeln in Abbildung 37 b-c sind freie Kapillaren im Bereich der Schweißnaht zu sehen. Diese Kapillaren führen vom Inneren des Chips bis nach außen, was die Dichtheit beeinträchtigt und durch die Ergebnisse des Leckagetests bestätigt werden kann. Begründet wird dies durch die Materialpaarung von Metall und Thermoplast, welche nicht homogen, sondern nur durch Formschluss zustande kommt. Dass die Dosiernadel mit größerem ID mehr dieser Kapillaren aufweist, welche zu einem niedrigeren Maximaldruck führen, unterstützt diese Behauptung zusätzlich.

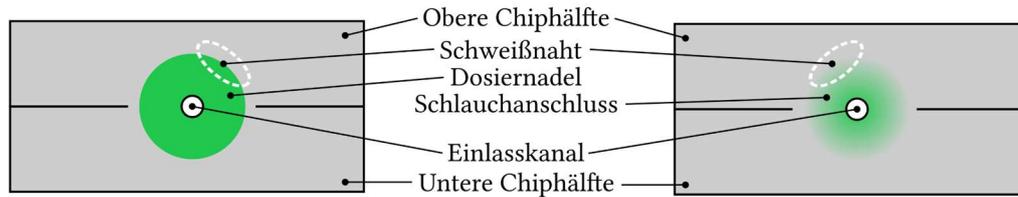
Beim Schlauchanschluss in Abbildung 37 d ist eine homogene und dichte Schweißnaht vorhanden, was sich auch mit dem Leckagetest deckt. Der auf den ultraschallgeprägten Chipeinlass geschweißte Luer-Lock-Anschluss sowie die durch 3D-Druck erzeugten Konnektoren aus PC und PET wiesen ebenfalls alle eine homogene Schweißnaht auf, welche in Abbildung 37 f-g exemplarisch gezeigt werden. Die in Abbildung 37 f erkennbaren Luftpneumatische Einschlüsse in den durch 3D-Druck generierten Konnektoren hatten im Gegensatz zu den Kapillaren bei den Dosiernadeln keinen Effekt auf deren Dichtheit. Wie auch bei den Leckagetests war kein Unterschied zwischen den Konnektoren aus PC und PET festzustellen. [115]

Wie in Soergel 2017 beschrieben bieten die durch Ultraschallschweißen integrierten Dosiernadeln aufgrund der Paarung unterschiedlicher Materialien nur eingeschränkt eine Möglichkeit zur fluidischen Kontaktierung mikrofluidischer Chips [134].

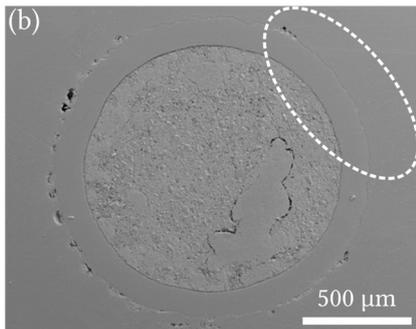
Die Konnektortypen, welche out-of-plane integriert wurden, stellen eine dichte und stabile fluidische Kontaktierung dar. Die Flexibilität dieser Anschlüsse ist am höchsten, da diese durch Ultraschallschweißen individuell an Ein- und Auslässen mikrofluidischer Chips anzubringen sind. Ferner ist die Fertigung dieser Konnektortypen aus PC und PET realisierbar. [115] Allerdings ermöglicht der Schlauchanschluss für die in-plane-Integration die geringste Gesamthöhe für den MBR, weshalb dieser Konnektortyp für alle 100 µl- und 800 µl-MBR verwendet wurde.

Integration in-plane

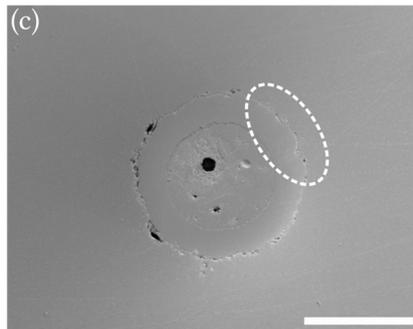
(a)



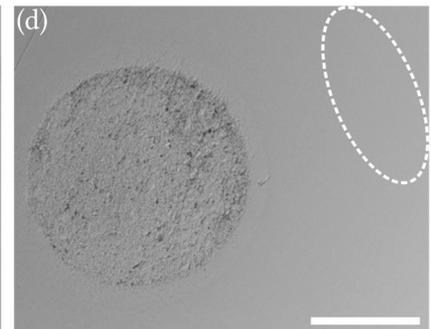
(b)



(c)

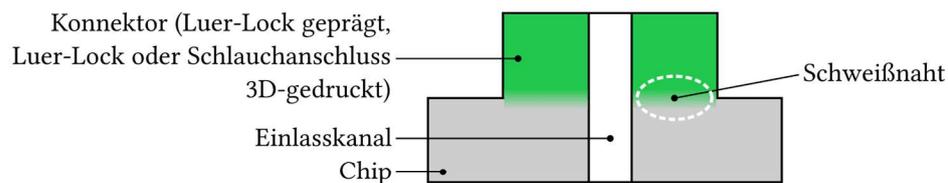


(d)

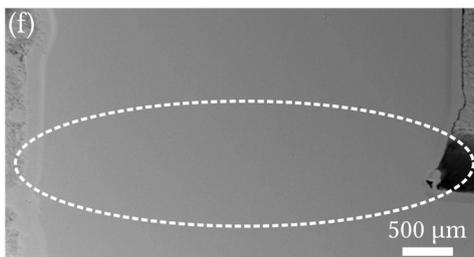


Integration out-of-plane

(e)



(f)



(g)

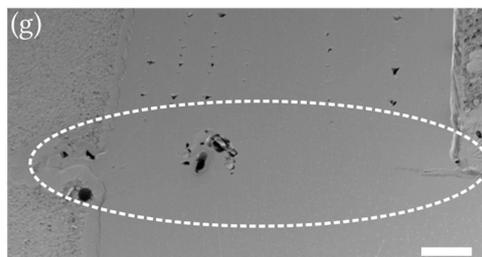


Abbildung 37: REM-Aufnahmen der Querschnitte der Schweißnähte. Die weiß gestrichelten Markierungen zeigen die Position der Schweißnähte an. Polymer und Metall sind glatt und grau, das Einbettmittel ist rau und grau und Lufteinschlüsse sind schwarz. (a) Schematische Querschnitte der in-plane-Konnektoren, (b-c) Schweißnaht der Dosiernadeln mit 1,36 mm und 0,51 mm ID, (d) Schweißnaht des Schlauchanschlusses, (e) Schematischer Querschnitt der out-of-plane-Konnektoren, (f) Schweißnaht der aufgebohrten Luer-Lock-Kappe auf dem ultraschallgeprägten Chipeinlass, (g) exemplarische Schweißnaht eines durch 3D-Druck erzeugten Konnektors [115].

4.2 Modifizierung des 200 μl -MBR

Parallel zur Entwicklung der neuen Formeinsätze für die 100 μl - und 800 μl -MBR konnte der 200 μl -MBR mit dieser fluidischen Kontaktierung versehen und getestet werden. Dieser bildet, wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, die Basis für die 100 μl -MBR und 800 μl -MBR.

Die Chiphälften des 200 μl -MBR wurden mit den Parametern in Tabelle 4 an der WUM 02 aus PC heißgeprägt. Im Anschluss daran wurde die Chiphälfte mit Versorgungskammer wie in Abbildung 38 a gezeigt auf der Rückseite durch Mikrofräsen mit halbrunden Kanälen versehen. Nach dem Ultraschallschweißen der Chiphälften mit den Parametern in Tabelle 5 wurden die Schlauchanschlüsse in die halbrunden Kanäle eingelegt. Abbildung 38 b zeigt ein zusätzliches, mikrogefrästes Bauteil mit ebenfalls halbrundem Kanal und ERG analog zu Abbildung 31 in Kapitel 3.6. Damit wurden die Schlauchanschlüsse durch Ultraschallschweißen mit den Parametern in Tabelle 5 in den 200 μl -MBR integriert. Dieser modifizierte 200 μl -MBR mit einer Gesamthöhe von 7,3 mm ist in Abbildung 38 c zu sehen.

Tabelle 4: Betriebsparameter an der WUM 02 zum Heißprägen der Chiphälften des 200 μl -MBR.

| Parameter Heißprägen | Chiphälften |
|-------------------------------|--------------------|
| F [kN] | 125 |
| T_P [°C] | 167 |
| Prägeweg [mm] | 3,0 |
| Prägegeschwindigkeit [mm/s] | 0,5 |
| Entformtemperatur [°C] | 85 |
| Entformgeschwindigkeit [mm/s] | 1,0 |
| Zyklusdauer [min] | 38,0 |

Tabelle 5: Schweißparameter zum anschließenden Ultraschallschweißen der Chiphälften mit der Membran sowie der Schlauchanschlüsse.

| Schweißparameter | Chiphälften | Schlauchanschlüsse |
|---------------------------------|--------------------|---------------------------|
| Fügeweg s_f [mm] | 0,27 | 0,27 |
| Triggerkraft [N] | 120 | 120 |
| Schweißkraft F_s [N] | 120 | 120 |
| Amplitude A [μm] | 16,09 | 16,09 |
| Max. Schweißzeit [s] | 0,6 | 0,4 |

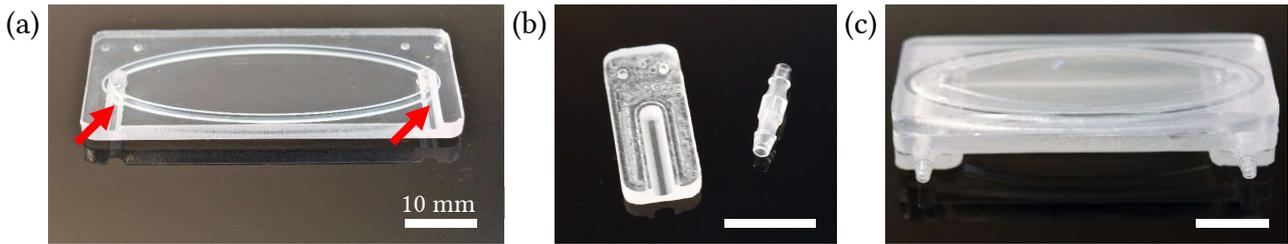


Abbildung 38: Modifizierung des 200 μ l-MBR. (a) Modifizierung der Chiphälfte mit Versorgungskammer auf der Rückseite durch Mikrofräsen von halbrunden Kanälen, (b) Schlauchanschluss und mikrogefrästes Gegenstück zu den halbrunden Kanälen auf der Chiphälfte mit Versorgungskammer mit ebenfalls halbrundem Kanal und ERG, (c) gefertigter MBR mit allen Komponenten. Der Maßstabsbalken entspricht einheitlich 10 mm.

Im Rahmen dieser Versuche wurden die beiden Membranen aus PC und PET (vgl. Tabelle 1, Kapitel 3.2) auf ihre Transparenz getestet. Dazu wurden Pflanzenzellen in den jeweiligen MBR eingefügt und, wie in Abbildung 39 a-b zu sehen, unter dem Mikroskop beobachtet. Die PC-Membran erschien unter dem Mikroskop opak, weshalb einzelne Zellen nur schwer erkannt werden konnten [126]. Dahingegen war die PET-Membran transparent, sodass Pflanzenzellen schnell zu finden und gut unter dem Mikroskop zu beobachten waren [135-137]. In einem in Abbildung 39 c gezeigten Test konnte überdies sichergestellt werden, dass Zellen von *T. chinensis*, welche mit ca. 60-80 μ m die kleinste Zellen aller analysierten Zellen waren, von einer Agarplatte nicht durch die 5 μ m großen Poren der aufgelegten PET-Membran wachsen [135].

Aus diesen gesammelten Erkenntnissen konnte der erste Prototyp gefertigt werden, der wiederum den finalen Machbarkeitsnachweis für die Entwürfe der neuen Formeinsätze - im speziellen dem für den 100 μ l-MBR - erbrachte. Dazu wurden die Chiphälften mit den fluidischen Strukturen, ERG sowie Drainagen und den Passstiften bzw. Passungen direkt mikrogefräst. Im Anschluss daran konnte dieser Prototyp durch Ultraschallschweißen mit einer Membran und Schlauchanschlüssen gefügt werden. In den nachfolgenden Chipsystemen wurde nur noch die PET-Membran eingesetzt.

Ein solcher Prototyp ist in Abbildung 40 gezeigt und die transparente Schweißnaht vom Ultraschallschweißen ist erkennbar. Durch diesen Machbarkeitsnachweis konnten die Formeinsätze zum Heißprägen der Chiphälften für den 100 μ l- und den 800 μ l-MBR gefertigt werden.

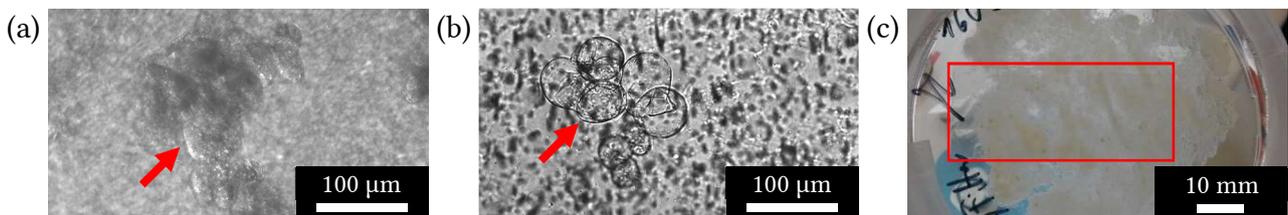


Abbildung 39: Untersuchung der Transparenz der Membranen unter dem Mikroskop. (a) Schemenhaft erkennbare Pflanzenzellen (roter Pfeil) auf der PC-Membran, (b) besser erkennbare Pflanzenzellen und Poren auf der PET-Membran (roter Pfeil), (c) *T. chinensis*-Zellen wachsen nicht durch den Membranzuschnitt (rotes Rechteck).



Abbildung 40: Der durch Mikrofräsen und anschließendes Ultraschallschweißen gefertigte 100 µl-MBR als Machbarkeitsnachweis für die Freigabe zur Fertigung der Formeinsätze.

4.3 Herstellung und Charakterisierung der Formeinsätze

Die in Kapitel 3.8 und 3.9 vorgestellten Formeinsätze für den 100 µl- und 800 µl-MBR wurden von i-sys Mikro- und Feinwerktechnik GmbH (Deutschland) mit Hartmetall- und Diamantfräsern gefertigt. In Abbildung 41 a ist der Formeinsatz für den 100 µl-MBR nach den ersten Abformungen und in Abbildung 41 b der Formeinsatz für den 800 µl-MBR im Auslieferungszustand zu sehen.

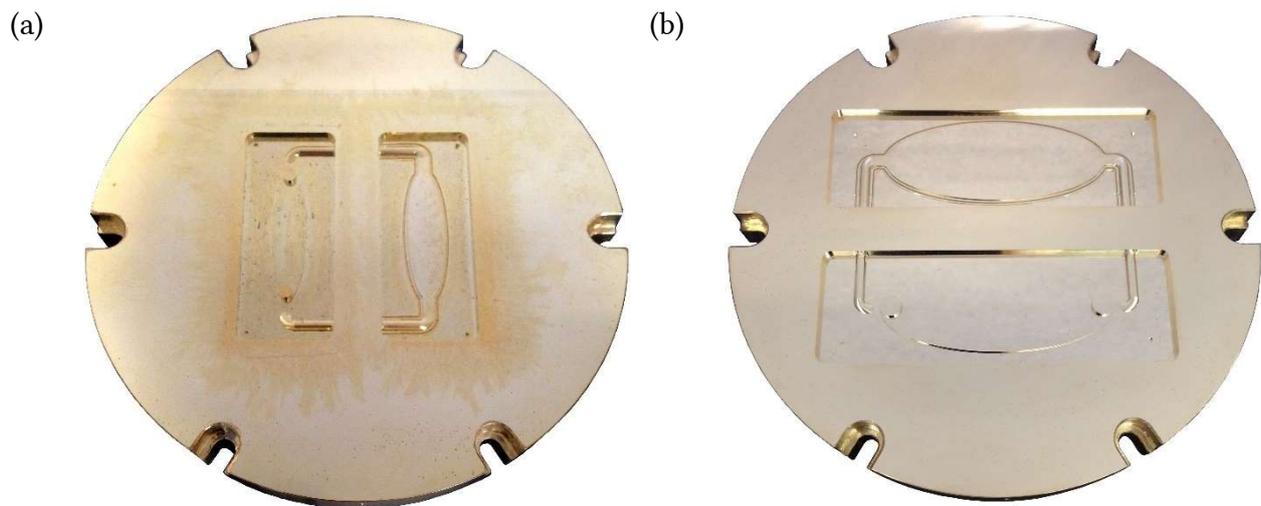


Abbildung 41: Fotos der Formeinsätze. (a) Formeinsatz des 100 µl-MBR nach den ersten Abformungen, (b) Formeinsatz für den 800 µl-MBR im Auslieferungszustand.

Nach Empfang der Formeinsätze wurden diese mit dem REM Supra 60VP (Zeiss, Deutschland) untersucht. Hauptaugenmerk waren die für die Funktionalität der MBR wichtigen Stellen wie Entformschrägen an den Seitenwänden, ebene Fläche der Zellkammer, ERG und Drainagen. In Abbildung 42 sind Aufnahmen vom Formeinsatz für die Chiphälften des 100 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen zu sehen.

In Abbildung 42 a sind Entformschrägen von 3° zu sehen, welche ausreichend glatt und porenfrei sind. Dies kann durch die gute Entformbarkeit im Verhältnis zum Formeinsatz für den 200 µl-MBR

belegt werden. Die Oberfläche an der Stelle der Zellkammer in Abbildung 42 b ist bis auf eine kleine Stufe eben und wird zu vernachlässigbarer Lichtstreuung und dem damit verbundenen Transparenzverlust durch Oberflächenrauheit führen. Die Freiformfläche des Fluidkanals in Abbildung 42 c ist mit sehr feinen Abstufungen gefertigt. Der Randbereich in Abbildung 42 d weist fertigungsbedingte Frässtufen auf. ERG und Drainagen sind bis auf eine für die Funktionalität vernachlässigbare Frässtufe fehlerfrei.

Analog dazu sind in Abbildung 43 REM-Aufnahmen vom Formeinsatz für die Chiphälften des 800 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen zu sehen. Die Qualität ist mit dem ersten Formeinsatz vergleichbar. Die Entformschräge in Abbildung 43 a ist ausreichend glatt und es ist nur ein Staubpartikel zu sehen. Auf der Oberfläche der Zellkammer in Abbildung 43 b ist keine Frässtufe. Alle weiteren Strukturen von Fluidkanal über ERG und Drainagen in Abbildung 43 c-f sind fehlerfrei. Nur am Ende der Drainagen in Abbildung 43 e ist erneut eine Frässtufe, welche jedoch nicht die Funktionalität des ERG und der Drainagen beeinträchtigt.

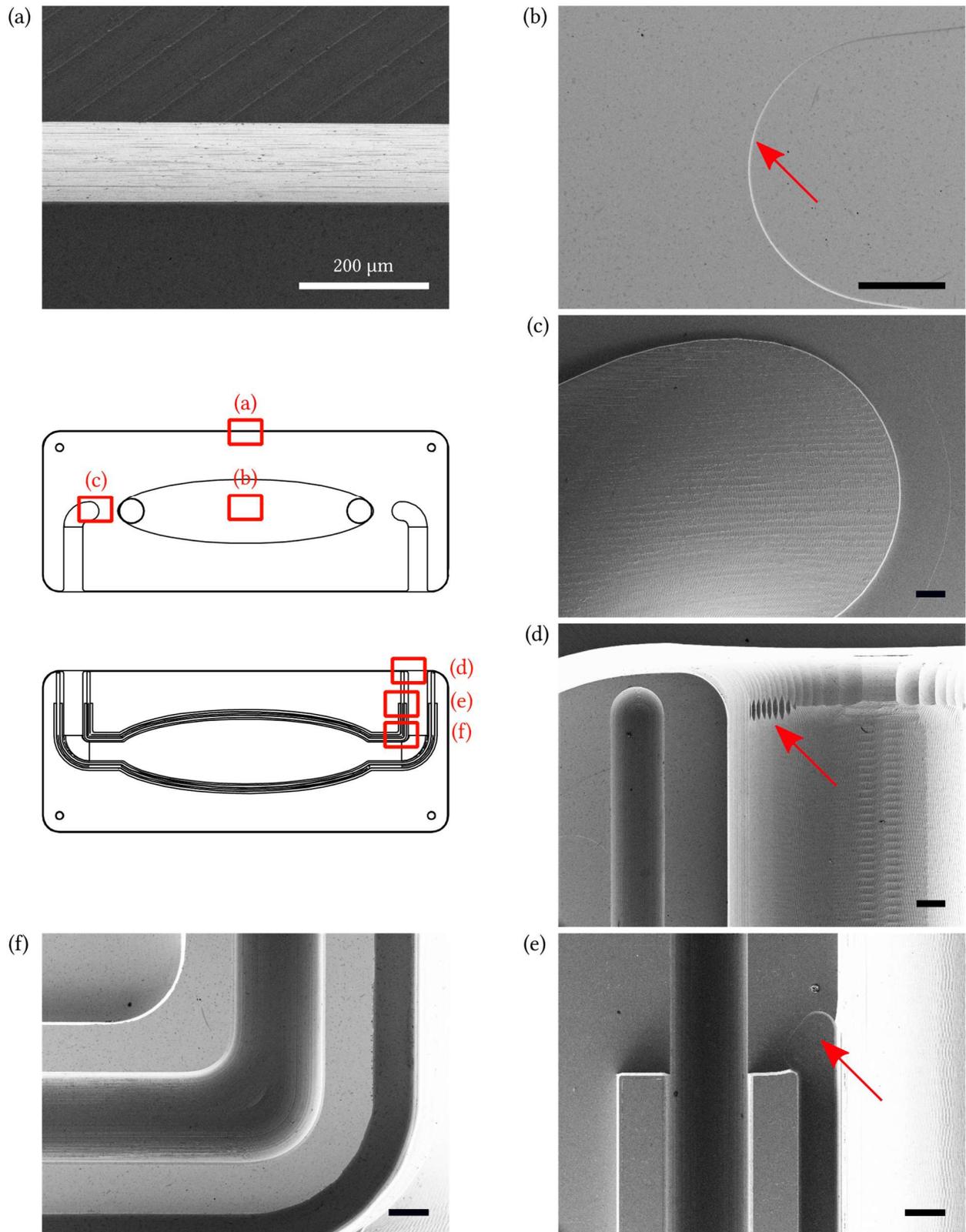


Abbildung 42: REM-Aufnahmen vom Formeinsatz für die Chiphälften des 100 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen. (a) Glatte und fast porenfreie Seitenwand mit Entformschräge, (b) Decke der Zellkammer mit leichten Fräsriefen, (c) Freiformfläche des Fluidkanals, (d) Randbereich von ERG und Fluidkanal, (e) Ende der Drainagen, (f) Rundung des ERG und der Drainagen. Der Maßstabsbalken entspricht einheitlich 200 µm. Kleine Fräsfehler sind durch rote Pfeile markiert.

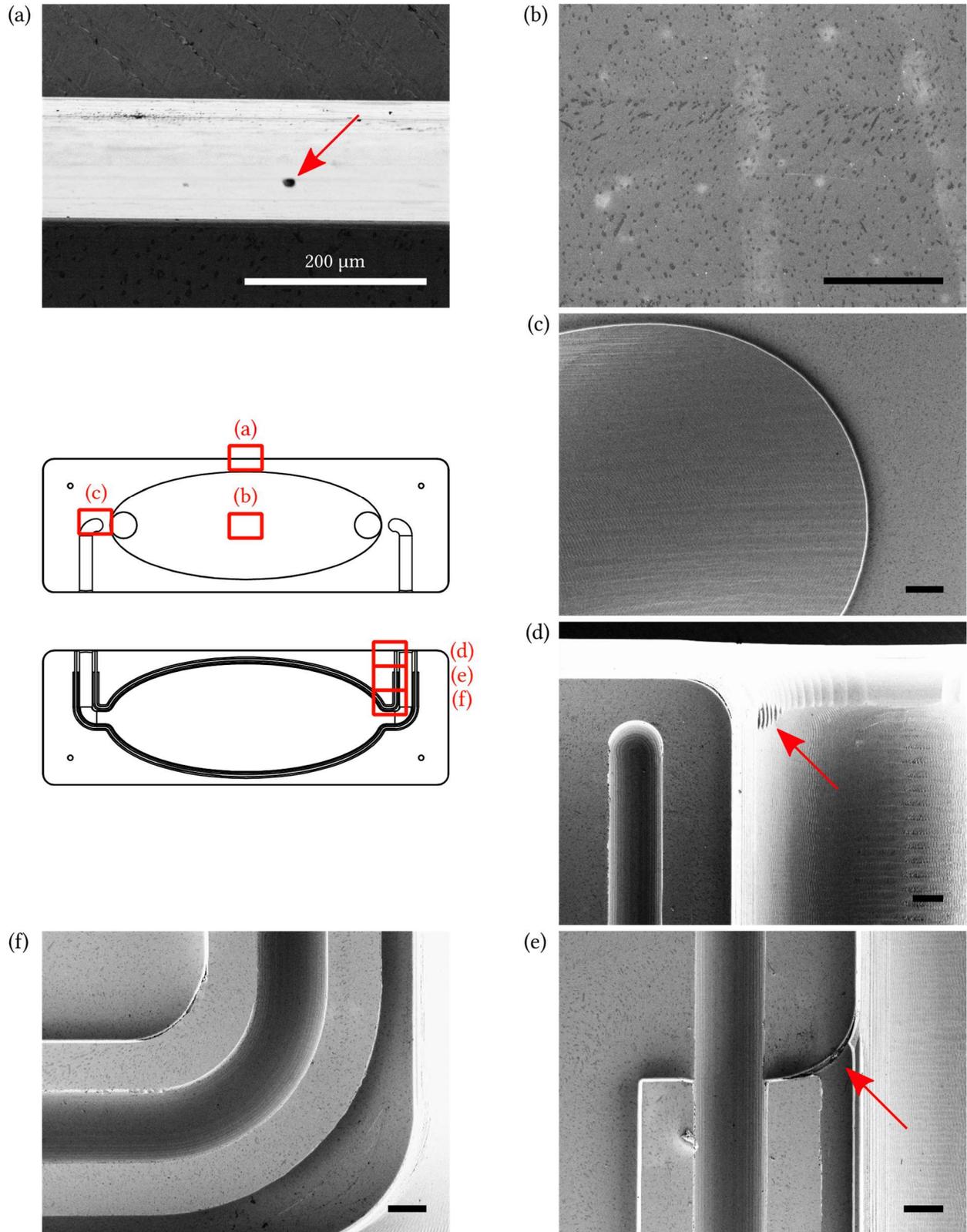


Abbildung 43: REM-Aufnahmen vom Formeinsatz für die Chiphälften des 800 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen. (a) Glatte und fast porenfreie Seitenwand mit Entformschräge, (b) Decke der Zellkammer, (c) Freiformfläche des Fluidkanals, (d) Randbereich von ERG und Fluidkanal, (e) Ende der Drainagen, (f) Rundung des ERG und der Drainagen. Der Maßstabsbalken entspricht einheitlich 200 µm. Rote Pfeile markieren Verunreinigungen oder Fräsfehler.

4.4 Heißprägen

Die Chiphälften wurden mit den beiden Formeinsätzen für den 100 µl- und den 800 µl-MBR aus PC und PET heißgeprägt. Dazu wurden die Formeinsätze sowie die Chromplatte vor dem Einbau in die WUM 01 und 02 mit 2-Propanol und DI-Wasser gereinigt. Eingebaut wurden die Formeinsätze jeweils auf der oberen und die Chromplatte auf der unteren Werkzeugplatte.

Vor dem Heißprägen wurden die Halbzeuge auf entsprechende Formate der Formnester des jeweiligen Formeinsatzes zugeschnitten. PC-Platten wurden in kleine Plättchen gesägt und PET-Folien durch eine Papierschneidemaschine auf Format gebracht.

Die in Tabelle 6 aufgeführten Formate erwiesen sich als optimal, da dabei keine überschüssige Schmelze in die Verschraubung der Formeinsätze drang. PC-Plättchen wurden anschließend von der Schutzfolie getrennt und PET-Folien mit 2-Propanol abgerieben, bevor diese wie in Abbildung 44 gezeigt auf der Chromplatte unter den Formnestern der Formeinsätze platziert wurden. Heißgeprägt wurde immer bei Prägetemperatur T_p und der Prägeweg wurde durch die Kraft F festgelegt.

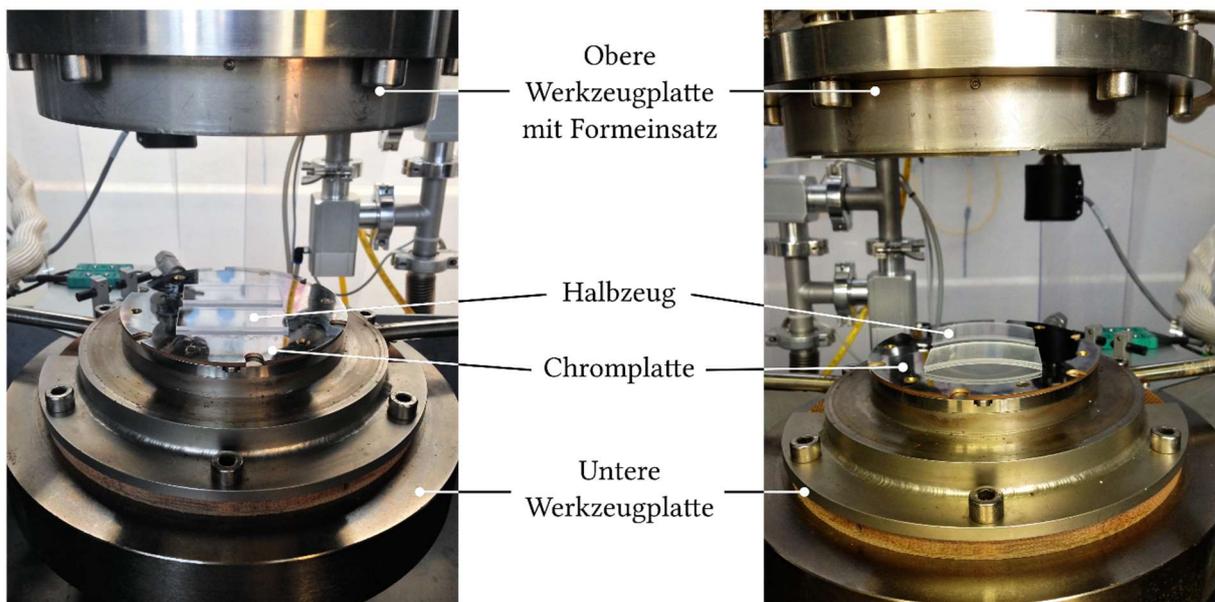


Abbildung 44: Platzierung der Halbzeuge in Form von PC-Plättchen (links) und PET-Folien (rechts) auf der Chromplatte zum Heißprägen mit dem in der oberen Werkzeugplatte eingebauten Formeinsatz, hier am Beispiel der WUM 02.

4.4.1 Optimierung der Betriebsparameter

Zu Beginn wurden die Betriebsparameter an beiden Maschinen WUM 01 und WUM 02 für eine fehlerlose Replikation der Chiphälften eingestellt. Von diesem Punkt aus wurde die Zeit unter variierenden Parametern und konstanter Qualität der Chiphälften optimiert.

An der WUM 02 stellten sich die Betriebsparameter in Tabelle 6 als optimal heraus. Die Temperatur des Ölkreislaufs wurde bei PC auf 195 °C und bei PET auf 125 °C gesetzt. Die Parameter konnten hinsichtlich der Zeit nicht optimiert werden. Pro Zyklus betrug die Zeit im Schnitt 38,0 min bei den Chiphälften aus PC und 29,1 min bei den Chiphälften aus PET.

Im Vergleich dazu konnten die Betriebsparameter gemäß Xia 2019 (Tabelle 6) bei der WUM 01 neben der Qualität auch hinsichtlich der Zeit optimiert werden. Da Heizung und Kühlung schneller als bei der WUM 02 ansprechen, war sogar eine individuelle Optimierung für den kleinen und großen Formeinsatz möglich. Diese optimalen Betriebsparameter sind ebenfalls in Tabelle 6 aufgelistet. Hier betrug die Zeit pro Zyklus bei den Chiphälften aus PC im Schnitt 7,3 min bzw. 8,7 min und bei den Chiphälften aus PET 8,8 min bzw. 9,2 min. [138]

Tabelle 6: Konfigurationen und Betriebsparameter zum Heißprägen der Chiphälften für den 200 µl-MBR an der WUM 02 sowie für die 100 µl-MBR und 800 µl-MBR an der WUM 01 nach Xia 2019 [138].

| Konfiguration | PC | | | PET | | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <i>Formeinsatz</i> | 100 µl- MBR | 200 µl- MBR | 800 µl- MBR | 100 µl- MBR | 200 µl- MBR | 800 µl- MBR |
| <i>Heißprägemaschine</i> | WUM 01 | WUM 02 | WUM 01 | WUM 01 | WUM 02 | WUM 01 |
| <i>Gesamtvolumen Formnester [mm³]</i> | 3297 | 4653 | 6547 | 3297 | 4653 | 6547 |
| <i>Gesamtvolumen Halbzeug [mm³]</i> | 4876 | 6426 | 9360 | 3110 | 6426 | 10350 |
| <i>Zuschnitt des Halbzeugs [mm²]</i> | 23 · 53 | 25 · 57 | 24 · 65 | 18 · 48 | 25 · 57 | 23 · 75 |
| <i>Dicke des Halbzeugs [mm]</i> | 2 | 3 | 3 | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| <i>Anzahl an Lagen des Halbzeugs</i> | 1 | 1 | 1 | 3 | 5 | 5 |
| Betriebsparameter | | | | | | |
| <i>F [kN]</i> | 150 | 125 | 150 | 170 | 120 | 185 |
| <i>T_P [°C]</i> | 170 | 167 | 180 | 125 | 98 | 130 |
| <i>Prägeweg [mm]</i> | 1,6 | 3,0 | 1,2 | 1,5 | 2,0 | 1,6 |
| <i>Prägeschwindigkeit [mm/s]</i> | 2,0 | 0,5 | 2,0 | 2,0 | 0,5 | 1,5 |
| <i>Entformtemperatur [°C]</i> | 145 | 85 | 145 | 45 | 50 | 70 |
| <i>Entformgeschwindigkeit [mm/s]</i> | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| <i>Zyklusdauer [min]</i> | 7,3 | 38,0 | 8,7 | 8,8 | 29,1 | 9,2 |

Kraft und Prägetemperatur wurden beim Heißprägen der kleinen Chiphälften niedriger als bei den großen Chiphälften gewählt, da die Volumina der Halbzeuge und der Formnester geringer waren. Weiterhin wurden für PET niedrigere Parameter beim Prägen und Entformen eingestellt, da PET einen niedrigeren Glasübergangsbereich besitzt. Der Prägeweg war in allen Fällen aufgrund der gleichen Formnesttiefen von 2,0-2,2 mm ähnlich. Nur beim 800 µl-MBR aus PC war der Prägeweg geringer, da die Plättchen in die Formnester passten und dadurch schon weiter in die Formnester ragten.

Beim Entformen hafteten die Chiphälften mit der Restschicht fast immer im Formeinsatz anstatt an der Chromplatte. Dafür ließen sich die Chiphälften aufgrund der Entformschrägen ohne Beschädigung aus dem Formeinsatz lösen.

Die Dicken der Restschicht der Chiphälften wurden gemessen und untereinander verglichen. Je näher an den Chiphälften gemessen wurde, desto dicker war die Restschicht, was dem normalen Fließverhalten des Polymers beim Heißprägen entspricht. Die Restschichten waren bei den Chiphälften aus PET dicker als bei den Chiphälften aus PC. Ein Grund hierfür könnte der geringere Prägeweg sein.

Für das Heißprägen mit der WUM 01 und 02 gilt abschließend, dass beide Polymere auch bei gleicher Qualität in der WUM 01 heißgeprägt werden können und einen 20-30 min kürzeren Prozess erlauben. Dies spiegelt sich auch in der Kostenanalyse in Kapitel 7 wider.

4.4.2 Charakterisierung der abgeformten Chiphälften

Neben der Analyse der Strukturen wurden weitere für den Gebrauch der MBR wichtige Materialeigenschaften untersucht. Dazu zählt zum einen die Transparenz der Bauteile, welche durch Transmissionsmessung bestimmt werden kann. Zum anderen wurde das Benetzungsverhalten der Chiphälften mit Wasser charakterisiert, welches sich im Kontaktwinkel widerspiegelt.

4.4.2.1 Vergleich der Strukturen

Ob die heißgeprägten Chiphälften der negativen Struktur des entsprechenden Formnestes in den Formeinsätzen entsprachen, wurde anhand REM-Aufnahmen analysiert. Diese Aufnahmen sind in Abbildung 45-46 dargestellt und wurden mit den REM-Aufnahmen der Formeinsätze in Abbildung 42-43 verglichen. Alle abgeformten Strukturen entsprechen genau ihrem Negativ im Formeinsatz. Wie in Abbildung 45 c-d und Abbildung 46 c-d zu erkennen ist, wurden sogar Fräsfehler in den Formeinsätzen exakt übertragen. Nur am Ende der Drainagestruktur des 800 µl-MBR entstanden beim Entformen zusätzliche Grate (s. Abbildung 46 d). Allerdings beeinträchtigt dieser Strukturverlust die Funktionalität in keiner Weise.

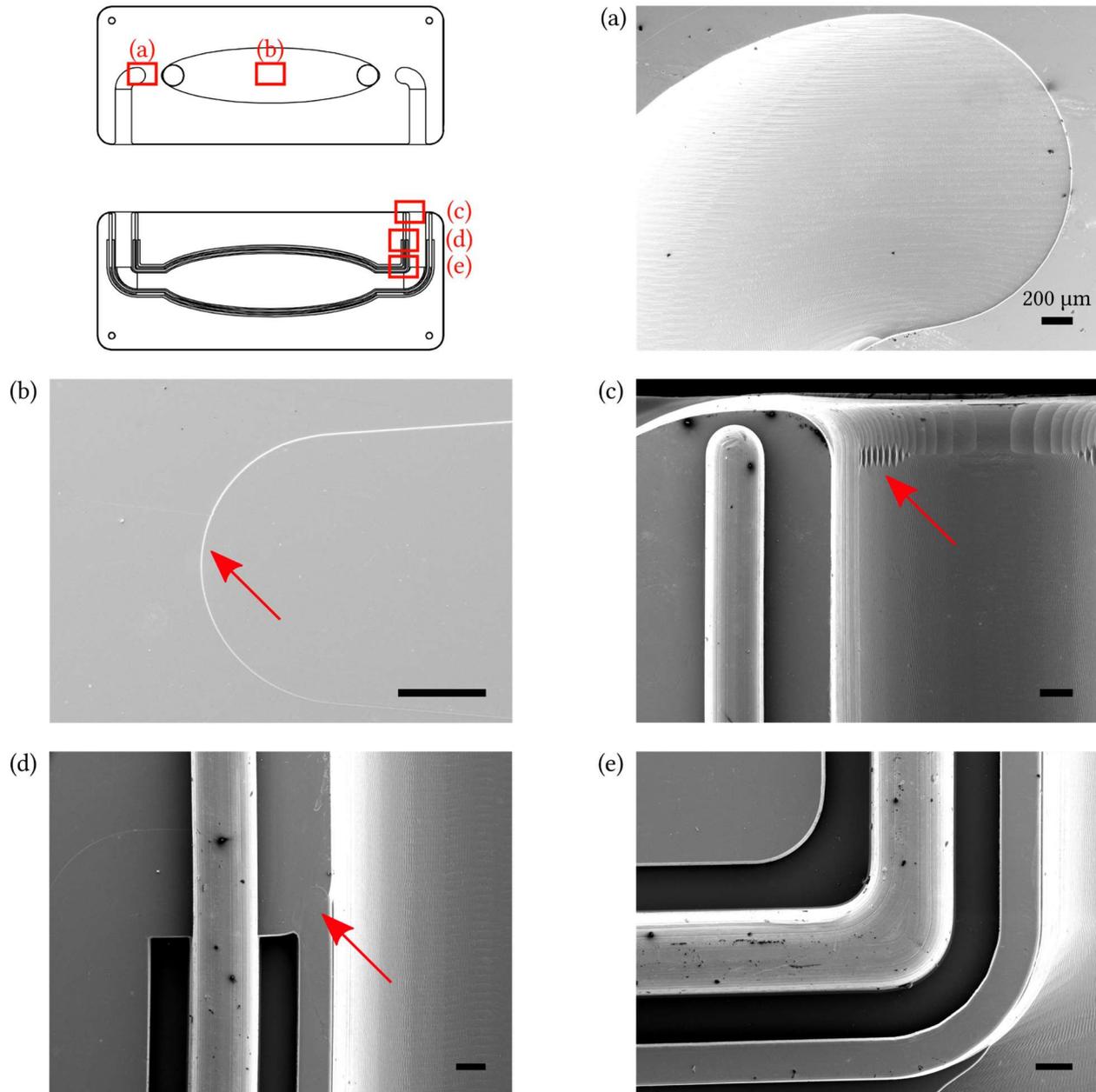


Abbildung 45: REM-Aufnahmen der heißgeprägten Chiphälften des 100 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen. (a) Freiformfläche des Fluidkanals, (b) Decke der Zellkammer mit leichten Fräsriefen, (c) Randbereich von ERG und Fluidkanal, (d) Ende der Drainagen, (e) Rundung des ERG und der Drainagen. Der Maßstabsbalken entspricht einheitlich 200 µm. Die schwarzen Punkte stellen Aufladungen des Kunststoffes im REM dar, Fräsfehler sind durch einen roten Pfeil markiert.

