GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Schlussbericht

Förderzeitraum 01.10.2022 – 31.12.2024

Universität Rostock
Lehrstuhl für Mikrofluidik

„KMU-innovativ -KMUi-BÖ03: ZUKUNFT – Zellträger zur Unterstützung kultivierter, neuer Fleischtechnologie“

Prof. Dr. Hermann Seitz
Tim Dreier M.Sc.

FKZ 031B1295B

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen FKZ 031B1295B gefördert.
Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“

Inhalt

1 Kurzbericht 3
1.1 Aufgabenstellung 3
1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand 3
1.3 Ablauf des Vorhabens 3
1.4 Wesentliche Ergebnisse 4
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 4
2 Eingehende Darstellung 5
2.1 Erzielte Projektergebnisse mit Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung 5
2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 21
2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 21
2.4 Voraussichtliche Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplan 22
2.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 22
2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses 23

1 Kurzbericht

1.1 Aufgabenstellung

Das Kooperationsprojekt zielte darauf ab, innovative Lösungen für die industrielle Produktion von zellbasierten Fleischprodukten zu etablieren, die einen wichtigen Beitrag zur nachhaltigen Bioökonomie im Lebensmittelsektor leisten. Im Projekt wurden dabei verschiedene Herstellungsmethoden und Werkstoffe für nachhaltige, kostengünstige und industriell skalierbare Gerüststrukturen (Scaffolds) für die Myozyten-Gewebezüchtung erforscht und evaluiert. Am Ende der Projektlaufzeit sollten zwei funktionale Scaffold-Prototypen sowie dazugehörige neuartige Herstellungsprozesse vorliegen. Das Projekt umfasste zudem die Zusammenarbeit mit der Innocent Meat GmbH, die Veröffentlichung der gewonnenen Erkenntnisse und die Integration der Forschung in die studentische Ausbildung durch Semester- und Abschlussarbeiten.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Das Electrospinning hat sich als vielversprechende Technik zur Herstellung von Nanofaser-Scaffolds etabliert. Das Verfahren nutzt elektrostatische Kräfte, um aus Polymerlösungen ultrafeine Fasern mit Durchmessern im Nanometerbereich zu erzeugen. Die gesponnenen Strukturen ähneln der natürlichen extrazellulären Matrix, was sie besonders wertvoll für biomedizinische Anwendungen macht. Eine einstellbare Porosität und die große spezifische Oberfläche der Scaffolds begünstigen dabei die Zelladhäsion und -proliferation.
Der Electrospinning Prozess besitzt eine hohe Skalierbarkeit und ist ein vielversprechendes Verfahren für die Herstellung von Scaffolds. bzw. Zellträgern.

1.3 Ablauf des Vorhabens

Die für den Lehrstuhl für Mikrofluidik bewilligte Position des Wissenschaftlichen Mitarbeiters konnte erst zum 01.03.2023 besetzt werden. Daraus resultierte für den LFM eine Verzögerung des Bearbeitungsstarts um 5 Monate gegenüber der beantragten Zeitplanung. Um die Arbeitspakete erfolgreich bearbeiten zu können, wurde eine kostenneutrale Verlängerung des Projekts bis 31.12.2024 durchgeführt. Mithilfe der Verlängerung konnten die geplanten Arbeitspakete erfolgreich bearbeitet und alle Meilensteile erreicht werden. Die Projektergebnisse wurden während des Vorhabens auf einschlägigen Fachkonferenzen präsentiert und in Form von wissenschaftlichen Papern veröffentlicht.

1.4 Wesentliche Ergebnisse

Zu Beginn des Projekts wurden bereits im Electrospinning-Verfahren etablierte (Bio-)Polymere ausgewählt und getestet. Dabei erfolgte eine umfassende Charakterisierung von Polymerlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen. Durch iterative Anpassungen der Polymerlösung sowie der Prozessparameter am Electrospinner konnten elektrogesponnene Scaffolds für die Myozyten-Gewebezüchtung erfolgreich und reproduzierbar hergestellt werden. Damit wurde der Meilenstein zur erfolgreichen Etablierung eines Electrospinning-Prozesses für die Scaffold-Produktion erreicht. Die hergestellten Scaffolds wurden dem Projektpartner für Zellbesiedlungsversuche zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden die kryogelierten Scaffolds des Projektpartners charakterisiert. Neben der Analyse der Oberflächenmorphologie erfolgte eine erfolgreiche Bestimmung des Durchmessers und der Porosität der sphärischen Scaffolds.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die enge Zusammenarbeit zwischen Lehrstuhl für Mikrofluidik und der Innocent Meat GmbH hat maßgeblich zum Erfolg des Projekts beigetragen. Durch regelmäßigen Austausch in Projekttreffen und die Bereitstellung von Proben konnten wertvolle Erkenntnisse gewonnen und wichtige Ziele erreicht werden. Durch regelmäßige Meetings wurde der aktuelle Projektstand kontinuierlich überprüft und abgestimmt. Während der Projektlaufzeit stellten beide Seiten Proben bereit, die mithilfe vorhandener Laborausstattung und fachlicher Expertise charakterisiert wurden.

2 Eingehende Darstellung

2.1 Erzielte Projektergebnisse mit Vergleich zur ursprünglichen Vorhabensbeschreibung

Die Zuwendung wurde verwendet, um einen wissenschaftlichen Mitarbeiter (Master of Science) für die Projektlaufzeit anzustellen. Die anfallenden Kosten für Verbrauchsmittel konnten durch die Zuwendung abgedeckt werden. Das Ziel, einen Electrospinning-Prozess zur Herstellung von Scaffolds für die Myozyten-Gewebezüchtung zu etablieren, wurde erfolgreich umgesetzt.

Die wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse sind nachfolgend beschrieben:

AP 1.2 Vorauswahl von Polymeren für das Electrospinning-Verfahren

Im Rahmen des Arbeitspakets wurden geeignete Biopolymere sowie synthetische Polymere für die Entwicklung von Scaffolds zur Zellbesiedlung identifiziert und untersucht. Ein potentielles Biopolymer für das Electrospinning ist **Kollagen**, welches in der extrazellulären Matrix (ECM) von Bindegewebe vorkommt. Kollagen ist biokompatibel, biologisch abbaubar und besitzt eine geringe Toxizität. Laut Literaturrecherche kann beim Electrospinnen eine gute Faserbildung erreicht werden, bei guten mechanischen Eigenschaften der gesponnenen Fasermatte (Mesh). Ein weiteres geeignetes Biopolymer ist **Chitosan**, welches aus Chitin gewonnen wird und in der Natur beispielsweise in den Schalen von Krebstieren vorkommt. Chitosan besitzt eine gute Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmittel wie z.B. Essigsäure, Ameisensäure und Dimethylsulfoxid (DMSO). Chitosan zeigt eine hohe Biokompatibilität und gute antibakterielle Eigenschaften. **Gelatine** stellt ein weiteres geeignetes Biopolymer dar, welches durch die Hydrolyse von Kollagen gewonnen wird. Aufgrund seiner Biokompatibilität wird Gelatine häufig in biomedizinischen Anwendungen eingesetzt. Gelatine ist wasserlöslich, biokompatibel und kostengünstig verfügbar. Neben den genannten Biopolymeren eignen sich auch synthetische Polymere aus **Polylactide** (PLA) und **Polycaprolacton** (PCL) für die Scaffoldherstellung mittels Electrospinning. PLA ist unter Wärmezufuhr verformbar und ist biokompatibel sowie biologisch abbaubar. In geringen Konzentrationen ist es für den menschlichen Körper unschädlich und kann verwertet werden. PCL ist ein aliphatischer, synthetischer Polyester, welcher oft mit anderen Polymeren wie z.B. Gelatine oder Chitosan kombiniert wird, um die Textur der gesponnenen Fasern zu verbessern.

Da parallel zum Electrospinning im Arbeitspaket 2.2 das Unternehmen Innocent Meat mit dem Biopolymer **Alginat** gute Erfahrungen im Bereich der Kryogelierung gemacht hat, wurde ebenfalls Alginat für den Electrospinning Prozess in Betracht gezogen. Bei Alginat handelt es sich um ein algen-/bakterienbasiertes Polysaccharid. Das Polymer wird bereits in der Anwendung als Scaffold im Tissue Engineering für Knochen und Haut eingesetzt. Da Alginat biokompatibel, bioaktiv und biologisch abbaubar ist, handelt es sich um ein geeignetes Polymer für den Electrospinning-Prozess zur Imitierung einer extrazellulären Matrix (ECM). Das Polysaccharid **Zellulose** ist ebenfalls ein geeignetes natürliches Biopolymer für die Herstellung von Scaffoldstrukturen für die Zellbesiedlung. Zellulose ist kostengünstig, in großen Mengen verfügbar, besitzt eine sehr gute Biokompatibilität und ist biologisch zersetzbar. Es besitzt eine hohe strukturelle Stabilität und Lebensdauer und besitzt gute mechanische Eigenschaften. Da es schwierig zu verspinnen ist, wird es häufig als Zellulosederivat wie z.B. Celluloseacetet verarbeitet.

Beim Electrospinning für Scaffolds für kultiviertes Fleisch ist neben der Auswahl geeigneter Polymere auch die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittel entscheidend für eine erfolgreiche Herstellung der Spinnerlösung. Als Lösungsmittel beim Electrospinning eignen sich halogenierte Lösungsmittel (z.B. Chloroform, Trifluorethanol-TFE und Tetrahydrofuran-THF), aprotische Lösungsmittel (z.B. Dimethylformamid-DMF, Dimethylacetamid-DMAC und Dimethylsulfoxid-DMS) sowie protische Lösungsmittel wie z.B. Wasser und Ethanol. Bei der Wahl der Lösungsmittel müssen jedoch auch ökologische und gesundheitliche Gesichtspunkte berücksichtigt werden, insbesondere bei der Verwendung in kultiviertem Fleisch.

AP 2.2 Vorauswahl von Polymeren für einen Kryogelier-Prozess

Im Rahmen des **AP 2.2** erfolgt eine Vorauswahl geeigneter Polymere für Untersuchungen des Kryogelierungsprozesses. Die Auswahlkriterien umfassten die Löslichkeit in relevanten Lösungsmitteln, die Biokompatibilität, die Essbarkeit sowie die mechanischen Eigenschaften, die für die spätere Nutzung als Scaffolds erforderlich sind. Im Zuge der Fortführung der Arbeiten aus Arbeitspaket 1.2, in dem verschiedene natürliche und synthetische Polymere für das Electrospinning identifiziert wurden, wurden diese Erkenntnisse mit dem Partnerunternehmen Innocent Meat geteilt. Daraufhin erfolgte eine Untersuchung bezüglich der Übertragbarkeit dieser Polymere auf den Prozess der Kryogelierung. Als geeignetes Polymer wurde Alginat (aufgrund seiner leichten Verarbeitung und guten Prozesseigenschaften), Alginat-Di-Aldehyd (besitzt eine verringerte Viskosität) und Chitosan (aufgrund der verbesserten Zellbindung) ausgewählt.

AP 1.3 Charakterisierung von Polymerlösungen für das Electrospinning-Verfahren

Im **AP 1.3** wurden die aus AP 1.2 beschriebenen (Bio-)Polymere mit den entsprechenden Lösungsmitteln gemischt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Polymer-Lösungsmittel-Paare löslich und kompatibel miteinander waren. Im Falle der Chitosan/Essigsäure-Kombination wurde eine geringe Löslichkeit festgestellt, was zur Bildung von erkennbaren Sedimenten führte (siehe Abbildung 1a). Dies deutet darauf hin, dass die gewählte Lösungsmittelkonzentration nicht ausreichend in der Lage ist, das Polymer zu lösen und eine homogene Lösung zu bilden. Im Gegensatz dazu zeigte die Kombination von Gelatine und Essigsäure eine gute Durchmischung von Polymer und Lösungsmittel (siehe Abbildung 1b). Neben Chitosan und Gelatine wurden weitere (Bio-)Polymere aus AP 1.2 in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt, um die Auswirkung der Konzentration auf die physikalischen Eigenschaften und das Verhalten der Electrospinning-Lösungen zu untersuchen. Im Laufe des Arbeitspaketes wurden auch Kombinationen aus verschiedenen Polymeren untersucht, um schlecht verspinnbare Polymere mit gut verspinnbaren Trägerpolymeren zu verknüpfen (siehe Abbildung 1c).

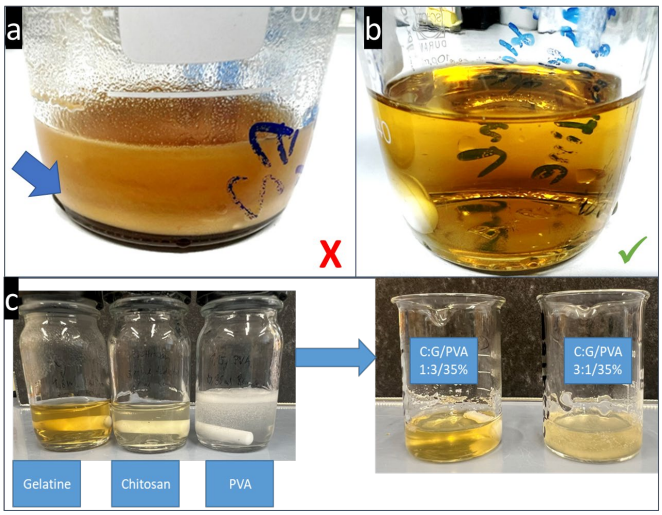

Abbildung 1: Geringe Löslichkeit von Chitosan in Essigsäure mit erkennbaren Sedimenten (a), gute Löslichkeit von Gelatine in Essigsäure (b), Kombination aus Gelatine, Chitosan und PVA in einem Lösungsmittel aus Essigsäure und Reinwasser.