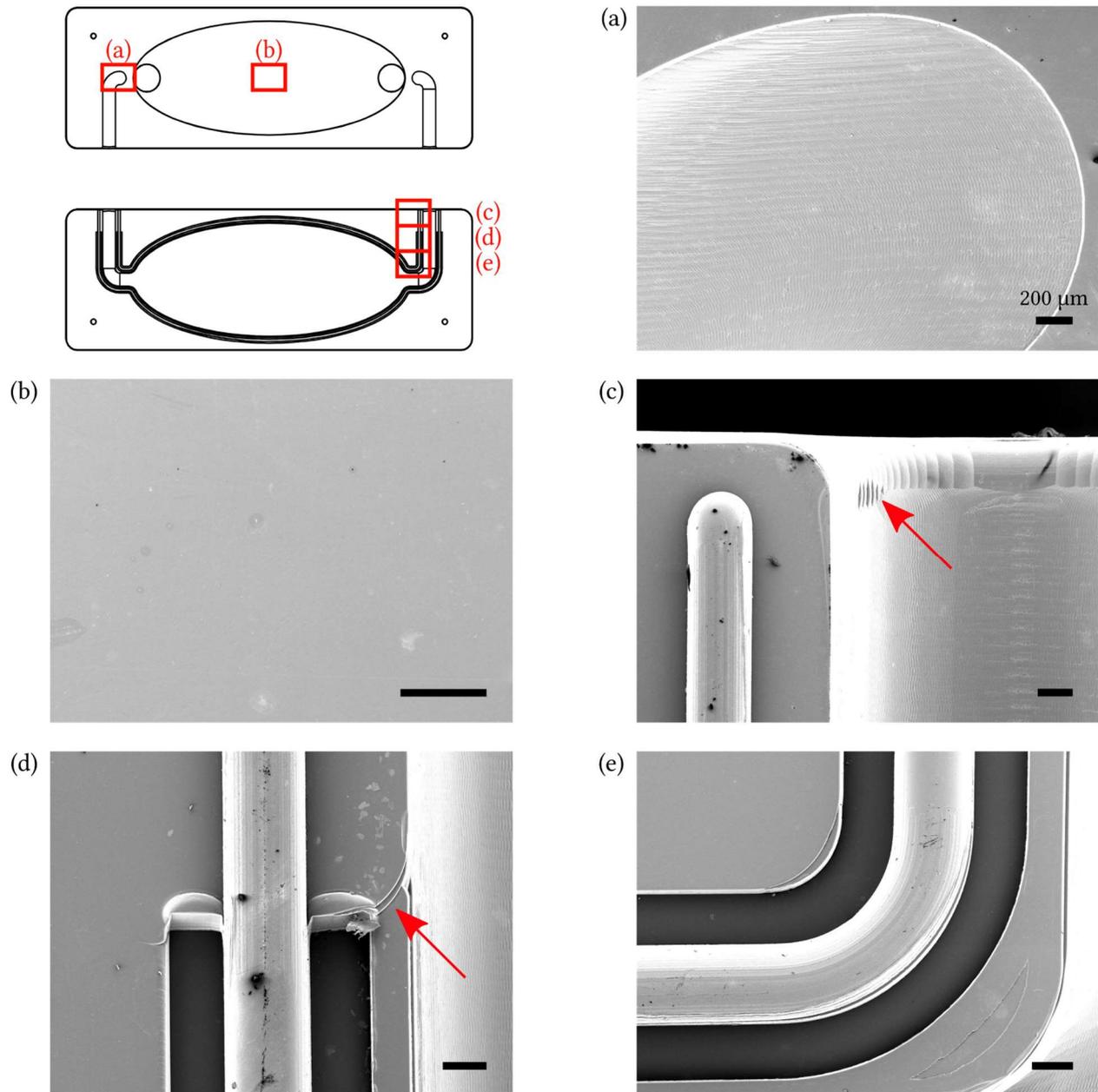


Abbildung 46: REM-Aufnahmen der heißgeprägten Chiphälften des 800 μl -MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen. (a) Freiformfläche des Fluidkanals, (b) Decke der Zellkammer, (c) Randbereich von ERG und Fluidkanal, (d) Ende der Drainagen, (e) Rundung des ERG und der Drainagen. Der Maßstabsbalken entspricht einheitlich 200 μm . Die schwarzen Punkte stellen Aufladungen des Kunststoffes im REM dar, Fräsfehler sind durch einen roten Pfeil markiert.

4.4.2.2 Messung der Transmission

Die Transmission von Licht im Spektrum von 250-1 000 nm wurde bei allen Chiphälften gemessen. Dazu wurden sowohl die Chiphälften mit Zellkammer als auch die mit Versorgungskammer analysiert. Jeweils drei Chiphälften des 100 μ l- und des 800 μ l-MBR wurden an den drei in Abbildung 47 gekennzeichneten Positionen im UV-Vis-Spektrophotometer Evolution™ 201 (Thermo Scientific™, Deutschland) vermessen. Die Ergebnisse wurden für jeden Punkt gemittelt.

Die Transmissionen der Chiphälften aus PC sind in Abbildung 48 a-d und aus PET in Abbildung 48 e-h über die Wellenlänge aufgetragen. Die Abformung mit der WUM 01 wies im Vergleich zur WUM 02 keine Unterschiede in der Transmission auf, weshalb exemplarisch nur die Messergebnisse der mit der WUM 02 abgeformten Chiphälften aufgeführt sind.

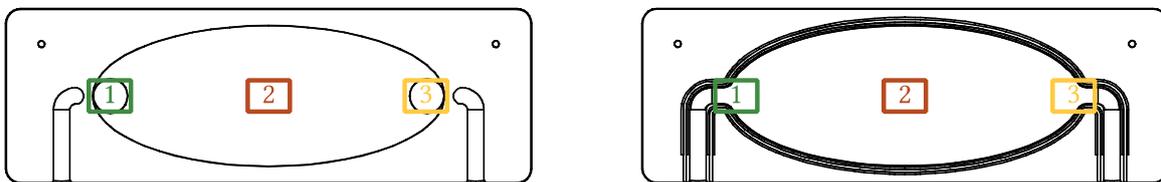


Abbildung 47: Drei Messpunkte für die Transmissionsmessungen aller Chiphälften. Die Messpunkte 1 und 3 liegen im Randbereich der Chiphälfte, der Messpunkt 2 in der Mitte.

Aus Abbildung 48 folgt, dass alle Chiphälften ausreichend transparent für biologische Experimente sind. Im Bereich des sichtbaren Lichts ist die Transmission über 80 % und auch für die meisten Fluoreszenzfarbstoffe ist dieser Bereich ausreichend [139]. Überdies unterscheiden sich PC und PET zwischen 500-1 000 nm Wellenlänge nicht, was für die Verwendung beider Materialien spricht.

Die Transmission aller Chiphälften aus PC ist zwischen ca. 400-1 000 nm konstant bei durchschnittlichen 81 %. Unter 400 nm nimmt die Transmission stark ab und Wellenlängen < 380 nm werden vollständig absorbiert. Diese Werte weichen um 7-8 % von den Angaben des Herstellers ab, welcher bei einer Dicke von 2-3 mm Halbzeug ca. 88-89 % Transmission angibt [116]. Somit kann angenommen werden, dass durch Erwärmen und Abkühlen beim Heißprägen sowie durch die nicht absolut glatte Oberfläche der Formeinsätze die Transmission des Polymers um den oben genannten Wert verringert wird.

Bei den Chiphälften aus PET liegt die Transmission zwischen ca. 650-1 000 nm konstant bei etwa 80 %. Unter 650 nm sinkt die Transmission. Bei 370 nm sind das bis zu 50 % und erst bei Wellenlängen < 320 nm wird vollständig absorbiert. Diese Werte konnten aufgrund fehlender Angaben von Seiten des Herstellers nicht verglichen werden [117].

Die Spektren im mittleren Messpunkt 2 (rote Spektren, Abbildung 48) weisen meist die höchste Transmission auf, was am stärksten bei der unteren Chiphälfte des 100 μ l-MBR aus PET in Abbildung 48 f auffällt. An dieser Stelle war der Formeinsatz am glattesten sowie die Planparallelität der abgeformten Chiphälften am größten, wodurch weniger Licht gestreut wurde und somit durchstrahlen konnte.

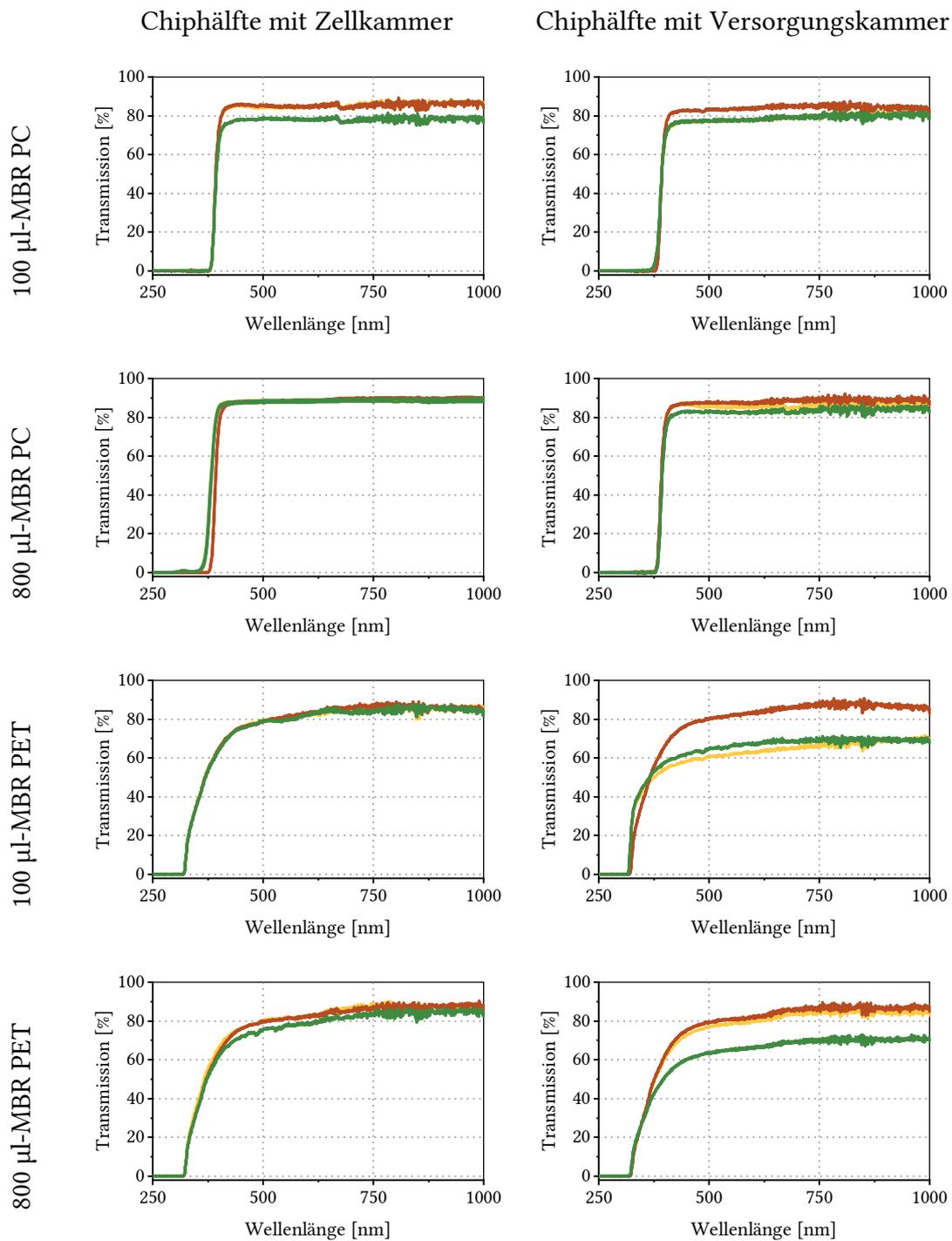


Abbildung 48: Die Transmission aller Chiphälften der 100 µl- und 800 µl-MBR aufgetragen über der Wellenlänge. Messpunkte 1 und 3 wurden grün und gelb, Messpunkt 2 rot aufgetragen.

Die in PC und PET abgeformten und anschließend polierten Chiphälften des 200 µl-MBR weisen einen ähnlichen Verlauf der Transmission über die Wellenlänge auf (Abbildung 49). Im Vergleich zu den Transmissionen der 100 µl- und 800 µl-MBR sind die des 200 µl-MBR aufgrund der um

0,1-0,5 mm größeren Schichtdicke der einzelnen Chiphälften auch grundsätzlich bei PC um ca. 4,0 % und bei PET um ca. 9,5 % niedriger.

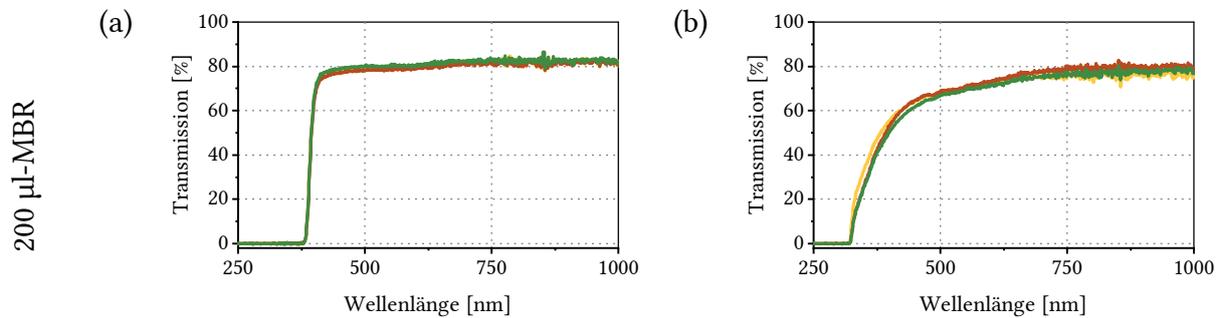


Abbildung 49: Die Transmission aller Chiphälften des 200 µl-MBR aufgetragen über der Wellenlänge. Messpunkte 1 und 3 wurden grün und gelb, der Messpunkt 2 rot aufgetragen.

4.4.2.3 Kontaktwinkel von Wasser

Der Kontaktwinkel von Wasser wurde am optischen Kontaktwinkelmessgerät OCA40 (DataPhysics Instruments GmbH, Deutschland) bestimmt. Die Proben wurden mit 2-Propanol gereinigt, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und mit einer Anti-Statik-Pistole entladen. Anschließend wurde jeweils ein Wassertropfen von 2 µl mit einer Spritzenpumpe durch eine Dosiernadel auf die Oberfläche der Proben aufgetragen. Die Aufnahme wurde sofort nach Ablegen des Tropfens gemacht und der Kontaktwinkel in der Software OCA20 durch Young-Laplace-Fitting gemessen. Als Proben wurden die Halbzeuge aus PC und PET, die daraus abgeformten PC- und PET-Chiphälften sowie die PC- und PET-Membranen untersucht. In Abbildung 50 ist die Benetzung jeden Materials mit einem Wassertropfen dargestellt und die gemittelten Kontaktwinkel θ_W aus Fünffachbestimmungen aufgelistet.

| | PC | | | PET | | |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Platte | Chip | Membran | Folie | Chip | Membran |
| | | | | | | |
| | $77,2^\circ \pm 0,9^\circ$ | $86,6^\circ \pm 0,4^\circ$ | $59,3^\circ \pm 2,3^\circ$ | $74,4^\circ \pm 0,9^\circ$ | $85,0^\circ \pm 0,7^\circ$ | $64,6^\circ \pm 0,8^\circ$ |

Abbildung 50: Die Benetzung mit einem Wassertropfen zur Messung des Kontaktwinkels θ_W der verschiedenen Halbzeuge, der daraus abgeformten Chiphälften und der eingesetzten Membranen aus PC und PET.

Die Kontaktwinkelmessungen zeigen ein hydrophiles Benetzungsverhalten beider Materialien in allen Ausführungen, da stets $\theta_W < 90^\circ$ ist. Für den Einsatz beider Materialien zur Herstellung des MBR - ob aus PC oder aus PET - bedeutet dies keine Limitierung auf eines der Materialien.

PC besitzt abgesehen von der Membran einen um ca. 1-3° größeren Kontaktwinkel. Auffällig ist, dass sich der Kontaktwinkel bei beiden Materialien durch das Heißprägen um 9-10° erhöht. Durch den Prozess des Heißprägens werden beide Thermoplaste erwärmt und bestimmte Bestandteile können dabei an die Oberfläche diffundieren. Dies kann zu einer anderen molekularen Oberflächenzusammensetzung führen, woraus wiederum eine niedrigere Oberflächenenergie, eine niedrigere Grenzflächenspannung γ und damit ein niedrigerer Kontaktwinkel θ_W resultieren kann. [140]

Den niedrigsten Kontaktwinkel mit Wasser weist die PC-Membran auf. Gleichzeitig zeigt dieser Wert die größte Standardabweichung. Der Grund dafür liegt darin, dass das Wasser aufgrund der Porosität der Membran zu schnell in die Membran eindrang und die Werte deshalb stärker als bei den anderen Messungen streuten.

4.5 Ultraschallschweißen

Das Ultraschallschweißen unterteilt sich in die Schritte der Membranintegration in die Chiphälfte mit Zellkammer, das Fügen der beiden Chiphälften und zum Schluss in die Charakterisierung der fluidischen Eigenschaften der MBR.

4.5.1 Membranintegration

Der Prozess des Ultraschallschweißens der 100 μl - und 800 μl -MBR wurde in zwei Schritte unterteilt. Wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben wurden einzelne Membranen im ersten Schritt auf die Chiphälften mit Zellkammer ultraschallgeschweißt.

Die Membranen aus PC und PET wurden durch die in Abbildung 51 a-b gezeigten strukturierten Sonotroden auf die Chiphälfte mit Zellkammer aus PC oder PET ultraschallgeschweißt. Die Konfigurationen und Eigenschaften des Schwinggebildes sowie der untersuchte Parameterraum sind für beide Membranen und beide Materialien der Chiphälften in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Eigenschaften des Schwinggebildes und Parameterraum für das Ultraschallschweißen der Membran auf die Chiphälfte mit Zellkammer der 100 μl - und 800 μl -MBR.

| Schweißparameter | 100 μl-MBR | 800 μl-MBR |
|---|---|---|
| <i>Abmessungen strukturierte Sonotrode [mm²]</i> | 14 · 37 | 25 · 53 |
| <i>Eigentransformation Sonotrode</i> | 1:2,3 | 1:1,7 |
| <i>Amplitudentransformationsstück</i> | 1:1,5 | 1:1,5 |
| <i>Fügeweg s_f [mm]</i> | 0,01-0,10 | 0,05-0,10 |
| <i>Triggerkraft [N]</i> | 100-300 | 100-150 |
| <i>Schweißkraft F_s [N]</i> | 100-250 | 100-150 |
| <i>Amplitude A [μm]</i> | 15,70-22,43 | 11,60-16,58 |
| <i>Max. Schweißzeit [s]</i> | 0,1-1,0 | 1,0 |

Vor dem Ultraschallschweißen wurden die Chiphälften in ein Becherglas mit einer 2-Propanol-Wasser-Lösung mit 25 %-igem (v/v) Volumenanteil von an 2-Propanol eingelegt. Darin wurden die Chiphälften für 10 min in einem Ultraschallbad DT 225 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) gereinigt. Die jeweilige Membran wurde mit einem Laserschneider VLS3.50 (Universal Laser Systems, USA) bei einer Leistung von 100 % und einer Geschwindigkeit von 80 % auf die entsprechende Kontur gebracht. Wie in Abbildung 51 c-d festgehalten, wurden dabei jeweils zwei Ausläufer mit Löchern integriert. Diese dienen dem passgenauen Auflegen der Membranen an die Positionen der Passstifte auf der Chiphälfte mit Zellkammer. Nach dem Platzieren der Chiphälfte in der Halterung der Ultraschallschweiß-Maschine wurde mit dieser der Triggerpunkt angefahren und dabei Amboss, Chiphälfte sowie Sonotrode planparallel zueinander ausgerichtet.

Anschließend wurde die jeweilige Membran auf die Chiphälfte mit Zellkammer gelegt. Mit optimierten Parametern war es teilweise möglich, die Membranen durch Ultraschallschweißen mit den Chiphälften mit Zellkammer zu verbinden. Die Schweißnaht war jedoch nie durchgehend und die Membranen ließen sich mit geringer Kraft wieder von der Chiphälfte abtrennen.

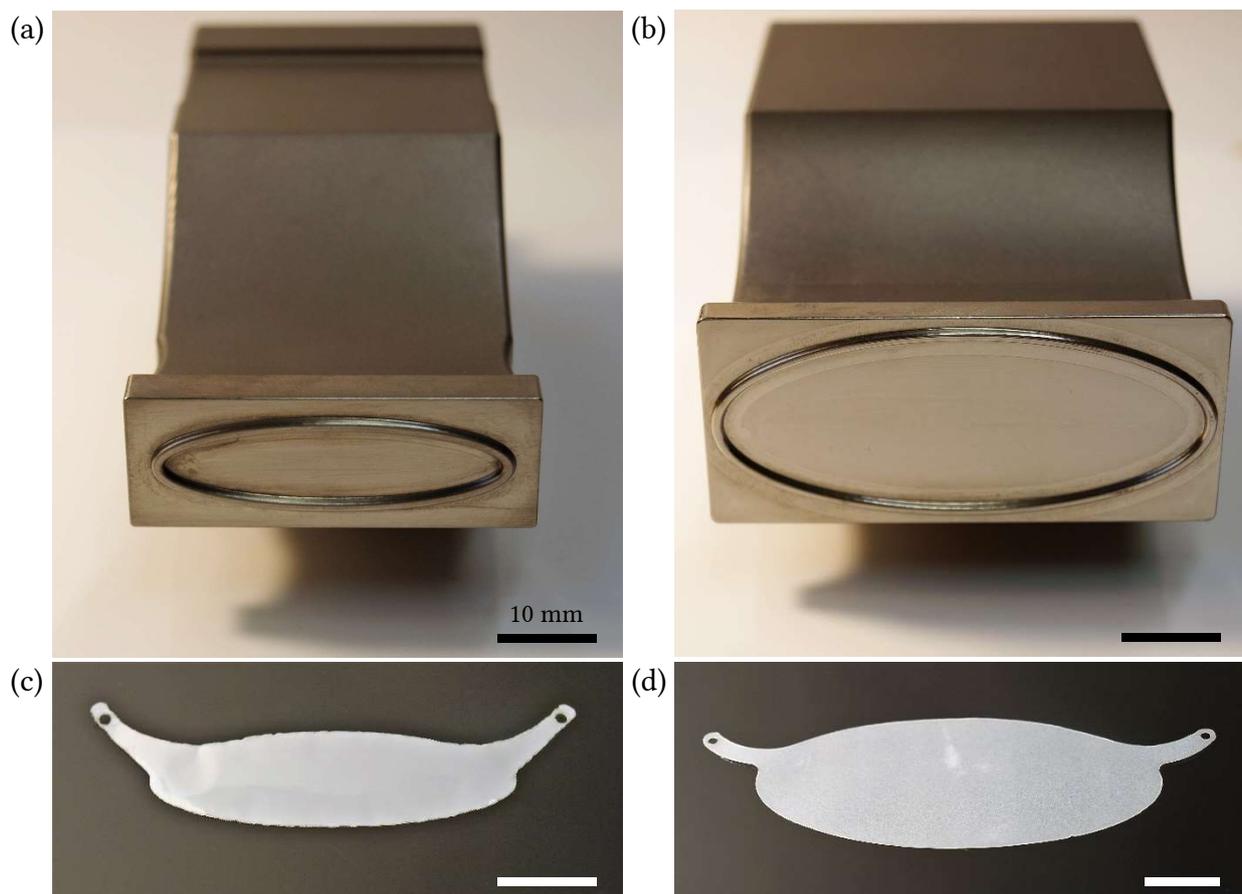


Abbildung 51: Strukturierte Sonotroden zum Ultraschallschweißen der Membranen auf die Chiphälfte mit Zellkammer. (a) Sonotrode für die Membranen des 100 µl-MBR, (b) Sonotrode für die Membranen des 800 µl-MBR, (c) Membranzuschnitt für den 100 µl-MBR, (d) Membranzuschnitt für den 800 µl-MBR. Der Maßstabsbalken ist einheitlich 10 mm.

Erst durch Ergänzung um eine weitere Lage des PET-Gewebes SEFAR PETEX® 07-105/52 mit 105 µm Maschenweite und 63 µm Dicke (Sefar AG, Schweiz) [141] konnten die Membranen mit der Chiphälfte mit Zellkammer verbunden werden. Mit der gitterförmigen Ausrichtung des Gewebes und dem wie in Abbildung 52 gezeigten runden Querschnitt der einzelnen Gewebefäden (Kett- und Schussfäden) ist eine Matrix an Auflagepunkten vorhanden, die wie zahlreiche „miniaturisierte“ ERG agieren.

Die Kontur der Gewebelage wurde an die Kontur der jeweiligen Membran angepasst. Dabei betrug die Breite des PET-Gewebes 1,71 mm beim 100 µl- und 2,95 mm beim 800 µl-MBR. Die Breite richtete sich primär nach der Struktur der Sonotroden, welche jeweils 1,65 mm breit waren. Zum anderen wurde die Kontur der Zellkammer ausgespart, um in diesem Bereich eine freiliegende Membran zu erhalten. Daraus ergaben sich für den 100 µl- und den 800 µl-MBR die PET-Geweberinge in Abbildung 53 a-b.

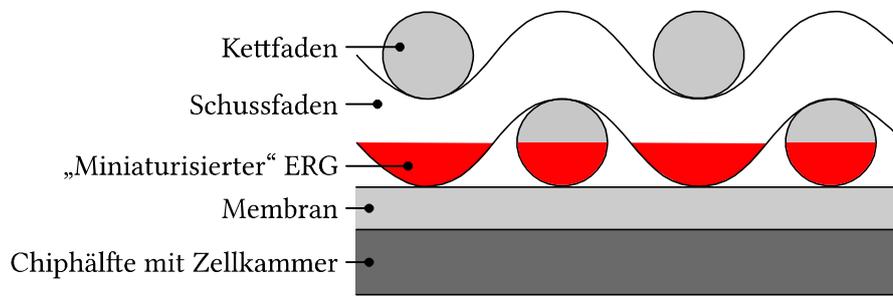


Abbildung 52: Querschnitt der Gewebelage aus PET. Die im Querschnitt runden Gewebefäden (Kett- und Schussfäden) agieren beim Verschweißen der 10-19 µm dünnen Membranen wie miniaturisierte ERG (rot).

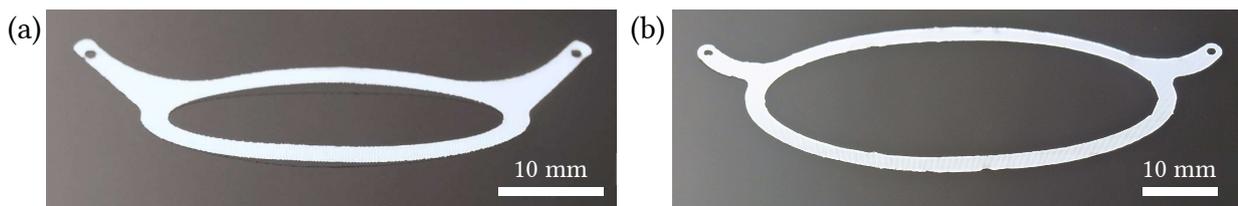


Abbildung 53: Zuschnitte der PET-Gewebe zur Unterstützung des Ultraschallschweißens der Membranen. (a) PET-Gewebering für den 100 µl-MBR, (b) PET-Gewebering für den 800 µl-MBR.

Das Ultraschallschweißen der Membranen mit dem PET-Gewebering generierte mit den in Tabelle 7 aufgeführten Parametern stabile Schweißnähte. Allerdings lag die Reproduzierbarkeit bei 10-20 %. In den meisten Fällen war die Schweißnaht noch nicht durchgängig, was auf eine unzureichende Planparallelität der Chiphälften mit Zellkammer zurückzuführen war. Deshalb war ein vorangestellter Teilschritt notwendig, in dem die Chiphälfte mit Zellkammer allein mit Ultraschall geprägt wurde. Dadurch war die Chiphälfte an der Position der Schweißnaht bereits planparallel zur strukturierten Sonotrode. Der Fügeweg s_f und die maximale Schweißzeit konnten somit im Vergleich zu den Werten in Tabelle 7 gesenkt werden und sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Optimierte Parameter zum Ultraschallschweißen der Membranen mit Vorprägen der Chiphälfte mit Zellkammer.

| Schweißparameter | 100 µl-MBR | | 800 µl-MBR | |
|------------------------|------------|-----------|------------|-----------|
| | Vorprägen | Schweißen | Vorprägen | Schweißen |
| Fügeweg s_f [mm] | 0,01 | 0,05 | 0,03 | 0,03 |
| Triggerkraft [N] | 250 | 250 | 200 | 200 |
| Schweißkraft F_s [N] | 250 | 250 | 200 | 200 |
| Amplitude A [µm] | 15,70 | 15,70 | 13,26 | 13,26 |
| Max. Schweißzeit [s] | 0,10 | 0,30 | 0,60 | 0,60 |

Im zweiten Teilschritt wurden Membran und PET-Gewebering mit der strukturierten Sonotrode auf die Chiphälfte mit Zellkammer ultraschallgeschweißt. Die Reproduzierbarkeit lag nunmehr bei zwischen 80-90 %. Entsprechende Protokolle des Ultraschallschweißens sind in Abbildung 96-97 und Abbildung 99-100 in Anhang F zu finden.

Der finale Ablauf zum Ultraschallschweißen der Membran auf die Chiphälfte mit Zellkammer ist schrittweise in Abbildung 54 a-f am Beispiel des 800 µl-MBR dargestellt. Die entsprechenden Protokolle des Ultraschallschweißens sind in Abbildung 98 und Abbildung 101 in Anhang F zu finden.

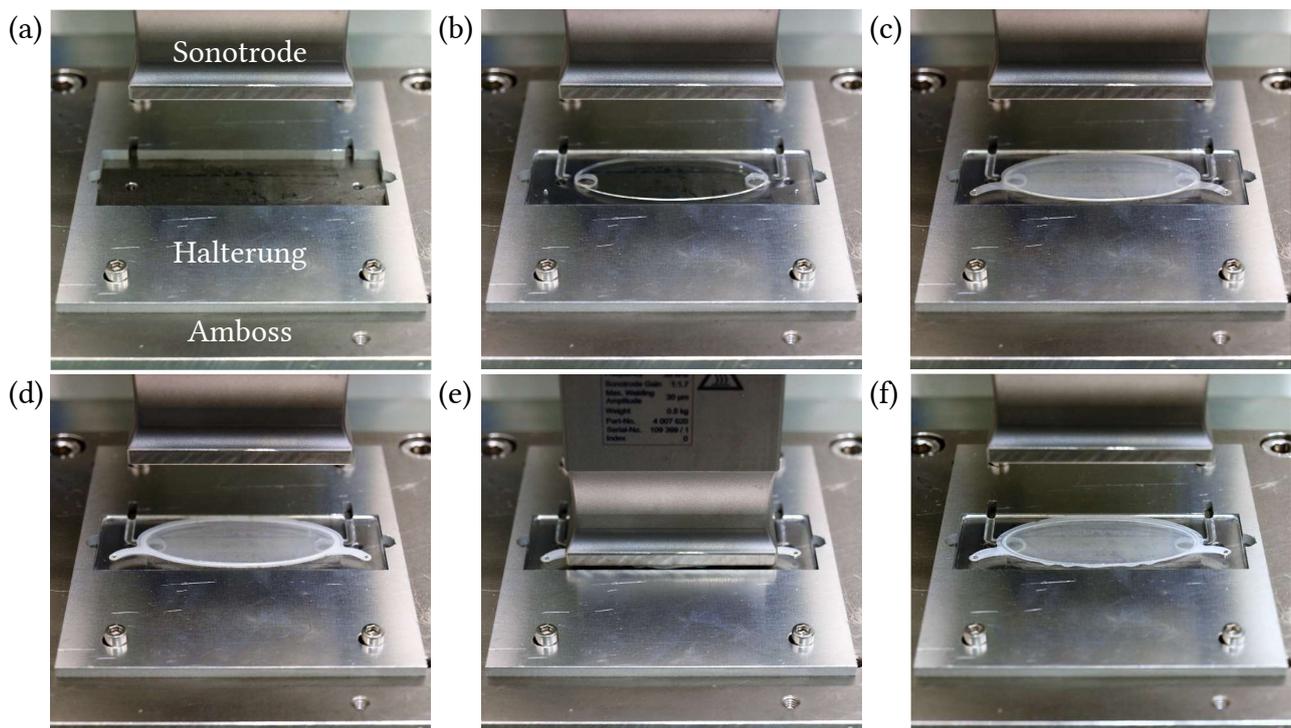


Abbildung 54: Schritte zum Ultraschallschweißen der Membranen mit dem PET-Gewebering auf die Chiphälfte mit Zellkammer, hier am Beispiel des 800 µl-MBR. (a) Ausrichten der Halterung auf dem Amboss, (b) Einlegen der Chiphälfte mit Zellkammer und Vorprägen, (c) Einlegen von Membran, (d) Eingelegen von PET-Gewebering, (e) Ultraschallschweißen aller Komponenten, (f) Chiphälfte mit aufgeschweißter Membran.

Die besten Ergebnisse wurden mit der PET-Membran mit Chiphälften aus PC und PET erzielt. Zudem ist die PC-Membran nicht transparent, weshalb diese nicht weiter ultraschallgeschweißt und für weitere Experimente verwendet wurde. In Abbildung 55 sind REM-Aufnahmen dieser Schweißnähte vom 100 μl - und 800 μl -MBR zu sehen, die eine erfolgreiche Verschweißung aufweisen. Die Aufnahmen zeigen die Ausschnitte der elliptischen Schweißnaht in den langen und kurzen Bereichen. Dabei ist zu erkennen, dass das Gewebe beim Ultraschallschweißen in die Membranlage eingedrungen ist und diese auf die Chiphälfte mit Zellkammer geschweißt hat. Membran und Gewebe sind neben der Schweißnaht unversehrt. Vor allem auf der Seite zur Zellkammer hin spielt dies eine wichtige Rolle für die Funktionalität, da es dort nicht zu einer Rissbildung oder Perforation kommen darf, durch die Pflanzenzellen in die Versorgungskammer gelangen könnten.

Wie stark die Membran durch diese Weise der Integration in den 100 μl - und den 800 μl -MBR Falten bildete, wurde durch die Messung des Oberflächenprofils ermittelt. Die Messung erfolgte wie in Abbildung 56 a-b gezeigt entlang der kurzen Seite quer durch die Mitte, da sich die Falten in dieser Richtung ausbildeten. Dazu wurden die Chiphälften mit ultraschallgeschweißter Membran unter dem Mikroskop KEYENCE VHX-6000 (KEYENCE Corporation, USA) analysiert. Für die Analyse der 800 μl -MBR mussten jeweils 2 Aufnahmen gemacht werden, die durch Stitching verbunden wurden. Alle Oberflächenprofile des 100 μl -MBR sind in Abbildung 56 c, die des 800 μl -MBR in Abbildung 56 d dargestellt.

Beim 100 μl -MBR wurde bei den Chiphälften aus PC eine durchschnittliche Höhendifferenz von 243,9 μm und bei denen aus PET von 591,0 μm gemessen. Beim 800 μl -MBR lag die durchschnittliche Höhendifferenz der Chiphälften aus PC bei 806,4 μm und aus PET bei 987,4 μm . Daraus geht hervor, dass die Welligkeit bei den MBR aus PC immer geringer war. Bei den Chiphälften aus PET war die Welligkeit vermutlich deshalb höher, da Membran und Gewebe ebenfalls aus PET sind. Zwar konnten alle Komponenten miteinander verschweißt werden, jedoch war die Verspannung bei PET höher, welche wiederum zu einer stärkeren Faltenbildung führte. Dies lässt den Schluss zu, dass sich PC in diesem speziellen Fall als schallhärteres Material besser eignet.

Bei einer Gesamthöhe der Kammern von 1,0 mm beim 100 μl -MBR und 1,5 mm beim 800 μl -MBR bedeutet dies, dass das Ziel der reduzierten Faltenbildung nur bedingt umgesetzt werden konnte. Zusätzliche Stützstreben quer durch die Zellkammer hätten die Membran gegen Faltenbildung in die Zellkammer hinein schützen können. Allerdings hätten diese zusätzlichen Strukturen beim Ultraschallschweißen nur für zusätzliche Reibung mit der Membran sorgen können, wodurch diese beschädigt worden wäre.

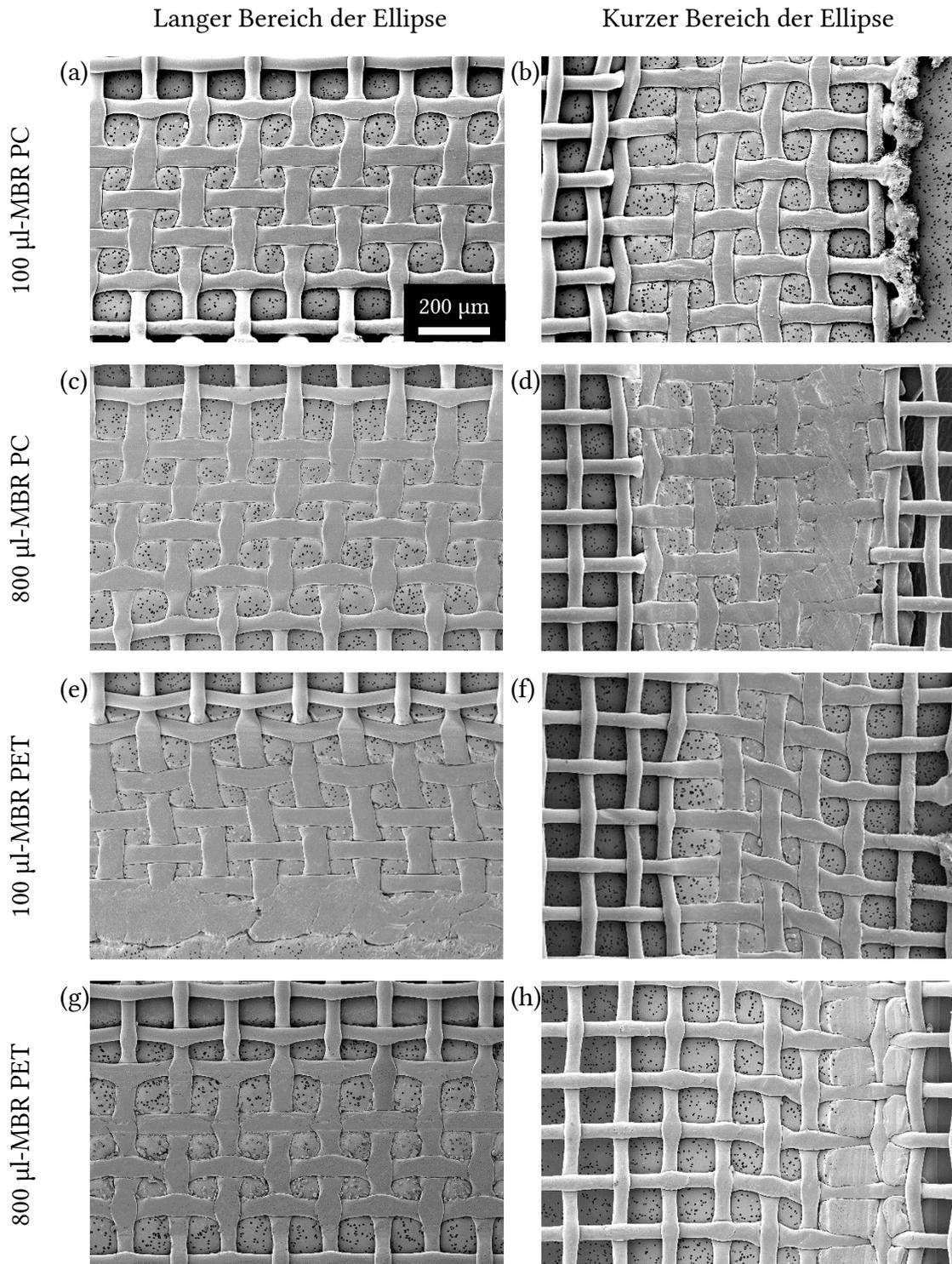


Abbildung 55: REM-Aufnahmen der Schweißnähte vom Ultraschallschweißen von Membran und PET-Gewebering auf die Chiphälfte mit Zellkammer. (a-b) Schweißnaht am 100 μl -MBR aus PC, (c-d) Schweißnaht am 800 μl -MBR aus PC, (e-f) Schweißnaht am 100 μl -MBR aus PET, (g-h) Schweißnaht am 800 μl -MBR aus PET. Der Maßstabsbalken 200 μm gilt für alle Aufnahmen.

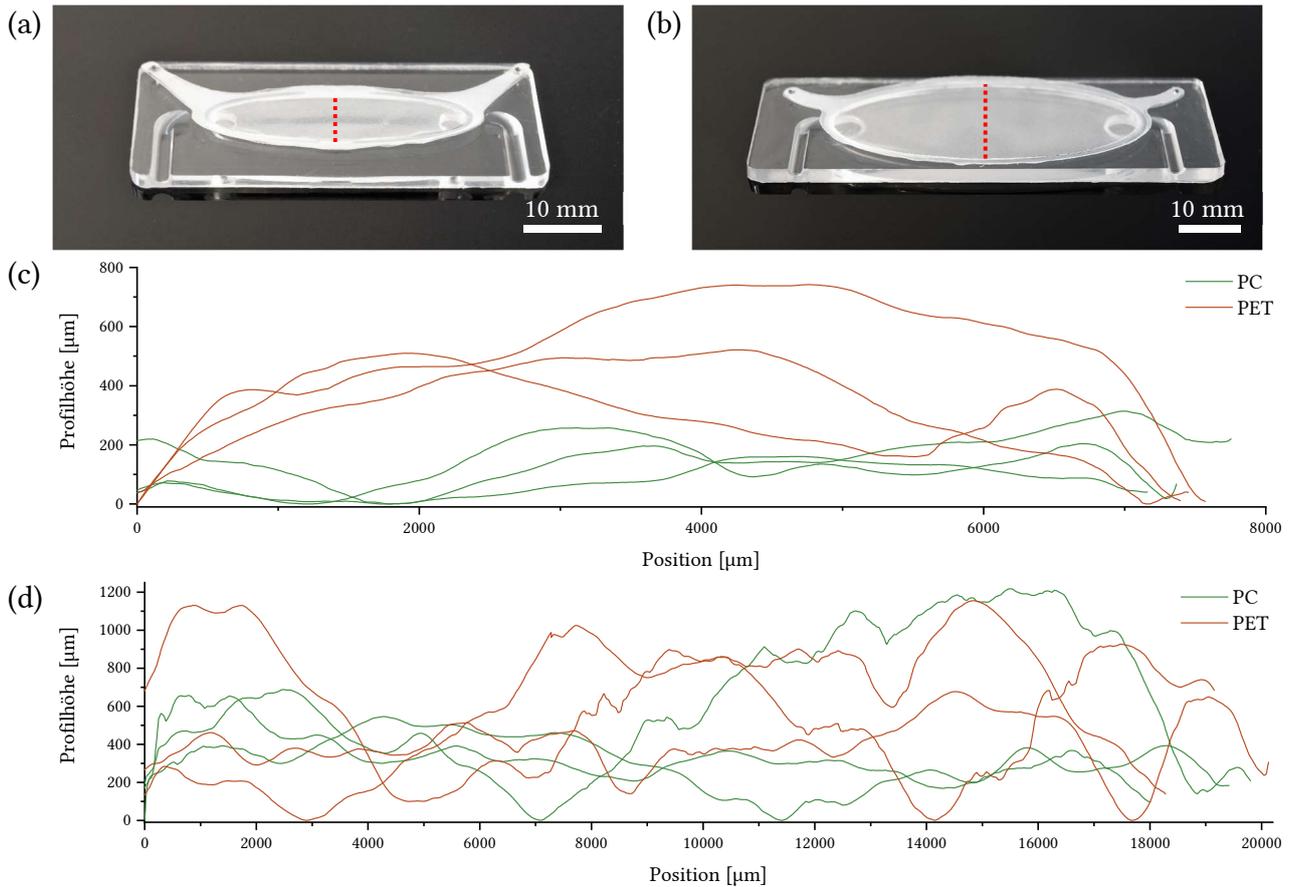


Abbildung 56: Analyse der Oberflächenprofile der faltigen Membranen. (a-b) Aufnahmen der Chiphälften mit Zellkammer, bei denen die PET-Membran mit PET-Gewebe ultraschallgeschweißt wurde. Die roten, gestrichelten Linien zeigen die vermessene Strecke. (c) Messungen des 100 µl-MBR, (d) Messungen des 800 µl-MBR.

4.5.2 Fügen der Chiphälften

Der zweite Schritt bestand aus dem Ultraschallschweißen der Chiphälfte mit Versorgungskammer auf die andere Chiphälfte und die gleichzeitige fluidische Kontaktierung. Dazu wurde anstelle der strukturierten Sonotrode eine flache Sonotrode verwendet. Die Chiphälfte mit Zellkammer, auf welcher sich bereits Membran und Gewebe befanden, wurde als erstes in die Halterung gelegt. Wie Abbildung 57 a zeigt, wurden Stahlkapillaren in die Schlauchanschlüsse gesteckt, um deren Innenkanal vor Verstopfung durch das Ultraschallschweißen zu schützen. Anschließend wurden die Schlauchanschlüsse mit einer Hälfte in den fluidischen Kanälen platziert. Die andere Hälfte ragte in die Aussparungen der Halterung in Abbildung 57 b.

Nach dem Einlegen der Chiphälfte mit Versorgungskammer in Abbildung 58 a wurden alle Komponenten mit den in Tabelle 9 aufgeführten Parametern wie in Abbildung 58 b-c dargestellt verschweißt. Beim 800 µl-MBR war ein höherer Fügeweg und eine höhere Triggerkraft notwendig, da die Länge des ERG beim 800 µl-MBR mit 172,7 mm um 42 % größer war als beim 100 µl-MBR mit 121,2 mm. Die fertiggestellten MBR sind in Abbildung 58 e-f festgehalten.

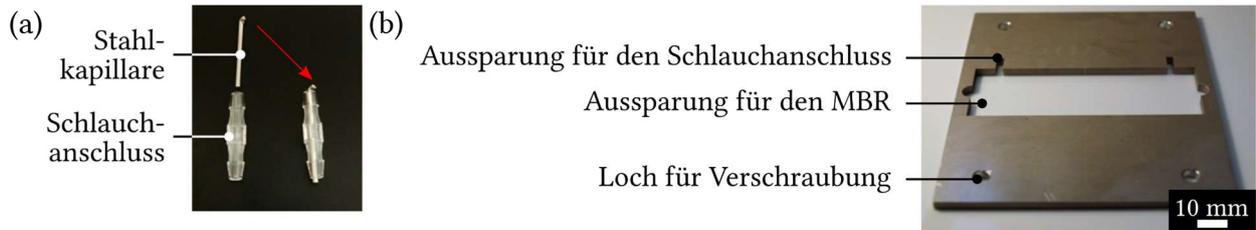


Abbildung 57: Vorbereitung für das Ultraschallschweißen der Chiphälften und der Schlauchanschlüsse. (a) Einstecken von Stahlkapillaren in die Schlauchanschlüsse vor dem Ultraschallschweißen, (b) Halterung zum Ultraschallschweißen, hier am Beispiel des 800 μl -MBR.

Tabelle 9: Parameter zum Ultraschallschweißen der beiden Chiphälften und der Schlauchanschlüsse.

| Schweißparameter | 100 μl -MBR | 800 μl -MBR |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| Fügeweg s_f [mm] | 0,27 | 0,41 |
| Triggerkraft [N] | 300 | 500 |
| Schweißkraft F_s [N] | 300 | 300 |
| Amplitude A [μm] | 21,94 | 21,94 |
| Max. Schweißzeit [s] | 1,00 | 1,00 |

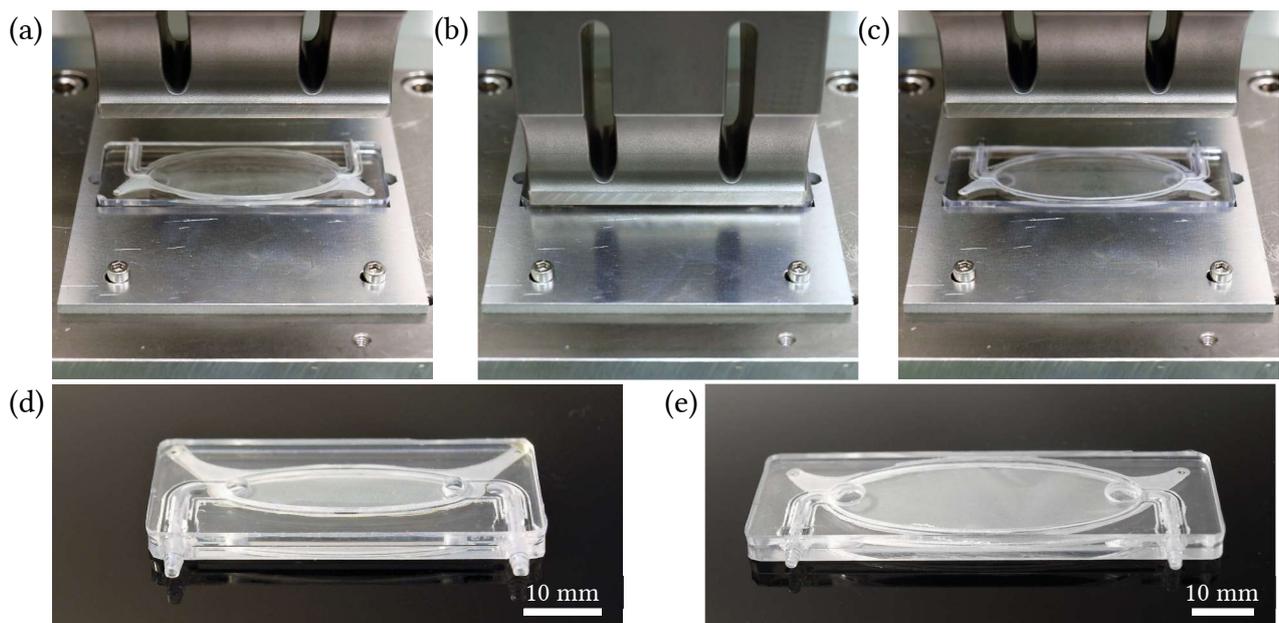


Abbildung 58: Schritte zum Ultraschallschweißen der Chiphälften und der Schlauchanschlüsse. (a) Einlegen aller Komponenten, hier am Beispiel des 800 μl -MBR, (b) Ultraschallschweißen, (c) verschweißter 800 μl -MBR, (d) ultraschallgeschweißter 100 μl -MBR, (e) ultraschallgeschweißter 800 μl -MBR.

Die Schweißnähte der 100 μl - und 800 μl -MBR aus PC und PET wurden unter dem Mikroskop KEYENCE VHX-600 (KEYENCE Corporation, USA) optisch begutachtet. Als Beispiele sind in Abbildung 59 Ausschnitte mit der Schweißnaht an der Mitte der Zellkammer sowie der 90°-Biegung des fluidischen Kanals dargestellt. Als Kriterium für eine gute Schweißnaht galt dabei ein durchgehend transparenter Bereich.

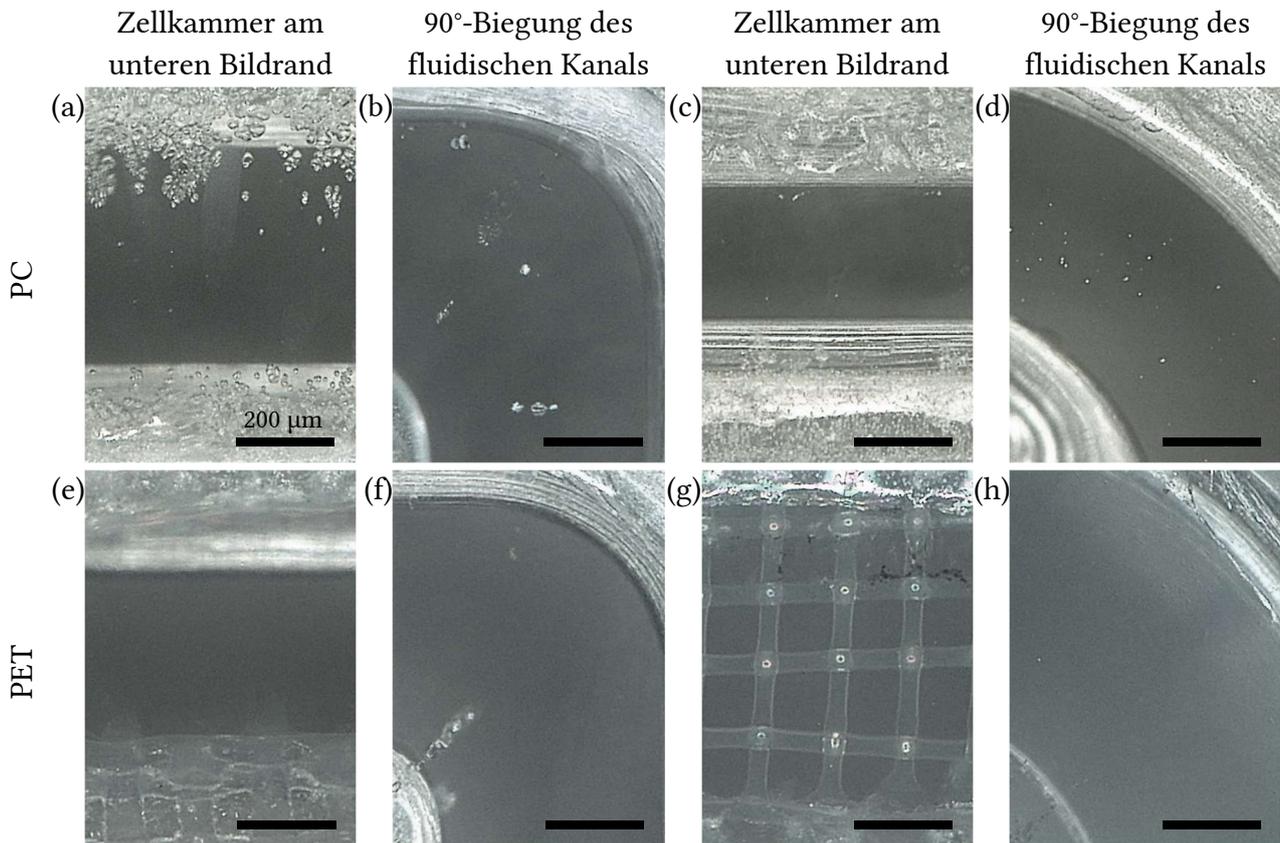


Abbildung 59: Mikroskopaufnahmen der Schweißnähte vom Ultraschallschweißen der 100 μl - und 800 μl -MBR aus PC und PET. (a-b) Schweißnaht am 100 μl -MBR aus PC, (c-d) Schweißnaht am 800 μl -MBR aus PC, (e-f) Schweißnaht am 100 μl -MBR aus PET, (g-h) Schweißnaht am 800 μl -MBR aus PET. Der Maßstabsbalken entspricht einheitlich 200 μm .

In allen vier Fällen konnte abgesehen von wenigen Blasen eine homogene und transparente Schweißnaht erzeugt werden. Allerdings kam es stellenweise zu einer unvollständigen Durchdringung des ERG durch Membran und Gewebe, wie es in Abbildung 59 g erkennbar ist. Dadurch waren die Chiphälften zwar trotzdem verschweißt, jedoch ließ dies auf eine beschränkte fluidische Dichtheit schließen (vgl. Kapitel 4.5.4.1).

Da der ERG aus PET schneller anschnolz, waren die Schweißnähte der MBR aus PET meistens breiter ausgeprägt. Wenn ohne die Schlauchanschlüsse ultraschallgeschweißt wurde, waren die Schweißnähte des MBR homogener ausgeprägt. Das Problem lag in den verschiedenen Stufen des Anschmelzens der verschiedenen ERG (vgl. Abbildung 19, Kapitel 2.6.1). Noch vor dem ERG der Chiphälfte mit Versorgungskammer mussten die radialen ERG der Schlauchanschlüsse an-

schmelzen. Da sich die Schlauchanschlüsse jedoch auf nur einer Seite des MBR befinden, brachte dies die Chiphälften für einen kurzen Moment in eine Schiefelage. Wie bereits erwähnt wurde versucht, dieses Problem durch eine hohe Triggerkraft zu vermindern, welche die Schlauchanschlüsse schon vor dem Ultraschallschweißen in die fluidischen Kanäle presste. Gleichwohl kam es zur Schiefelage und auch durch das Erhöhen von Schweißkraft, Schweißweg oder der Amplitude konnte dieses Problem nicht vollständig verhindert werden.

Abbildung 60 zeigt die Schweißnähte zwischen dem radialen ERG des Schlauchanschlusses und dem fluidischen Kanal in den Chiphälften. Dabei ist in Abbildung 60 b-c zu erkennen, dass der radiale ERG des Schlauchanschlusses bei den MBR aus PC vollständig mit den Chiphälften verschweißt wurde, da die Schweißnaht homogen ist. Wie Abbildung 60 d-e zeigen, kam es bei den MBR aus PET zwar zum Aufschmelzen des radialen ERG, jedoch konnte sich dieser aufgrund der verschiedenen Materialien PC und PET nicht homogen mit den Chiphälften verbinden. Nichtsdestotrotz waren keine freien Kapillaren vorhanden, welche zu einer Leckage führen könnten, wie es bei den Dosiernadeln in Kapitel 4.1.1.3 der Fall war.

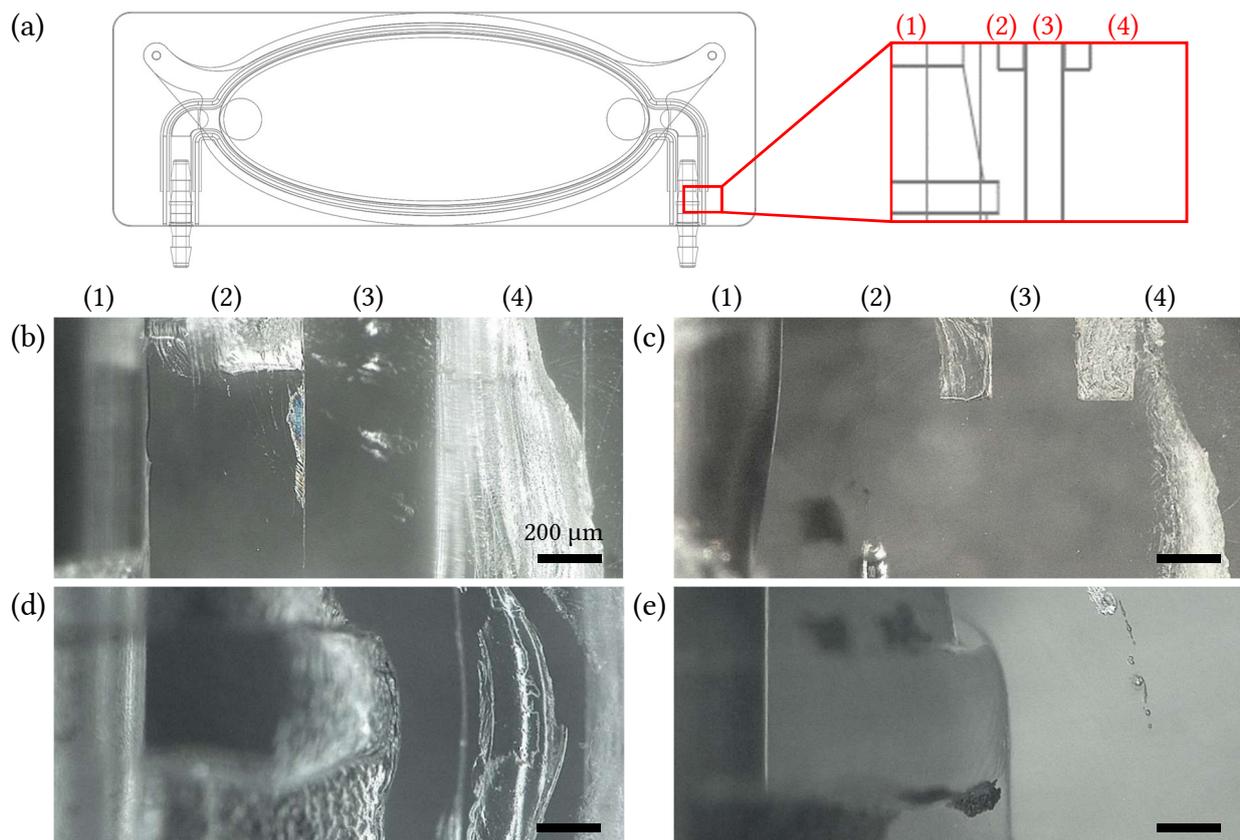


Abbildung 60: Mikroskopaufnahmen der Schweißnähte zwischen dem radialen ERG des Schlauchanschlusses und dem fluidischen Kanal in den Chiphälften der 100 µl- und 800 µl-MBR aus PC und PET. (a) Die vier Positionen stellen den Kanal des Schlauchanschlusses (1), den ehemals radialen ERG auf dem Schlauchanschluss (2), den ERG der Chiphälfte (3) und die auslaufende Schweißnaht (4) dar. (b) 100 µl-MBR aus PC, (c) 800 µl-MBR aus PC, (d) 100 µl-MBR aus PET, (e) 800 µl-MBR aus PET. Der Maßstabsbalken entspricht einheitlich 200 µm.

4.5.3 Reversibler Verschluss der Zellkammer

Wie in Kapitel 3.7 beschrieben, wurden zwei Varianten an Verschlüssen realisiert, mit denen die Öffnungen der Zellkammer reversibel verschlossen werden konnten. Die Stöpsel bestanden wie Schrauben aus einem breiteren Griff und aus einem dünnen Teil, der in die Öffnung der Zellkammer gesteckt wurde. Die Herstellung der Stöpsel erfolgte durch Abformung aus dem PDMS SYLGARD™ 184 (The Dow Chemical Company, USA) in einem aus Polymethylmethacrylat (PMMA) gefrästen Formeinsatz. Dazu wurden Binder und Härter im Gewichtsverhältnis 10:1 gemischt, für 5 min im Unterdruck entgast und bei ca. 65 °C für 1 h ausgehärtet. Die entformten Stöpsel sind mit dem Formeinsatz in Abbildung 61 a gezeigt.

Als Schraubverschluss kamen die in Abbildung 61 b dargestellten Zylinderschrauben aus Polyamid PA6.6 (Schrauben-Jäger AG, Deutschland) zum Einsatz, welche noch auf eine Gewindelänge von 3,5 mm gekürzt wurden. Als Dichtungsring wurde ein bei höheren Temperaturen im Autoklaven beständiger O-Ring aus Fluor-Kautschuk mit einem ID von 5 mm und einer Schnurdicke von 2 mm (Trelleborg AB, Schweden) verwendet. Alternativ wurde ein O-Ring aus PDMS hergestellt. Der aus PDMS gefertigte Dichtungsring ist in Abbildung 61 c mit dazugehörigem Formeinsatz dargestellt. Um den Schraubverschluss in die Öffnungen der Zellkammer im 800 µl-MBR einschrauben zu können, wurden die Öffnungen nach dem Heißprägen mit einem M6-Gewindebohrer mit entsprechendem Gewindegang versehen.

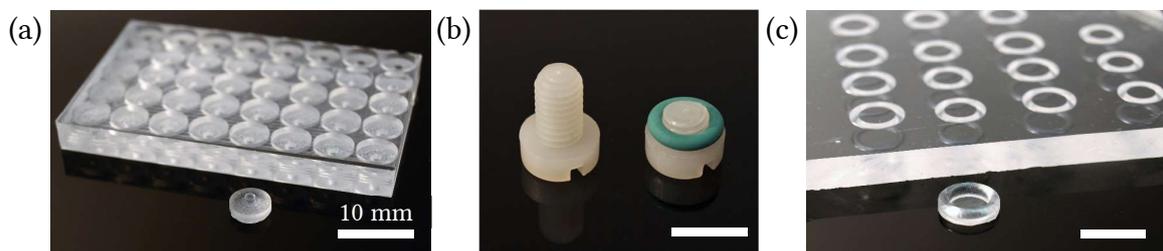


Abbildung 61: Reversible Verschlüsse für die Zellkammer der MBR. (a) Stöpsel aus PDMS und Formeinsatz, (b) Schraubverschluss aus Polyamid mit Dichtungsring aus Fluor-Kautschuk, (c) Dichtungsring aus PDMS und Formeinsatz. Der Maßstabsbalken entspricht einheitlich 10 mm.

4.5.4 Charakterisierung der fluidischen Eigenschaften

Die Qualität der Schweißnaht wurde wie in Kapitel 2.8.3 erläutert fluidisch charakterisiert, indem ein Leckagetest und die Aufzeichnung der Kennlinien des Drucks p über die Flussrate \dot{V} durchgeführt wurden.

4.5.4.1 Leckagetest

Beim Leckagetest wiesen die verschiedenen MBR unterschiedliche Maximaldrücke auf, welche in Abbildung 62 aufgetragen sind. Keine MBR-Variante zeigte einen höheren Maximaldruck als der 800 µl-MBR aus PET mit ca. 0,4 bar. Die Streuung der Messwerte war hoch im Vergleich zum

Mittelwert der jeweiligen Messreihe, was sich in der hohen Standardabweichung niederschlägt. Daher war eine zuverlässige Aussage über die MBR-Variante bezüglich deren Maximaldruck unmöglich und jeder MBR muss individuell betrachtet werden. Allerdings wäre ein ähnliches Ergebnis wie in Kapitel 4.1.1.3 zu erwarten gewesen.

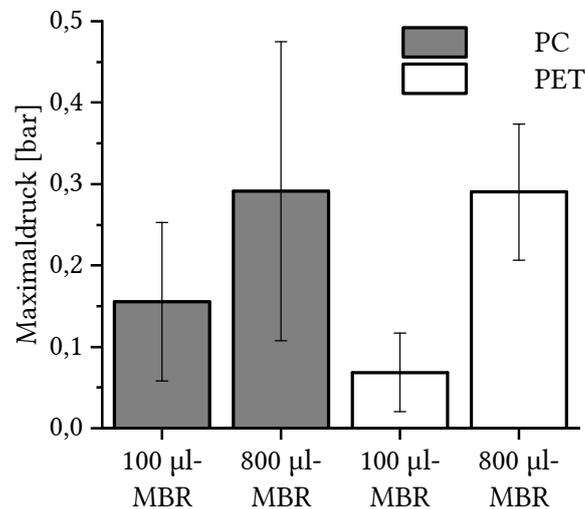


Abbildung 62: Messungen des maximal möglichen Drucks der MBR aus PC und PET.

Die Leckagen konnten durch eine Farblösung lokalisiert werden. Hierfür wurde in Abwandlung des in Kapitel 2.8.3 beschriebenen Verfahrens eine Farblösung mit in DI-Wasser gelöstem Farbstoff Orasol Red 335 (BASF SE, Deutschland) verwendet. Diese Farblösung wurde durch eine Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 1 ml/min in den jeweiligen MBR eingeleitet. In Abbildung 63 sind exemplarische Aufnahmen des Tests mit dem 100 µl-MBR aus PC unter dem Mikroskop zu sehen. Zu erkennen ist in Abbildung 63 a, dass im Bereich der Schlauchanschlüsse keine Farblösung austritt. Hingegen tritt die Farblösung im Bereich der Membran- und Gewebeausläufern aus, was in Abbildung 63 b-c veranschaulicht wird. Auch eine Optimierung der Kontur von Membran- und Gewebeausläufern führte zu keinem besseren Ergebnis.

Nur wenn die MBR ohne Membran und Gewebe ultraschallgeschweißt wurden, waren diese absolut dicht bis zu einem Druck von mind. 3,75 bar. Ein Lösungsansatz war die Erhöhung der Schweißkraft sowie des Schweißwegs. Dabei konnte jedoch entweder die Membran einreißen oder die fluidische Kontaktierung trotz Schutz mit Stahlkapillaren stark verengt werden. Zudem war die Schweißnaht in diesem Fall nicht mehr transparent, sondern es kam zu einer Blasenbildung und damit zu einer Materialdegeneration. Als weitere Möglichkeit hätten ein dünneres Gewebe oder ein anderes Gewebematerial verwendet werden können. Beides eignete sich wiederum nicht für die Membranintegration.

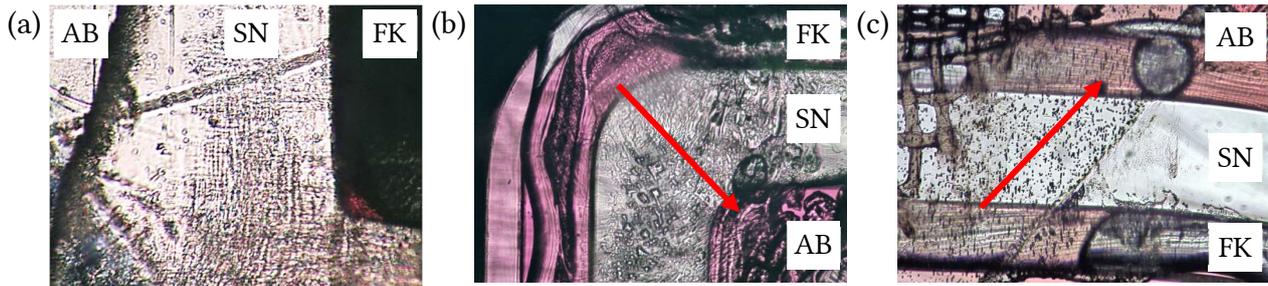


Abbildung 63: Leckagetest mit einer roten Farblösung, hier am Beispiel des 100 µl-MBR aus PC. (a) Dichte Schweißnaht (SN) zwischen Fluidkanal (FK) und Außenbereich (AB), (b-c) rote Pfeile symbolisieren den Austritt der Farblösung vom Fluidkanal in den Außenbereich an der Stelle der Membran- und Gewebeausläufern.

4.5.4.2 Kennlinie Flussrate-Druck

Für die Erstellung der Kennlinie für die Flussrate über den Druck wurden die 100 µl- und 800 µl-MBR getestet. Dabei wurden neben einzelnen MBR auch die Reihenschaltung von zwei gleichartigen MBR untersucht. Weiterhin wurden alle Versuche mit den beiden in Kapitel 3.10 genannten Betriebsmodi „Diffusionsbetrieb“ und „Durchströmungsbetrieb“ durchgeführt. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 64 mit dem gemessenen Druck p über die Flussrate \dot{V} aufgetragen.

Im gemessenen Bereich der Flussraten zwischen 0,5-30 ml steigt der Druck mit steigender Flussrate linear an. Die Kennlinien der 100 µl-MBR sind flacher als die der 800 µl-MBR. Da die von der Flüssigkeit zurückgelegte Strecke in den 100 µl-MBR kürzer ist, herrscht auch ein geringerer hydrodynamischer Widerstand, was sich wiederum in geringeren Drücke niederschlägt. Aus demselben Grund sind die Drücke bei Reihenschaltung des 100 µl- oder des 800 µl-MBR immer höher als im Einzelbetrieb.

Im Vergleich zwischen Diffusions- und Durchströmungsbetrieb ist auffällig, dass die Drücke bei Durchströmungsbetrieb durchgehend höher sind als die bei Diffusionsbetrieb. Da die Flüssigkeit beim Durchströmungsbetrieb durch die Membranporen strömen muss, ist dabei auch ein höherer Druck notwendig.

Eine Flussrate von 0,02 ml/min im Realbetrieb würde einen Druckanstieg im Bereich weniger mbar bedeuten, was für die Pflanzenzellen verschwindend gering ist. Zudem ist dieser Druckanstieg bei dieser Flussrate in Bezug auf den maximal möglichen Druck aus Kapitel 4.5.4.1 vernachlässigbar gering, sodass eine Leckage unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden konnte.

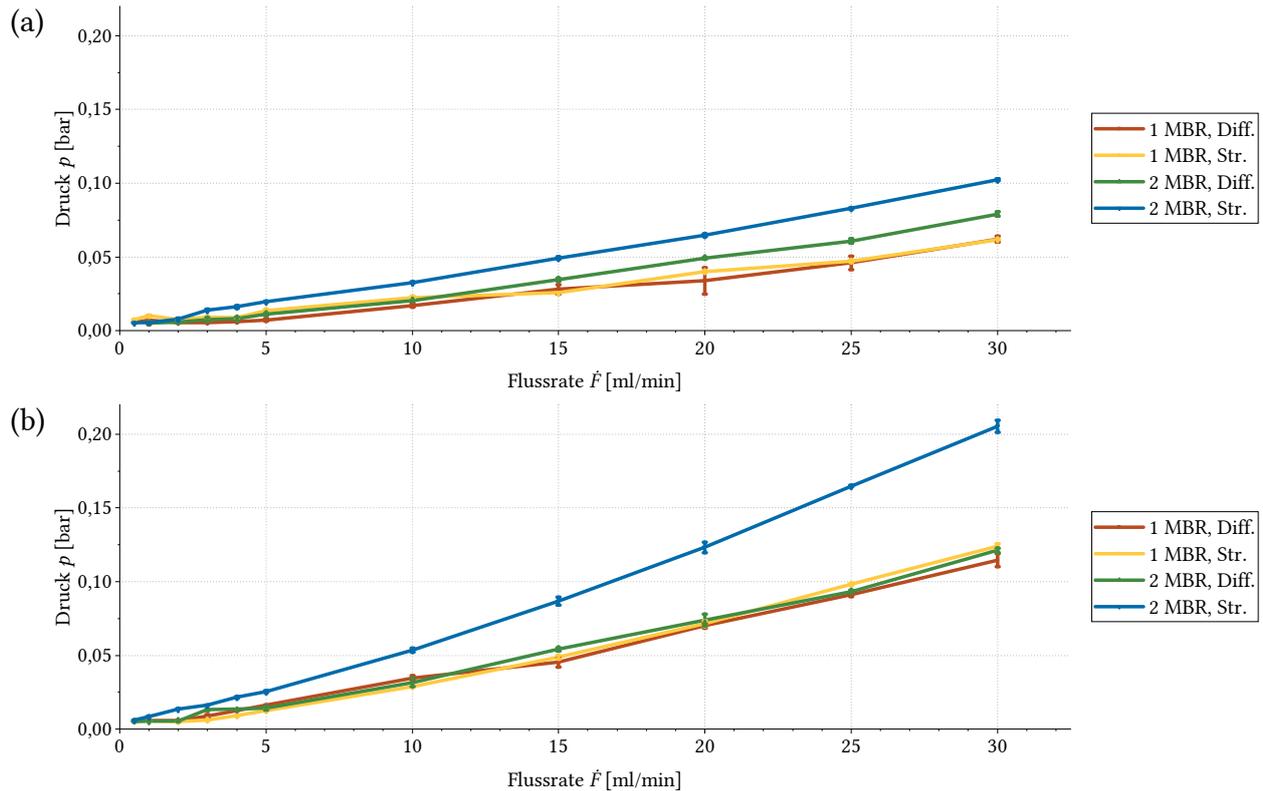


Abbildung 64: Kennlinien für den Druck p über der Flussrate \dot{F} im Diffusionsbetrieb (Diff.) und im Durchströmungsbetrieb (Str.) eines oder zweier MBR. (a) Kennlinien der 100 µl-MBR, (b) Kennlinien der 800 µl-MBR.

4.6 Laserdurchstrahlschweißen

Neben dem Ultraschallschweißen wurde das Laserdurchstrahlschweißen¹ mit den 800 µl-MBR getestet. Hierbei wurde einerseits versucht, die PET-Membran einzeln auf die Chiphälfte mit Zellkammer zu schweißen. Andererseits wurde getestet, den gesamten MBR in einem Schritt mit der PET-Membran zu verschweißen. Auf die Integration der fluidischen Kontaktierung musste verzichtet werden, da für die radiale Verschweißung der Schlauchanschlüsse eine 3D-Führung des Laserstrahls notwendig wäre.

Die Verschweißungen wurden mit der Lasermaschine OYSTER® (ACSYS Lasertechnik GmbH, Deutschland) und einem Laser mit einer Wellenlänge von 1,064 µm durchgeführt. Da alle Fügepartner für den Laser transparent sind, musste eine bei entsprechender Wellenlänge absorbierende Schicht angebracht werden. Diese wurde mithilfe des Clearweld®-Faserstifts LD940C (Clearweld, Gentex technology Corporation, USA) manuell aufgetragen. Der Bereich der Schweißnaht wurde mit diesem Stift markiert und getrocknet. Danach wurden die Fügepartner in der Lasermaschine auf einer Laborhebebühne von unten gegen eine Glasplatte gepresst. Durch diese Fügevorrichtung wurde das Anpressen der Fügepartner an deren Grenzflächen gewährleistet. Von oben wurde der

¹ Die Durchführung des Laserdurchstrahlschweißens mit dem Einstellen geeigneter Parameter erfolgte bei der memetis GmbH mithilfe von Lea Menken, Bahman Moradi und Dr. Christof Megnin.

Laserstrahl durch die Glasplatte in den MBR eingekoppelt und in der Beschichtung absorbiert. Die Betriebsparameter sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Parameter zum Laserdurchstrahlschweißen der 800 µl-MBR.

| Schweißparameter | Membran allein | MBR gesamt |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>Frequenz f [kHz]</i> | 1 000 | 1 000 |
| <i>Pulsdauer [ns]</i> | 200 | 200 |
| <i>Leistung [%]</i> | 80 | 80 |
| <i>Geschwindigkeit [mm/s]</i> | 750 | 750 |
| <i>Linienabstand [mm]</i> | 0,02 | 0,02 |
| <i>Wiederholungen [-]</i> | 4 | 2 |

Sowohl die Chiphälften aus PC als auch die aus PET ließen sich mit denselben Parametern mit der PET-Membran verschweißen. Bei den bloßen Verschweißungen der Membran wurde im Vergleich zu den des gesamten MBR eine doppelte Wiederholungsrate eingestellt. Der Grund war die Notwendigkeit einer größeren Fläche der Schweißnaht, um eine vergleichsweise höhere Stabilität der Membran zu erzeugen.

Wie in Abbildung 65 zu sehen ist, konnten die Chiphälften mit der Membran verschweißt werden, ohne dass die Strukturen des MBR beschädigt wurden. Die Detailaufnahmen in Abbildung 65 c-f zeigen die transparente Schweißnaht, in welcher die Membranporen durch das Verschweißen aufgeschmolzen wurden. Neben den Schweißnähten sind die Membranporen sichtbar und intakt.

Die Vorteile dieses Verfahrens waren, dass zum einen die Membran verspannungsfrei integriert werden konnte und zum anderen auf ERG und Drainagen verzichtet werden könnte. Nachteilig ist beim Laserdurchstrahlschweißen in diesem Fall der weitere Prozessschritt durch das Auftragen der Absorberschicht. Überdies ist der Schweißprozess als solcher mit ca. 3 min um ein Vielfaches länger als mit < 1 s beim Ultraschallschweißen. Nur durch Simultanschweißen könnte die Zeit verkürzt werden, was jedoch im Gegenzug einen apparativen Mehraufwand bedeutet oder noch teurere Maschinen erfordert.

Die durch Laserdurchstrahlschweißen gefügten MBR aus PC und PET wurden für Leckagetests analog zu den ultraschallgeschweißten MBR (vgl. Abbildung 63, Kapitel 4.5.4.1) mit Farblösung überprüft. Zum Durchströmen mit Farblösung wurden Schlauchanschlüsse in die Öffnungen in-plane eingeklebt (vgl. Kapitel 4.1.1.3). Dabei zeigten diese MBR im Vergleich zu den ultraschallgeschweißten MBR keinerlei Leckagen, wie es exemplarisch in Abbildung 66 a-c gezeigt wird.

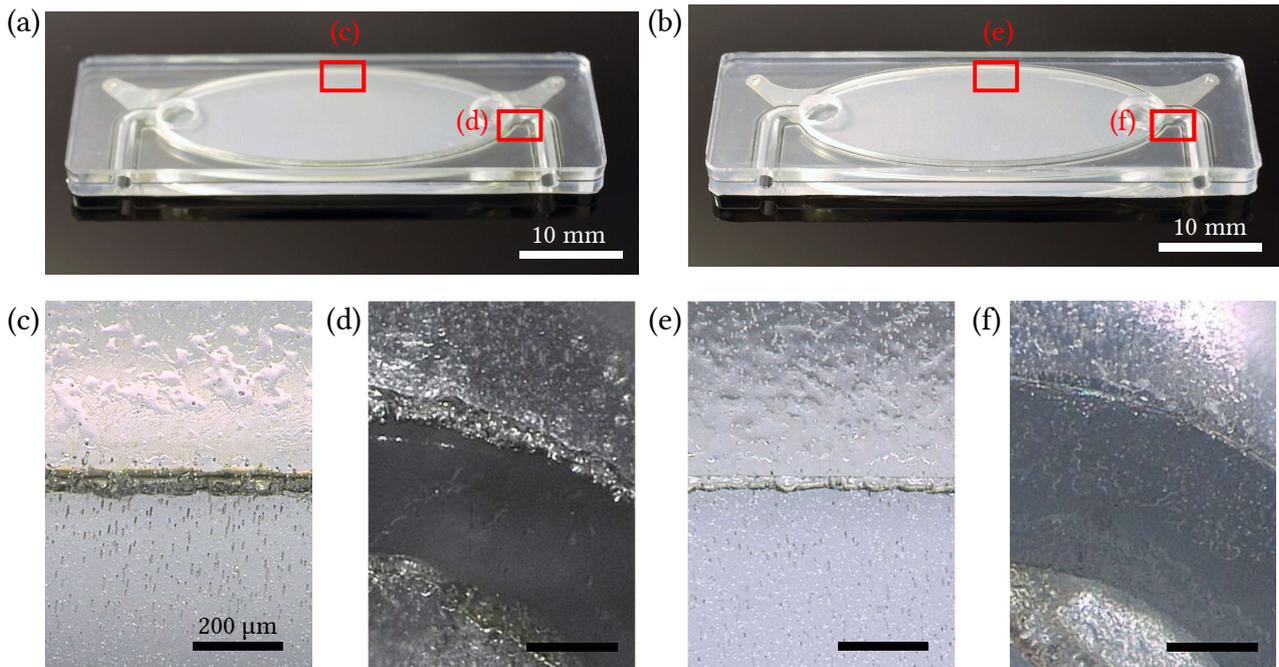


Abbildung 65: Durch Laserdurchstrahlschweißen gefügte 800 µl-MBR. (a) MBR aus PC, (b) MBR aus PET, (c) der obere Bildbereich stellt die transparente Schweißnaht der MBR aus PC dar, in welcher keine Membranporen mehr zu sehen sind, (d) die Schweißnaht des MBR aus PC ist an der 90°-Biegung ebenfalls transparent, (e-f) die Schweißnähte des MBR aus PET sind auch transparent. Bei diesen Bildern entspricht der Maßstabsbalken einheitlich 200 µm.