Im nächsten Schritt wurden die Oberflächenspannung und die dynamische Viskosität der verschiedenen Polymerlösungen experimentell ermittelt und verglichen. Die Oberflächenspannung beeinflusst die Bildung des Taylor Cones beim Electrospinning und beeinflusst somit die Qualität der gefertigten Fasern. Zur Messung der Oberflächenspannung der Spinnlösung wurde das Ring- und Plattentensiometer Lauda TD 1C (LAUDA Scientific GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland) mit einer Wilhelmy-Platte als Messkonfiguration verwendet.

Das Tensiometer wurde benutzt, um sowohl den Einfluss der Polymerkonzentration als auch der Lösungsmittelkonzentration (siehe Abbildung 2a) zu untersuchen. Die dynamische Viskosität gibt hingegen Auskunft über die Fließeigenschaften der Lösungen und ist ein wichtiger Parameter für die Prozesssteuerung im Electrospinning-Verfahren. Für die Untersuchungen der dynamischen Viskosität in einem Scherratenbereich von 0,1 bis 1000 1/s wurde das Rheometer MCR 302e (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) mit einer Plattengeometrie von 50 mm verwendet. In Abbildung 2b wird dargestellt, wie sich unterschiedliche Polymerlösungen je nach Konzentration bzw. Polymerart unterscheiden. Durch die Charakterisierung der dynamischen Viskosität und der Oberflächenspannung der (Bio-)Polymerlösungen ist es möglich, optimale Prozessparameter für das Electrospinning-Verfahren abzuleiten.

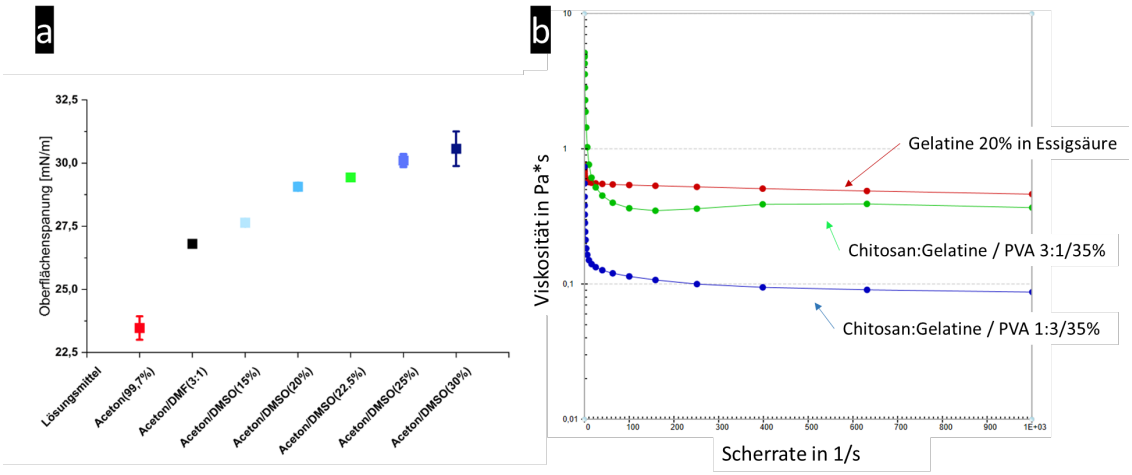

Abbildung 2: Graphische Darstellung der ermittelten Oberflächenspannungen von 12% Celluloseacetat in verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen (a), rheologische Untersuchungen von unterschiedlichen Polymerlösungen (b).

Im Rahmen des **AP 1.3** wurden unterschiedlich konzentrierte Polymerlösungen hergestellt und hinsichtlich der Lösbarkeit, Oberflächenspannung und dynamischen Viskosität untersucht. Für die nachfolgenden Electrospinning-Versuche im **AP 1.4** sollen folgende herausgearbeitete (Bio-)Polymere auf die Spinnbarkeit am Nanospinner NS1 (Inovenso Ltd., Istanbul, Turkey) untersucht werden:

- Alginat in Reinwasser
- Gelatine in Essigsäure
- Chitosan in Essigsäure
- Chitosan + Gelatine + PVA in Essigsäure
- Celluloseacetat in Aceton/Dimethylformamid (DMF)

AP 1.4 Prozessentwicklung für Verarbeitung ausgewählter Polymerlösungen im Electrospinning-Verfahren

In diesem Arbeitspaket wurde die Electrospinning-Anlage Nanospinner NS1 (Inovenso Ltd., Istanbul, Turkey) in Betrieb genommen und mit den in den vorherigen Arbeitspaketen herausgearbeiteten Polymerlösungen getestet. Electrospinnen ist ein Verfahren zur Herstellung von Nanofasern aus Polymerlösungen, bei dem eine elektrische Spannung verwendet wird, um eine Flüssigkeit zu einer dünnen Faser zu ziehen. Neben der elektrischen Spannung ist eine gezielte Anpassung von weiteren Prozessparametern wie der Flussrate und der Distanz zwischen Düse und Kollektor notwendig, um eine erfolgreiche Scaffoldherstellung zu ermöglichen. Die Umgebungseinflüsse wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit können ebenfalls den Spinningprozess beeinflussen. Um diese Einflüsse möglichst gering zu halten, wurden alle Versuche in einem klimatisierten Laborraum durchgeführt.
Die Verarbeitung von **Alginat** im Electrospinning Prozess war herausfordernd, da keine hohe Verkettung der Polymerketten vorlag. Aufgrund der hohen Oberflächenspannung neigt der Taylor Cone an der Düsenspitze zum Zerfall in Tröpfchen, welche sich randomisiert an der Kollektorplatte verteilten. Um ein erfolgreiches Electrospinnen mit Alginat gewährleisten zu können, wurden weitere Copolymere und Zusätze in die Spinnerlösung gegeben. In der Literatur wurden dafür bereits Alginat mit Polyethyleneglycol (PEG) als Trägerpolymer kombiniert, was jedoch nicht erfolgreich war. Durch eine iterative Anpassung der Prozessparameter konnte hingegen mit **Gelatine** ein konstanten Materialaustrag ermöglicht werden und somit ein gut handelbares Mesh hergestellt werden (siehe Abbildung 3).

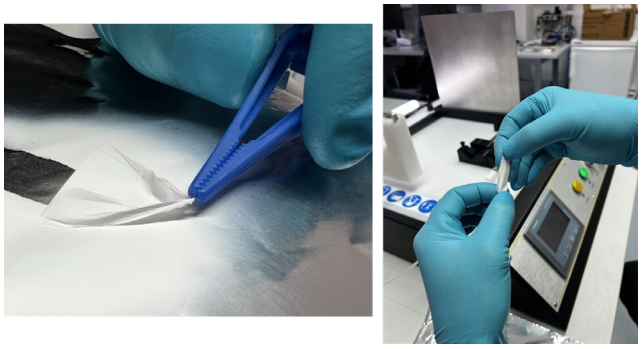

Abbildung 3: Erfolgreich hergestellte Scaffoldmatte aus Gelatine und Essigsäure.