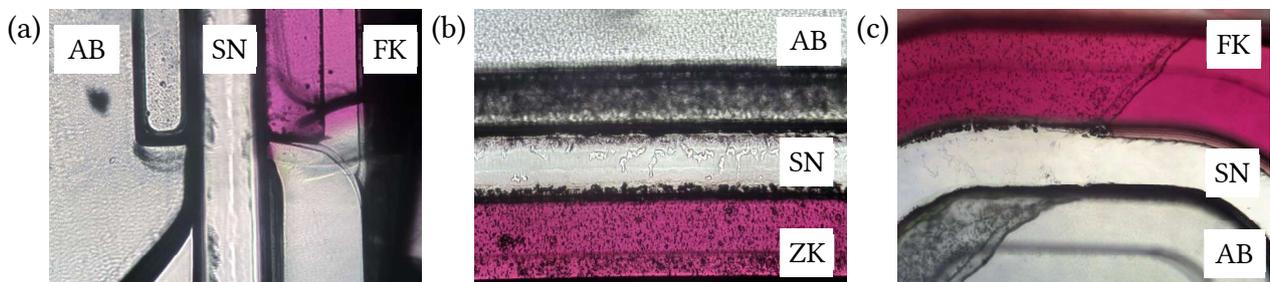


Abbildung 66: Leckagetest mit einer roten Farblösung bei den durch Laserdurchstrahlschweißen gefügten MBR. (a-c) Durchgehend dichte Schweißnaht (SN) zwischen Fluidkanal (FK) bzw. Zellkammer (ZK) und Außenbereich (AB).

4.7 Strukturierung der Membran

Zur Fixierung der Pflanzenzellen mit einer Gitterstruktur auf der Membran wurde versucht, das PET-Gewebe durch Laminieren oder Ultraschallschweißen auf die PET-Membran aufzutragen, da dieses Gewebe in vielen verschiedenen Größen erhältlich ist [141] und somit für individuelle Anforderungen auswählbar. Dabei war jedoch keine vollflächige Verbindung beider Lagen möglich.

Aufgrund dessen wurde zur Fertigung individueller und feiner Gitterstrukturen auf der Membran ein modifiziertes Elektrosplein-Verfahren eingesetzt, welches ausführlich in Jordahl et al. 2018 beschrieben wird und am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) am KIT verfügbar ist. Damit kann das biokompatible Polymer Polylactid-co-Glycolid (PLGA) in mosaikartigen Gerüststrukturen angeordnet werden. [142]

Erste Versuche zeigten, dass die Haftung der Polymerfäden auf der PET-Membran zuvor optimiert werden musste. Eine Chloroform-Lösung (Honeywell Specialty Chemicals Seelze, Deutschland) mit 35 %-iger (w/v) Massenkonzentration an PLGA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) wurde durch eine Kanüle mit einem ID von 0,25 mm und einer Flussrate von 1,5 µl/min direkt auf die PET-Membran aufgebracht. Die Auftraggeschwindigkeit betrug 2,5 mm/s. Anschließend wurde die beschichtete PET-Membran für 1 Woche im Vakuum aufbewahrt, um sicherzustellen, dass kein zelltoxisches Chloroform mehr vorhanden war.²

Die Mikrowells in der einlagigen Gitterstruktur besaßen bei einer quadratischen Grundfläche eine Kantenlänge von 300 µm. Die Anordnung erfolgte in einer Matrix von 50 · 50 Mikrowells. Wie in Abbildung 67 zu erkennen ist, ergaben sich fertigungstechnisch bedingt quadratische Mikrowells mit einer Kantenlänge von ca. 200 µm und einer Höhe von ca. 60 µm.

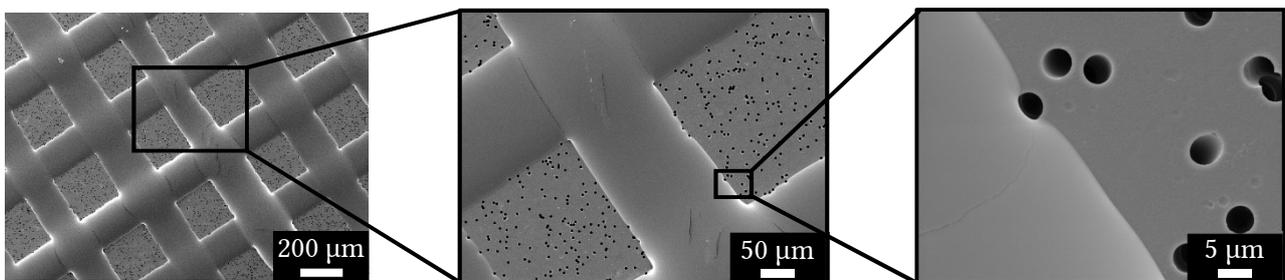


Abbildung 67: Strukturierung der Membran mit PLGA durch ein Elektrosplein-Verfahren. Mit freundlicher Genehmigung von Anke Steier, © Anke Steier, IFG, KIT, 2018.

Die PET-Membranen konnten analog zu den unstrukturierten Membranen in Kapitel 4.5.1 durch Ultraschallschweißen in die MBR integriert werden. Die Haftung des PLGA war ausreichend, sodass sich dieses nicht beim Ultraschallschweißen von der PET-Membran löste. Nachdem mehrere

² Die PET-Membranen wurden von Anke Steier am Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG) am KIT strukturiert und zur weiteren Verarbeitung bereitgestellt.

800 μl -MBR mit der strukturierten Membran gefertigt wurden, konnte eine Zellsuspension mit BY-2 hineingefüllt werden. Auch in wässriger Umgebung löste sich die Gitterstruktur nicht von der PET-Membran.

Abbildung 68 zeigt Aufnahmen dieser BY-2-Zellen in diesen Mikrowells, die mit einem Mikroskop Axio Imager Z1 (Carl Zeiss AG, Deutschland) erstellt wurden. Einzelne BY-2-Zellen sowie Zellaggregate konnten in die Mikrowells rutschen und nach der Observierung wieder ausgespült werden, ohne sich in den Mikrowells zu verfangen. Damit bietet diese Art der Membranstrukturierung ein großes Potential, um individuelle Mikrowells für Pflanzenzellen zu fertigen und diese für die Einzelzellanalyse zu verwenden.

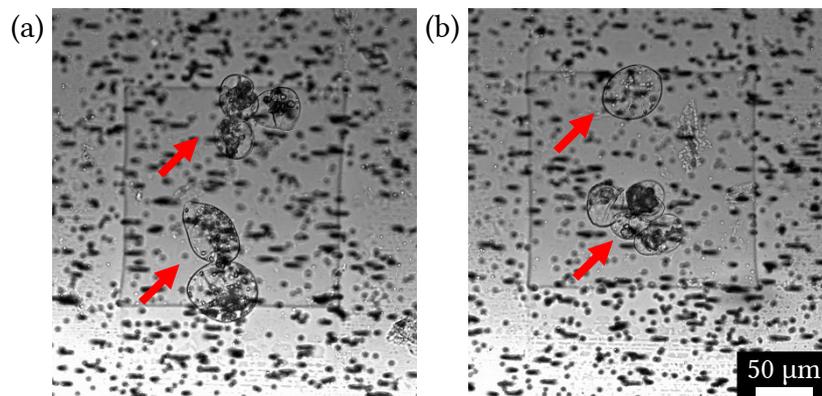


Abbildung 68: Beobachtung der BY-2-Zellen in den Mikrowells der strukturierten PET-Membran in den 800 μl -MBR. (a-b) Zwei exemplarische Stellen auf der strukturierten Membran, an denen die Zellaggregate (rote Pfeile) in die Mikrowells gerutscht sind.

5 Untersuchung des Diffusionsverhaltens an der Membran

Zur Untersuchung des Diffusionsverhaltens an der in die MBR integrierte PET-Membran wurde eine Analyse durch NMR-Spektroskopie durchgeführt, für die ein spezieller Messeinsatz entwickelt wurde. Parallel dazu wurde die Diffusion 2D-simuliert. Abschließend erfolgte ein Vergleich zwischen NMR-Analyse und Simulation.

5.1 NMR-Analyse

Eine Methode zur Bestimmung eines Diffusionskoeffizienten bzw. des Diffusionsverhaltens einer in Flüssigkeit gelösten Substanz stellt die sogenannte Stokes'sche Diaphragmazelle dar. Diese kann aus zwei durch eine poröse Membran getrennte Kammern bestehen, welche mit Lösungen unterschiedlicher Konzentration gefüllt werden. Nach Versuchsende können die Konzentrationen der Kammern gemessen und daraus der Diffusionskoeffizient abgeleitet werden. Ein Nachteil dieser Methode stellt die Notwendigkeit eines hohen Konzentrationsunterschieds dar. [40] Daneben sind in der Literatur auch Ansätze zur direkten Messung der Diffusionsrate von Maltose durch elektrochemische oder optische Detektion beschrieben [143, 144]. Da im Rahmen dieser Arbeit neben der Messung von Edukten die Messung weiterer Substanzen nicht ausgeschlossen wurde, kam eine allgemeinere Methode zum Einsatz. Wenn der Konzentrationsunterschied nicht hoch sein muss, bietet sich beispielsweise die Analyse durch NMR an [40].

Aufgrund dessen wurde ein Messaufbau für die Messung mit einem Micro 5-Probenkopf am NMR-Spektrometer AVANCE III HD mit 500 MHz und 11,74 T (Bruker Corporation, USA) entwickelt, bei dem sowohl verschiedene Membranen als auch verschiedene Substanzen auf ihr Diffusionsverhalten untersucht werden können. Dieser Messaufbau besteht aus einem speziellen Einsatz für NMR-Probenröhrchen (10 mm), welcher auf einem in Jenne 2018 beschriebenen Konzept basiert [145]. Dieser Einsatz spiegelt wie in Abbildung 69 a dargestellt die Messsituation an der Membran wider, welche Zell- und Versorgungskammer trennt. Dabei kann durch den Konzentrationsanstieg von Maltose in der Zellkammer dessen Signalanstieg gemessen werden. Versorgungs- und Zellkammerseite sind im NMR-Probenröhrchen zwei ausgedehnte Kammern. Dabei wird im Folgenden die Versorgungskammerseite als obere Kammer und die Zellkammerseite als untere Kammer bezeichnet. Die obere Kammer wurde mit Maltose-Wasser-Lösung und die untere Kammer ausschließlich mit Deuteriumoxid (D_2O) gefüllt. D_2O ist Wasser, bei dem die Wasserstoffatome im Atomkern neben einem Proton auch noch ein Neutron besitzen und dadurch dessen Spektrum im 1H -NMR verschwindet [110].

Damit die Diffusion von Maltose von der oberen in die untere Kammer beginnen kann, muss die Membran abgedichtet sein und zu Messbeginn gezielt freigelegt werden können (Abbildung 69 b).

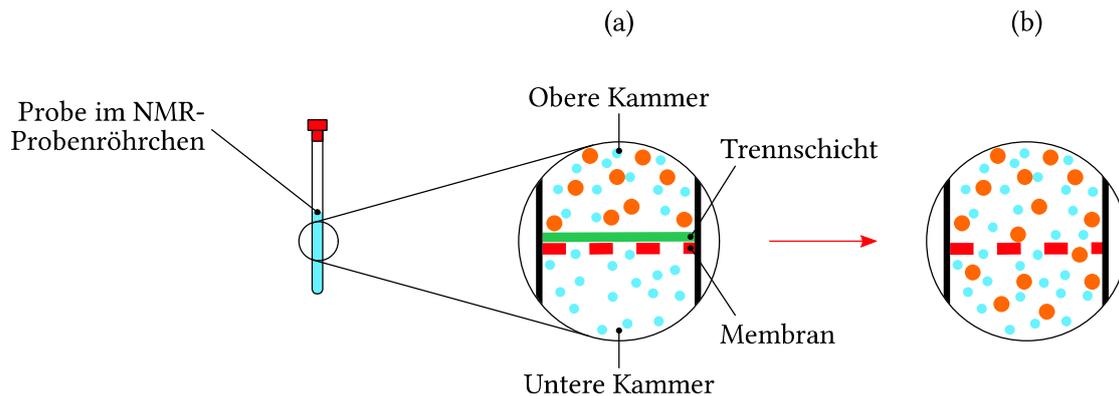


Abbildung 69: Versuchsaufbau mit speziellem Einsatz für ein NMR-Probenröhrchen. (a) Verhinderung der Diffusion zwischen oberer und unterer Kammer bis zu Versuchsbeginn durch eine Trennschicht, (b) Moleküle können nach Entfernen der Trennschicht durch die Membran diffundieren.

Der Einsatz musste reversibel in einem NMR-Probenröhrchen verbaut werden können und gegenüber dem Probenraum flüssigkeitsdicht abschließen. Um mit NMR messen zu können, dürfen die Werkstoffe das NMR-Signal der Probe nicht überlagern oder stören [110].

NMR-Röhrchen mit einem ID von 8 mm wurden aus Glas (Glasbläserei des Institutes für Katalysatorforschung und -technik, KIT, Deutschland) angefertigt. Die PET-Membran wurde mit dem Klebstoff Ultra Light-Weld® 1187-M (vgl. Kapitel 4.1.1.3) zwischen zwei Ringen aus dem PMMA-Typ POLYCASA CAST (3A Composites GmbH, Deutschland) fixiert. Im selben Schritt wurde als Trennschicht eine Folie aus thermoplastischem Polyurethan (TPU) 4119 A (Gerlinger Industries GmbH, Deutschland) in einen Spalt im oberen Ring eingeklemmt. Diese wurde nicht mit den anderen Komponenten verklebt, um sie später herausziehen zu können und dadurch die Membran zu Versuchsbeginn freizulegen. Durch die Elastizität der Folie dichtet sie bei Kompression zwischen Membran und einem am Oberteil integrierten Klemmring ab. Vor Versuchsbeginn wurde die Folie mit einer 0,26 mm dicken, reißfesten Schnur 100% Soft Fluoro Carbon (Savage Gear, Dänemark) verknotet. Diese Schnur führt durch den Probenraum aus dem NMR-Spektrometer heraus, sodass der beschriebene Mechanismus von außen betätigt werden kann.

Damit ein Kontakt von oberer und unterer Kammer an der Außenseite des Messeinsatzes verhindert wird und der Messeinsatz im NMR-Probenröhrchen befestigt werden kann, konnte der in Abbildung 61 c (vgl. Kapitel 4.5.3) vorgestellte Dichtungsring verwendet werden. Der Messeinsatz im NMR-Probenröhrchen wird schematisch in Abbildung 70 und als Foto in Abbildung 71 a gezeigt. Die entsprechenden technischen Zeichnungen der Komponenten für diesen Messeinsatz sind in Abbildung 102 in Anhang F zu finden.

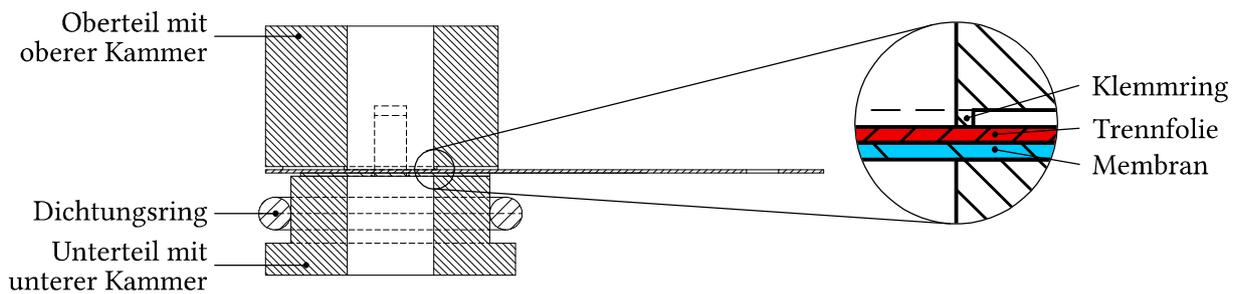


Abbildung 70: CAD-Querschnitt des Messeinsatzes mit herausziehbarer Trennfolie.

In Müller 2018 wurde in einem Vorversuch der Mechanismus einer herausziehbaren Trennfolie mit einem Tintenversuch visualisiert. Dabei wurde die untere Kammer mit DI-Wasser und die obere Kammer mit Tinte gefüllt, was in Abbildung 71 b zu sehen ist. Anschließend wurde die Trennfolie entfernt und die Tinte begann in die untere Kammer zu diffundieren, was durch die blaue Verfärbung in Abbildung 71 c veranschaulicht wird. [146]

Für einen realen Test im NMR-Spektrometer musste das gesamte NMR-Probenröhrchen gegenüber dem Probenraum wasserdicht sein. Dazu wurden aus flexiblem FLEX-Filament (REC, Russland) mit 3D-Druck Verschlüsse für beide Enden des NMR-Probenröhrchens gefertigt. Diese werden wie in Abbildung 71 d gezeigt nach dem Füllen auf beiden Seiten aufgesteckt. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass sich in der unteren Kammer keine Blasen im Bereich der Membran anlagern, welche die Diffusion vollständig unterbinden können. [146]

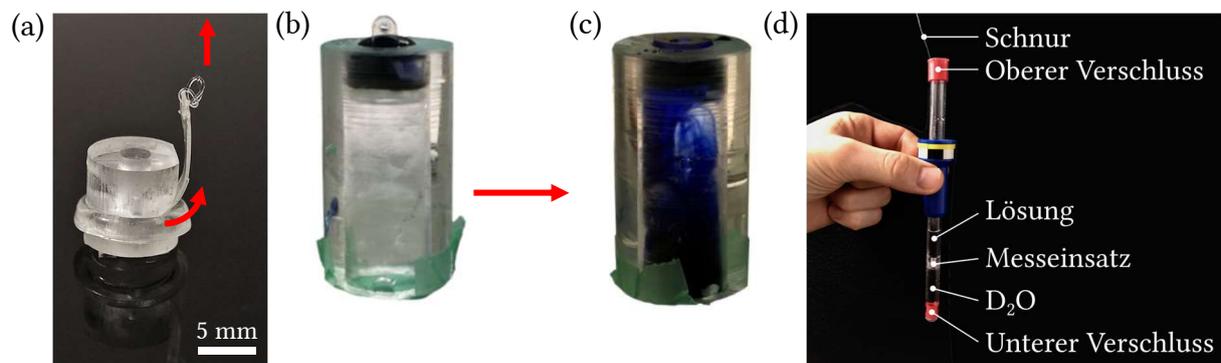


Abbildung 71: Verifizierung des Mechanismus der herausziehbaren Trennfolie. (a) Fertiggestellter Messeinsatz mit herausziehbarer Trennfolie, rote Pfeile deuten die Bewegungsrichtung der Trennfolie beim Herausziehen an, (b) nach Einsetzen in ein Probenröhrchen wurde die untere Kammer mit DI-Wasser und die obere Kammer mit Tinte gefüllt, (c) Tinte diffundiert nach Entfernen der Trennfolie in die untere Kammer, (d) mit einer Probelösung und D_2O gefüllter Messeinsatz vor dem Einfügen in den Probenraum im NMR-Spektrometer, mit freundlicher Genehmigung von Maximilian Müller, © Maximilian Müller, IMT, KIT, 2018. [146]

Für einen ersten Probelauf des Messeinsatzes im NMR-Spektrometer wurde als diffundierendes Medium 2-Propanol (VWR International, USA) getestet, da es wenige intensive und nicht vom Wasser überlagerte charakteristische Peaks im NMR-Spektrum aufweist. Nach Entfernen der Trennfolie diffundierte 2-Propanol von der oberen Kammer durch die PET-Membran in die untere Kammer mit D₂O. Dabei erschienen zwei für 2-Propanol charakteristische Peaks bei 3,9 ppm und 1,1 ppm, welche über die Zeitschritte 7 s und 448 s anstiegen, wie es in Abbildung 72 a zu sehen ist. Bei ca. 5,1-4,7 ppm liegt der Peak für D₂O und Wasser, welcher im Gegenzug zum Peak von 2-Propanol abnimmt.

Um die Diffusion von Maltose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) zu analysieren, wurde eine Maltose-Wasser-Lösung mit einer Maltose-Konzentration von 342 g/l (\approx 1 mol/l) hergestellt. Die Konzentration wurde um ein Vielfaches höher gewählt, als diese in dem entsprechenden Nährmedium für *T. chinensis* enthalten ist, um wie bei den Versuchen mit 2-Propanol ein eindeutig messbares Signal zu erhalten. Analog zu den Versuchen mit 2-Propanol wurde die Diffusion dieser Lösung im NMR-Spektrometer untersucht. Die NMR-Spektren sind in Abbildung 72 b zu den Zeitpunkten 0 s, 5 s und 595 s aufgetragen. Dabei sind zwei für Maltose charakteristische Peaks im Bereich von 5,6-5,2 ppm und von 4,2-3,2 ppm zu sehen, welche mit der Zeit ansteigen. Ebenso nahm der Peak von D₂O und Wasser zwischen ca. 5,1-4,7 ppm mit der Zeit zu, was vor allem am Wasseranteil der diffundierenden Maltose-Wasser-Lösung liegt. Nach 600 s war kein weiterer Anstieg der Peaks erkennbar. [146]

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Diffusion von Maltose durch die PET-Membran durch NMR-Spektroskopie verfolgt und qualitativ abgebildet werden konnte. Darüber hinaus bietet dieser Messeinsatz die Möglichkeit, die Diffusion weiterer Stoffe sowie andere Membranen zu untersuchen.

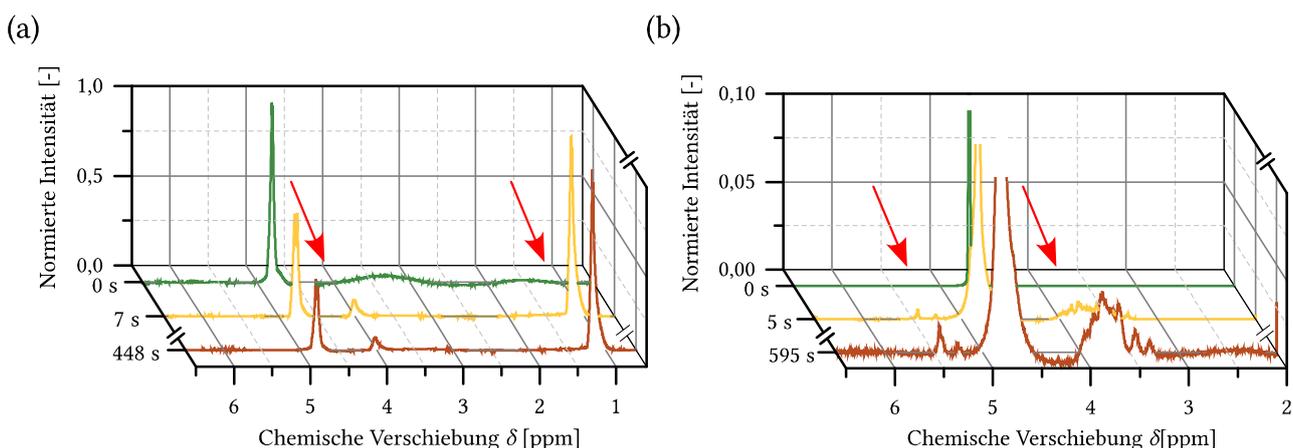


Abbildung 72: NMR-Spektren der Versuche mit 2-Propanol und Maltose vor Versuchsstart, unmittelbar nach Herausziehen der Trennfolie und zu Versuchsende. (a) Anstieg der für 2-Propanol charakteristischen Peaks, welche durch rote Pfeile markiert sind. (b) Anstieg der für Maltose charakteristischen Peaks, welche durch rote Pfeile markiert sind. Die Intensitäten wurden auf den Maximalwert der jeweiligen Messreihe normiert.

5.2 Simulation von Strömung und Diffusion im MBR

Die Simulation der Strömung zeigt die Strömungsprofile im 100 μl - und 800 μl -MBR auf und gibt Aufschluss darüber, ob die Zellen ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden. Zur Simulation von Strömung und Diffusion im 100 μl - und 800 μl -MBR wurde die Software COMSOL Multiphysics® mit den Modulen „Laminar Flow“ (laminare Strömung) und „Transport of Diluted Species“ (Transport verdünnter Stoffe) eingesetzt. Die Simulation der Durchströmung und der Diffusion wurde aufgrund begrenzter Rechenkapazität und -zeit nur in der x - z -Ebene entlang der Mitte (vgl. Abbildung 34, Kapitel 3.10) der 100 μl - und 800 μl -MBR durchgeführt. In beiden Fällen wurde nur die PET-Membran mit 5,0 μm -Poren betrachtet, da die PC-Membran mit 0,4 μm -Poren eine größere Porendichte besitzt. Dadurch würde die Geometrie komplexer, was wiederum die Rechenkapazität und -zeit erhöht. Als strömendes Medium wurde eine wässrige Lösung mit Maltose oder Saccharose angenommen und weitere gelöste Substanzen des Nährmediums wurden vernachlässigt. Maltose ist ein Zweifachzucker und das Substrat bei der Kultivierung von *T. chinensis*. Hingegen ist bei *C. roseus* und BY-2 das Substrat der Zweifachzucker Saccharose.

Das Vorgehen bei der Simulation erfolgte schrittweise, was in den folgenden Unterkapiteln beschrieben wird.

5.2.1 Erstellung der Geometrie

Die Geometrie kann entweder in COMSOL oder durch Importieren eines CAD-Modells erzeugt werden. Da in dieser Arbeit ausschließlich in 2D simuliert wurde, konnte die Geometrie in COMSOL aufgebaut werden. Die Höhen und Längen von Versorgungskammer, Zellkammer sowie Membran mit Membrandicke und Porenradius r waren gegeben. In der Literatur werden Membranen häufig als poröse Medien dargestellt. In dieser Arbeit hingegen wurde die Membran mit individuellen Poren geometrisch realitätsnäher abgebildet, was mehr Rechenleistung erfordert. [147-149] Dafür musste ausschließlich die Distanz L_{p-p} zwischen zwei Poren nachträglich ermittelt werden. Diese kann gemäß Chung et al. mithilfe folgender Formel berechnet werden. [147]

$$L_{p-p} = \sqrt{\frac{\pi r^2}{\sin(60)\varepsilon}} \quad (5.1)$$

Die Membranporosität ε ergibt sich unter der Annahme von senkrechten zylindrischen Poren durch:

$$\varepsilon = \frac{A_{\text{Poren}}}{A_{\text{Membran}}} = \frac{n_{\text{Poren}} \cdot \pi r^2}{A_{\text{Membran}}} \quad (5.2)$$

Dabei ist A_{Poren} die Porenfläche, A_{Membran} die Membranfläche und n_{Poren} die Porenanzahl bezogen auf die Membranfläche A_{Membran} . Zwar wird die Porosität ε vom Hersteller angegeben, allerdings nur mit Abweichungen von $\pm 15\%$ [119]. Deshalb wurde ein genauerer Wert für die Porosität ε anhand von REM-Aufnahmen der Membran in Abbildung 73 ermittelt. Als arithmetischer

Mittelwert für n_{Poren} ergaben sich dabei 116,7 Poren bezogen auf eine vermessene Membranfläche $A_{\text{Membran}} = 3,2927 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^2$ mit den Abmessungen $230,1 \mu\text{m} \cdot 143,1 \text{ mm}$. Aus (5.1) und (5.2) resultiert eine reale Porendistanz $L_{p-p} = 18,09 \mu\text{m}$ (im Vergleich zu $16,99 \mu\text{m}$ in der Herstellerangabe). Im 2D-Schnitt ergeben sich daraus 1749 Poren beim $100 \mu\text{l}$ -MBR und 2778 Poren beim $800 \mu\text{l}$ -MBR.

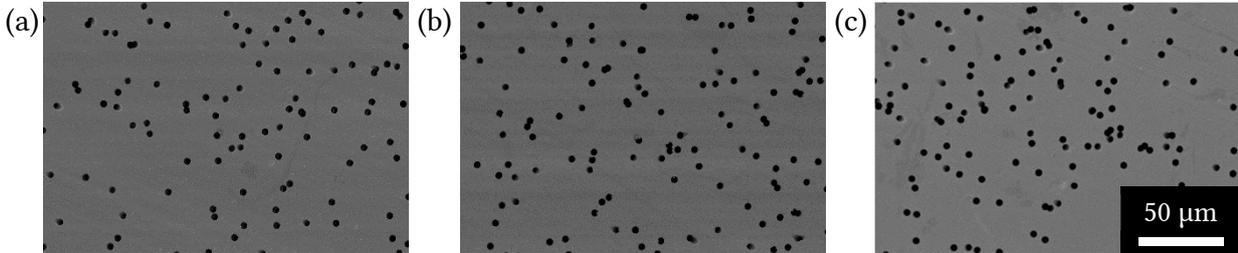


Abbildung 73: Mithilfe von REM-Aufnahmen ermittelte Porenanzahlen. (a) 120 Poren, (b) 126 Poren, (c) 104 Poren.

5.2.2 Auswählen des physikalischen Modells

Da Maltose und Saccharose in wässriger Lösung vorliegen, wird das Modell „Transport verdünnter Spezies“ verwendet. Im Modell wird als Ausgangslage eine mit Wasser gefüllte Zell- und Versorgungskammer angenommen. Zum Zeitpunkt t_0 strömt die Maltose- bzw. Saccharose-Wasser-Lösung in die Versorgungskammer ein.

Die Diffusionskoeffizienten wurden für die Simulation mit der Stokes-Einstein-Gleichung aus Formel (2.5) berechnet. Als Temperatur T_0 wird eine Raumtemperatur von $21 \text{ }^\circ\text{C}$ ($294,15 \text{ K}$) angenommen. Die Viskositäten $\eta_{\text{Maltose,Wasser}}$ und $\eta_{\text{Saccharose,Wasser}}$ der Maltose- und Saccharose-Wasser-Lösung mit einer Konzentration von 10 g/l Maltose und 30 g/l Saccharose wurden am Rheometer RheoStress 300 (ThermoHaake®, Deutschland) mit einer konischen Titanplatte (60 mm Durchmesser, 1° , $52 \mu\text{m}$ Spalt) mittels Dreifachbestimmung gemessen. Bei T_0 ergibt sich für die Maltose-Wasser-Lösung eine Viskosität $\eta_{\text{Maltose,Wasser}} = 0,9971 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ und für die Saccharose-Wasser-Lösung eine Viskosität $\eta_{\text{Saccharose,Wasser}} = 1,0277 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, welche zur Vereinfachung für den gesamten Konzentrationsbereich als konstant angenommen wurden.

Auf der Basis von Baker 2012 und Kashima et al. 2017 wurden die Molekülradien von Maltose und Saccharose auf $R_{\text{Maltose}} = 5,4 \text{ \AA}$ und $R_{\text{Saccharose}} = 5,5 \text{ \AA}$ geschätzt [150, 151]. Für die Diffusionskoeffizienten $D_{\text{Maltose,Wasser}}$ und $D_{\text{Saccharose,Wasser}}$ folgt dafür aus (2.6):

$$D_{\text{Maltose,Wasser}} = \frac{k_B T_0}{6\pi\eta_{\text{Maltose,Wasser}} R_{\text{Maltose}}} = 3,9995 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}} \quad (5.3)$$

$$D_{\text{Saccharose,Wasser}} = \frac{k_B T_0}{6\pi\eta_{\text{Saccharose,Wasser}} R_{\text{Saccharose}}} = 3,8101 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^2}{\text{s}} \quad (5.4)$$

Mit den Molvolumina $\bar{V}_{Maltose} = 222,81 \text{ cm}^3/\text{mol}$ und $\bar{V}_{Saccharose} = 212,06 \text{ cm}^3/\text{mol}$ [152] folgt für die Diffusionskoeffizienten $D_{Maltose,Wasser}$ und $D_{Saccharose,Wasser}$ aus (2.7):

$$D_{Maltose,Wasser} = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(\varphi \tilde{M}_{Wasser})^{1/2} T_0}{\eta_{Maltose,Wasser} \bar{V}_{Maltose}} = 5,8267 \cdot 10^{-10} \frac{m^2}{s} \quad (5.5)$$

$$D_{Saccharose,Wasser} = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{(\varphi \tilde{M}_{Wasser})^{1/2} T_0}{\eta_{Saccharose,Wasser} \bar{V}_{Saccharose}} = 5,8237 \cdot 10^{-10} \frac{m^2}{s} \quad (5.6)$$

Diese Ergebnisse liegen im selben Größenbereich wie die in Kashima et al. 2017 sowie Shen 2018 und decken sich mit einer anderen Berechnungsmethode von Hisashi et al. 1969 [151, 153, 154].

Die Diffusionskoeffizienten nach Stokes-Einstein in (5.3) und (5.4) sind ca. $2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ kleiner als die Diffusionskoeffizienten nach Wilke-Chang in (5.5) und (5.6). Die Simulation der Diffusion wird mit den kleineren Werten aus (5.3) und (5.4) durchgeführt, um den langsameren Fall der Maltose- und Saccharose-Diffusion zu betrachten.

Die Flussrate \dot{F} , mit der die MBR in den biologischen Versuchen durchströmt werden, liegt bei $20 \mu\text{l}/\text{min}$. Für den hydraulischen Durchmesser d_h ergibt sich mit (2.3) bei einer Kanalhöhe $h = 0,5 \text{ mm}$ und einer Kanalbreite $b = 2,35 \text{ mm}$ am Eingang zur Versorgungskammer in den MBR ein Wert von $d_h = 0,8246 \text{ mm}$. Die aus der Kanalgeometrie und der Flussrate abgeleitete mittlere Strömungsgeschwindigkeit beträgt $\bar{v} = 2,8369 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$. Aus Formel (2.2) resultiert mit der Dichte ρ von Wasser mit $997,99 \text{ kg}/\text{m}^3$ bei Raumtemperatur T_0 eine Reynoldszahl $Re = 2,3653 \cdot 10^{-7}$. Dadurch kann das Modell „Laminare Strömung“ eingesetzt werden.

5.2.3 Vernetzung und Lösung des Modells

Bei der Vernetzung eines Modells werden die Erhaltungsgleichungen auf kleine Flächen- (2D) oder Volumenelemente (3D) diskretisiert. Je feiner ein Modell vernetzt wird, desto genauer wird das Ergebnis. Hingegen wird die Rechenzeit dadurch verlängert und ein sinnvolles Abwägen zwischen gewünschter Genauigkeit und Rechenzeit ist notwendig. [155] Die minimale Elementgröße des Netzes muss zumindest kleiner als die kleinste Struktur sein, was in diesem Fall dem Porendurchmesser von $5 \mu\text{m}$ entspricht. In Richtung der Membranporen wird das Netz feiner, um diese Bereiche möglichst genau darzustellen. Auch nahe den Rändern muss das Netz feiner sein, um die Haftbedingung des Fluids detailgetreuer abzubilden.

Zur Lösung des Modells wurde eine zeitabhängige Berechnung mit einer Schrittweite von $0,5 \text{ s}$ und einer Gesamtdauer von 250 s durchgeführt. Als Solver wurde das Verfahren der Backward Differentiation Formulas eingesetzt, um eine Lösung der nicht-linearen Berechnung mit exakten Zeitschritten zu realisieren.

5.2.4 Simulation der Strömung

Die Ergebnisse der Simulation des Strömungsprofils mit der Maltose- und der Saccharose-Wasser-Lösung sind in Abbildung 74 a für den 100 μl -MBR und in Abbildung 74 b für den 800 μl -MBR zum Zeitpunkt 250 s dargestellt. Da die Viskositäten der Maltose- und der Saccharose-Wasser-Lösung trotz unterschiedlicher Konzentrationen sehr ähnlich sind, konnten beim Simulationsergebnis der Strömungsprofile in der Chipmitte keine sichtbaren Unterschiede festgestellt werden. Aufgrund dessen wird in jeder Abbildung nur jeweils ein für den 100 μl -MBR und ein für den 800 μl -MBR repräsentatives Ergebnis gezeigt.

Beide Strömungsprofile besitzen einen laminaren Charakter mit höherer Strömungsgeschwindigkeit v in der Mitte (in z -Richtung) der Versorgungskammer. Im 800 μl -MBR ist die maximale Strömungsgeschwindigkeit v in der Mitte (x - und z -Richtung) mit ca. $2,5 \cdot 10^{-4}$ m/s kleiner als im 100 μl -MBR mit $3,5 \cdot 10^{-4}$ m/s.

Gekoppelt an die Diffusion kommt es zu einer zusätzlichen Strömung in der Zellkammer. Dadurch ist dort die lokale Strömungsgeschwindigkeit $v > 0$ und liegt in der Mitte (x - und z -Richtung) bei ca. $7 \cdot 10^{-5}$ m/s beim 100 μl -MBR und $8 \cdot 10^{-5}$ m/s beim 800 μl -MBR. Eine lokale Strömungsgeschwindigkeit $v > 0$ trotz Membran stimmt mit vergleichbaren Berechnungen von Chung et al. überein [147]. Zudem decken sich diese Ergebnisse auch mit anderen Literaturwerten, welche einen vergleichbaren Aufbau aufweisen, aber auf einer anderen Berechnungsgrundlage basieren [148, 149].

Trotz gleichem Volumenstrom \dot{F} ist die lokale Strömungsgeschwindigkeit v in der Mitte des 800 μl -MBR in der Versorgungskammer um ca. $1 \cdot 10^{-4}$ m/s kleiner und in der Zellkammer ca. $1 \cdot 10^{-5}$ m/s höher als im 100 μl -MBR. Dies kann zum einen auf die größere Austauschfläche A_{Membran} und zum anderen auf den größeren hydraulischen Durchmesser der Zellkammer zurückgeführt werden. Beide Tatsachen führen beim 800 μl -MBR zu einem geringeren fluidischen Widerstand und folglich zu einer höheren Strömungsgeschwindigkeit v in der Zellkammer.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass eine Strömung an den Zellen scheren kann. Allerdings ist der Betrag dieser Strömung zu vernachlässigen. Zudem befinden sich die Zellen direkt über der Membran und dadurch nicht unmittelbar in der Mitte (z -Richtung) der Zellkammer, wo die lokale Strömungsgeschwindigkeit v am höchsten ist. Die geringe Durchströmung der Zellkammer fördert somit den Stofftransport im Nährmedium.

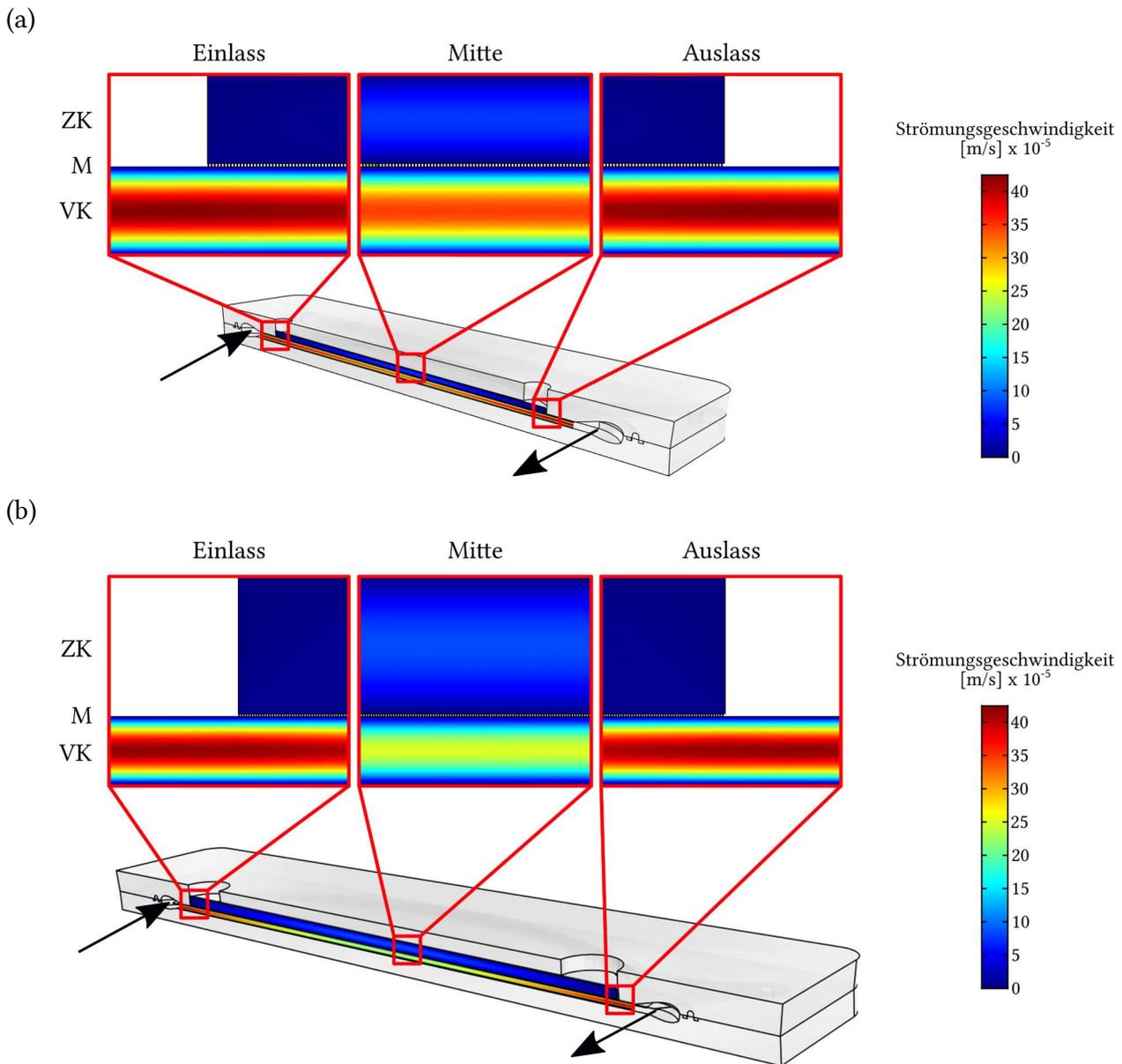


Abbildung 74: Ergebnisse der Strömungssimulation der Maltose- und der Saccharose-Wasser-Lösung zum Zeitpunkt von 250 s in der Mitte (x - z -Ebene) der MBR mit Zellkammer (ZK), Membran (M) und Versorgungskammer (VK). (a) Querschnitt des 100 μ l-MBR, (b) Querschnitt des 800 μ l-MBR.