Das Electrospinning von **Chitosan** gestaltete sich aufgrund der hohen Viskosität der Polymerlösung als Herausforderung. Im Rahmen von Parameterstudien wurden auch unterschiedliche Chitosan-Chargen mit niedrigem Molekulargewicht von 50.000−190.000 g/mol und einem Chitosan mit mittlerem Molekulargewicht von 350.000 g/mol untersucht. Zwar gelang es, Chitosan zu verspinnen, prozessstabile Ergebnisse konnten jedoch erst durch eine Zugabe von synthetischen Polymeren erreicht werden.

Ein stabiler Spinnprozess konnte mit 2,5% Chitosan + 2,5% **Polyethylenoxid** (PEO) mit einer Spannung von 20kV, einer Kollektor-Düsen Distanz von 15 cm und einem Vorschub von 0,29 ml/h erreicht werden. Weitere erfolgreiche Versuche konnten mit dem Polymer **Polyvinylalkohol** (PVA) durchgeführt werden. Dabei zeigte die Kombination aus 2% Chitosan und 10% PVA bei einer Spannung von 30kV, einem Abstand von 12cm und einem Vorschub von 0,6 ml/h die besten Ergebnisse. Neben der Kombination aus Chitosan mit synthetischen Polymeren wurden auch Experimente mit einer Kombination aus zwei Biopolymeren (**Gelatine + Chitosan**) und **PVA** in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. In der Untersuchung wurde beobachtet, dass eine Mischung aus Chitosan und Gelatine im Verhältnis 1:3, ergänzt durch 35% Polyvinylalkohol (PVA), zu einem instabilen Spinnprozess führte, der eher dem Electrospraying als dem Electrospinning entsprach. Eine Erhöhung des Anteils von Chitosan in der Polymermischung führte zu einer Stabilisierung des Spinnprozesses. Folglich konnte unter diesen Bedingungen ein erfolgreiches Electrospinning realisiert werden.
Beim Electrospinning von **Celluloseacetat** wurden unterschiedliche Lösungsmittelkonzentrationen in Essigsäure untersucht, welche aber primär in Electrospraying resultierten. Durch den Wechsel des Lösungsmittels auf eine Kombination von Aceton und DMF konnte ein stabiler Taylor Cone erreicht werden. Durch eine Vielzahl an Versuchen konnte mit einer Polymerkonzentration von 12% in einem Lösungsmittel aus Aceton/DMF im Verhältnis 3:1 ein gutes Mesh hergestellt werden. Folgende Prozessparameter stellten sich am Nanospinner als Optimum heraus: Spannung von 14kV, eine Düsen-Kollektor Distanz von 10cm und eine Flussrate von 0,8 ml/h. Nach der Durchführung des Electrospinning-Prozesses mit verschiedenen Polymeren wurde eine detaillierte Auswertung der erzeugten Fasern, die auch als Vlies oder Mesh bezeichnet werden, vorgenommen. Diese Evaluation erfolgte mittels mikroskopischer Untersuchungen, deren Ergebnisse in Abbildung 4 dargestellt sind. Die Analyse des Meshes konnte mittels Mikroskops (VHX 5000, Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) lediglich oberflächlich durchgeführt werden, da dessen Auflösung und Tiefenschärfe für eine detaillierte Untersuchung der Struktur begrenzt ist. Um eine präzisere Betrachtung zu ermöglichen, wurde daher ein konfokales Laserscanning-Mikroskop (LEXT OLS4000, Olympus, Hamburg, Deutschland) eingesetzt, welches eine verbesserte dreidimensionale Darstellung der Proben erlaubt. Die höchste Detailgenauigkeit und Aussagekraft bei der Untersuchung der Scaffolds wurde durch den Einsatz eines Rasterelektronenmikroskops (ZEISS Supra 25, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) erreicht, das aufgrund seiner hohen Auflösung und Tiefenschärfe die feinsten Strukturen der Scaffolds sichtbar machen konnte. Erst durch die Untersuchung des gesponnenen Meshes mit einem Rasterelektrodenmikroskop konnten die Nanofasern deutlich dargestellt und ausgewertet werden. Die Auswertung der Faserdurchmesser erfolgte mit dem Programm ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

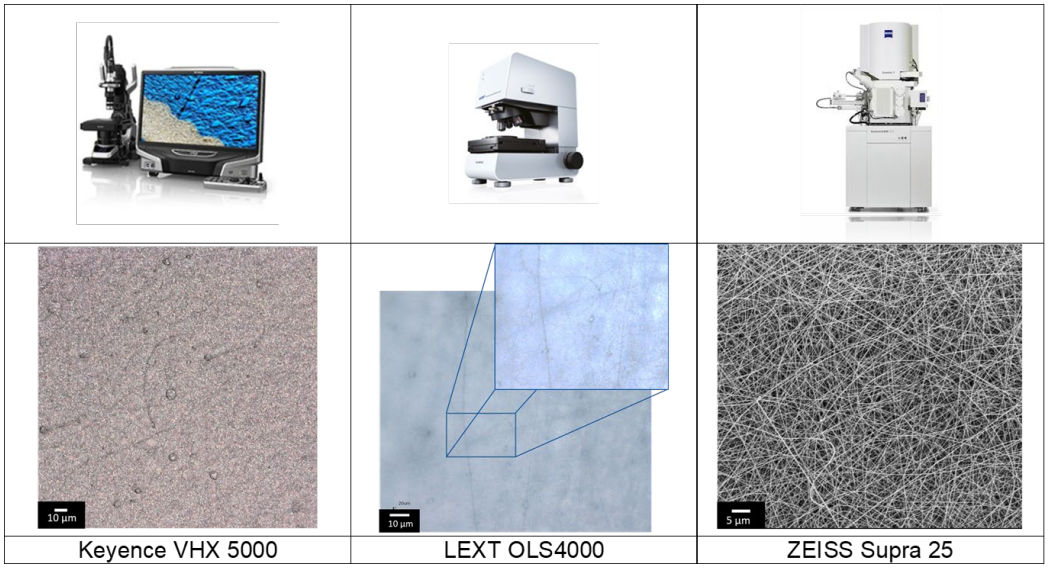

Abbildung 4: Morphologische Betrachtung der Oberfläche von hergestellten Meshes.

Die mikroskopische Betrachtung ermöglicht eine präzise Beurteilung der morphologischen Eigenschaften der Fasern, einschließlich ihrer Durchmesser, Ausrichtung und Verteilung, was für die weitere Anwendung und Optimierung des Spinnprozesses entscheidend ist.

Im AP 1.4 wurden auch die rheologischen Eigenschaften der Polymerlösung analysiert. Die Eigenschaften der durch Electrospinning gewonnenen Fasern können mit der Viskosität der verwendeten Polymerlösung korreliert werden. Eine niedrige Viskosität sorgt für einen Electrospraying-Prozess (siehe Abbildung 5c). Auf der Kollektorplatte werden keine Fasern abgelegt, sondern lediglich einzelne Tröpfchen bzw. Partikel. Wird die Viskosität der Spinnerlösung erhöht, bilden sich Fasern aus, welche noch vereinzelt Flüssigkeitstropfen (Beads) besitzen. Vergrößert sich die Viskosität weiter, werden uniforme Fasern mittels Electrospinnings hergestellt.

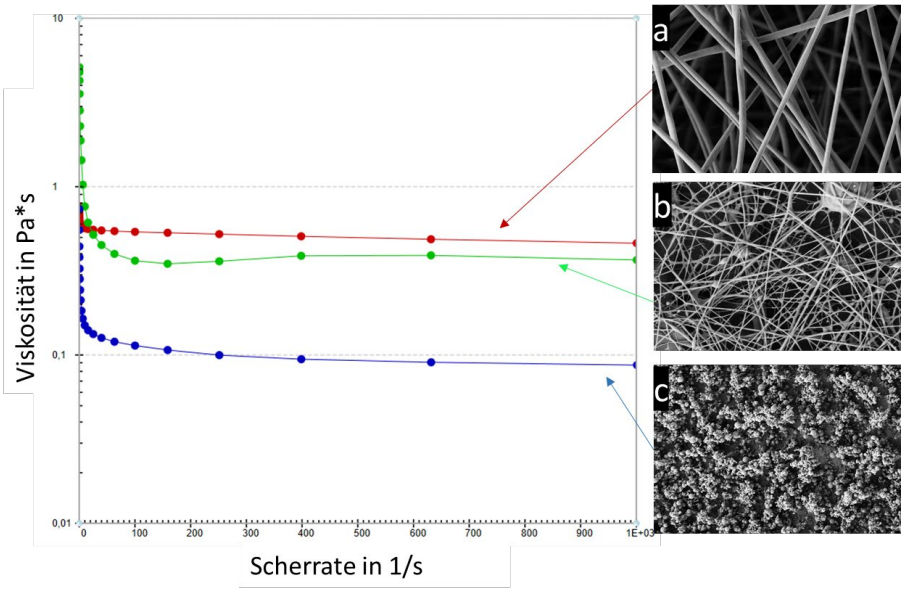

Abbildung 5: Zusammenhang zwischen Viskosität und Morphologie der hergestellten Fasern aus Gelatine (a), Chitosan:Gelatine/PVA 3:1/35% (b) und Chitosan:Gelatine/PVA 1:3/35%.

Die Ausrichtung von Fasern beim Electrospinnprozess kann durch verschiedene Techniken erreicht werden. Eine zentrale Rolle spielt hierbei das Design des Kollektors, der maßgeblich die Faserausrichtung beeinflusst. Besonders hervorzuheben sind in diesem Kontext rotative Kollektorverfahren, welche gegenwärtig als die effektivsten Methoden zur Ausrichtung von Fasern gelten, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Skalierung und Kommerzialisierung des Electrospinnverfahrens. Im Rahmen des Arbeitspakets AP 1.4 konnte erfolgreich ein Zylinderkollektor zur Ausrichtung der Fasern entwickelt werden, welcher in den bestehenden Electrospinner NS1 integriert wurde. Zunächst wurden für die Entwicklung verschiedene Konzepte zur Umsetzung herausgearbeitet und systematisch bewertet. Der finale Entwurf des Kollektors ist als CAD-Modell in Abbildung 6a dargestellt. Um einen funktionierenden Prototypen herstellen zu können, wurden Komponenten des rotierenden Kollektors mittels additiver Fertigungsverfahren hergestellt (siehe Abbildung 6b) und iterativ angepasst. Neben den additiv gefertigten Bauteilen wurden alle weiteren Bauteile mechanisch gefertigt. Dazu zählen die Teilwellen, die Profile für die Plattform, die Hohlwelle, die Flansche, die Motorplatte und die Kupferplatte für die Erdung. Der vollständige Aufbau des zusammengebauten Rotating-Drum-Kollektor ist in Abbildung 6c dargestellt. Aufgrund des modularen Aufbaus kann je nach Bedarf der Rotating-Drum-Kollektor oder die statische Kollektorplatte in den Electrospinner eingebaut werden.

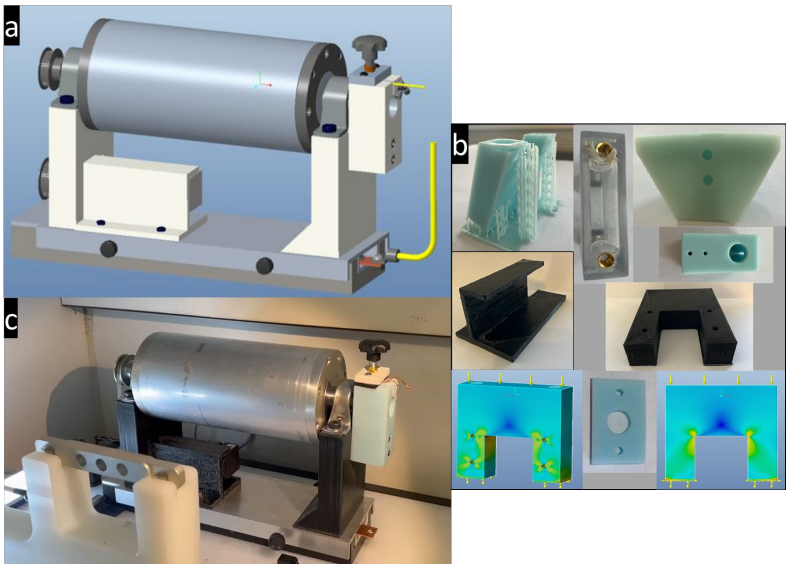

Abbildung 6: Konstruktiver Entwurf des Rotating-Drum-Kollektors (a), additiv gefertigte Komponenten für Kollektor (b), eingebauter Kollektor im Nanospinner NS1 (c).

Durch den Rotating-Drum-Kollektor konnte mit zunehmender Umdrehung der Trommel eine Ausrichtung der gesponnenen Fasern erreicht werden (siehe Abbildung 7). Die Faserausrichtung im Electrospinnprozess wird nicht nur durch die Rotationsgeschwindigkeit des Kollektors beeinflusst, sondern auch durch eine Reihe weiterer Prozessparameter. Der Ausrichtungsgrade kann durch eine niedrige Materialflussrate oder hohe elektrische Spannungen reduziert werden. Es ist somit essenziell, eine sorgfältige Abstimmung sämtlicher Prozessparameter vorzunehmen, um die Optimierung der gewünschten Fasereigenschaften zu erreichen.

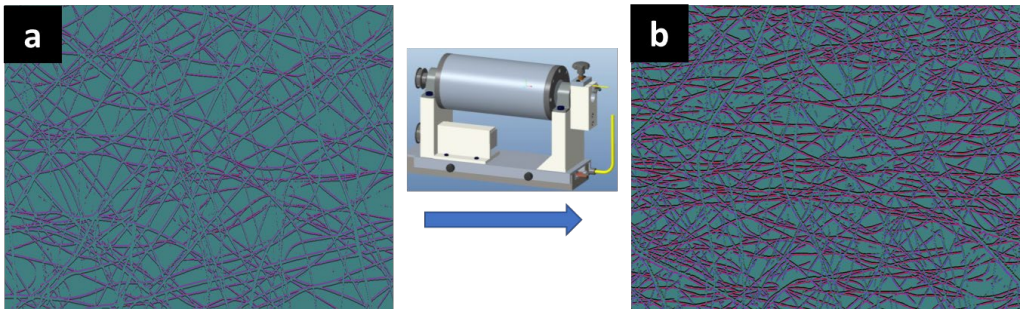

Abbildung 7: Randomisiert ausgerichtete elektrogesponnene Fasern auf Kollektorplatte (a), horizontal ausgerichtete elektrogesponnene Fasern auf Rotating-Drum-Kollektor (b).