5.2.5 Simulation der Diffusion durch die Membranporen

Die Simulationsergebnisse der Diffusion von Maltose sowie Saccharose im 100 μ l- und 800 μ l-MBR sind in Abbildung 75 a und in Abbildung 76 a zu den Zeitpunkten 10 s, 50 s und 250 s dargestellt. Wie auch bei der Simulation des Strömungsprofils decken sich hierbei die Ergebnisse von Maltose und Saccharose im Profil, lediglich die Konzentrationen als solche sind unterschiedlich.

Durch Diffusion aufgrund eines Konzentrationsgradienten dringen Maltose und Saccharose zwischen Versorgungs- und Zellkammer durch die Membranporen in die Zellkammer. Dort steigt die Konzentration sowohl im 100 μ l- als auch im 800 μ l-MBR an. In der Zellkammer des 100 μ l-MBR

beträgt die durchschnittliche Konzentration nach 250 s bei Maltose 0,013 mol/l und bei Saccharose 0,039 mol/l (s. Abbildung 75 b). Beim 800 μ l-MBR sind dies in der Zellkammer nach 250 s durchschnittlich 0,007 mol/l bei Maltose und 0,022 mol/l bei Saccharose (s. Abbildung 76 b). Ein lokal erhöhter Konzentrationsanstieg betrifft in diesen 250 s vorrangig den Bereich nahe dem Einlass und geringer die Mitte. Am Auslass der Versorgungskammer ist nach 250 s ein asymmetrisches Konzentrationsprofil zu erkennen. Der Grund hierfür liegt an der zeitgleichen Strömung in der Versorgungs- und Zellkammer. Diese Koppelung und die Massenerhaltung führen dazu, dass die Konzentration in der Zellkammer einerseits ansteigt. Andererseits senkt das Volumenelement mit niedrigerer Konzentration am Ende der Zellkammer bei Wiedereintritt in die Versorgungskammer im Bereich des Auslasses die lokale Konzentration. Somit pflanzt sich das anfangs symmetrische Konzentrationsprofil (vgl. Abbildung 75 a bzw. Abbildung 76 a, Einlass zum Zeitpunkt 10 s) nicht auf diese Weise bis zum Ende fort.

Wie in Abbildung 75 a und Abbildung 76 a am Auslass der Versorgungskammer zum Zeitpunkt 250 s zu sehen ist, steigt die Konzentration im 100 μ l-MBR schneller an, als es beim 800 μ l-MBR der Fall ist. Dies ist auf die kürzeren Diffusionspfade und das geringere Volumen im 100 μ l-MBR bedingt durch die geringere Höhe und Länge der Zellkammer zurückzuführen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Simulation, dass die Pflanzenzellen mit Maltose und Saccharose als Substrat sowohl im 100 μ l- als auch im 800 μ l-MBR versorgt werden können, dies im 100 μ l-MBR aber schneller geschieht. Die Membran stellt kein Hindernis dar, welches die Versorgung mit den Substraten Maltose und Saccharose beschränkt. Um mit dem bestehenden System einen noch schnelleren Konzentrationsanstieg in der Zellkammer zu erzeugen, könnte eine höhere Strömungsgeschwindigkeit v bzw. eine höhere Flussrate \dot{F} eingestellt werden.

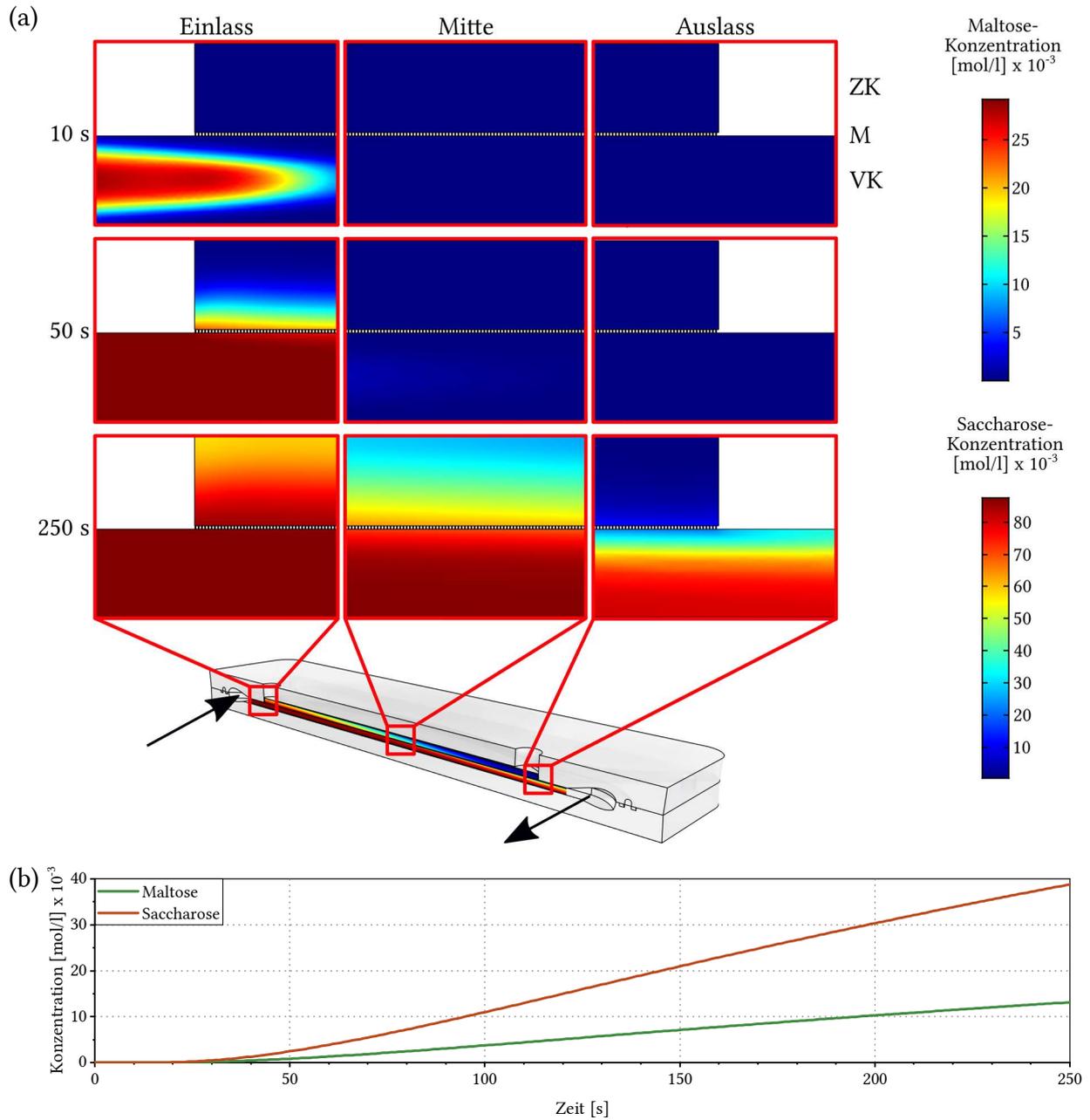


Abbildung 75: Simulationsergebnisse der Diffusion von Maltose und Saccharose des 100 μl -MBR mit Zellkammer (ZK), Membran (M) und Versorgungskammer (VK). (a) Querschnitt der Mitte (x - z -Ebene) des MBR zu den Zeitpunkten 10 s, 50 s und 250 s, die Konzentrationsprofile unterscheiden sich nur in der Skala, (b) Konzentrationsverlauf von Maltose (grün) und Saccharose (rot) in der Zellkammer über eine Dauer von 250 s.

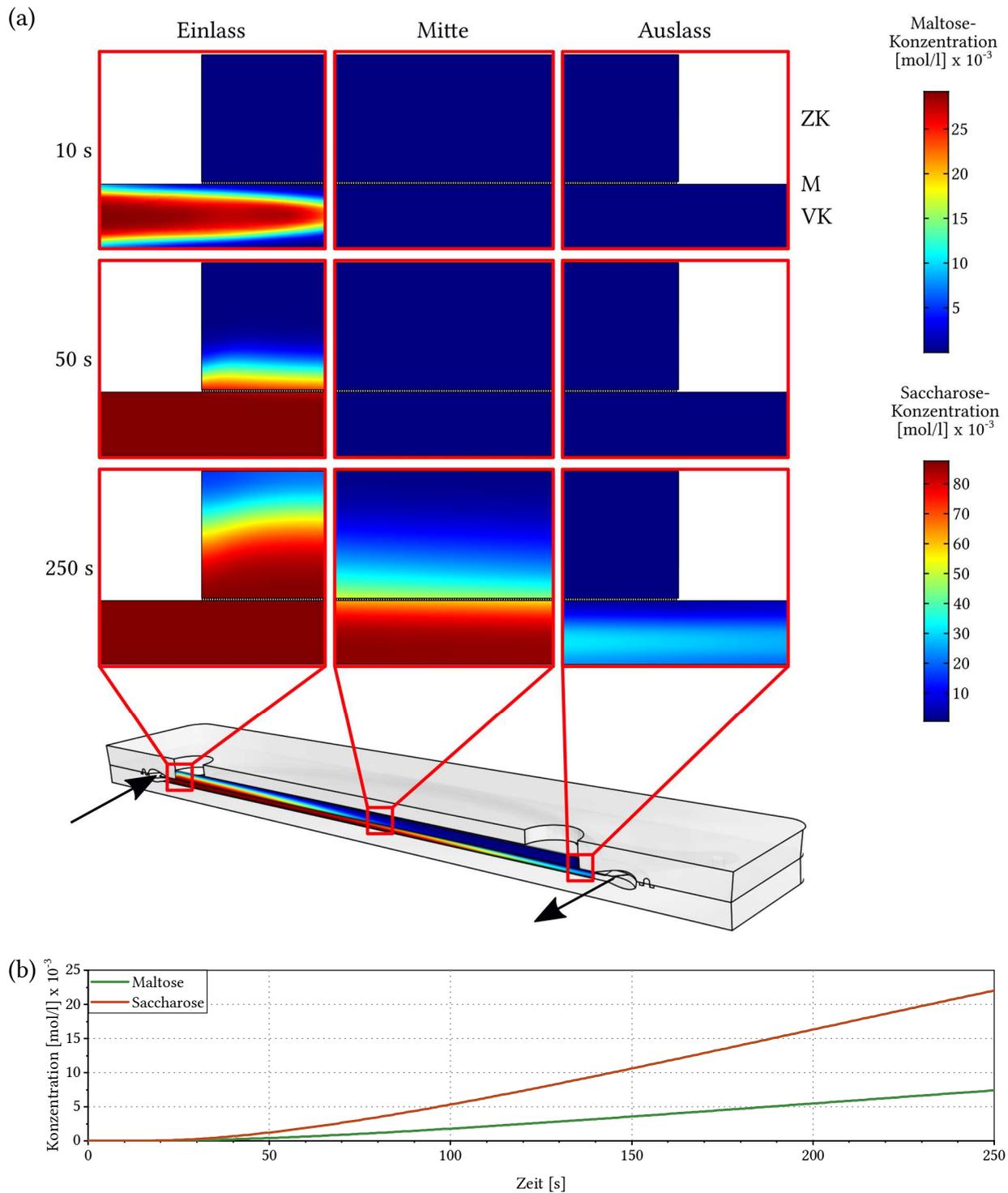


Abbildung 76: Simulationsergebnisse der Diffusion von Maltose und Saccharose des 800 μ l-MBR mit Zellkammer (ZK), Membran (M) und Versorgungskammer (VK). (a) Querschnitt der Mitte (x - z -Ebene) des MBR zu den Zeitpunkten 10 s, 50 s und 250 s, die Konzentrationsprofile unterscheiden sich nur in der Skala, (b) Konzentrationsverlauf von Maltose (grün) und Saccharose (rot) in der Zellkammer über eine Dauer von 250 s.

5.3 Simulation von Strömung und Diffusion im NMR-Messeinsatz

Zum Vergleich von NMR-Analyse und Simulation wurde die Diffusion von Maltose im NMR-Messeinsatz (vgl. Kapitel 5.1) 2D-simuliert. Bei dieser Simulation wurde analog zur Simulation in Kapitel 5.2 vorgegangen. Entsprechend der NMR-Experimente war die obere Kammer zu Beginn mit einer Maltose-Wasser-Lösung mit einer Konzentration von 342 g/l (≈ 1 mol/l) gefüllt. Die untere Kammer enthielt nur Wasser.

Die Simulationsergebnisse der Diffusion von Maltose sind in Abbildung 77 a zu den Zeitpunkten 0 s, 600 s (vgl. Versuchsende NMR-Analyse in Kapitel 5.1) und 3600 s dargestellt. Der Konzentrationsanstieg ist in Abbildung 77 b über die Dauer von 3600 s aufgetragen.

Im Gegensatz zum Ergebnis der NMR-Analyse, bei der nach 600 s kein weiterer Anstieg der Maltose-Konzentration detektierbar war, stieg die Konzentration bei der Simulation zu diesem Zeitpunkt weiter an. Selbst nach 3600 s war noch kein Gleichgewicht erreicht. Nur die Geschwindigkeit des Konzentrationsanstiegs verlangsamte sich stetig. Folglich ist in diesem Fall eine Vergleichbarkeit zwischen NMR-Analyse und Simulation nur eingeschränkt möglich. Begründet werden diese Unterschiede durch die Idealisierung der Parameter und Geometrie bei der Simulation.

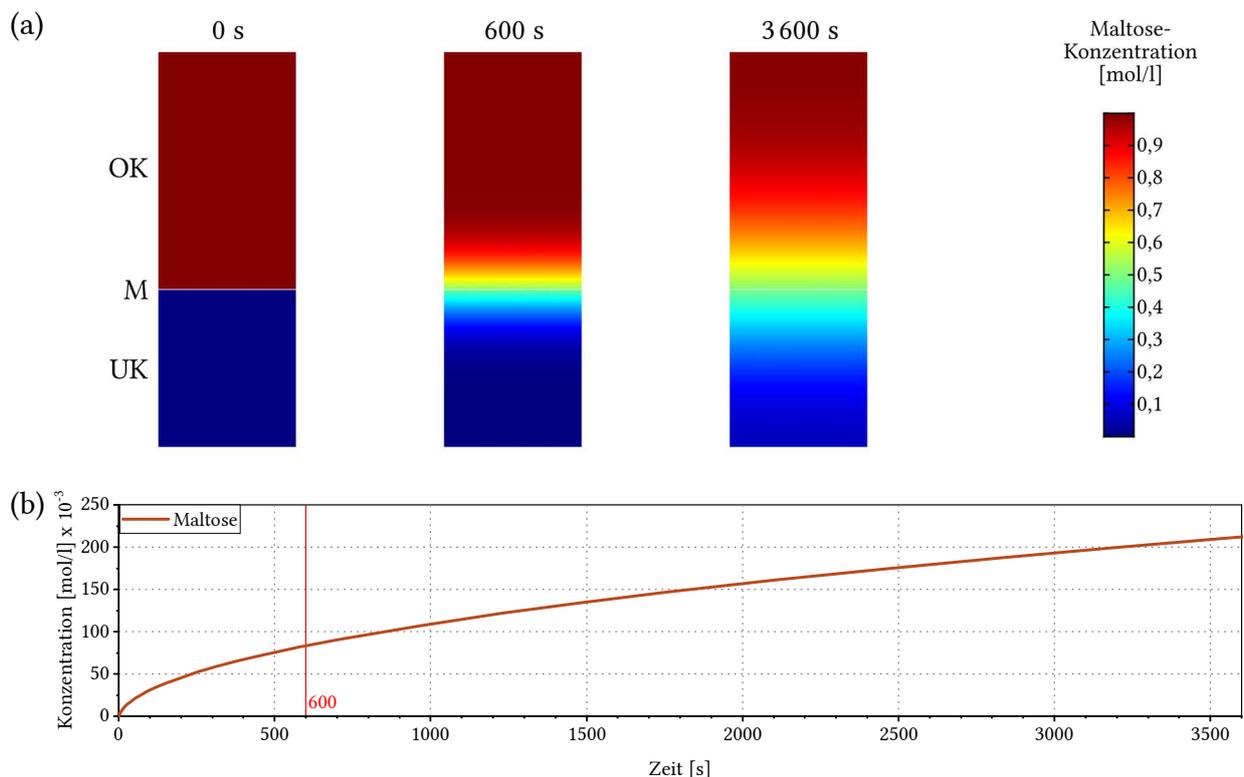


Abbildung 77: Simulation von Strömung und Diffusion im NMR-Messeinsatz. (a) Querschnitt der Mitte (x - z -Ebene) des Messeinsatzes mit der oberen Kammer (OK), Membran (M) und der unteren Kammer (UK) zu den Zeitpunkten 0 s, 600 s und 3600 s, (b) Konzentrationsverlauf von Maltose (rot) in der unteren Kammer über eine Dauer von 3600 s.

6 Biologische Experimente

Die biologischen Experimente mit verschiedenen MBR sowie unterschiedlichen Pflanzenzellen wurden von den Kooperationspartnern am Botanischen Institut I (BOT I) am KIT und bei Phyton Biotech GmbH durchgeführt.

6.1 Verpackung und Sterilisation

Für den Transport wurden die MBR direkt nach dem Ultraschallschweißen in Minigrip® Druckverschlussbeutel verpackt. Die Sterilisierung der MBR aus PC und PET sowie den Schläuchen, Schlauchverbindern, Behältern und Nährmedien wurde von beiden Partnern jeweils vor Ort durchgeführt. Abgesehen von den MBR aus PET konnten alle Komponenten bei 121 °C und 2,1 bar Nassdampf für 20 min in den jeweiligen Autoklaven sterilisiert werden. Die MBR aus PET mussten hingegen aufgrund der fehlenden Hitzebeständigkeit von PET auf eine andere Weise sterilisiert werden. Dazu wurden diese erst mit Ethanol durchspült, getrocknet und anschließend durch UV-Licht unter einer Sterilbank bestrahlt. In beiden Fällen konnte von ausreichender Sterilität der MBR gesprochen werden, da keine Kontaminationen zu beobachten waren [156]. Da die Pflanzenzellen nach den Versuchen vollständig ausgespült wurden, konnten die MBR erneut zum Einsatz kommen.

6.2 Zellversuche

Mit den 100 µl- und 800 µl-MBR wurden Versuche mit unterschiedlichen Pflanzenzellen durchgeführt. Neben dem Machbarkeitsnachweis mit BY-2-Zellen konnten *C. roseus* und *T. chinensis* in den MBR kultiviert werden. Die Zellversuche wurden mit individuell auf die jeweiligen Zelllinien abgestimmten Nährmedien durchgeführt, die in Tabelle 11 aufgeführt sind.

Beladen wurden die MBR mit den jeweiligen Pflanzenzellen, indem die entsprechende Zellsuspension wie in Abbildung 78 a gezeigt mithilfe einer Pipette mit einer gekürzten 2,5 ml-Pipettenspitze durch eine Öffnung in der Zellkammer eingefügt wurde. Wie in Abbildung 78 b angedeutet, konnte durch wechselndes Hin- und Herpumpen mit der Pipette sichergestellt werden, dass alle Zellen in den MBR überführt wurden. Nachdem die Öffnungen der Zellkammer verschlossen wurden und die Nährlösung die Versorgungskammer flutete, wurde der MBR vorübergehend kopfüber gehalten. Dadurch konnten sich alle aufsteigenden Blasen in der Versorgungskammer sammeln, wo sie durch die Strömung abtransportiert wurden. Auf diese Weise konnten Lufteinschlüsse vermieden werden. Nachfolgend konnte das System wie in Abbildung 6 in Kapitel 2.3.1 entweder im einfachen Durchfluss oder im Kreislauf betrieben werden.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Nährmedien für die verschiedenen Zelllinien [10].

| BY-2 | <i>C. roseus</i> | <i>T. chinensis</i> |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Gamborg B5 Medium: 3,21 g/l • Saccharose: 30 g/l • 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure: 1,1 mg/l | <ul style="list-style-type: none"> • Gamborg B5 Medium: 3,21 g/l • Maltose: 10 g/l • Picloram: 2,42 mg/l • Thidiazuron: 0,022 mg/l | <ul style="list-style-type: none"> • Murashige-Skoog-Medium-Salze: 4,3 g/l • Saccharose: 30 g/l • KH_2PO_4: 200 mg/l • Inositol: 100 mg/l • Thiamin: 1 mg/l • 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure: 0,2 mg/l |

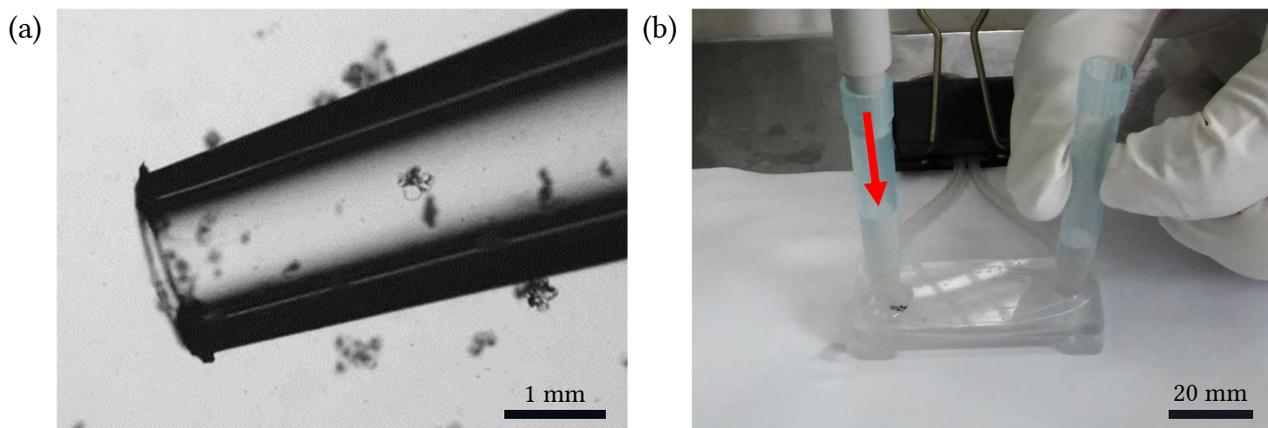


Abbildung 78: Befüllung der MBR mit Pflanzenzellen, hier mit *T. chinensis*. (a) Zellaggregate am Ausgang einer Pipettenspitze, (b) Befüllung mit gekürzten Pipettenspitzen zum rückstandslosen Überführen aller Pflanzenzellen, mit freundlicher Genehmigung von Phyton Biotech GmbH, © Phyton Biotech GmbH, 2016.

6.2.1 Versuche mit BY-2

Als Machbarkeitsnachweis für den modularen Ansatz des MBR wurden in zwei Ansätzen jeweils zwei MBR A und B in Reihe geschaltet und im Kreislauf betrieben. Jeder MBR wurde mit einer Suspension an BY-2-Zellen befüllt. Wie in Abbildung 79 a dargestellt wurden bei Ansatz 1 beide MBR A und B mit 1:300 verdünnten BY-2-Suspensionen befüllt. In Ansatz 2 beinhaltete der MBR B ebenfalls eine 1:300-Verdünnung, MBR A hingegen eine 1:30-Verdünnung (vgl. Abbildung 79 b). Dabei wurde jeder Ansatz mit drei biologischen Replikaten durchgeführt.

Es wurde versucht, die Kommunikation der BY-2-Zellen über ihre Kompartimentierung hinweg nachzuweisen. Die Annahme dahinter war, dass die Zellkommunikation bei einer hohen Verdünnung von Pflanzenzellen (z. B. 1:300) gestört und damit deren Zellteilung gestoppt wird. Für den umgekehrten Fall wurde vermutet, dass sich verdünnte Pflanzenzellen durch Signale von höher konzentrierten Zellkulturen (z. B. 1:30) erneut zu teilen beginnen.

Nach Befüllen der MBR mit entsprechender Zellsuspension wurden die Öffnungen der Zellkammer mit Polyester-Klebeband 851 (3M™, USA) versiegelt. Beide MBR wurden mit Tygon-Schläuchen (Reichert Chemietechnik GmbH & Co., Deutschland) mit einem ID von 1,6 mm gekoppelt und konnten mit einer Flussrate von 20 µl/min durch eine 4-kanalige Schlauchpumpe REGLO Digital MS-4/6 (Cole-Parmer GmbH, Deutschland) betrieben werden. Bei jedem Ansatz wurden 25 ml Nährmedium aus einem Behälter durch die MBR im Kreislauf gepumpt. Die Laufzeit dieser Versuche betrug drei Tage. Ein Foto dieses Aufbaus wird in Abbildung 80 a gezeigt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen jedes Ansatzes in Fünffachbestimmung ausgezählt.

Beim ersten Ansatz mit 1:300-Verdünnung in beiden MBR war keine Zellteilung zu beobachten, woraus sich ein Wachstumsfaktor von ca. 1 ergab. Anders war es beim zweiten Ansatz. Wie oben angenommen, kam es hier durch Signale der 1:30 verdünnten Zellen zur erneuten Zellteilung der mit 1:300 verdünnten Zellen, was sich in einer höheren Zellzahl und einem Wachstumsfaktor von ca. 2 widerspiegelte. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 80 b statistisch durch einen t-Test mit einem Signifikanzwert < 0,001 ausgewertet. [10]

Damit zeigte sich, dass Signale bzw. bestimmte Signalmoleküle der Zellkommunikation durch den metabolischen Fluss von einem zum nächsten MBR übertragen werden und dort eine Wirkung erzeugen können.

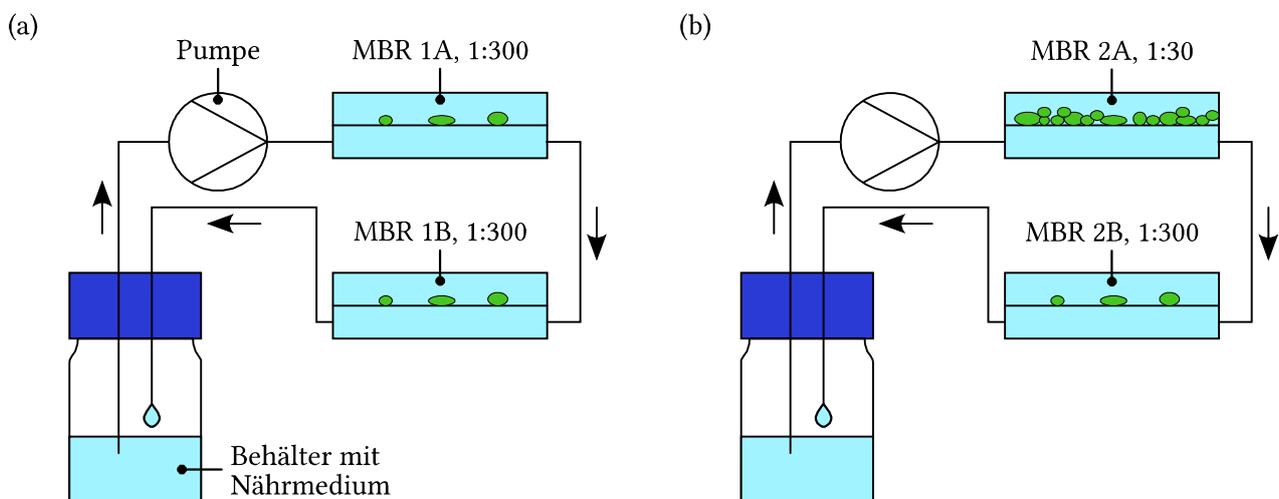


Abbildung 79: Schematischer Versuchsaufbau für den Machbarkeitsnachweis der Modularität zweier MBR. (a) BY-2-Zellen mit der Verdünnung 1:300 in beiden MBR, (b) BY-2-Zellen mit einer zehnmals geringeren Verdünnung von 1:30 im ersten MBR und mit 1:300 im zweiten MBR.

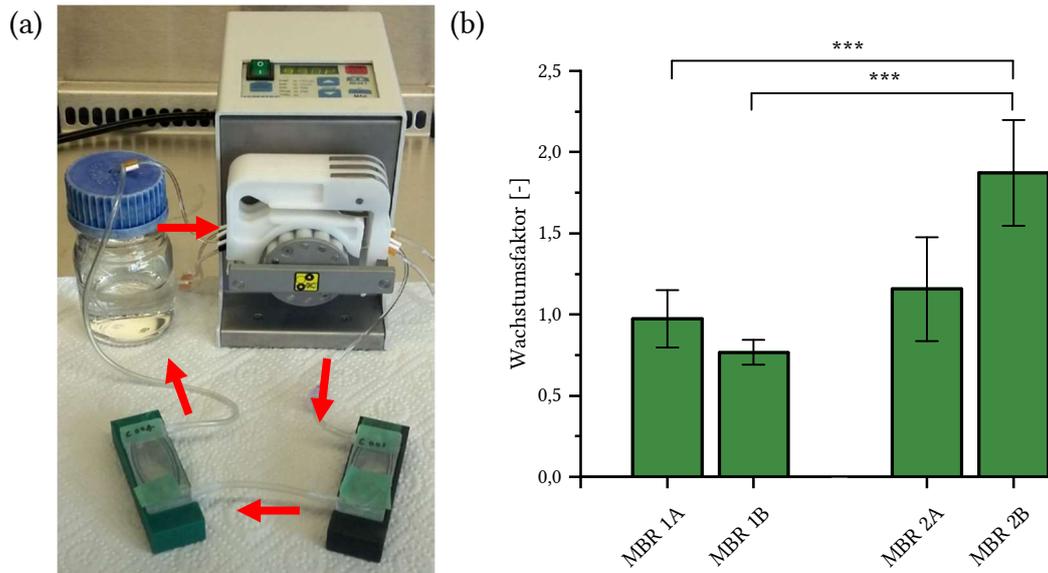


Abbildung 80: Versuchsdurchführung der zwei gekoppelten MBR mit unterschiedlich konzentrierten BY-2-Zellen. (a) Versuchsaufbau, die Flussrichtung wird durch rote Pfeile angedeutet, mit freundlicher Genehmigung von Christina Manz, © Christina Manz, BOT I, KIT, 2018. (b) Auswertung des Wachstumsfaktors in den beiden Ansätzen durch einen t-Test mit einem Signifikanzwert $< 0,001$, der durch (***) gekennzeichnet ist, modifiziert nach [10].

6.2.2 Versuche mit *C. roseus*

Mit *C. roseus* wurde der modulare Ansatz mit zwei unterschiedlichen, fluidisch gekoppelten Pflanzenzelllinien analysiert. Dieser Ansatz konnte sowohl mit dem 200 μl -MBR als auch mit den 100 μl - und 800 μl -MBR durchgeführt werden. Dazu wurden in den einen MBR Zellen der Linie Cath 001 und in den anderen MBR Cath 004 eingefügt, welche beide exemplarisch in Abbildung 81 gezeigt werden.

Im Vordergrund stand dabei die parallele Kultivierung der beiden Pflanzenzelllinien in den MBR. In Versuchen mit beiden Zelllinien in einem Schüttelkolben zeigte sich nämlich, dass eine parallele Kultivierung nicht möglich war, da Cath 001 mit der Zeit Cath 004 verdrängte. [10] Durch die Kompartimentierung beider Zelllinien bei gemeinsamem metabolischem Fluss könnte diese Beeinträchtigung aufgehoben werden.

In diesem Ansatz wurde analog zu den Versuchen mit BY-2 eine Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ im Kreislauf betrieben. Die Detektion gebildeter, spezifischer Zwischenprodukte wie beispielsweise Vinkaalkaloide kann durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie detektiert werden. Die Synthese dieser Zwischenprodukte wurde durch den Botenstoff Methyljasmonat (Duchefa Biochemie, Niederlande) angeregt [3, 157], welcher in einer Konzentration von 100 μM hinzugegeben wurde. [10]

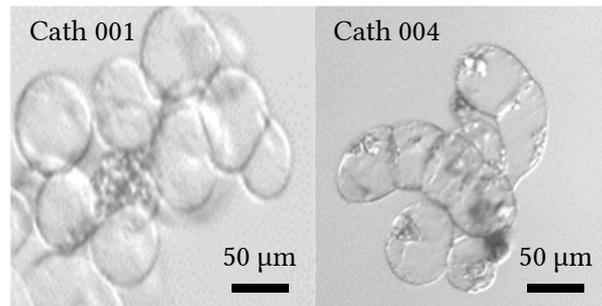


Abbildung 81: Versuche mit den zwei Zelllinien Cath 001 und Cath 004 von *C. roseus*, mit freundlicher Genehmigung von Christina Manz, © Christina Manz, BOT I, KIT, 2017.

Nach sieben Tagen wurden die Zellen aus den MBR ausgespült und für die Analyse und Detektion gebildeter Zwischenprodukte gemäß Manz 2019 präpariert. Es zeigte sich, dass beide Zelltypen wachsen konnten und nicht wie im Schüttelkolben miteinander konkurrierten und sich dabei beeinträchtigten. Bei der Analyse stellte sich heraus, dass Cath 001 und Cath 004 Catharantin aufwies [10]. Catharantin ist neben Vindolin ein Zwischenprodukt für Vinblastin (vgl. Kapitel 2.1.4). Nur in Ansätzen ohne Cath 001 konnte in Cath 004 neben Catharantin auch Vindolin nachgewiesen werden [10].

Daraus lässt sich ableiten, dass beide Zelllinien im 200 µl-MBR kultiviert werden konnten und auch durch die Anregung mit Methyljasmonat Vorstufen für Vinblastin bildeten. Da Cath 004 nur ohne Cath 001 Vindolin bildete, kann daraus geschlossen werden, dass sich die Zelllinien zumindest in der Produktion, jedoch nicht im Wachstum beeinträchtigten.

6.2.3 Versuche mit *T. chinensis*

Die Versuche mit *T. chinensis* wurden zum einen im einfachen Durchfluss und zum anderen im Kreislauf durchgeführt. Im einfachen Durchfluss wurde eine Flussrate von ca. 2-3 Tropfen/min eingestellt. Dabei wurde wie in Abbildung 82 a gezeigt das Nährmedium für sieben Tage aus einer Schottflasche durch die einzelnen 200 µl-MBR geführt und in einem Behälter gesammelt.

Beim Ansatz mit Kreislauf wurde das Nährmedium mit einer Flussrate von 300 µl/min und einem Volumen von 6 ml für eine Dauer von 14 Tagen betrieben. Zur Förderung des Gasaustauschs wurde der Sammelbehälter mit Nährmedium wie in Abbildung 82 b dargestellt auf einem Magnetrührer platziert.

Die Zellen konnten nur schwer mithilfe einer Pipette mit 2,5 ml-Pipettenspitze in die MBR überführt werden, da es sich dabei um die 200 µl-MBR mit 1,7 mm großen Öffnungen der Zellkammer handelte. Dies war entscheidend für die Änderung im Entwurf des 100 µl- und 800 µl-MBR, welche jedoch nicht mehr mit *T. chinensis* getestet werden konnten.

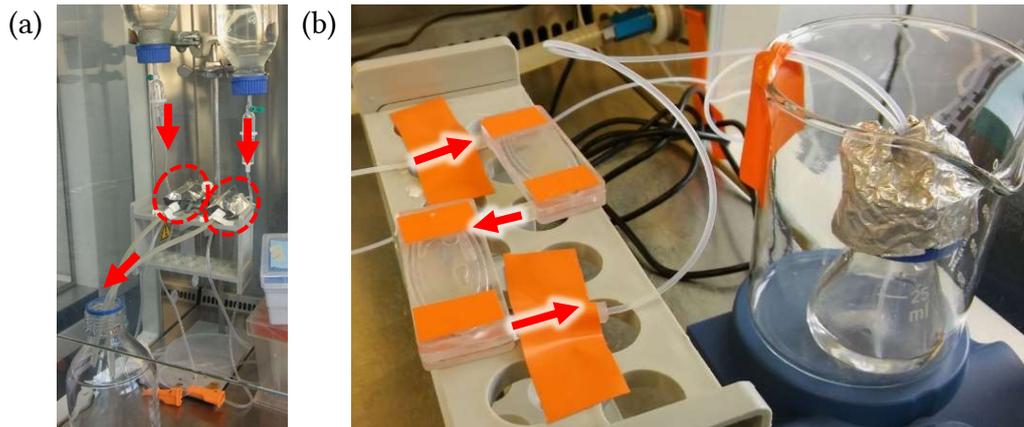


Abbildung 82: Kultivierung einer Zelllinie aus *T. chinensis* im 200 µl-MBR. (a) Aufbau für den einfachen Durchfluss, MBR sind durch rote, gestrichelte Ellipsen und die Flussrichtung durch rote Pfeile markiert, (b) Aufbau für den Kreislauf, die Flussrichtung wird durch rote Pfeile angedeutet, mit freundlicher Genehmigung von Phyton Biotech GmbH, © Phyton Biotech GmbH, 2017.

In allen Versuchen konnten die Zellen von *T. chinensis* über die genannte Versuchsdauer kultiviert werden. Allerdings war in keinem Ansatz Paclitaxel durch HPLC-Analysen oder Massenspektrometrie detektierbar.

6.2.4 pH-Messung

Zur Messung des pH-Wertes in der Zellkammer wurde der Verschluss der Zellkammer modifiziert, wodurch diesem Bauteil zwei Aufgaben zukamen. Als Sensorsystem wurden Komponenten der PreSens Precision Sensing GmbH (Deutschland) verwendet. Mit dem zu messenden Medium stand jeweils ein selbstklebender Sensorspot SP-HP5 mit prototypischem Messbereich und einer Reaktionszeit von < 2 min in Kontakt. Dessen Signal konnte durch eine Polymer-optische Faser als Lichtleiter an das Messgerät pH-1 mini v2 übertragen werden, wo das optische Signal in ein elektrisches umgewandelt und an einen Computer übertragen wurde. Dort wurde es mit der Software pH1-View als zeitlicher pH-Verlauf aufgezeichnet. Um die Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes zu kompensieren, wurde zusätzlich ein Temperatursensor an das Messgerät angeschlossen.

Der Verschluss der Zellkammer konnte durch 3D-Druck aus PC-Filament gefertigt werden, um neben einer passgenauen Halterung für den Lichtleiter auch eine ausreichend transparente Schicht zwischen Sensorspot und Lichtleiter zu ermöglichen. Die Länge des Verschlusses wurde so dimensioniert, dass dieser mit aufgeklebtem Sensorspot bündig mit der Decke der Zellkammer abschloss. Ein schematischer Querschnitt dieses Verschlusses mit angebrachten Sensorkomponenten wird in Abbildung 83 a gezeigt.

Wie transparent diese durch 3D-Druck erzeugte Schicht bei einem Emissionsmaximum des Messgerätes von 470 nm war, konnte durch die Messung der Transmission im UV/Vis-Spektrophotometer LAMBDA 950 (PerkinElmer Inc., USA) kontrolliert werden. Die Transmission der

Wellenlängen zwischen 400-550 nm lag stets über 60 % und eine ausreichende Signalübertragung war somit gewährleistet.

Auf den Verschluss wurde ein M6-Gewinde geschnitten und die horizontale Fläche zwischen Gewinde und Oberteil musste plangefräst werden, um mit dem Dichtungsring einen dichten Abschluss zu realisieren. Hierbei konnte der in Kapitel 4.5.3, Abbildung 61 c gezeigte Dichtungsring aus PDMS verwendet werden. Anschließend konnte dieser Verschluss mit Dichtungsring autoklaviert und der Sensorspot unter der Sterilbank auf dessen transparente Unterseite geklebt werden. Der Sensorspot wurde durch ROTI®CALIPURE pH-Pufferlösungen mit den pH-Werten 4,62; 6,00; 6,865; 7,00; 7,413 und 8,00 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland) kalibriert. Der Temperatursensor wurde zeitgleich in die Kalibrierlösung getaucht. Der pH-Wert der jeweiligen Lösung wurde im Rahmen der oben genannten Reaktionszeit von 2 min erreicht.

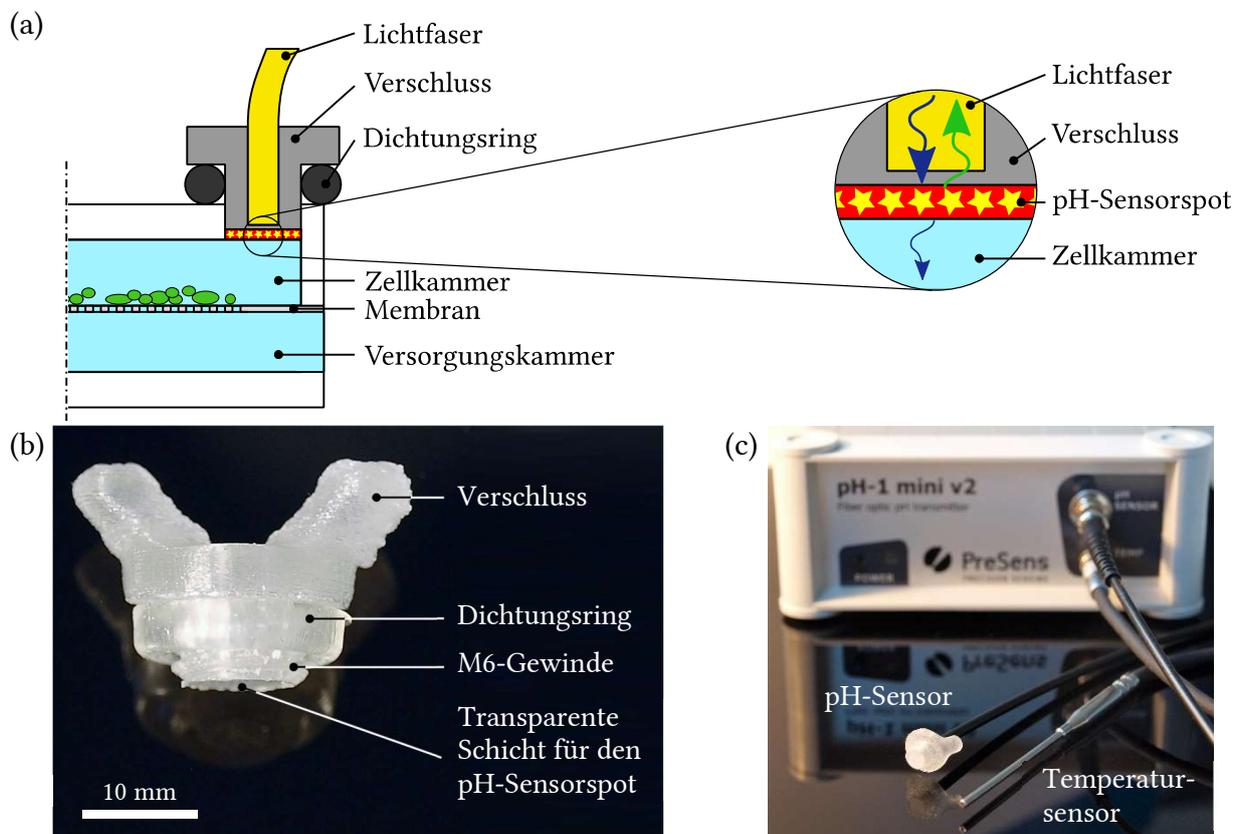


Abbildung 83: Durch 3D-Druck erzeugter Verschluss für die Zellkammer mit Schnittstelle für einen pH-Sensor. (a) Schematischer Querschnitt dieses Verschlusses, (b) Aufnahme des Verschlusses, (c) Messgerät pH-1 mini v2 mit angeschlossenen pH- und Temperatursensor.