Im Arbeitspaket AP 1.4 konnte erfolgreich der **Meilenstein 1** erreicht werden. Ein erfolgreicher Electrospinning-Prozess zur Herstellung von Scaffold für die Myozyten-Gewebezüchtung konnte erfolgreich für etabliert werden, indem geeignete Polymer-Lösungsmittelkombinationen, sowie stabile Prozessparameter für den Nanospinner herausgearbeitet wurden.

AP 1.5 Entwicklung von elektrogesponnenen Scaffolds mit gezielten morphologischen und mechanischen Eigenschaften

Im **AP 1.5** wurden Scaffolds mittels Electrospinning hergestellt und bezüglich ihrer Morphologie und spezifischen Oberfläche hin charakterisiert. Ziel war es Scaffolds zu entwickeln, welche eine optimierte spezifische Oberfläche für Zelladhäsion aufweisen, mit Porengrößen zwischen 5 und 40 µm.

An dem verwendeten Nanospinner NS1 wurden verschiedene Düsenaufsätze eingesetzt, um deren Einfluss auf die Morphologie der gesponnenen Fasern zu analysieren. Hierbei kamen 27G-Kanülen, 21G-Kanülen sowie eine Innovenso-Düse zur Anwendung. Die daraus resultierenden Fasernetze (Meshes) und die Düsen selbst sind in Abbildung 8 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist auch der Einfluss der Düsenöffnung auf die Ausbildung des Taylor-Kegels veranschaulicht.

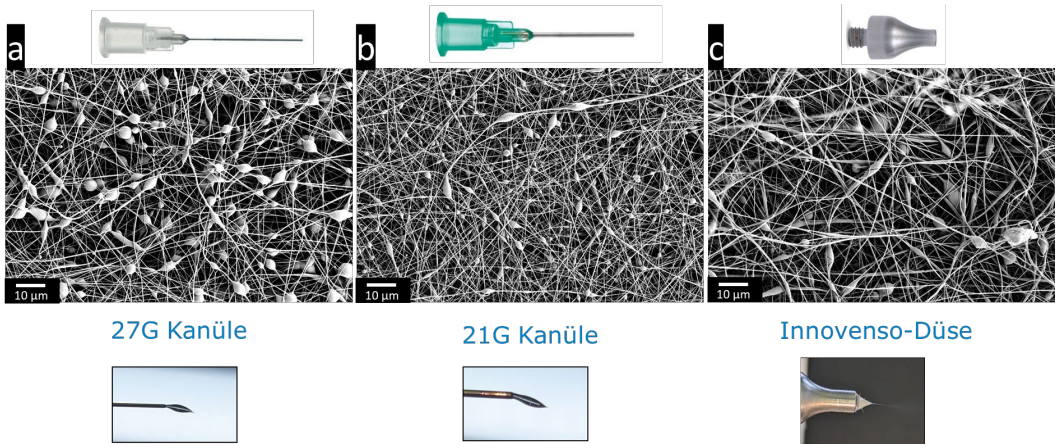

Abbildung 8: Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Düsenöffnungen 27G-Kanüle (a), 21G-Kanüle (b) und Innovenso-Düse (c) auf die Morphologie der Fasern.

Es wurde festgestellt, dass der größte und stabilste Taylor Cone mit der Innovenso-Düse erzielt werden konnte. Die Untersuchung der Fasermorphologie der verschiedenen Meshes offenbarte das Vorhandensein von perlenartigen Strukturen entlang der Fasern (Beads). Diese ungewünschten Beads lassen sich durch eine Anpassung der Viskosität bzw. durch die Substitution des Lösungsmittels umgehen. Abbildung 9a zeigt exemplarisch REM Aufnahmen eines perlenbehafteten Meshes aus einer Polymerlösung mit 12% Chitosan in einem Lösungsmittel aus Aceton/DMF (3:1). Durch eine Substitution von DMF durch DMSO im Lösungsmittel konnten nach einer mehrstufigen Anpassung des Lösungsmittelsystem uniforme perlenfreie Fasern mit Celluloseacetat generiert werden (siehe Abbildung 9b). Die Auswirkungen der iterativen Lösungsmittel-Anpassung auf den Taylore Cone ist in Abbildung 9c dargestellt.

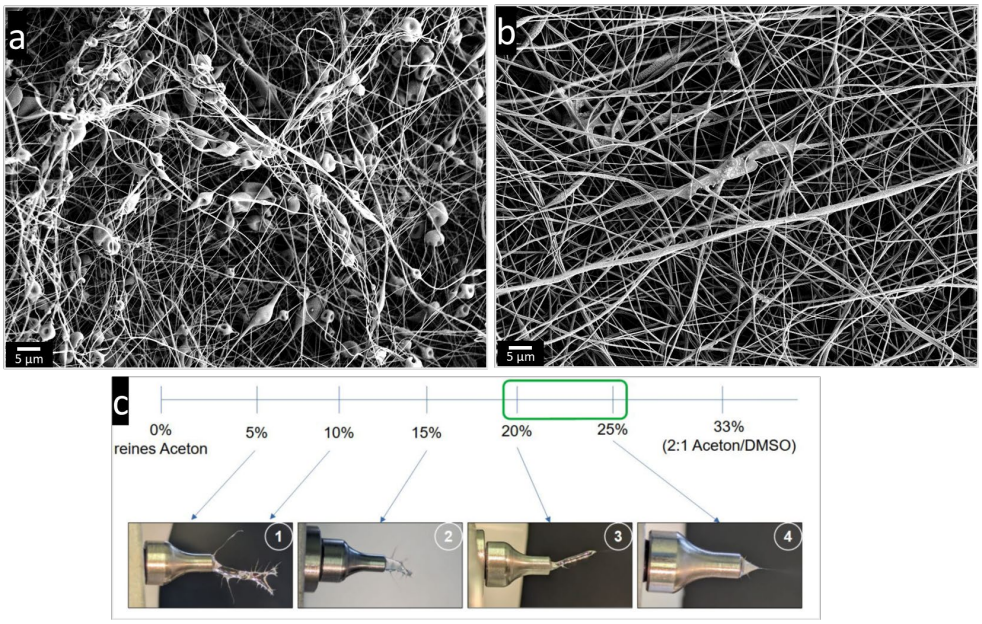

Abbildung 9: REM-Aufnahmen von Celluloseacetat (12wt%) mit Aceton/DMF (a) und uniforme Fasern mit Celluloseacetat (12wt%) mit Aceton/DMSO (b), Einfluss der DMSO-Konzentration auf Taylor Cone (c).

In Spinnlösungen mit einem niedrigen DMSO-Gehalt von 5-10% kam es zu erheblichen Prozessstörungen. Diese äußerten sich vor allem in einem raschen Austrocknen des Taylor Cones nach ca. 2 bis 3 Minuten. Dies erforderte eine Unterbrechung des Prozesses zur Entfernung des Polymeraufbaus. Mit einem erhöhten DMSO-Anteil in der Lösung verringerten sich die beschriebenen Probleme deutlich. Bei einem DMSO-Gehalt von 15% bildete sich zwar noch Polymer an der Düsenspitze, jedoch trat dieser Vorgang deutlich verzögert ein, und die entstandene Polymerstruktur war wesentlich kleiner. Bei einer DMSO-Konzentration von 20% reduzierte sich die Störung soweit, dass der Prozess über eine Dauer von 20 Minuten stabil lief. Während dieser Zeit bildete sich nur eine geringfügige Menge Polymer an der Düse, die die Extrusion des Materials nicht merklich beeinträchtigte. Ein DMSO-Anteil von 25% in der Spinnlösung führte schließlich zu keinerlei Störungen des Taylor Cones und ein gleichmäßiges perlenfreies Mesh konnte erstellt werden (siehe Abbildung 9b).

Im **AP 1.5** wurde weiterhin der Einfluss unterschiedlicher Polymerkonzentrationen in der Spinnlösung untersucht. Durch systematische Variation der Polymerkonzentrationen und anschließende Untersuchung der morphologischen Eigenschaften der generierten Fasern konnte eine signifikante Abhängigkeit des Faserdurchmessers vom Polymergehalt nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind besonders relevant für die Entwicklung von Scaffolds für biomedizinische Anwendungen, da die Faserdurchmesser und die damit verbundene Porosität des Scaffolds entscheidend die Zellmigration, -adhäsion und das Wachstumsverhalten beeinflussen können. Die Kontrolle über den Faserdurchmesser durch Anpassung der

Polymerkonzentration bietet somit einen wichtigen Ansatzpunkt zur Optimierung der Scaffold-Eigenschaften. In Abbildung 10 sind REM Aufnahmen von hergestellten Scaffolds aus Celluloseacetat und deren Faserdurchmesser dargestellt. Bei einer Polymerkonzentration von 12% wurde ein durchschnittlicher Faserdurchmesser von 0,292 µm ± 0,032 µm ermittelt. Eine Erhöhung der Polymerkonzentration auf 14% vergrößerte den durchschnittlichen Faserdurchmesser auf 0,363 µm ± 0,118 µm. Der größte Faserdurchmesser wurde bei einer Polymerkonzentration von 16% erreicht und betrug 1,34 µm ± 0,595 µm.

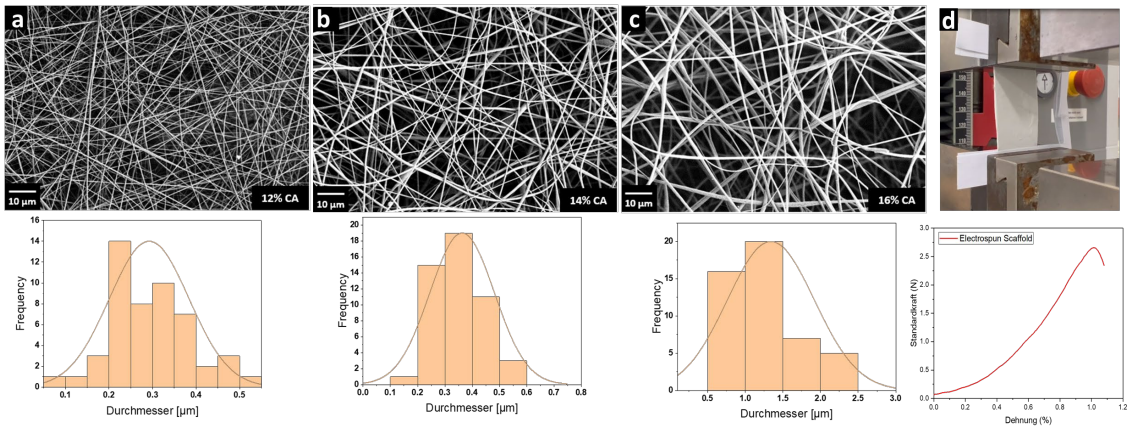

Abbildung 10: REM Aufnahmen von Celluloseacetat mit einem Polymergehalt von 12% (a), 14% (b) und 16 % (c) und mechanische Analyse mittels Zugversuches (d).

Zur Beurteilung der hergestellten Meshes wurden neben REM-Untersuchungen und mechanischen Analysen auch Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Die Durchführung von Kontaktwinkelmessungen ist entscheidend, um Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen den Scaffolds und den Zellen beziehungsweise der Zellkulturflüssigkeit zu gewinnen. Diese Informationen sind von zentraler Bedeutung für die Entwicklung von Scaffold-Strukturen für kultiviertes Fleisch. Ziel ist es, optimale Bedingungen für das Zellwachstum und die Geweberegeneration zu etablieren, was letztendlich die Effizienz und Qualität des kultivierten Fleisches verbessern kann. Die hergestellten Meshes zeigten ein hydrophiles Verhalten für Gelatine und Chitosan + PVA (siehe Abbildung 11).

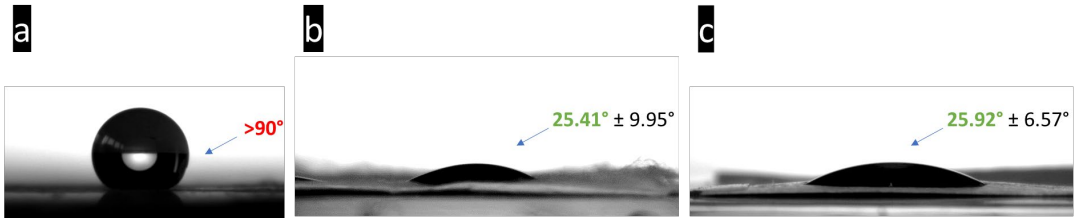

Abbildung 11: Kontaktwinkelmessungen für Celluloseacetat (a), Gelatine (b) und Chitosan + PVA (c).