Als Machbarkeitsnachweis diente ein Versuchsaufbau mit einem 800 μ l-MBR, welcher Weinzellen der Wildtyp-Linie *Vitis rupestris* enthielt. Dabei waren MBR und Kreislauf mit einer Nährlösung mit pH 5 gefüllt. Nach ca. 5 min wurde eine Lösung mit pH 8 in den Behälter mit Nährmedium hineingegeben. Der pH-Wert des Nährmediums stieg im Behälter dadurch auf ca. pH 7,2. In diesen

Behälter wurde der Temperatursensor eingetaucht. Der pH-Sensor wurde in die vorderste Öffnung der Zellkammer am ersten MBR eingeschraubt. Nach dem Anlegen einer Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurde der zeitliche Verlauf des pH-Wertes im MBR aufgezeichnet und ergab das in Abbildung 84 gezeigte Diagramm.

Zu erkennen ist in Abbildung 84, dass sich erst nach ca. 38 min das Gleichgewicht bei pH 7,2 einstellte. Dabei muss jedoch die über das Volumen des Schlauchs und der Flussrate berechnete Verweilzeit von ca. 13,8 min berücksichtigt werden, die die Lösung bis zum Eingang des MBR benötigt. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch der pH-Wert anzusteigen, wie es in Abbildung 84 sichtbar ist. Dies stimmt mit der oben genannten Reaktionszeit von 2 min überein. Die Dauer von weiteren 24,2 min bis zum Gleichgewicht von pH 7,2 ist auf Verdünnungs- und Diffusionseffekte zwischen Einlass des MBR, Versorgungskammer, Membran, Zellkammer und Sensor spot zurückzuführen. Somit ist der Sensor spot für diese Anwendung geeignet, da sich der pH-Wert bei einer Kultivierung von Zellen immer zuerst in der Zellkammer ändern würde.

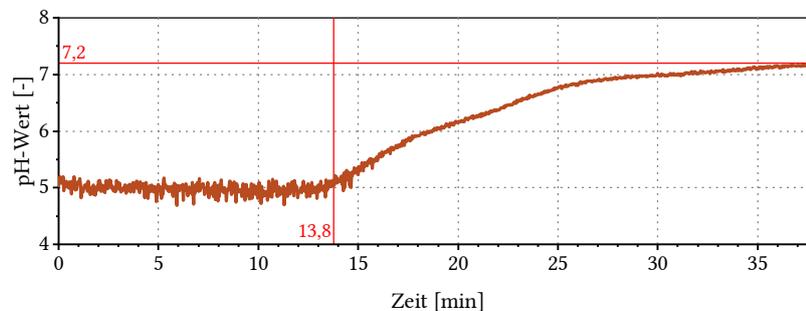


Abbildung 84: Verlauf des pH-Wertes im MBR, nachdem der pH-Wert des im Kreis geführten Nährmediums von pH 5 auf pH 7,2 erhöht wurde.

7 Kostenanalyse

Neben der technischen und biologischen Betrachtung der Herstellung der MBR wurde der ökonomische Standpunkt betrachtet, indem eine Kostenanalyse durchgeführt wurde. Generell werden die Kosten in Fixkosten und variable Kosten aufgeteilt. Zu den Fixkosten zählen die Werkzeugkosten für Replikation und Fügen der Komponenten sowie die jeweiligen Rüstkosten. Zu den variablen Kosten zählen die Kosten für die benötigten Materialien wie Polymer-, Gewebe- und Membranzuschnitte sowie die Schlauchanschlüsse. Hierbei sind auch Maschinen- und Personalkosten maßgeblich, welche in den Prozessen Replikation und Fügen eine Rolle spielen.

Das Vorgehen der Kostenanalyse wurde in drei Abschnitte unterteilt. Zunächst wurden die Kosten der Materialien aufgeführt und verglichen. Anschließend wurden Werkzeug- sowie Fertigungskosten für die Replikation und das Fügen aller Komponenten ermittelt. Dabei wurden zur Veranschaulichung der Kosten ausschließlich die Herstellung der 100 µl- und 800 µl-MBR aus PC-Chiphälften betrachtet. Zuletzt wurde die Sterilisation und die im direkten Zusammenhang stehende Verpackung analysiert und exemplarisch für eine Stückzahl von 1 000 MBR abgeschätzt.

7.1 Kosten für die Materialien

Die Kosten der Materialien sind für den 100 µl- und den 800 µl-MBR in Tabelle 12 aufgeführt. Zu beachten ist hierbei, dass die PC-Plättchen nur für die Replikation durch Heißprägen benötigt werden. Die Kosten der Materialien für den 100 µl-MBR sind mit 1,32 € aufgrund der geringeren Größe niedriger als beim 800 µl-MBR mit 2,16 €.

Tabelle 12: Materialkosten für die thermoplastischen Komponenten der 100 µl- und 800 µl-MBR.

| | | 100 µl-MBR | 800 µl-MBR |
|------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| | Komponente | Stückkosten [€] | Stückkosten [€] |
| <i>Halbzeuge</i> | PC-Plättchen | 0,10 | 0,13 |
| | PET-Membran | 0,36 | 0,96 |
| | PET-Gewebe | 0,08 | 0,29 |
| | Schlauchanschlüsse | 0,78 | 0,78 |
| <i>Summe</i> | | 1,32 | 2,16 |

7.2 Werkzeugkosten für Replikation und Fügen

Als Replikationsmethoden wurden Heißprägen mit Spritzguss und als Fügetechnologien Ultraschallschweißen mit Laserdurchstrahlschweißen verglichen. Da der Spritzguss wie erwähnt extern durchgeführt werden würde, wurden die dabei anfallenden Kosten für entsprechende Formeinsätze angefragt. Dazu wurden drei unabhängige Hersteller um Auskunft gebeten und der Mittelwert aus diesen Angeboten berechnet. Alle diese ermittelten Fixkosten sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die

Werkzeugkosten für das Heißprägen und das Ultraschallschweißen der 100 µl-MBR und der 800 µl-MBR sind nahezu identisch.

Tabelle 13: Kosten der Werkzeuge für die Replikation und das Fügen der 100 µl- und 800 µl-MBR.

| | | 100 µl-MBR | 800 µl-MBR |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Komponente | | Werkzeugkosten [€] | Werkzeugkosten [€] |
| <i>Replikation</i> | Formeinsatz Heißprägen | 6.830,00 | 7.460,00 |
| | Formeinsatz Spritzguss | 13.650,00-18.300,00 | k. A. |
| <i>Fügen</i> | Flache Sonotrode | 1.532,00 | 1.532,00 |
| | Strukturierte Sonotrode | 2.029,00 | 1.353,00 |

7.3 Fertigungskosten für Replikation und Fügen

Welche Replikationsmethode bietet sich aus ökonomischem Blick für welche Stückzahlen an? Aus Tabelle 13 folgt unmittelbar, dass die Fixkosten bei der Wahl des Spritzgusses fast 8.000 € teurer sind als beim Heißprägen. Somit ist das Heißprägen für < 212-344 Stück günstiger. Beim Heißprägen an der WUM 01 werden hier pro MBR 31,25-37,50 € einkalkuliert. In Abbildung 85 sind die Kosten beider Methoden in Abhängigkeit der Stückzahl veranschaulicht. Dabei ist das Heißprägen ab einer Stückzahl von ≥ 212 -344 MBR unökonomischer als der Spritzguss dieser drei Hersteller. Dies deckt sich auch mit vergleichbaren Berechnungen in Worgull 2009 [67]. Überdies könnten beim Spritzguss auch gleich die fluidischen Anschlüsse in die Chiphälften integriert werden, wodurch die Materialkosten und die Montagekosten für den Schlauchanschluss entfallen würden.

Bei der Ermittlung der geeigneteren Fügemethode und darüber hinaus der ökonomischsten Kombination aus Replikations- und Fügemethode spielt der Zeitfaktor eine tragende Rolle, da dieser in direktem Zusammenhang mit den Gesamtkosten steht. Hierfür wurden die Gesamtzeiten zur Herstellung eines 100 µl- oder 800 µl-MBR für die jeweilige Kombination in Tabelle 14 verglichen. Die Maschinenkosten wurden an dieser Stelle ausgeklammert, da die Maschinen für Ultraschallschweißen und Laserschweißen bereits verfügbar sind.

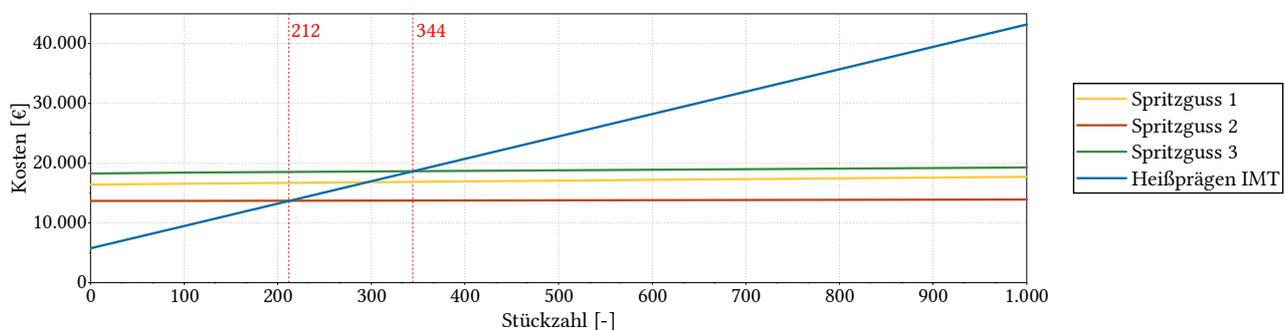


Abbildung 85: Kostenvergleich der Abformverfahren Spritzguss und Heißprägen. Es wurden drei verschiedene Angebote für den Spritzguss (gelb, rot, grün) eingeholt und zum Vergleich mit dem Heißprägen am IMT (blau) über die Stückzahl aufgetragen.

Aus Tabelle 14 geht am Beispiel des 100 µl-MBR hervor, dass die Kombination aus Spritzguss und Ultraschallschweißen mit einer Gesamtzeit von < 4,02 min mehr als 3,7 Mal schneller ist als mit 15,00 min die Kombination aus Heißprägen und Laserdurchstrahlschweißen. Die zeitliche Differenz macht hierbei hauptsächlich das Replikationsverfahren aus. Je höher die Stückzahl, desto stärker fällt der Zeitfaktor und damit auch die Maschinenbetriebs- und Personalkosten ins Gewicht.

Tabelle 14: Gesamtzeit zur Herstellung eines 100 µl- oder 800 µl-MBR.

| | Komponente | 100 µl-MBR Zeit pro MBR [min] | 800 µl-MBR Zeit pro MBR [min] |
|---|--|--|--|
| <i>Prozessschritt</i> | Heißprägen | 10 | 12 |
| | Spritzguss | < 1 | < 1 |
| | Laserschneiden von Membran und Gewebe | 1 | 1 |
| | Ultraschallschweißen | 0,02 | 0,02 |
| | Laserdurchstrahlschweißen | 2 | 3 |
| | Rüstzeiten Fügen | 2 | 2 |
| | <i>Gesamtzeiten</i> | Heißprägen und Ultraschallschweißen | 13,02 |
| Heißprägen und Laserdurchstrahlschweißen | | 15,00 | 18,00 |
| Spritzguss und Ultraschallschweißen | | < 4,02 | < 4,02 |
| Spritzguss und Laserdurchstrahlschweißen | | < 6,00 | < 7,00 |

7.4 Kosten für Verpackung und Sterilisation

Als Sterilisationsmethode für PC und PET wird die Gassterilisation durch Ethylenoxid empfohlen [158] und von einem Anbieter wurden entsprechende Kosten am Beispiel einer Stückzahl von 1000 MBR ermittelt [159]. Zur Hitzesterilisation durch Autoklavieren, wie es in der Laborpraxis verwendet wurde (vgl. Kapitel 6.1), wird nur bedingt geraten, da bei manchen PET-Typen in diesem Fall T_g überschritten wird.

Zuerst erfolgt die Verpackung der MBR, indem diese in gasdurchlässigen Beuteln versiegelt werden. Größere Stückzahlen an MBR können in Faltschachteln verpackt werden. Erst danach wird die Sterilisation mit Ethylenoxid nach ISO 11135 durchgeführt. Zuletzt wird eine Validierung aller Schritte von Verpackung bis zur Auslieferung erfolgen. Diese umfasst Reinigung, Verpackung, Sterilisation sowie Transport und kann gemäß verschiedener ISO-Normen die Qualität aller Schritte mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit sichern. [159]

Die Kosten der einzelnen Schritte von Verpackung und Sterilisation sind für eine angenommene Stückzahl von 1000 100 µl- oder 800 µl-MBR in Tabelle 15 zusammengefasst. Pro MBR würde dies 32,64 € kosten, was für diese geringe Stückzahl in der Größenordnung der Herstellungskosten des MBR liegt. Folglich ist die Verpackung und Sterilisation auf diese Weise für eine Stückzahl von

1 000 MBR ökonomisch nicht sinnvoll. Da die Kosten nicht linear mit der Stückzahl ansteigen, sollte über eine Verpackung und Sterilisation in diesem Maßstab erst bei mehreren 1000 Stück nachgedacht werden. Der gesamte Prozess von der Herstellung eines MBR bis zum Öffnen des verpackten MBR durch einen Anwender kann wie in Abbildung 86 dargestellt wiedergegeben werden.

Tabelle 15: Kosten der Sterilisation und Verpackung für 1000 MBR.

| Schritt | Details | Kosten [€] |
|---|---|---------------|
| Verpackung | Beutel und Faltschachteln | 3.580 |
| | Werkzeug (Faltschachtelstanze) | 750 |
| | Druck und Label | 475 |
| Sterilisation und Validierung | Reinigungsvalidierung | 10.375 |
| | Verpackungsvalidierung | 1.100 |
| | Sterilisation durch Ethylenoxid und anschließende Validierung | 11.167 |
| | Transportsimulation | 4.475 |
| | Überprüfung der Integrität der Verpackung | 720 |
| Gesamtkosten für Sterilisation und Verpackung von 1000 MBR [€] | | 32.642 |

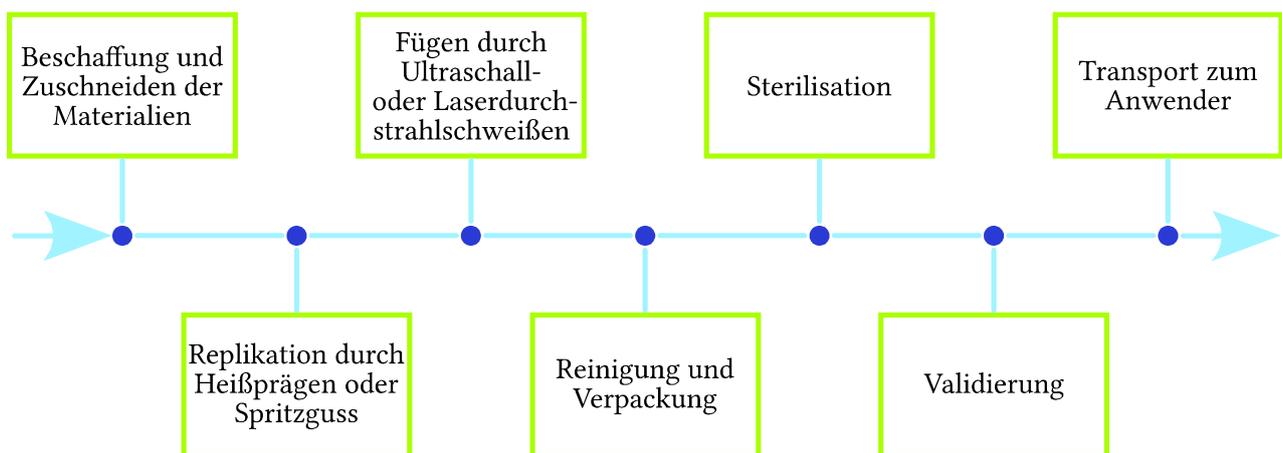


Abbildung 86: Der gesamte Prozessablauf von der Herstellung eines MBR bis zur Auslieferung.

Wenn davon ausgegangen wird, dass die MBR per Spritzguss (durchschnittlich 16,96 €/MBR) und Ultraschallschweißen (ca. 2,00 €/MBR) mit durchschnittlichen Materialkosten von 1,25 € gefertigt sowie verpackt und sterilisiert (32,64 €/MBR) in einer Stückzahl von 1000 vorlägen, betrügen die gesamten Herstellungskosten 52,85 €/MBR. Bei einem Verkaufspreis von 100 €/MBR läge dies in der Größenordnung mit vergleichbaren Produkten auf dem Markt, wie beispielsweise bei dem Querstrom-Membran-Chip 480 (microfluidic ChipShop, Deutschland) auf thermoplastischer Basis mit 89,50 € [160]. Verglichen mit weiteren analogen mikrofluidischen Systemen aus Glas mit integrierter PET-Membran (Micronit Microtechnologies B.V., Niederlande) (235,83 €) oder mit PTFE-Membran (Dolomite Microfluidics, Großbritannien) (300,00 €) wäre der MBR sogar noch kostengünstiger [161, 162].

8 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von mikrofluidischen Bioreaktoren (MBR) zur Kultivierung von Pflanzenzellen auf der Basis von biokompatiblen und thermoplastischen Polymeren. Um Pflanzengewebe mit der Kompartimentierung seiner verschiedenen Zelltypen technisch nachzuahmen, wurde die modulare Verschaltung dieser MBR ermöglicht. Jeder der fluidisch gekoppelten MBR enthielt den jeweiligen Zelltyp im Syntheseweg des entsprechenden Sekundärmetaboliten. Weiterhin wurde das Ziel verfolgt, die Zellen im MBR während der Kultivierung optisch zu beobachten und zu analysieren sowie die nachträgliche Untersuchung der Zwischen- und Endprodukte bzw. Sekundärmetaboliten zu erlauben. Im Folgenden werden alle praktischen Entwicklungen zusammengefasst.

Durch den Aufbau der MBR in zwei Ebenen mit einer oberen Zell- und einer unteren Versorgungskammer können die Pflanzenzellen außerhalb des Versorgungsstroms kultiviert werden. Gleichzeitig kann durch die dazwischenliegende poröse Membran der Stoffaustausch stattfinden und die Zwischenprodukte durch den metabolischen Fluss weiter zum nächsten gekoppelten Modul transportiert werden. Dort werden diese Zwischenprodukte weiter konvertiert, im Idealfall wie im realen Pflanzengewebe bis zum Endprodukt bzw. Sekundärmetaboliten.

Der aus den Vorarbeiten von Kreppenhofer [21] und Sobich [54] abgeleitete Entwurf eines 200 μl -MBR bildete die Basis, von der aus Modifizierungen wie in Abbildung 87 dargestellt durchgeführt wurden. Bei jeder weiteren Optimierung konnte der MBR anwenderfreundlicher und kompakter gestaltet werden. Ausgehend davon konnten alle gesammelten Erkenntnisse in die Entwicklung und Fertigung der in Abbildung 87 im letzten Schritt dargestellten neuen MBR überführt werden. Dazu wurde der bestehende Prozess optimiert sowie durch neue, erforderliche Prozessschritte ergänzt.

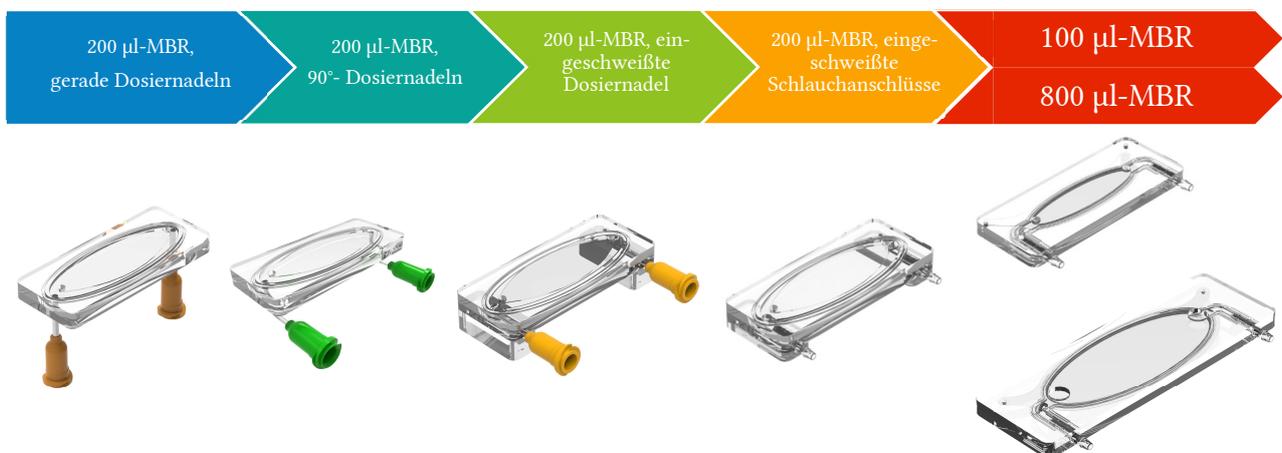


Abbildung 87: Übersicht der einzelnen Entwicklungsstufen der verschiedenen MBR.

Mithilfe des 100 μl -MBR kann aufgrund des reduzierten Volumens das parallelisierte Vorscreening geeigneter Zelllinien bzw. Starterkulturen mit geringen Zellzahlen erfolgen. Dadurch können bei der Vorbereitungsphase zur biotechnologischen Fermentation Zeit und Kosten eingespart werden. Mit dem 800 μl -MBR kann die Kultivierung einer höheren Zellzahl erfolgen. Zudem können diese MBR als einzelne Module hintereinandergeschaltet werden, um so die Kompartimentierung im Pflanzengewebe technisch nachzubilden und durch einen gemeinsamen metabolischen Fluss unterschiedliche Pflanzenstoffe zu produzieren.

Durch Mikrofräsen konnten erste Prototypen für den 100 μl - und 800 μl -MBR verifiziert und daraus das Design für die Formeinsätze abgeleitet werden. Die Formeinsätze wiederum ermöglichten eine detailgetreue Abformung der Chiphälften der MBR. Transparente Chiphälften konnten durch die Integration von Entformschrägen und die Verwendung einer polierten Chromplatte direkt generiert werden. Überdies konnte die Prozessdauer von anfänglichen 40 min für beide Materialien PC und PET bei gleicher Qualität auf unter 10 min gesenkt werden.

Zum Fügen der MBR wurde ein zweistufiger Ultraschallschweiß-Prozess erfolgreich implementiert. Dabei wird die PET-Membran mit einem PET-Gewebering im ersten Schritt direkt auf die Zellkammer der einen Chiphälfte aufgeschweißt und die Zellkammer nach unten versiegelt. Im zweiten Schritt werden beim Ultraschallschweißen neben dem Fügen der Chiphälfte mit Versorgungskammer auch gleich die fluidische Kontaktierung in Form von gängigen Schlauchanschlüssen mit einem ID von 1,6 mm realisiert. Die Vorteile dieses zweistufigen Prozesses liegen hierbei in der Montage der Schlauchanschlüsse in-plane und der damit verbundenen Reduktion der Bauteilhöhe von anfänglichen 35 mm auf 3,6 mm beim 100 μl -MBR und auf 4,2 mm beim 800 μl -MBR.

Neben dem Ultraschallschweißen konnte das Laserdurchstrahlschweißen erprobt werden, mit dem der MBR zwar mit weniger Falten in der Membran, aber dafür ohne Schlauchanschlüsse und bei einer längeren Prozessdauer gefügt werden konnte. Die Nettozeit der gesamten Fertigung eines einzelnen MBR betrug zwischen 13,02-18,00 min abhängig von der jeweiligen Füge-technologie. Das Minimum stellte das Heißprägen mit Ultraschallschweißen des 100 μl -MBR, das Maximum das Heißprägen und Laserdurchstrahlschweißen des 800 μl -MBR dar. Der neue Herstellprozess war unabhängig von der gewählten Füge-technologie reproduzierbar und lässt sich für PC und PET für alle Replikations- und Fügemethoden auf die Massenfertigung übertragen. Ob die Chiphälften aus PC oder PET gefertigt werden, ist weniger vom Materialpreis als vielmehr von der Verfügbarkeit von Membranen oder Schlauchanschlüssen aus dem jeweiligen Material abhängig. Für beide Materialien zeigte sich eine Kompatibilität mit der PET-Membran und den PC-Schlauchanschlüssen. Beide Versionen des MBR konnten durch einfaches Aufstecken von Schläuchen auf die Schlauchanschlüsse kontaktiert und über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen fluidisch dicht bei den Flussraten von 20 - 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ betrieben werden.

Das Diffusionsverhalten der Nährstoffe Maltose und Saccharose an der Membran konnte einerseits mit einer Simulation in COMSOL Multiphysics® und andererseits mit Messungen am NMR-Spektrometer untersucht werden. Die Simulation zeigte für den 800 μl -MBR entsprechend dessen größerer Höhe und Länge eine langsamere Verteilung der Nährstoffe in der gesamten Zellkammer. Dennoch konnte sowohl für den 100 μl -MBR als auch für den 800 μl -MBR eine ausreichende

Versorgung der Pflanzenzellen verifiziert werden. Ein Vergleich beider Methoden anhand des Beispiels des Messeinsatzes für die NMR-Experimente war bedingt möglich, da die Konzentrationsanstiege unterschiedlich schnell erfolgten.

Durch die 100 µl- und 800 µl- MBR war eine Langzeitkultivierung verschiedener Pflanzenzellen über mehr als 14 Tage möglich. Die eingesetzten Pflanzenzellen der Arten BY-2, *C. roseus* und *T. chinensis* konnten unter sterilen Bedingungen kultiviert und am Ende wieder entnommen werden. Obwohl die Membran nicht völlig faltenfrei in die MBR integriert werden konnte, hatte dies keine negativen Auswirkungen auf die Kultivierung der Pflanzenzelllinien.

Mit BY-2 wurde der Machbarkeitsnachweis erbracht, indem Signalstoffe aus den Zellen des ersten Moduls die Zellen im zweiten Modul nachweislich beeinflussen. Mit *C. roseus* konnten analog zwei gekoppelte, mit verschiedenen Zelllinien befüllte MBR betrieben werden. Als MBR wurden in diesem Fall alle MBR-Versionen eingesetzt und verifiziert. Dabei wurden bei jedem Ansatz entweder Vindolin oder Catharantin als Vorstufen von Vinblastin detektiert. Bei *T. chinensis* waren zwar keine spezifischen Zwischen- oder Endprodukte auszumachen, dafür ließen sich diese Zellen ebenfalls über mehr als 14 Tage erfolgreich kultivieren.

Im Betrieb der MBR konnten alle Pflanzenzellen in der Zellkammer aufgrund der Bauteilhöhen sowie durch die Transparenz der Bauteile unter dem Mikroskop fokussiert sowie beobachtet werden. Zudem war es mit einem in den Verschluss der Zellkammer integrierten Sensor möglich, den pH-Wert online direkt in der Zellkammer zu messen.

Für die Analyse einzelner Zellen oder Zellaggregate konnte die Membran mit einer Struktur versehen werden, welche die Zellen in einer Art Mikrowells hält. Diese Struktur kann individuell an die Größe einzelner Zellen oder Zellaggregate angepasst werden und bietet sich vor allem für das Vorscreening im 100 µl-MBR an.

Abschließend wurde eine Kostenanalyse durchgeführt, aus der die Gesamtkosten pro MBR errechnet und für die einzelnen Fertigungsschritte verglichen wurden. Die mit ca. 4 min schnellste und damit billigste Variante zur Fertigung eines MBR stellt die Replikation durch Spritzguss und das Fügen durch Ultraschallschweißen dar. Wie erwartet wäre das Heißprägen nur bei einer Stückzahl von wenigen 100 MBR anstelle des Spritzgusses ökonomischer.

9 Ausblick

Beide in dieser Arbeit entwickelten MBR können in Zukunft für weitere Kombinationen und Verschaltungen von Pflanzenzellen oder Zellen anderer Organismen eingesetzt werden und bieten Potential zur Untersuchung verschiedener Aspekte:

- BY-2, *C. roseus* und *T. chinensis* können in anderen Reihen- und Parallelschaltungen kultiviert werden. Dabei könnten weitere Sekundärmetaboliten im metabolischen Fluss produziert bzw. detektiert werden. Zudem wären Versuche mit unterschiedlichen Anzahlen an MBR pro Zelltyp denkbar, da im realen Gewebe auch nicht alle Zelltypen in derselben Zellzahl vorkommen.
- Weitere Organismen wie beispielsweise Bakterien, Pilze, etc. könnten in den MBR kultiviert werden. Darüber hinaus könnte deren Wechselwirkungen untereinander untersucht werden. [163, 164]
- Als Vergleich zum Diffusionsbetrieb kann der Durchströmungsbetrieb erprobt werden. Dabei können die Auswirkung auf das Zellwachstum und die Produktion von Sekundärmetaboliten analysiert werden.
- Die bisherigen Versuche können wiederholt werden, während gleichzeitig über die gesamte Kultivierungsdauer eine pH-Messung erfolgt.
- Über mehrere Tage können verschiedene Pflanzenzelllinien in den MBR mit der strukturierten PET-Membran kultiviert und deren Auswirkung auf das Zellwachstum untersucht werden.

Im Konkreten können in der Fertigung folgende Aspekte getestet werden:

- Zum Spritzguss der Chiphälften können Werkzeuge aufgebaut werden. Dabei können flüssige Kontaktierung bereits integriert werden, wodurch Kosten für separate Schlauchanschlüsse entfallen würden.
- Die Fertigung und Erprobung der Chiphälften könnte aus anderen transparenten sowie biokompatiblen thermoplastischen Polymeren wie z. B. Cycloolefin-Copolymere (COC) oder Polystyrol (PS) erfolgen [165].
- Die PET-Membran könnte wie in Abbildung 88 gezeigt mit einer strukturierten Sonotrode mit mehreren ERG-Strukturen ultraschallgeschweißt werden. Dafür wären zusätzlich Stege in der Zellkammer erforderlich. Hierbei könnte das Ultraschallschweißen der Membran unter reduzierter Faltenbildung erreicht werden.
- Zum Ultraschallschweißen der PET-Membran und des PET-Gewebes können spitzere ERG anstatt der verrundeten ERG erprobt werden, wodurch diese die Membran und das Gewebe reproduzierbarer durchdringen und es reproduzierbar zu vollständig dichten Schweißnähten kommen kann.

- Ein alternativer Fügeprozess der MBR durch Laserdurchstrahlschweißen der Membran und Ultraschallschweißen der Chiphälften mit den Schlauchanschlüssen könnte untersucht werden.

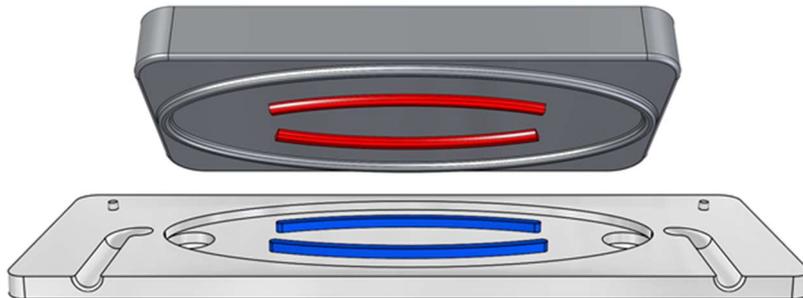


Abbildung 88: Ultraschallschweißen mit einer strukturierten Sonotrode (oben), welche zusätzliche ERG-Strukturen (rot) besitzt, mit der eine Membran auf die sich in der Zellkammer (unten) befindenden, zusätzlichen Stege (blau) fixiert werden kann.

Bei der Untersuchung des Diffusionsverhaltens an der Membran wären weitere Untersuchungen denkbar:

- Der NMR-Messeinsatz kann mit Saccharose oder den von den Pflanzenzellen jeweils produzierten Stoffen wie Vinblastin oder Paclitaxel getestet werden.
- Die Charakterisierung der Diffusion und Messung der Diffusionskoeffizienten kann durch alternative Methoden, z. B. Interferometrie (Gouy, Rayleigh, Mach-Zehnder), erfolgen [40].

A Literaturverzeichnis

- [1] Yao, J., Weng, Y., Dickey, A. und Wang, K. Y., *Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges*, Int. J. Mol. Sci., 2015, 16(12), 28549-28565.
- [2] Saito, K. und Matsuda, F., *Metabolomics for Functional Genomics, Systems Biology, and Biotechnology*, Annu. Rev. Plant. Biol., 2010, 61, 463-489.
- [3] El-Sayed, M. und Verpoorte, R., *Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation*, Phytochem. Rev., 2007, 6(2), 277-305.
- [4] van Der Heijden R., J. D. I., Snoeijer W., Hallard D., Verpoorte R., *The Catharanthus Alkaloids: Pharmacogenosy and Biotechnology*, Curr. Med. Chem., 2004, 11(5), 607-628.
- [5] Nick, P. und Zdeněk, O., *Applied Plant Cell Biology: Cellular Tools and Approaches for Plant Biotechnology*, Plant Cell Monographs; 22, Nick, P., 2014, Berlin, Heidelberg: Springer.
- [6] Shen, Y.-C., Chen, Y.-J. und Chen, C.-Y., *Taxane diterpenoids from the seeds of Chinese yew Taxus chinensis*, Phytochemistry, 1999, 52(8), 1565-1569.
- [7] Grigoriev, I. S., Chernobelskaya, A. A. und Vorobjev, I. A., *Nocodazole, vinblastine and taxol at low concentrations affect fibroblast locomotion and saltatory movements of organelles*, Membr. Cell Biol., 1999, 13(1), 23-48.
- [8] Lüttge, U., Kluge, M. und Thiel, G., *Botanik : die umfassende Biologie der Pflanzen*, 1. Aufl., 2010, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [9] Ziegler, J. und Facchini, P. J., *Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking*, Annu. Rev. Plant. Biol., 2008, 59(59), 735-769.
- [10] Manz, C., *Cell fermentation and microfluidics*, Dissertation, 2019, Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- [11] Maisch, J., Kreppenhof, K., Buchler, S., Merle, C., Sobich, S., Gorling, B., Luy, B., Ahrens, R., Guber, A. E. und Nick, P., *Time-resolved NMR metabolomics of plant cells based on a microfluidic chip*, J. Plant Physiol., 2016, 200, 28-34.
- [12] Ko, J. M., Ju, J., Lee, S. und Cha, H. C., *Tobacco protoplast culture in a polydimethylsiloxane-based microfluidic channel*, Protoplasma, 2006, 227(2-4), 237-240.
- [13] Wu, H., Liu, W. M., Tu, Q., Song, N., Li, L., Wang, J. C. und Wang, J. Y., *Culture and chemical-induced fusion of tobacco mesophyll protoplasts in a microfluidic device*, Microfluid. Nanofluid., 2011, 10(4), 867-876.
- [14] Busch, W., Moore, B. T., Martsberger, B., Mace, D. L., Twigg, R. W., Jung, J., Pruteanu-Malinici, I., Kennedy, S. J., Fricke, G. K., Clark, R. L., Ohler, U. und Benfey, P. N., *A microfluidic*

- device and computational platform for high-throughput live imaging of gene expression*, Nat. Methods, 2012, 9(11), 1101-1106.
- [15] Grossmann, G., Guo, W.-J., Ehrhardt, D. W., Frommer, W. B., Sit, R. V., Quake, S. R. und Meier, M., *The RootChip: an integrated microfluidic chip for plant science*, Plant Cell, 2011, 23(12), 4234-4240.
- [16] Sanati Nezhad, A., Ghanbari, M., Agudelo, C. G., Naghavi, M., Packirisamy, M., Bhat, R. B. und Geitmann, A., *Optimization of flow assisted entrapment of pollen grains in a microfluidic platform for tip growth analysis*, Biomed. Microdevices, 2014, 16(1), 23-33.
- [17] Sanati Nezhad, A., Naghavi, M., Packirisamy, M., Bhat, R. und Geitmann, A., *Quantification of cellular penetrative forces using lab-on-a-chip technology and finite element modeling*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2013, 110(20), 8093-8098.
- [18] Yetisen, A. K., Jiang, L., Cooper, J. R., Qin, Y., Palanivelu, R. und Zohar, Y., *A microsystem-based assay for studying pollen tube guidance in plant reproduction*, J. Micromech. Microeng., 2011, 21(5), 054018.
- [19] Temiz, Y., Lovchik, R. D., Kaigala, G. V. und Delamarche, E., *Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?*, Microelectron. Eng., 2015, 132, 156-175.
- [20] Berthier, E., Young, E. W. und Beebe, D., *Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia*, Lab Chip, 2012, 12(7), 1224-1237.
- [21] Kreppenhöfer, K., *Modular Biomicrofluidics: Mikrofluidikchips im Baukastensystem für Anwendungen aus der Zellbiologie*, Dissertation, 2013, Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- [22] Huang, T. K. und McDonald, K. A., *Bioreactor systems for in vitro production of foreign proteins using plant cell cultures*, Biotechnol. Adv., 2012, 30(2), 398-409.
- [23] Heldt, H. W., *Pflanzenbiochemie*, 5. Aufl., SpringerLink : Bücher, Piechulla, B., 2015, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- [24] Keasling, J. D., *Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering*, Science, 2010, 330(6009), 1355-1358.
- [25] Thieman, W. J. und Palladino, M. A., *Biotechnologie*, Hopf, N.W., 2007, München: Pearson Studium.
- [26] Nawaz, Z., Kakar, K. U., Ullah, R., Yu, S., Zhang, J., Shu, Q. Y. und Ren, X. L., *Genome-wide identification, evolution and expression analysis of cyclic nucleotide-gated channels in tobacco (Nicotiana tabacum L.)*, Genomics, 2019, 111(2), 142-158.
- [27] Shoji, T. und Hashimoto, T., *Why does anatabine, but not nicotine, accumulate in jasmonate-elicited cultured tobacco BY-2 cells?*, Plant Cell Physiol., 2008, 49(8), 1209-1216.
- [28] Nagata, T. und Kumagai, F., *Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line*, Methods Cell Sci., 1999, 21(2), 123-127.

- [29] Nagata, T., Nemoto, Y. und Hasezawa, S., *Tobacco BY-2 Cell Line as the "HeLa" Cell in the Cell Biology of Higher Plants*, in *International Review of Cytology* Jeon, K.W. und Friedlander, M., 1992: Academic Press, 1-30.
- [30] Naeem, M., Tariq, A. und Khan, M. M. A., *Catharanthus roseus : Current Research and Future Prospects*, SpringerLink : Bücher, 2017, Cham: Springer International Publishing.
- [31] Furusaki, S. und Takeda, T., *Bioreactors for Plant Cell Culture*, in *Ref. Mod. Life Sci.*, 2017, Dordrecht: Elsevier.
- [32] Karlheinz Knoch, *Catharanthus roseus var. albus-5*, 2013; <https://drive.google.com/file/d/0Bxr08jqsf4y0RTJkc1BWdjFUMjQ/view> (Zugriff am 22.01.2019).
- [33] Karlheinz Knoch, *Taxus baccata-1*, 2013; <https://drive.google.com/file/d/0Bxr08jqsf4y0QV80U2dQclBJS2s/view> (Zugriff am 22.01.2019).
- [34] Delamarche, E. und Govind, V. K., *Open-Space Microfluidics: Concepts, Implementations, Applications*, 2018, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [35] Whitesides, G. M., *The origins and the future of microfluidics*, *Nature*, 2006, 442(7101), 368-373.
- [36] Kockmann, N., *Micro process engineering: fundamentals, devices, fabrication, and applications*, *Advanced micro and nanosystems*; 5, Kockmann, N., 2006, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [37] Oertel, H., Böhle, M. und Reviol, T., *Strömungsmechanik für Ingenieure und Naturwissenschaftler*, 7. Aufl., 2015, Wiesbaden: Springer Vieweg.
- [38] Baehr, H. D. und Stephan, K., *Wärme- und Stoffübertragung*, 9. Aufl., 2016, Berlin, Heidelberg: Springer Vieweg.
- [39] Nguyen, N.-T. und Wereley, S. T., *Fundamentals and applications of microfluidics*, 2. Aufl., *Integrated microsystems series*, 2006, Boston, London: Artech House Inc.
- [40] Cussler, E. L., *Diffusion: mass transfer in fluid systems*, 3. Aufl., 2009, Cambridge: Cambridge University Press.
- [41] Wilke, C. R. und Chang, P., *Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions*, *AIChE Journal*, 1955, 1(2), 264-270.
- [42] Castillo-León, J. und Svendsen, W. E., *Lab-on-a-Chip Devices and Micro-Total Analysis Systems: a practical guide*, 2015, Cham: Springer International Publishing.
- [43] Funke, M., Buchenauer, A., Mokwa, W., Kluge, S., Hein, L., Müller, C., Kensity, F. und Buchs, J., *Bioprocess control in microscale: scalable fermentations in disposable and user-friendly microfluidic systems*, *Microb. Cell Fact.*, 2010, 9(86).

- [44] Wohlgemuth, R., Plazl, I., Žnidaršič-Plazl, P., Gernaey, K. V. und Woodley, J. M., *Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis*, Trends Biotechnol., 2015, 33(5), 302-314.
- [45] Žnidaršič-Plazl, P. und Plazl, I., *Microbioreactors*, in *Comprehensive Biotechnology*, 2. Aufl., Moo-Young, M., 2011, Burlington: Elsevier, 289-301.
- [46] Andersson, H. und van den Berg, A., *Microfluidic devices for cellomics: a review*, Sens. Actuators B Chem., 2003, 92(3), 315-325.
- [47] Dittrich, P. S. und Schwille, P., *An integrated microfluidic system for reaction, high-sensitivity detection, and sorting of fluorescent cells and particles*, Anal. Chem., 2003, 75(21), 5767-5774.
- [48] Fredrickson, C. K. und Fan, Z. H., *Macro-to-micro interfaces for microfluidic devices*, Lab Chip, 2004, 4(6), 526-533.
- [49] Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P.-A. und Manz, A., *Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology*, Anal. Chem., 2002, 74(12), 2623-2636.
- [50] Šalić, A., Tušek, A. und Zelić, B., *Application of microreactors in medicine and biomedicine*, J. Appl. Biomed., 2012, 10(3), 137-153.
- [51] Web of Science, *Suchbegriffe "microfluidic", "cell"*; <https://apps.webofknowledge.com/> (Zugriff am 30.01.2019).
- [52] Vasdekis, A. E. und Stephanopoulos, G., *Review of methods to probe single cell metabolism and bioenergetics*, Metab. Eng., 2015, 27, 115-135.
- [53] Rajabi, F., Heene, E., Maisch, J. und Nick, P., *Combination of plant metabolic modules yields synthetic synergies*, PLoS One, 2017, 12(1), e0169778.
- [54] Sobich, S., *Konzeption und Realisierung eines Mehrkammer-Chip-Systems für Pflanzenzellen*, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Masterarbeit, 2013.
- [55] Sackmann, E. K., Fulton, A. L. und Beebe, D. J., *The present and future role of microfluidics in biomedical research*, Nature, 2014, 507(7491), 181-189.
- [56] Domininghaus, H., *DOMININGHAUS - Kunststoffe: Eigenschaften und Anwendungen*, 8. Aufl., VDI-Buch, Elsner, P., Eyerer, P., und Hirth, T., 2012, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [57] Wintermantel, E. und Ha, S.-W., *Medizintechnik: Life Science Engineering*, 5. Aufl., 2009, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [58] Abts, G., *Kunststoff-Wissen für Einsteiger*, 3. Aufl., 2016, München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- [59] Kaiser, W., *Kunststoffchemie für Ingenieure: von der Synthese bis zur Anwendung*, 4. Aufl., 2015, München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.

- [60] Runge, T., Sackmann, J., Schomburg, W. K. und Blank, L. M., *Ultrasonically manufactured microfluidic device for yeast analysis*, *Microsyst. Technol.*, 2017, 23(6), 2139-2144.
- [61] Potente, H., *Fügen von Kunststoffen: Grundlagen, Verfahren, Anwendung*, 2004, München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- [62] Grewell, D., Benatar, A. und Park, J. B., *Plastics and composites welding handbook*, 2003, München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- [63] Rajabi, T., Ahrens, R., Huck, V., März, M., Gantenbein, H., Schneider Stefan, W., Schrotten, H. und Guber Andreas, E., *Investigation of endothelial growth using a sensors-integrated microfluidic system to simulate physiological barriers*, *Current Directions in Biomedical Engineering*, 2015, 1(1), 14.
- [64] Rajabi, T., Finkbeiner, T., Ahrens, R., Garschagen, R. und Guber, A. E. *Introduction of Polyethylene Terephthalate (PET) Enabling the Fabrication of In Vitro Models for Medical or Pharmaceutical Applications*. in *22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. 2018.
- [65] Klocke, F. und König, W., *Fertigungsverfahren 1: Drehen, Fräsen, Bohren*, 8. Aufl., 2008, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [66] Menz, W., Mohr, J. und Paul, O., *Mikrosystemtechnik für Ingenieure*, 3. Aufl., 2012, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [67] Worgull, M., *Hot embossing: theory and technology of microreplication*, 1. Aufl., Micro & nano technologies, Ramsden, J., 2009, Oxford: William Andrew.
- [68] Ho, C. M. B., Ng, S. H., Li, K. H. H. und Yoon, Y.-J., *3D printed microfluidics for biological applications*, *Lab Chip*, 2015, 15(18), 3627-3637.
- [69] Au, A. K., Huynh, W., Horowitz, L. F. und Folch, A., *3D-Printed Microfluidics*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55(12), 3862-3881.
- [70] Tsao, C.-W. und DeVoe, D. L., *Bonding of thermoplastic polymer microfluidics*, *Microfluid. Nanofluid.*, 2009, 6(1), 1-16.
- [71] Grewell, D. und Benatar, A., *Welding of plastics: fundamentals and new developments*, *Int. Polym. Proc.*, 2007, 22(1), 43-60.
- [72] Ehrenstein, G. W., *Handbuch Kunststoff-Verbindungstechnik*, 2004, München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- [73] Matthes, K.-J. und Schneider, W., *Schweißtechnik: Schweißen von metallischen Konstruktionswerkstoffen*, 5. Aufl., 2012, München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- [74] *Taschenbuch DVS-Merkblätter und -Richtlinien: Fügen von Kunststoffen*, 12. Aufl., Fachbuchreihe Schweißtechnik Band 68/IV, 2008, Düsseldorf: DVS-Verlag.
- [75] Rotheiser, J., *Joining of plastics: handbook for designers and engineers*, 3. Aufl., 2009, München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.

- [76] Benatar, A., Eswaran, R. V. und Nayar, S. K., *Ultrasonic welding of thermoplastics in the near-field*, Polym. Eng. Sci., 1989, 29(23), 1689-1698.
- [77] Herrmann Ultraschalltechnik GmbH & Co. KG, *Das Ultraschallschweißen* 2019; <https://www.herrmannultraschall.com/de/ultraschall-grundlagen/grundlagen/das-ultraschallschweissen/> (Zugriff am 18.01.2019).
- [78] Benatar, A. und Cheng, Z., *Ultrasonic welding of thermoplastics in the far-field*, Polym. Eng. Sci., 1989, 29(23), 1699-1704.
- [79] Troughton, M. J. und International Institute of Welding, *Handbook of plastics joining: a practical guide*, 2. Aufl., Plastics Design Library, 2008, Norwich: William Andrew.
- [80] Herrmann Ultraschalltechnik GmbH & Co. KG, *Kunststoffe schweißen mit Ultraschall*, 2019; <https://www.herrmannultraschall.com/de/ultraschall-grundlagen/kunststoffe-schweissen/> (Zugriff am 18.01.2019).
- [81] SABEU GmbH & Co. KG, *Montage - SABEU GmbH & Co. KG*, 23.06.2015; <https://de.sabeu.com/membranen/montage> (Zugriff am 27.01.2019).
- [82] Herrmann Ultraschalltechnik GmbH & Co. KG, *MEDICAL - Herrmann Ultraschall*; <https://www.herrmannultraschall.com/de/branchen/medical/> (Zugriff am 27.01.2019).
- [83] Jevšnik, S., Eryürük, S. H., Kalaoğlu, F., Kayaoğlu, B. K., Komarkova, P., Golombikova, V. und Stjepanović, Z., *Seam properties of ultrasonic welded multilayered textile materials*, J. Ind. Text., 2016, 46(5), 1193-1211.
- [84] Iswara, V., *Aufbau membranbasierter mikrofluidischen Systeme mit Hilfe von Ultraschallschweißen*, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Masterarbeit, 2014.
- [85] Nentwig, J., *Kunststoff-Folien: Herstellung, Eigenschaften, Anwendung*, 3. Aufl., 2006, München: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- [86] Potente, H., *Untersuchung der Schweißbarkeit thermoplastischer Kunststoffe mit Ultraschall*, Dissertation, 1971, Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- [87] Sackmann, J., Burlage, K., Gerhardy, C., Memering, B., Liao, S. und Schomburg, W. K., *Review on ultrasonic fabrication of polymer micro devices*, Ultrasonics, 2015, 56, 189-200.
- [88] Altmann, B., Ahrens, R., Welle, A., Dinglreiter, H., Schneider, M. und Schober, A., *Microstructuring of multiwell plates for three-dimensional cell culture applications by ultrasonic embossing*, Biomed. Microdevices, 2012, 14(2), 291-301.
- [89] Zhu, J., Tian, Y., Yang, C., Cui, L., Wang, F., Zhang, D. und Liu, X., *Low-cost and fast fabrication of the ultrasonic embossing on polyethylene terephthalate (PET) films using laser processed molds*, Microsyst. Technol., 2017, 23(12), 5653-5668.
- [90] Mekar, H., Goto, H. und Takahashi, M., *Development of ultrasonic micro hot embossing technology*, Microelectron. Eng., 2007, 84(5-8), 1282-1287.

-
- [91] Khuntontong, P. und Schomburg, W. K., *Fabrication of polymer micro devices by ultrasonic hot embossing*, Dissertation, 2008, Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- [92] Schomburg, W. K., Burlage, K. und Gerhardy, C., *Ultrasonic Hot Embossing*, *Micromachines*, 2011, 2(2), 157-166.
- [93] Luo, Y., Yan, X., Qi, N., Wang, X. und Wang, L., *Study of double-side ultrasonic embossing for fabrication of microstructures on thermoplastic polymer substrates*, *PLoS One*, 2013, 8(4), e61647.
- [94] Liu, S.-J. und Dung, Y.-T., *Hot embossing precise structure onto plastic plates by ultrasonic vibration*, *Polym. Eng. Sci.*, 2005, 45(7), 915-925.
- [95] Perozziello, G., Bundgaard, F. und Geschke, O., *Fluidic interconnections for microfluidic systems: a new integrated fluidic interconnection allowing plug 'n' play functionality*, *Sens. Actuators B Chem.*, 2008, 130(2), 947-953.
- [96] Pfreundt, A., Andersen, K. B., Dimaki, M. und Svendsen, W. E., *An easy-to-use microfluidic interconnection system to create quick and reversibly interfaced simple microfluidic devices*, *J. Micromech. Microeng.*, 2015, 25(11), 115010.
- [97] Yuen, P. K., *A reconfigurable stick-n-play modular microfluidic system using magnetic interconnects*, *Lab Chip*, 2016, 16(19), 3700-3707.
- [98] Wilhelm, E., Neumann, C., Duttonhofer, T., Pires, L. und Rapp, B. E., *Connecting microfluidic chips using a chemically inert, reversible, multichannel chip-to-world-interface*, *Lab Chip*, 2013, 13(22), 4343-4351.
- [99] Puntambekar, A. und Ahn, C. H., *Self-aligning microfluidic interconnects for glass- and plastic-based microfluidic systems*, *J. Micromech. Microeng.*, 2002, 12(1), 35-40.
- [100] Ng, S. H., Wang, Z. F. und de Rooij, N. F., *Microfluidic connectors by ultrasonic welding*, *Microelectron. Eng.*, 2009, 86(4-6), 1354-1357.
- [101] Lee, S.-J. J. und Sundararajan, N., *Microfabrication for microfluidics*, Integrated microsystems series, 2010, Boston, London: Artech House Inc.
- [102] Mair, D. A., Geiger, E., Pisano, A. P., Fréchet, J. M. J. und Svec, F., *Injection molded microfluidic chips featuring integrated interconnects*, *Lab Chip*, 2006, 6(10), 1346-1354.
- [103] Sackmann, J., *Ultraschallfertigung zur Herstellung mikrofluidischer Systeme*, Dissertation, 2016, Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.
- [104] Tollkötter, A., Sackmann, J., Baldhoff, T., Schomburg, W. K. und Kockmann, N., *Modulares Mikroreaktorsystem aus ultraschallheißgeprägten Polymerfolien*, *Chem. Ing. Tech.*, 2015, 87(6), 823-829.
- [105] Hoehr, L., Bavendiek, J., Sackmann, J. und Schomburg, W. K., *Ultrasonic welding of polymer micro fluidic devices by inserting metal parts*, *Microsyst. Technol.*, 2019, 25(2), 673-681.

- [106] Katō, S., Horiuchi, J. i. und Yoshida, F., *Biochemical engineering: a textbook for engineers, chemists and biologists*, 2. Aufl., 2015, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [107] Chmiel, H., Takors, R. und Weuster-Botz, D., *Bioprozesstechnik*, 4. Aufl., 2018, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- [108] Mortimer, C. E. und Müller, U., *Chemie: das Basiswissen der Chemie*, 10. Aufl., 2010, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- [109] Gey, M. H., *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*, 3. Aufl., 2015, Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- [110] Friebolin, H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung*, 5. Aufl., 2013, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [111] Hore, P. J., *Nuclear magnetic resonance*, Oxford chemistry primers, 32, 1995, Oxford: Oxford University Press.
- [112] Wencel, D., Abel, T. und McDonagh, C., *Optical chemical pH sensors*, *Anal. Chem.*, 2014, 86(1), 15-29.
- [113] Shinwari, M. W., Zhitomirsky, D., Deen, I. A., Selvaganapathy, P. R., Deen, M. J. und Landheer, D., *Microfabricated reference electrodes and their biosensing applications*, *Sensors (Basel)*, 2010, 10(3), 1679-1715.
- [114] Narayanaswamy, R. und Wolfbeis, O. S., *Optical Sensors: industrial, environmental and diagnostic applications*, 2004, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- [115] Finkbeiner, T., Soergel, H. L., Koschitzky, M. P., Ahrens, R. und Guber, A. E., *Ultrasonic welding for the rapid integration of fluidic connectors into microfluidic chips*, *J. Micromech. Microeng.*, 2019, 29(6).
- [116] Covestro AG Communications, *Makrolon® GP*, <https://www.sheets.covestro.com/Products/Makrolon-Solid-Sheets/Makrolon-GP.aspx> (Zugriff am 20.02.2019).
- [117] MEDIPACK AG, *Datenblätter*, <https://www.medipack.ch/page/downloads/datenblaetter.php> (Zugriff am 20.02.2019).
- [118] Merck KGaA, *Isopore Membran, Polykarbonat, hydrophil, 0,4 µm, 142 mm, weiß, glatt | HTTP14250*, http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Isopore-Membrane-Filter,MM_NF-HTTP14250 (Zugriff am 22.02.2019).
- [119] Sterlitech Corporation, *Hydrophilic Polyester (PETE) Membrane Filters - Polyester Membran*, 2018; <https://www.sterlitech.com/polyester-pete-membranes.html> (Zugriff am 20.02.2019).
- [120] Nordson Corporation, *Tube to Tube Fitting - N210-9 | Nordson MEDICAL*, 2019; <https://www.nordsonmedical.com/Shop/Fluid-Management/Products/N210-9> (Zugriff am 20.02.2019).

- [121] Nordson Corporation, *Luer Fitting - FTLLP-9 | Nordson MEDICAL*, 2019; <https://www.nordsonmedical.com/Shop/Fluid-Management/Products/FTLLP-9> (Zugriff am 20.02.2019).
- [122] Polymaker, *PolyLite™ PC (formerly PC-Plus™) - Polymaker EU*, 2019; <https://eu.polymaker.com/product/polylite-pc/> (Zugriff am 20.02.2019).
- [123] Innofil3D BV, *Natural Translucent Coloured - 2.85mm - 750gr | Recycled PET Filament*; <https://www.innofil3d.com/product/epr-innopet-2-85mm-750gr/> (Zugriff am 20.02.2019).
- [124] Deutsches Kupferinstitut, *Deutsches Kupferinstitut: Werkstoff Datenblätter*, 2019; <https://www.kupferinstitut.de/de/beratung-und-service/downloads/downloads/werkstoffe/werkstoff-datenblaetter.html> (Zugriff am 23.02.2019).
- [125] Rajabi, T., *Entwicklung eines mikrofluidischen Zweikammer-Chipsystems mit integrierter Sensorik für die Anwendung in der Tumorforschung*, Dissertation, 2014, Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- [126] Persönliche Mitteilung von Lenke, J., 30.05.2016.
- [127] Persönliche Mitteilung von Lenke, J., 20.10.2016.
- [128] Koschitzky, M. P., *Untersuchung und Fertigung thermoplastischer Mikrobauteile mittels Ultraschallprägen*, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Masterarbeit, 2018.
- [129] Persönliche Mitteilung von Lenke, J., 08.08.2017.
- [130] Reichen, M., Macown, R. J., Jaccard, N., Super, A., Ruban, L., Griffin, L. D., Veraitch, F. S. und Szita, N., *Microfabricated modular scale-down device for regenerative medicine process development*, PLoS One, 2012, 7(12), e52246.
- [131] TissUse GmbH, *4-Organ-Chip (4-OC) | TissUse GmbH*, 2019; <https://www.tissuse.com/de/produkte/4-organ-chip-4-oc/> (Zugriff am 18.02.2019).
- [132] Persönliche Mitteilung von Lenke, J., 07.07.2016.
- [133] Persönliche Mitteilung von Raorane, M., 30.08.2017 und Lenke, J., 01.09.2017.
- [134] Soergel, H. L., *Entwicklung und Validierung verschiedener Konnektortypen für einen mikrofluidischen Bioreaktor*, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Bachelorarbeit, 2017.
- [135] Persönliche Mitteilung von Lenke, J., 02.03.2017.
- [136] Persönliche Mitteilung von Manz, C., 19.03.2017.
- [137] Persönliche Mitteilung von Raorane, M., 05.04.2017.

- [138] Xia, Y., *Kostenanalyse und Prozessoptimierung bei der Herstellung eines mikrofluidischen Chips für die Wirk-stoffherstellung*, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Bachelorarbeit, 2019.
- [139] Hawe, A., Sutter, M. und Jiskoot, W., *Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization*, Pharm. Res., 2008, 25(7), 1487-1499.
- [140] Persönliche Mitteilung von Thelen, R., 05.04.2019.
- [141] Sefar AG, *SEFAR - Filter-Produkte für Membranen & Brennstoffzellen*; <https://www.sefar.com/de/609/Membrantechnik.htm?Folder=3293748> (Zugriff am 11.03.2019).
- [142] Jordahl, J. H., Solorio, L., Sun, H., Ramcharan, S., Teeple, C. B., Haley, H. R., Lee, K. J., Eyster, T. W., Luker, G. D., Krebsbach, P. H. und Lahann, J., *3D jet writing: functional microtissues based on tessellated scaffold architectures*, Adv. Mater., 2018, 30(14), 1707196.
- [143] Váradi, M., Adányi, N., Nagy, G. und Rezessy-Szabó, J., *Studying the bienzyme reaction with amperometric detection for measuring maltose*, Biosens. Bioelectron., 1993, 8(6), 339-345.
- [144] Le, N. C. H., Gel, M., Zhu, Y., Dacres, H., Anderson, A. und Trowell, S. C., *Real-time, continuous detection of maltose using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) on a microfluidic system*, Biosens. Bioelectron., 2014, 62, 177-181.
- [145] Jenne, F., *Design and fabrication of a NMR-compatible insert for in vivo analyses of zebrafish embryos*, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Bachelorarbeit, 2018.
- [146] Müller, M., *Entwicklung eines mikrofluidischen Testaufbaus zur Messung der Diffusionsrate verschiedener Mole-küle durch eine Polymermembran*, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Bachelorarbeit, 2018.
- [147] Chung, H. H., Chan, C. K., Khire, T. S., Marsh, G. A., Clark, A., Jr., Waugh, R. E. und McGrath, J. L., *Highly permeable silicon membranes for shear free chemotaxis and rapid cell labeling*, Lab Chip, 2014, 14(14), 2456-2468.
- [148] Loskill, P., Sezhian, T., Tharp, K. M., Lee-Montiel, F. T., Jeeawoody, S., Reese, W. M., Zushin, P.-J. H., Stahl, A. und Healy, K. E., *WAT-on-a-chip: a physiologically relevant microfluidic system incorporating white adipose tissue*, Lab Chip, 2017, 17(9), 1645-1654.
- [149] Vereshchagina, E., Mc Glade, D., Glynn, M. und Ducree, J., *A hybrid microfluidic platform for cell-based assays via diffusive and convective trans-membrane perfusion*, Biomicrofluidics, 2013, 7(3), 034101.
- [150] Baker, R. W., *Membrane Technology and Applications*, 3. Aufl., 2012, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- [151] Kashima, K. und Imai, M., *Selective diffusion of glucose, maltose, and raffinose through calcium alginate membranes characterized by a mass fraction of guluronate*, Food Bioprod. Process., 2017, 102, 213-221.

- [152] Parvinder Khanuja, V. R. C. a. A. A. A., *Apparent molar volume and viscometric study of carbohydrate in aqueous solution*, Der Chemica Sinica, 2012, 3(4), 948-952.
- [153] Hisashi, U. und Hatsuho, U., *Diffusion coefficients of xylose and maltose in aqueous solution*, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1969, 42(8), 2140-2142.
- [154] Shen, N., *Numerische Simulation zur Optimierung der Diffusion von Maltose durch eine Polymermembran*, Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT), Masterarbeit, 2018.
- [155] Lecheler, S., *Numerische Strömungsberechnung: schneller Einstieg durch anschauliche Beispiele mit ANSYS 15.0*, 3. Aufl., 2014, Wiesbaden: Springer Vieweg.
- [156] Persönliche Mitteilung von Manz, C., 09.01.2018.
- [157] Rischer, H., Oresic, M., Seppanen-Laakso, T., Katajamaa, M., Lammertyn, F., Ardiles-Diaz, W., Van Montagu, M. C. E., Inze, D., Oksman-Caldentey, K. M. und Goossens, A., *Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in Catharanthus roseus cells*, P. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103(14), 5614-5619.
- [158] Lerouge, S. und Simmons, A., *Sterilisation of biomaterials and medical devices*, 1. Aufl., Woodhead Publishing Series in Biomaterials, 46, 2012, Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- [159] Persönliche Mitteilung von Mailänder, W., 05.10.2018.
- [160] microfluidic ChipShop, *The Lab-on-a-Chip Catalogue*, 2019; <https://www.microfluidic-chipshop.com/catalogue/> (Zugriff am 06.04.2019).
- [161] Micronit Microtechnologies B.V., *Organ-On-a-Chip*, 2019; <https://store.micronit.com/microfluidic-chips/organ-on-a-chip> (Zugriff am 06.04.2019).
- [162] Dolomite Microfluidics, *Membrane Chip Interface*, 2019; <https://www.dolomite-microfluidics.com/product/membrane-chip/> (Zugriff am 06.04.2019).
- [163] Massalha, H., Korenblum, E., Malitsky, S., Shapiro, O. H. und Aharoni, A., *Live imaging of root-bacteria interactions in a microfluidics setup*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2017, 114(17), 4549-4554.
- [164] Stanley, C. E. und van der Heijden, M. G. A., *Microbiome-on-a-Chip: new frontiers in plant-microbiota research*, Trends Microbiol., 2017, 25(8), 610-613.
- [165] Gencturk, E., Mutlu, S. und Ulgen, K. O., *Advances in microfluidic devices made from thermoplastics used in cell biology and analyses*, Biomicrofluidics, 2017, 11(5), 051502-051502.

B Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1: | Technische Nachahmung von Pflanzengewebe durch Kultivierung unterschiedlich differenzierter Zelltypen in einzelnen Modulen mit einer Koppelung durch einen gemeinsamen metabolischen Fluss..... | 2 |
| Abbildung 2: | Schematischer Aufbau einer Pflanzenzelle, in Anlehnung an [23]. | 6 |
| Abbildung 3: | Die in <i>C. roseus</i> am Stoffwechselweg für Vindolin, der Vorstufe von Vinblastin, beteiligten Zelltypen..... | 8 |
| Abbildung 4: | Das Madagaskar-Immergrün (<i>C. roseus</i>). | 8 |
| Abbildung 5: | Wasser steigt in einem Kanal mit Gas auf. Dabei kann der Kontaktwinkel zwischen den verschiedenen Phasengrenzen bestimmt werden..... | 10 |
| Abbildung 6: | Betrieb eines mikrofluidischen Chips für die Zellkultivierung. | 12 |
| Abbildung 7: | MBR zur Kultivierung von Pflanzenzellen mit Zellwand nach Kreppenhofer 2013 [21]. | 14 |
| Abbildung 8: | Erster durch Mikrofräsen hergestellter und durch Ultraschall verschweißter Prototyp eines mikrofluidischen Bioreaktors mit durch Presspassung befestigte Dosiernadeln für den fluidischen Anschluss. | 14 |
| Abbildung 9: | Durch Heißprägen der Chiphälften und anschließendes Ultraschallschweißen gefertigter 200 µl-MBR. | 15 |
| Abbildung 10: | Chemische Struktur von Bisphenol-A-Polycarbonat [56, 57, 59]. | 16 |
| Abbildung 11: | Chemische Struktur von Polyethylenterephthalat [56, 57]. | 17 |
| Abbildung 12: | Spritzgussmaschine, vereinfacht dargestellt nach [56]. | 19 |
| Abbildung 13: | Schematische Darstellung des Heißprägeprozesses..... | 20 |
| Abbildung 14: | Zum Heißprägen verwendete Wärmeumformmaschinen WUM 01 (links) und WUM 02 (rechts)..... | 21 |
| Abbildung 15: | Exemplarischer Verlauf der Parameter Temperatur (rot), Weg (grün) und Kraft (blau) beim Heißprägen eines Bauteils aus PC in der WUM 02. | 21 |
| Abbildung 16: | Schematische Darstellung des 3D-Drucks durch das Schmelzschichtverfahren (FDM), vereinfacht dargestellt nach [69] (links), rote Pfeile zeigen die Bewegungsrichtungen der einzelnen Komponenten an. Frontaufnahme des in dieser Arbeit eingesetzten 3D-Druckers (rechts)..... | 22 |
| Abbildung 17: | Ultraschallschweiß-Maschine..... | 24 |
| Abbildung 18: | Der Prozess des Ultraschallschweißens zweier Fügepartner mit ERG kann in vier Phasen eingeteilt werden, abgewandelt nach [61, 74]..... | 25 |
| Abbildung 19: | Der zeitliche Verlauf des Fügeweges s_f beim Ultraschallschweißen [61, 72, 74]...26 | 26 |
| Abbildung 20: | Schematische Darstellung des Ablaufs beim Ultraschallprägen eines thermoplastischen Halbzeugs..... | 28 |
| Abbildung 21: | Laserdurchstrahlschweißen von Thermoplasten, in Anlehnung an [61, 72, 74]...29 | 29 |
| Abbildung 22: | Unterschiedliche Konnektortypen und ihre Gegenstücke zur fluidischen Kontaktierung. | 31 |
| Abbildung 23: | Schematischer Aufbau eines NMR-Spektrometers, in Anlehnung an [109]..... | 34 |
| Abbildung 24: | Funktionsweise der optischen pH-Messung durch Fluoreszenz in Anlehnung an [112]. | 35 |

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 25: | Schematische Darstellung des Aufbaus zur Messung der Dichtheit der Schweißnaht bzw. des Maximaldrucks, dem der MBR widersteht, in Anlehnung an Perozziello et al. [95]. | 36 |
| Abbildung 26: | Schematische Darstellung des Aufbaus zur Messung der Kennlinie Druck-Flussrate durch einen oder mehrere MBR. | 37 |
| Abbildung 27: | (a-b) Querschnitt des 200 µl-MBR vor dem Ultraschallschweißen, eine Niederdruckstruktur dient zum Spannen der Membran während dem Ultraschallschweißen, (c) Übersicht des 200 µl-MBR, (d-e) eingewachsene Pflanzenzellen im Restspalt zwischen den Chiphälften des 200 µl-MBR [126]. | 42 |
| Abbildung 28: | Querschnitt der strukturierten Sonotrode und der Chiphälfte mit Zellkammer beim Ultraschallschweißen der Membran. | 43 |
| Abbildung 29: | Querschnitte der zu verbindenden Komponenten (a) vor und (b) nach dem Ultraschallschweißen. | 44 |
| Abbildung 30: | Schematische Darstellung der verschiedenen Konnektortypen. | 45 |
| Abbildung 31: | Schematische Querschnitte aller Ausgangspositionen, bei denen die verschiedenen Konnektortypen in- oder out-of-plane integriert werden können. | 46 |
| Abbildung 32: | Schematische Darstellung des Formeinsatzes zum Heißprägen der Chiphälften des 100 µl-MBR. | 48 |
| Abbildung 33: | Schematische Darstellung des Formeinsatzes zum Heißprägen der Chiphälften des 800 µl-MBR. | 49 |
| Abbildung 34: | Unterschiedliche Betriebsmodi für die MBR. | 50 |
| Abbildung 35: | Gitterstruktur auf der Membran als Mikrowells für die Pflanzenzellen. | 50 |
| Abbildung 36: | Maximaldrücke der durch Ultraschallschweißen gefügten Konnektoren [115]. | 53 |
| Abbildung 37: | REM-Aufnahmen der Querschnitte der Schweißnähte. | 55 |
| Abbildung 38: | Modifizierung des 200 µl-MBR. | 57 |
| Abbildung 39: | Untersuchung der Transparenz der Membranen unter dem Mikroskop. | 57 |
| Abbildung 40: | Der durch Mikrofräsen und anschließendes Ultraschallschweißen gefertigte 100 µl-MBR als Machbarkeitsnachweis für die Freigabe zur Fertigung der Formeinsätze. | 58 |
| Abbildung 41: | Fotos der Formeinsätze. | 58 |
| Abbildung 42: | REM-Aufnahmen vom Formeinsatz für die Chiphälften des 100 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen. | 60 |
| Abbildung 43: | REM-Aufnahmen vom Formeinsatz für die Chiphälften des 800 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen. | 61 |
| Abbildung 44: | Platzierung der Halbzeuge in Form von PC-Plättchen (links) und PET-Folien (rechts) auf der Chromplatte zum Heißprägen mit dem in der oberen Werkzeugplatte eingebauten Formeinsatz, hier am Beispiel der WUM 02. | 62 |
| Abbildung 45: | REM-Aufnahmen der heißgeprägten Chiphälften des 100 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen. | 65 |
| Abbildung 46: | REM-Aufnahmen der heißgeprägten Chiphälften des 800 µl-MBR mit Ausschnitten aller für die Funktionalität wichtigen Stellen. | 66 |
| Abbildung 47: | Drei Messpunkte für die Transmissionsmessungen aller Chiphälften. | 67 |
| Abbildung 48: | Die Transmission aller Chiphälften der 100 µl- und 800 µl-MBR aufgetragen über der Wellenlänge. | 68 |
| Abbildung 49: | Die Transmission aller Chiphälften des 200 µl-MBR aufgetragen über der Wellenlänge. | 69 |

| | | |
|---------------|--|-----|
| Abbildung 50: | Die Benetzung mit einem Wassertropfen zur Messung des Kontaktwinkels θ_w der verschiedenen Halbzeuge, der daraus abgeformten Chiphälften und der eingesetzten Membranen aus PC und PET..... | 69 |
| Abbildung 51: | Strukturierte Sonotroden zum Ultraschallschweißen der Membranen auf die Chiphälfte mit Zellkammer..... | 71 |
| Abbildung 52: | Querschnitt der Gewebelage aus PET.. | 72 |
| Abbildung 53: | Zuschnitte der PET-Gewebe zur Unterstützung des Ultraschallschweißens der Membranen. | 72 |
| Abbildung 54: | Schritte zum Ultraschallschweißen der Membranen mit dem PET-Gewebering auf die Chiphälfte mit Zellkammer, hier am Beispiel des 800 µl-MBR. | 73 |
| Abbildung 55: | REM-Aufnahmen der Schweißnähte vom Ultraschallschweißen von Membran und PET-Gewebering auf die Chiphälfte mit Zellkammer..... | 75 |
| Abbildung 56: | Analyse der Oberflächenprofile der faltigen Membranen. | 76 |
| Abbildung 57: | Vorbereitung für das Ultraschallschweißen der Chiphälften und der Schlauchanschlüsse..... | 77 |
| Abbildung 58: | Schritte zum Ultraschallschweißen der Chiphälften und der Schlauchanschlüsse..... | 77 |
| Abbildung 59: | Mikroskopaufnahmen der Schweißnähte vom Ultraschallschweißen der 100 µl- und 800 µl-MBR aus PC und PET. | 78 |
| Abbildung 60: | Mikroskopaufnahmen der Schweißnähte zwischen dem radialen ERG des Schlauchanschlusses und dem fluidischen Kanal in den Chiphälften der 100 µl- und 800 µl-MBR aus PC und PET. | 79 |
| Abbildung 61: | Reversible Verschlüsse für die Zellkammer der MBR..... | 80 |
| Abbildung 62: | Messungen des maximal möglichen Drucks der MBR aus PC und PET. | 81 |
| Abbildung 63: | Leckagetest mit einer roten Farblösung, hier am Beispiel des 100 µl-MBR aus PC. | 82 |
| Abbildung 64: | Kennlinien für den Druck p über der Flussrate \dot{F} im Diffusionsbetrieb (Diff.) und im Durchströmungsbetrieb (Str.) eines oder zweier MBR..... | 83 |
| Abbildung 65: | Durch Laserdurchstrahlschweißen gefügte 800 µl-MBR..... | 85 |
| Abbildung 66: | Leckagetest mit einer roten Farblösung bei den durch Laserdurchstrahlschweißen gefügten MBR..... | 85 |
| Abbildung 67: | Strukturierung der Membran mit PLGA durch ein Elektrosplein-Verfahren..... | 86 |
| Abbildung 68: | Beobachtung der BY-2-Zellen in den Mikrowells der strukturierten PET-Membran in den 800 µl-MBR..... | 87 |
| Abbildung 69: | Versuchsaufbau mit speziellem Einsatz für ein NMR-Probenröhrchen. | 90 |
| Abbildung 70: | CAD-Querschnitt des Messeinsatzes mit herausziehbarer Trennfolie. | 91 |
| Abbildung 71: | Verifizierung des Mechanismus der herausziehbaren Trennfolie. | 91 |
| Abbildung 72: | NMR-Spektren der Versuche mit 2-Propanol und Maltose vor Versuchsstart, unmittelbar nach Herausziehen der Trennfolie und zu Versuchsende. | 92 |
| Abbildung 73: | Mithilfe von REM-Aufnahmen ermittelte Porenanzahlen..... | 94 |
| Abbildung 74: | Ergebnisse der Strömungssimulation der Maltose- und der Saccharose-Wasser-Lösung zum Zeitpunkt von 250 s in der Mitte (x - z -Ebene) der MBR mit Zellkammer (ZK), Membran (M) und Versorgungskammer (VK)..... | 97 |
| Abbildung 75: | Simulationsergebnisse der Diffusion von Maltose und Saccharose des 100 µl-MBR mit Zellkammer (ZK), Membran (M) und Versorgungskammer (VK). | 99 |
| Abbildung 76: | Simulationsergebnisse der Diffusion von Maltose und Saccharose des 800 µl-MBR mit Zellkammer (ZK), Membran (M) und Versorgungskammer (VK). | 100 |
| Abbildung 77: | Simulation von Strömung und Diffusion im NMR-Messeinsatz. | 101 |

| | | |
|----------------|---|-----|
| Abbildung 78: | Befüllung der MBR mit Pflanzenzellen, hier mit <i>T. chinensis</i> | 104 |
| Abbildung 79: | Schematischer Versuchsaufbau für den Machbarkeitsnachweis der Modularität zweier MBR. | 105 |
| Abbildung 80: | Versuchsdurchführung der zwei gekoppelten MBR mit unterschiedlich konzentrierten BY-2-Zellen. | 106 |
| Abbildung 81: | Versuche mit den zwei Zelllinien Cath 001 und Cath 004 von <i>C. roseus</i> | 107 |
| Abbildung 82: | Kultivierung einer Zelllinie aus <i>T. chinensis</i> im 200 µl-MBR. | 108 |
| Abbildung 83: | Durch 3D-Druck erzeugter Verschluss für die Zellkammer mit Schnittstelle für einen pH-Sensor. | 109 |
| Abbildung 84: | Verlauf des pH-Werts im MBR, nachdem der pH-Wert des im Kreis geführten Nährmediums von pH 5 auf pH 7,2 erhöht wurde. | 110 |
| Abbildung 85: | Kostenvergleich der Abformverfahren Spritzguss und Heißprägen. | 112 |
| Abbildung 86: | Der gesamte Prozessablauf von der Herstellung eines MBR bis zur Auslieferung. | 114 |
| Abbildung 87: | Übersicht der einzelnen Entwicklungsstufen der verschiedenen MBR. | 115 |
| Abbildung 88: | Ultraschallschweißen mit einer strukturierten Sonotrode (oben), welche zusätzliche ERG-Strukturen (rot) besitzt, mit der eine Membran auf die sich in der Zellkammer (unten) befindenden, zusätzlichen Stege (blau) fixiert werden kann. | 120 |
| Abbildung 89: | LabVIEW-Blockdiagramm zum Auslesen und Aufzeichnen des Drucks bei den Leckagetests und den Flussrate-Kennlinien. | 141 |
| Abbildung 90: | Technische Zeichnung des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den 100 µl-MBR. | 142 |
| Abbildung 91: | Technische Zeichnung der Versorgungskammer des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den 100 µl-MBR. | 143 |
| Abbildung 92: | Technische Zeichnung der Zellkammer des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den 100 µl-MBR. | 144 |
| Abbildung 93: | Technische Zeichnung des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den großen MBR. | 145 |
| Abbildung 94: | Technische Zeichnung der Versorgungskammer des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den 800 µl-MBR. | 146 |
| Abbildung 95: | Technische Zeichnung der Zellkammer des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den 800 µl-MBR. | 147 |
| Abbildung 96: | Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Vorprägens mit der kleinen, strukturierten Sonotrode. | 148 |
| Abbildung 97: | Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Ultraschallschweißens der PET-Membran und des PET-Gewebes mit der kleinen, strukturierten Sonotrode. | 148 |
| Abbildung 98: | Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Ultraschallschweißens des 100 µl-MBR mit der flachen Sonotrode. | 149 |
| Abbildung 99: | Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Vorprägens mit der großen, strukturierten Sonotrode. | 149 |
| Abbildung 100: | Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Ultraschallschweißens der PET-Membran und des PET-Gewebes mit der großen, strukturierten Sonotrode. | 150 |
| Abbildung 101: | Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Ultraschallschweißens des großen MBR mit der flachen Sonotrode. | 150 |
| Abbildung 102: | Technische Zeichnung der Komponenten Oberteil, Unterteil und Folie für den Messeinsatz des NMR-Probenröhrchens. | 151 |

C Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit zur Herstellung der MBR getesteten und verwendeten Materialien..... | 40 |
| Tabelle 2: Parameter zum 3D-Druck der Konnektoren aus PC- und PET-Filament. | 52 |
| Tabelle 3: Parameter für das Ultraschallschweißen der verschiedenen Konnektortypen. | 52 |
| Tabelle 4: Betriebsparameter an der WUM 02 zum Heißprägen der Chiphälften des 200 µl-MBR. | 56 |
| Tabelle 5: Schweißparameter zum anschließenden Ultraschallschweißen der Chiphälften mit der Membran sowie der Schlauchanschlüsse. | 56 |
| Tabelle 6: Konfigurationen und Betriebsparameter zum Heißprägen der Chiphälften für den 200 µl-MBR an der WUM 02 sowie für die 100 µl-MBR und 800 µl-MBR an der WUM 01 nach Xia 2019 [138]. | 63 |
| Tabelle 7: Eigenschaften des Schwinggebildes und Parameterraum für das Ultraschallschweißen der Membran auf die Chiphälfte mit Zellkammer der 100 µl- und 800 µl-MBR. | 70 |
| Tabelle 8: Optimierte Parameter zum Ultraschallschweißen der Membranen mit Vorprägen der Chiphälfte mit Zellkammer. | 73 |
| Tabelle 9: Parameter zum Ultraschallschweißen der beiden Chiphälften und der Schlauchanschlüsse..... | 77 |
| Tabelle 10: Parameter zum Laserdurchstrahlschweißen der 800 µl-MBR..... | 84 |
| Tabelle 11: Zusammensetzung der Nährmedien für die verschiedenen Zelllinien [10]. | 104 |
| Tabelle 12: Materialkosten für die thermoplastischen Komponenten der 100 µl- und 800 µl-MBR. | 111 |
| Tabelle 13: Kosten der Werkzeuge für die Replikation und das Fügen der 100 µl- und 800 µl-MBR. | 112 |
| Tabelle 14: Gesamtzeit zur Herstellung eines 100 µl- oder 800 µl-MBR..... | 113 |
| Tabelle 15: Kosten der Sterilisation und Verpackung für 1 000 MBR..... | 114 |

D Publikationen, Vorträge, Patentanmeldung, Lehrtätigkeit

Finkbeiner, T., Soergel, H. L., Koschitzky, M. P., Ahrens, R. and Guber, A. E., *Ultrasonic welding for the rapid integration of fluidic connectors into microfluidic chips*, J. Micromech. Microeng., 2019, 29(6).

Finkbeiner, T., Ahrens, R., Maisch, J., Raorane, M. L., Manz, C., Ullisch, D. A., Lenke, J., Gorr, G., Nick, P., Guber, A. E., *Fertigung von modularen mikrofluidischen Bioreaktoren zur Synthese von pflanzlichen Sekundärmetaboliten*, 2017, 7. MikroSystemTechnik Kongress, München, Deutschland.

Rajabi, T. *, **Finkbeiner, T. ***, Ahrens, R., Garschagen, R., Guber, A. E., *Introduction of polyethylene terephthalate (PET) enabling the fabrication of in vitro models for medical or pharmaceutical applications*, 2018, MicroTAS 2018, Kaohsiung, Taiwan.

Finkbeiner, T., Ahrens, R., Guber, A. E., *Ultraschallschweiß-Verfahren zum Verschweißen von dünnen Polymerschichten und Ultraschallschweiß-Kit dafür*, Patent eingereicht (102018129163.9), 2018, Deutschland.

Finkbeiner, T., Plant-on-chip, Beiträge in der BioMEMS-IV-Vorlesungsreihe, Wintersemester 2017/18, Sommersemester 2018, Wintersemester 2018/19, Sommersemester 2019, KIT.

Finkbeiner, T., Hands-on-BioMEMS-Praktikum, Betreuung, Wintersemester 2017/18, Sommersemester 2018, Wintersemester 2018/19, Sommersemester 2019, KIT.

E Betreute Abschlussarbeiten

Soergel 2017

Soergel, Hannah; *Entwicklung und Validierung verschiedener Konnektortypen für einen mikrofluidischen Bioreaktor*. Institut für Mikrostrukturtechnik, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorarbeit, 2017.

Koschitzky 2018

Koschitzky, Moritz; Co-Betreuer: Garschagen, Ruben; *Untersuchung und Fertigung thermoplastischer Mikrobauteile mittels Ultraschallprägen*. Institut für Mikrostrukturtechnik, Karlsruher Institut für Technologie, Masterarbeit, 2018.

Müller 2018

Müller, Maximilian; *Entwicklung eines mikrofluidischen Testaufbaus zur Messung der Diffusionsrate verschiedener Moleküle durch eine Polymermembran*. Institut für Mikrostrukturtechnik, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorarbeit, 2018.

Reuter 2018

Reuter, Timo; Co-Betreuer: Garschagen, Ruben; *Ultraschallschweißen ohne Energierichtungsgeber*. Institut für Mikrostrukturtechnik, Karlsruher Institut für Technologie, Masterarbeit, 2018.

Shen 2018

Shen, Na; *Numerische Simulation zur Optimierung der Diffusion von Maltose durch eine Polymermembran*, Institut für Mikrostrukturtechnik, Karlsruher Institut für Technologie, Masterarbeit, 2018.

Xiang 2018

Xiang, Yijie; Co-Betreuer: Garschagen, Ruben, Sánchez, Daniela; *Entwicklung eines modularen Mikrodebblers*, Institut für Mikrostrukturtechnik, Karlsruher Institut für Technologie, Masterarbeit, 2018.

Xia 2019

Xia, Yunshen; *Kostenanalyse und Prozessoptimierung bei der Herstellung eines mikrofluidischen Chips für die Wirkstoffherstellung*, Institut für Mikrostrukturtechnik, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorarbeit, 2019.

F Anhang

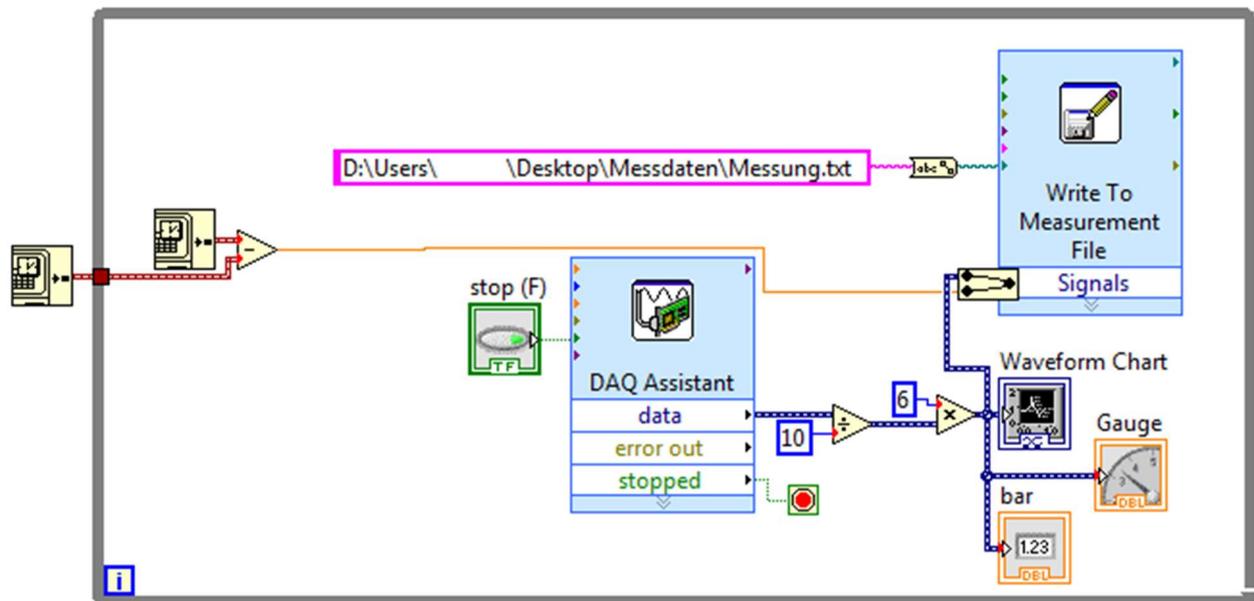


Abbildung 89: LabVIEW-Blockdiagramm zum Auslesen und Aufzeichnen des Drucks bei den Leckagetests und den Flussrate-Kennlinien.

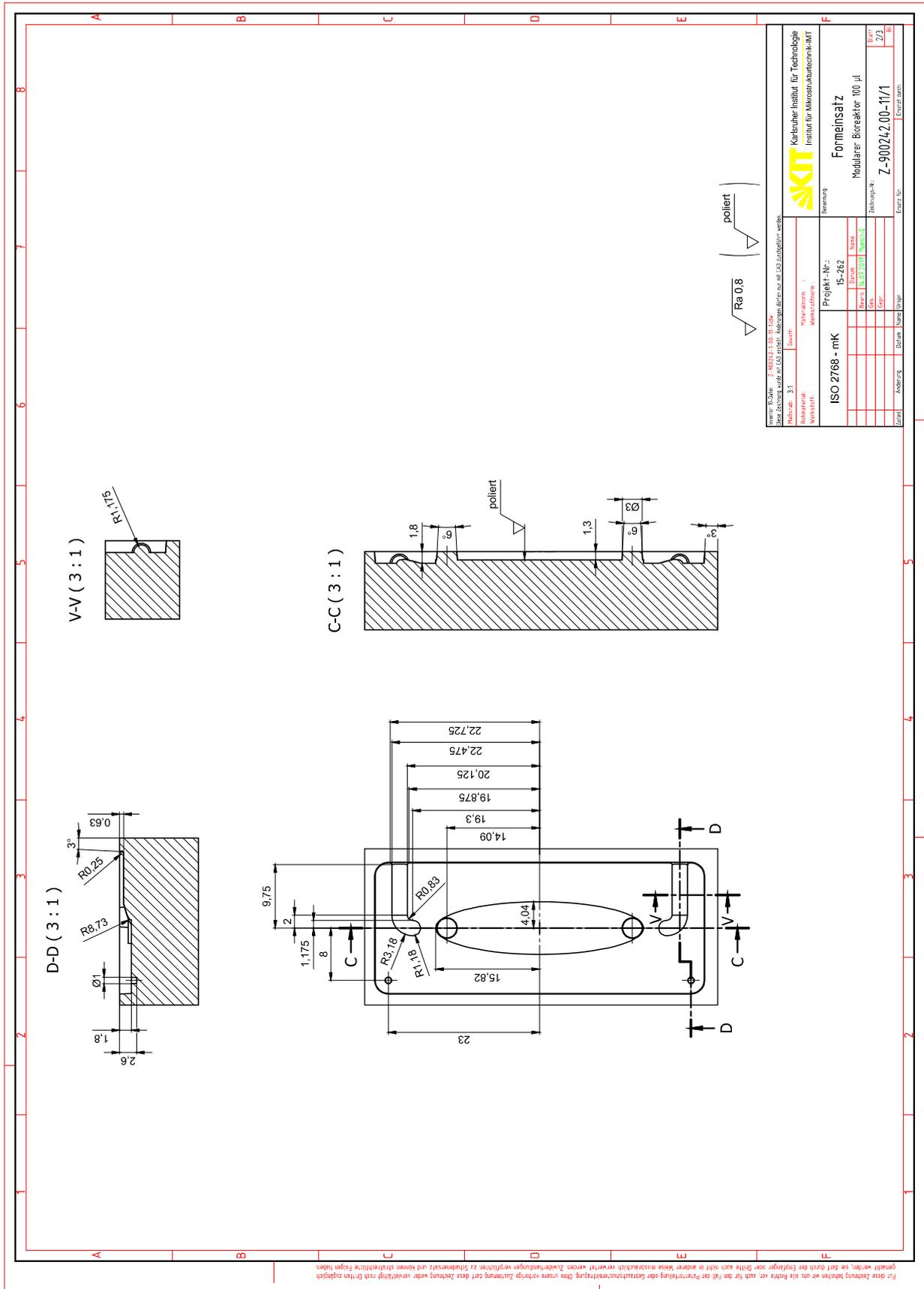


Abbildung 92: Technische Zeichnung der Zellkammer des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den 100 µl-MBR

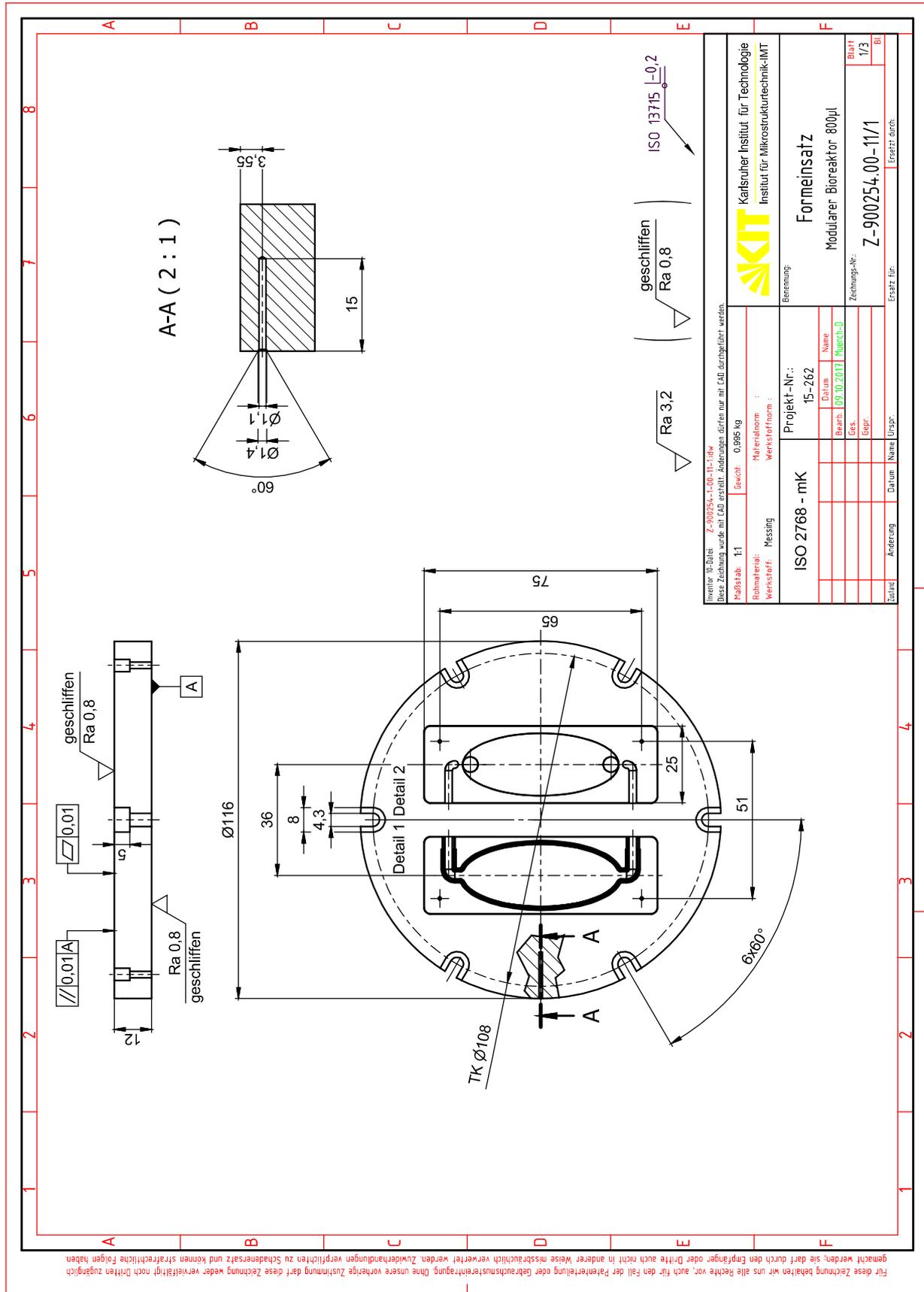


Abbildung 93: Technische Zeichnung des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den großen MBR.

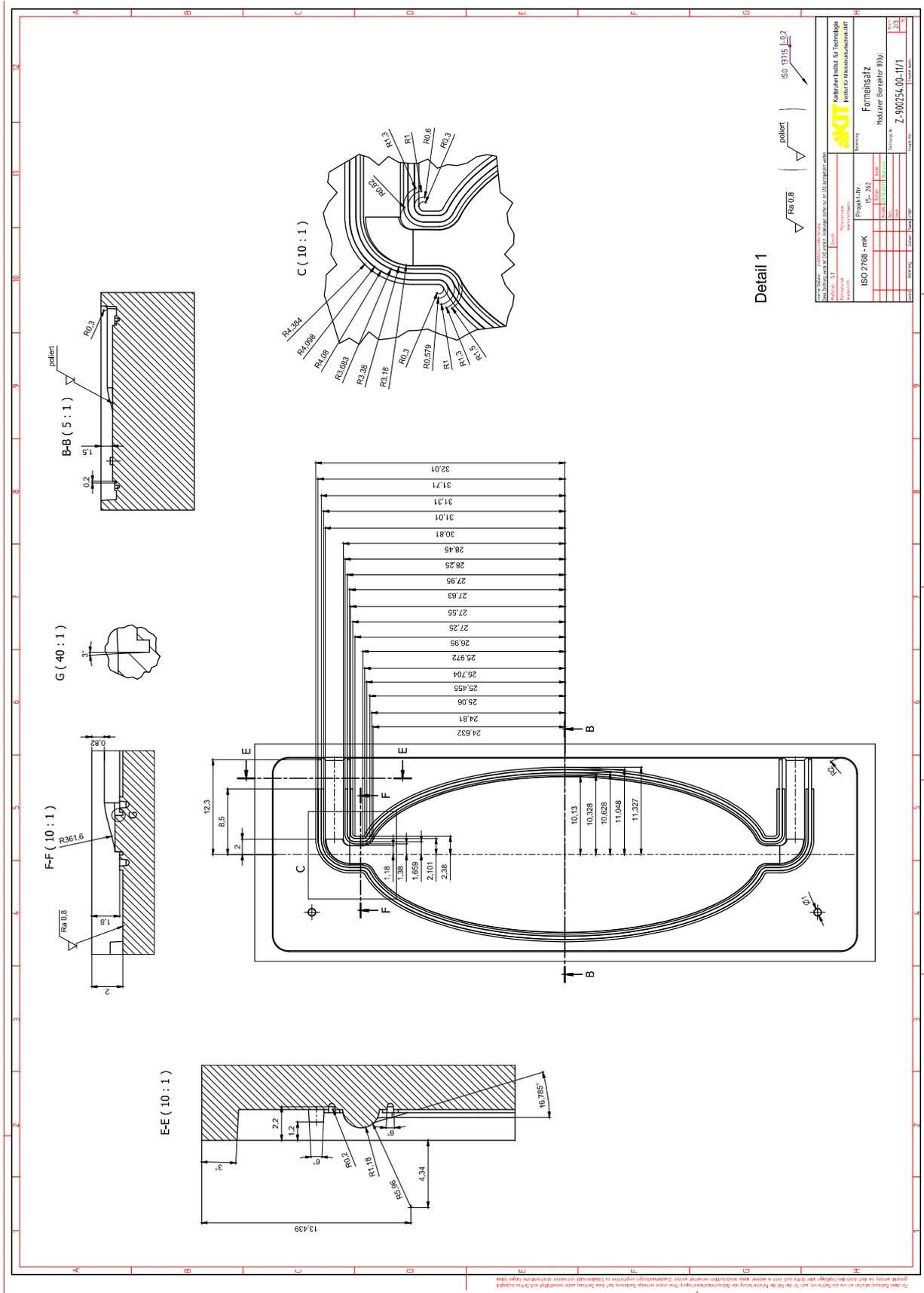


Abbildung 94: Technische Zeichnung der Versorgungskammer des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den 800 µl-MBR

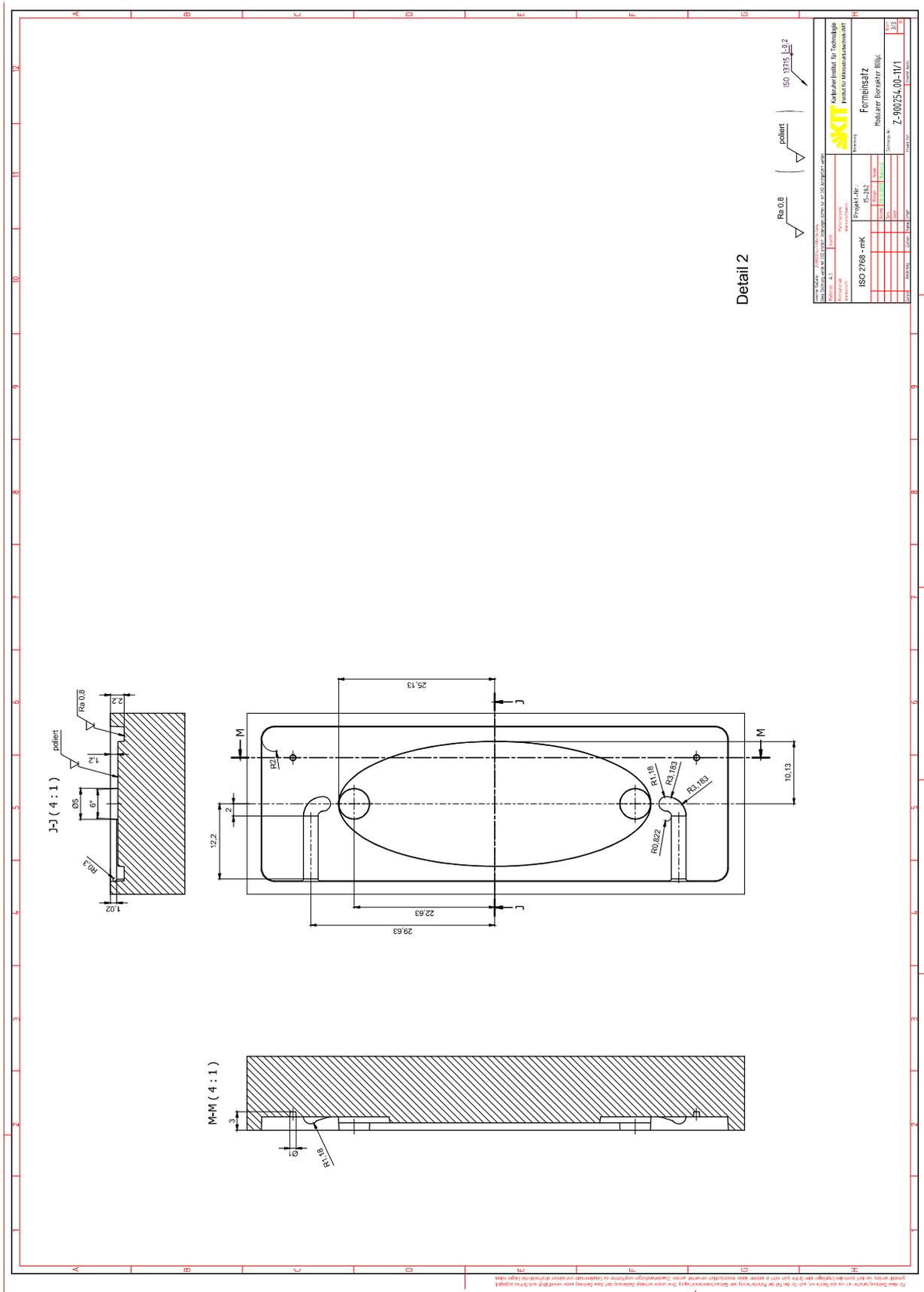


Abbildung 95: Technische Zeichnung der Zellkammer des Formeinsatzes zur Abformung der Chiphälften für den 800 µl-MBR

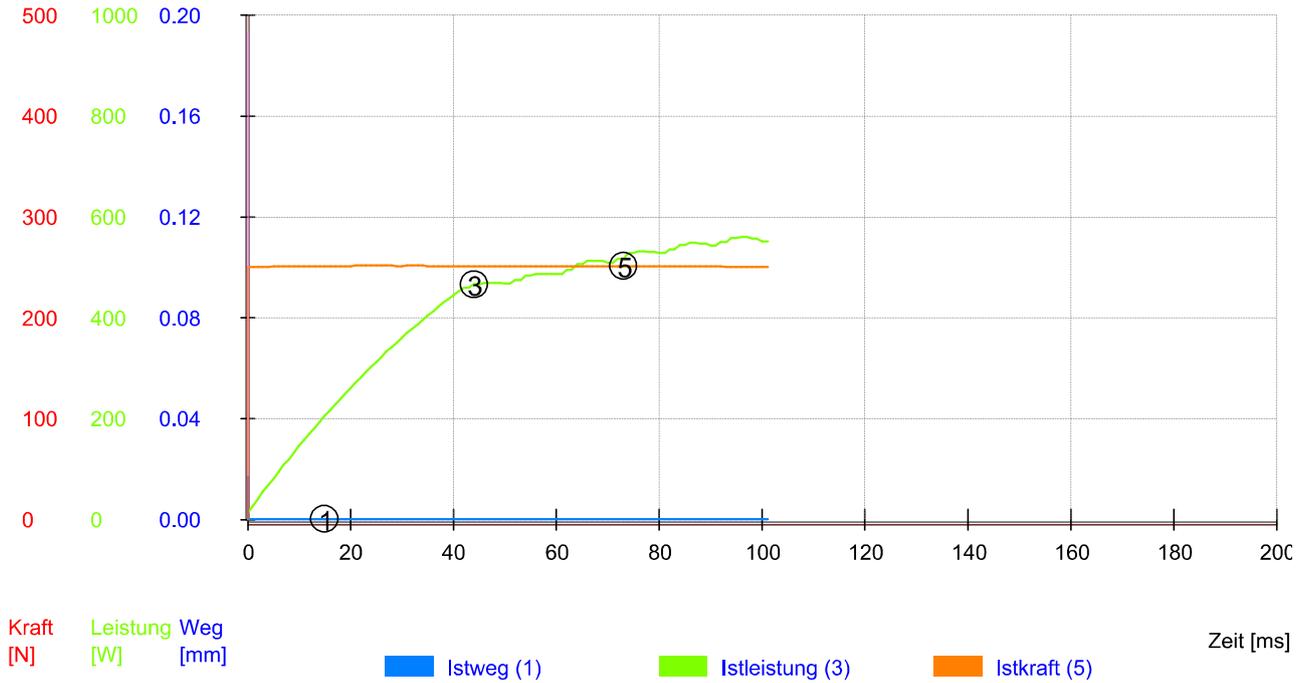


Abbildung 96: Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Vorprägens mit der kleinen, strukturierten Sonotrode.

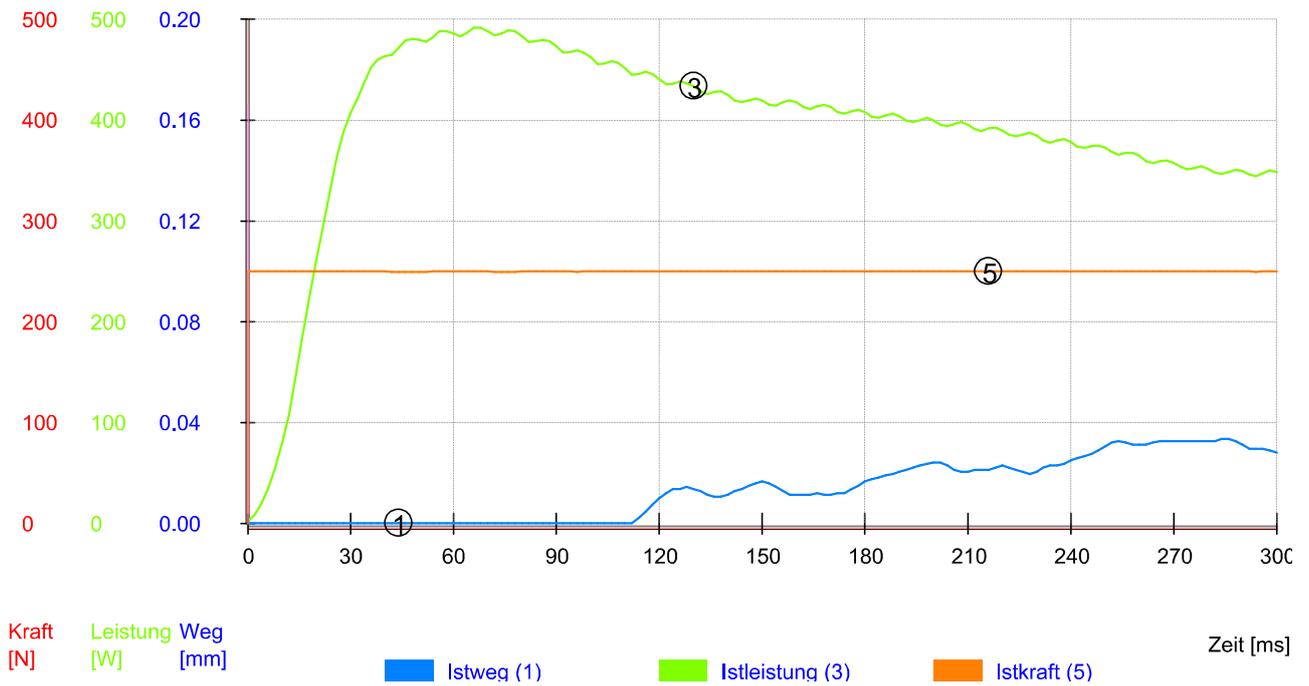


Abbildung 97: Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Ultraschallschweißens der PET-Membran und des PET-Gewebes mit der kleinen, strukturierten Sonotrode.

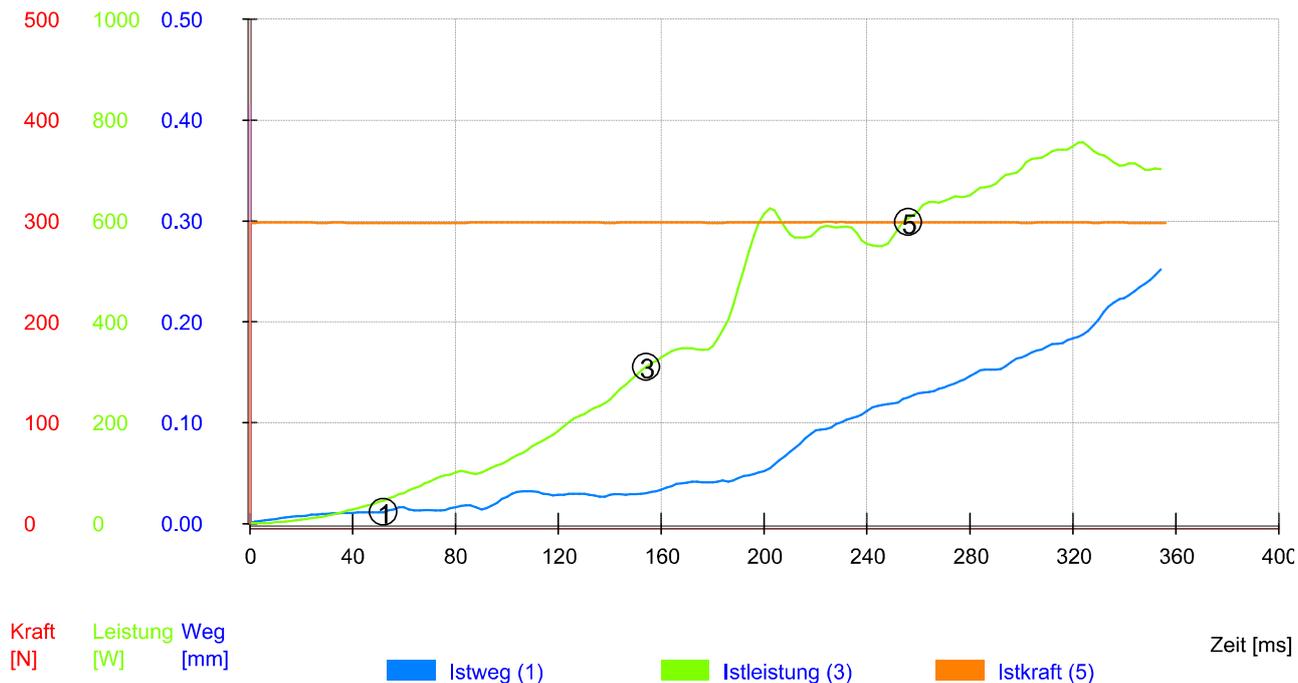


Abbildung 98: Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Ultraschallschweißens des 100 µl-MBR mit der flachen Sonotrode.

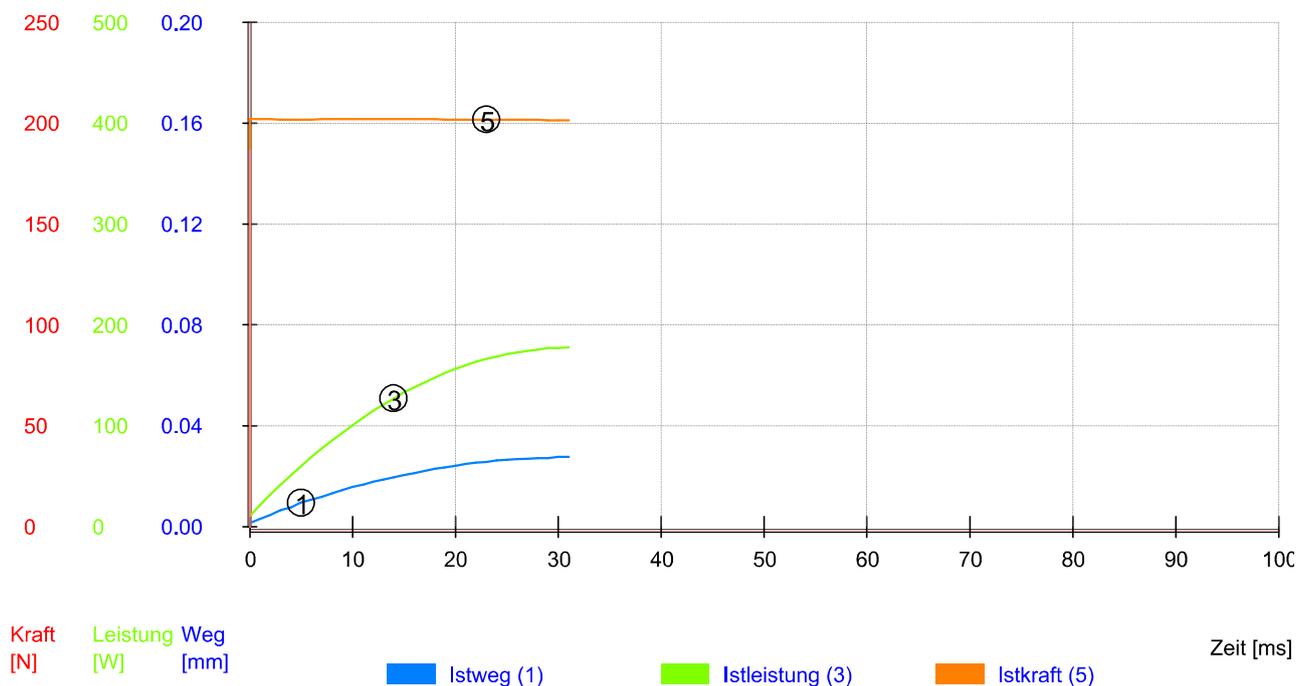


Abbildung 99: Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Vorprägens mit der großen, strukturierten Sonotrode.

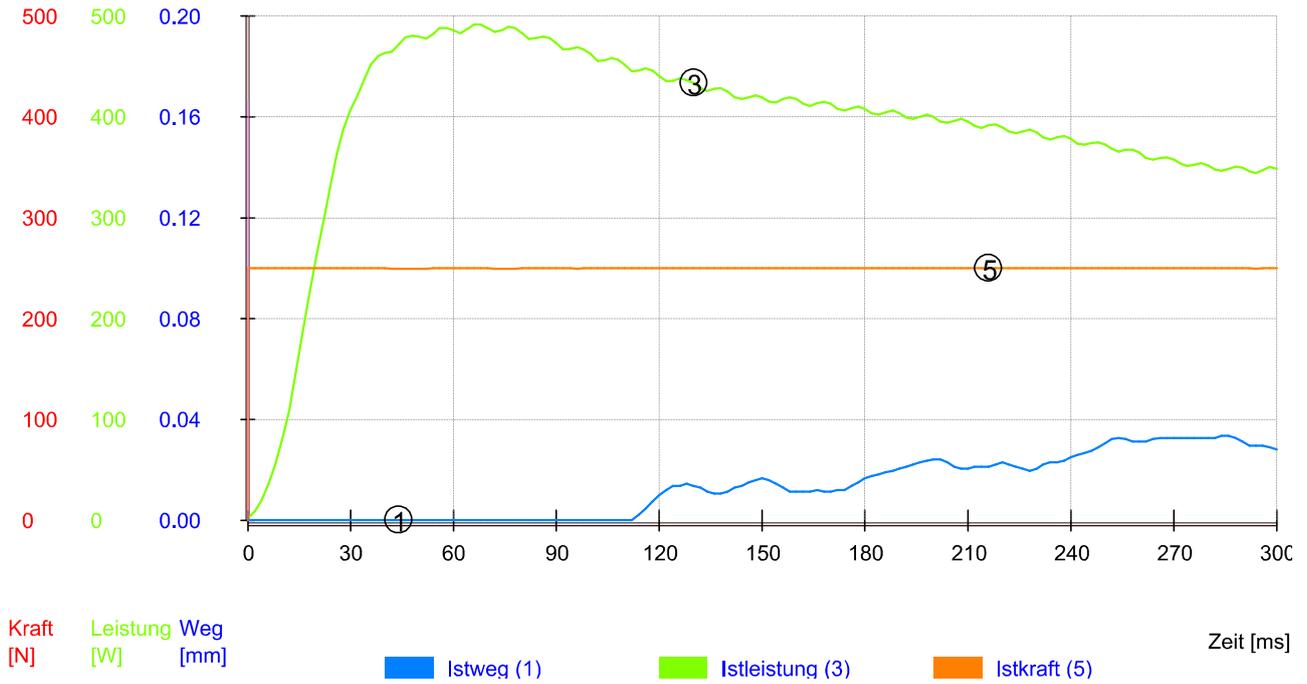


Abbildung 100: Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Ultraschallschweißens der PET-Membran und des PET-Gewebes mit der großen, strukturierten Sonotrode.

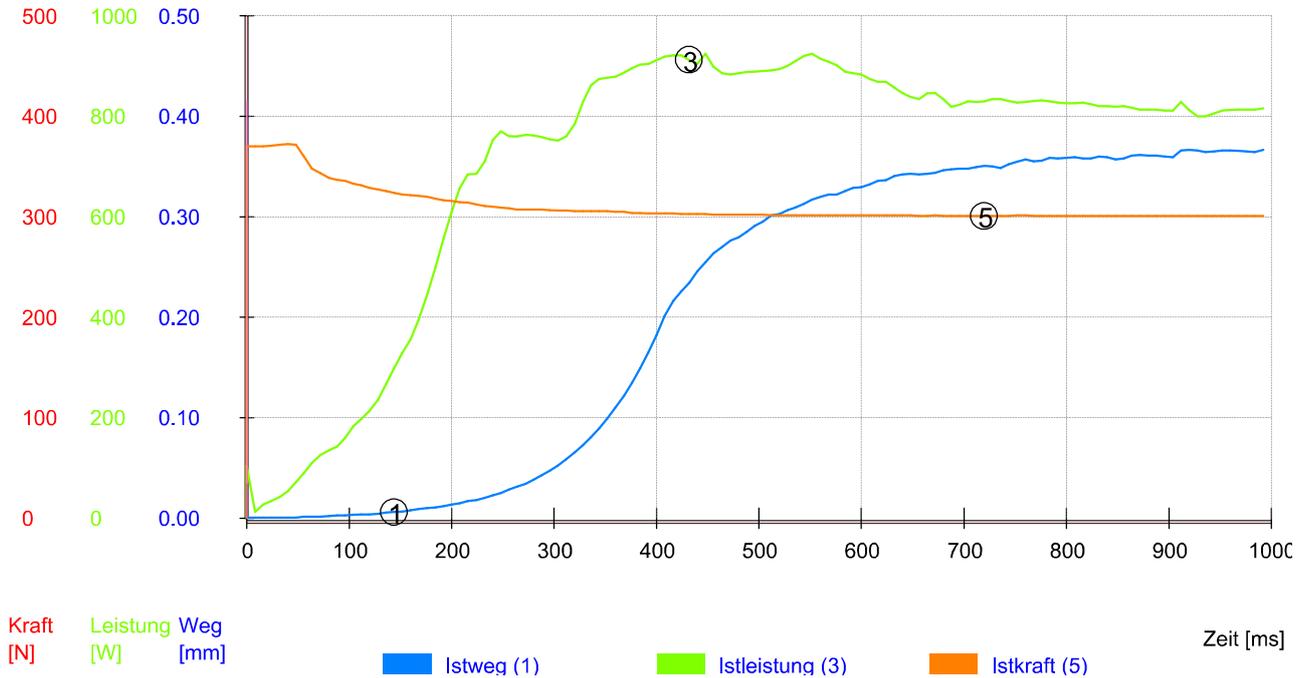


Abbildung 101: Schweißprotokoll mit typischem Verlauf des Ultraschallschweißens des großen MBR mit der flachen Sonotrode.

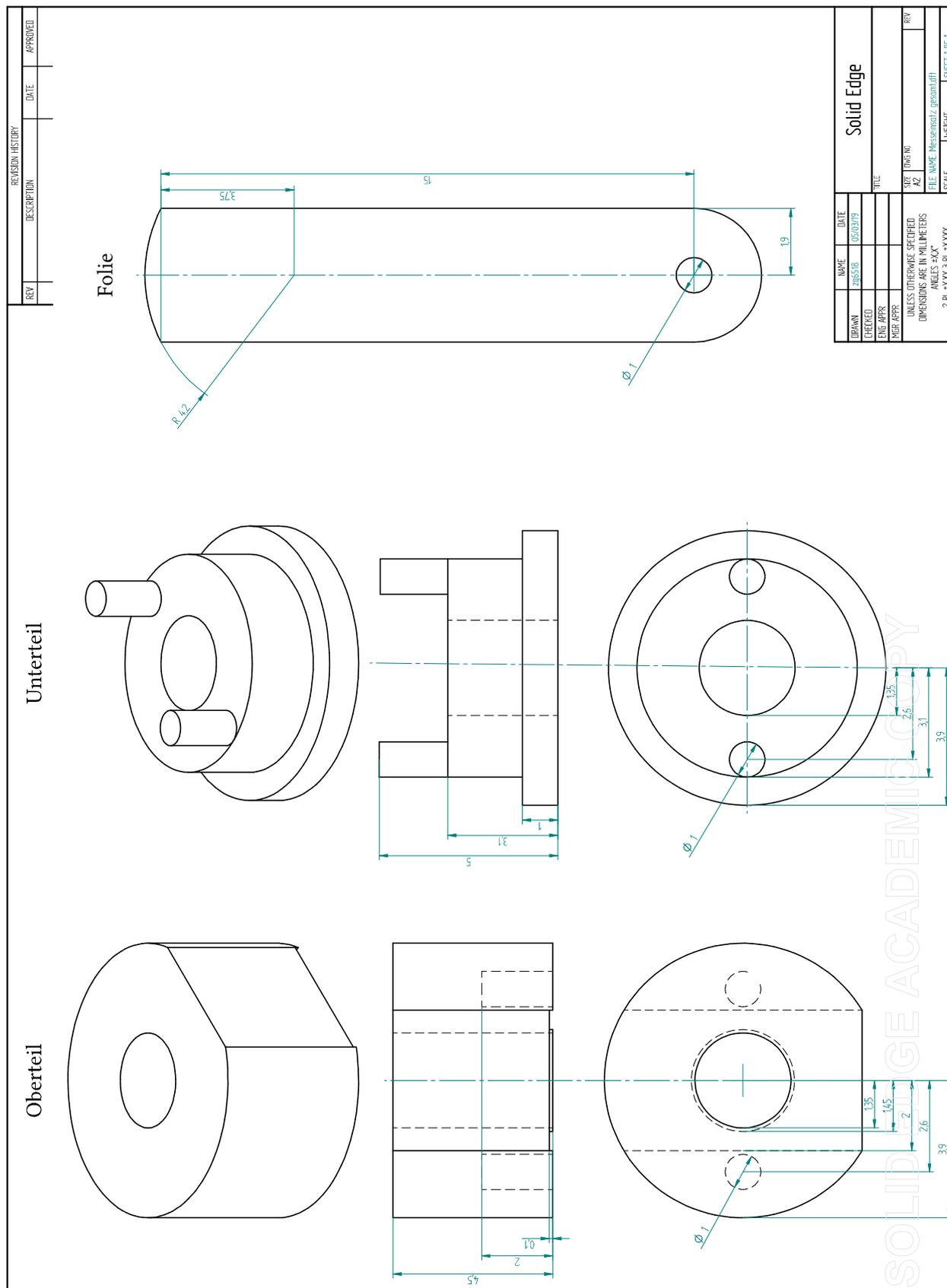


Abbildung 102: Technische Zeichnung der Komponenten Oberteil, Unterteil und Folie für den Messeinsatz des NMR-Probenröhrchens.