AP 1.6 Optimierung der Polymerlösung für gezielte Funktionalisierung und Degradation

Zusatzstoffe spielen beim Elektrospinnen eine wichtige Rolle für die gezielte Modifikation der Fasereigenschaften und Prozessoptimierung. Die physikalischen Eigenschaften der Polymerlösung werden durch diese Additive beeinflusst - insbesondere die elektrische Leitfähigkeit und Viskosität, welche den Spinnprozess maßgeblich bestimmen. Im Rahmen des AP 1.6 wurde ein Biopolymer (Celluloseacetat) ausgewählt und gezielt angepasst. Celluloseactetat ist ein kostengünstiges und nachwachsendes Material, welches sich hervorragend für die Gewebezüchtung eignet, da es biokompatibel, biologisch abbaubar und ungiftig ist. Zur gewünschten Optimierung können beim Elektrospinnen zahlreiche Arten von Pflanzenextrakten oder ätherischen Ölen zu den elektrogesponnenen Polymerfasern hinzugefügt werden. Im Rahmen der Untersuchung am LFM wurde das pflanzliche Produkt „Annatto (Bixa orellana)“, ein natürlicher Farbstoff, der aus tropischen, in Südamerika beheimateten Pflanzen gewonnen wird, verwendet. Seine Inhaltsstoffe haben gute antibakterielle und antioxidative Eigenschaften und bieten daher ein großes Potenzial für den Einsatz im Bereich der Gewebezüchtung. In mehreren Versuchsreihen wurde das Annatto mit verschiedenen Polymerlösungen vermengt und analysiert.

In Abbildung 12a werden die gemessenen Oberflächenspannungen von Spinnlösungen gezeigt, die 12%, 14% und 16% Celluloseacetat und Celluloseacetat, angereichert mit Annattoextrakt (CA@A), enthalten. Eine Erhöhung des Polymergehalts resultiert in einer Vergrößerung der ermittelten Oberflächenspannung. Es zeigt sich, dass die Oberflächenspannung bei zunehmendem Gehalt an CA@A ähnliche Werte aufweist wie die Lösungen, die nur CA enthalten, ohne Annattoextrakt. Daraus lässt sich schließen, dass eine zusätzliche Modifkation der Polymerlösung durch Annattoextrakt keinen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenspannung hat. Bei den rheologischen Untersuchungen (siehe Abbildung 12b) zeigte sich hingegen ein klarer Einfluss des Annattoextrakts. Eine Zugabe führte unabhängig von der untersuchten Polymerkonzentration zu einer Reduzierung der gemessenen Viskosität der Polymerlösung.

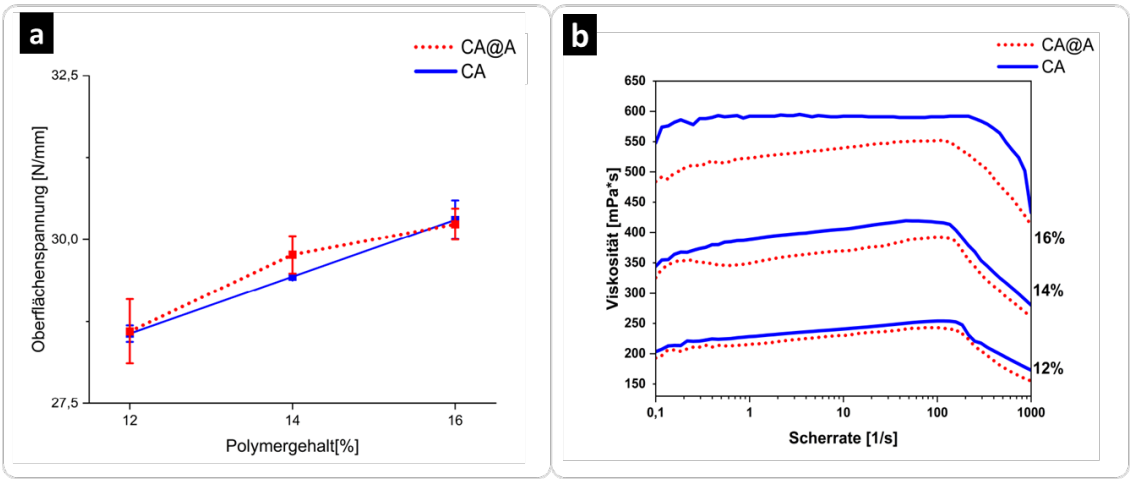

Abbildung 12: Oberflächenspannung (a) und Viskositätsmessung (a) von 12%, 14% und 16% Celluloseacetat (CA) und Celluloseacetat+Annatto (CA@A) in Aceton/DMSO (22.5%).

Nach iterativer Anpassung der Prozessparameter war es möglich, einen prozessstabilen Elektrospinning Prozess zu etablieren. Bei einer Polymerkonzentration von 12% zeigten sich vermehrt perlenartige Fasern (siehe Abbildung 13). Durch eine Erhöhung der Polymerkonzentration auf 14% war es möglich, perlen-freie uniforme Fasern zu generieren. Durch eine weitere Erhöhung der Polymerkonzentration auf 16% konnten sowohl der Faserdurchmesser als die Porengröße gesteigert werden. Neben den Untersuchungen und Vermessungen der Fasermorphologie wurden auch Kontaktwinkelmessungen auf den hergestellten Scaffolds durchgeführt. Bei allen getesteten Scaffolds wurde ein Kontaktwinkel unter 90° festgestellt, was auf ein hydrophiles Verhalten der Scaffold Oberfläche hindeutet.

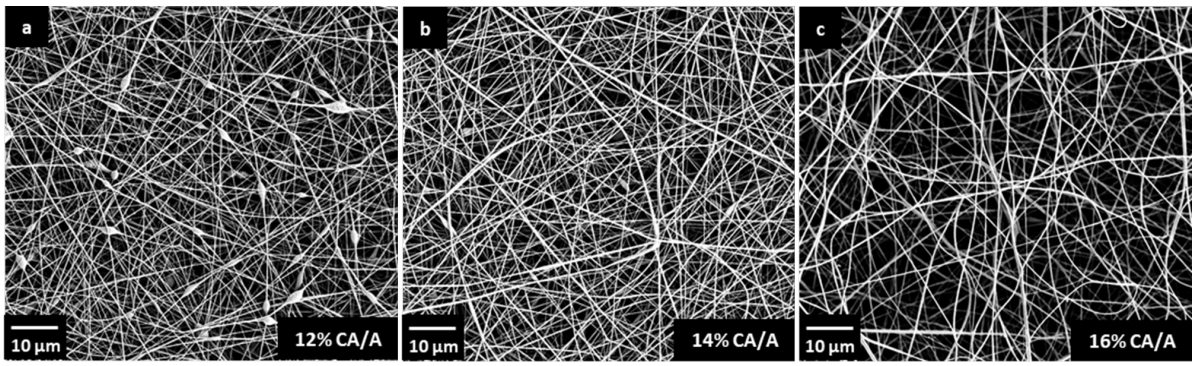

Abbildung 13: REM Aufnahmen von Celluloseacetat + Annattoextrakt mit einem Polymergehalt von 12% (a), 14% (b) und 16 % (c).

AP 2.5 Morphologischen und mechanischen Eigenschaften (Kryoglierprozess)

Im Rahmen des AP 2.5 stellte der Projektpartner Innocent Meat GmbH mehrere Ausführungen der sphärischen kryogelierten Scaffolds zur Verfügung, welche am Lehrstuhl für Mikrofluidik erfolgreich analysiert und vermessen werden konnten (siehe Abbildung 14). Eine Vermessung der kryoglierten Scaffolds zeigte bei den vereinzelten Scaffolds einen Durchmesser zwischen 135-189 µm. Dabei vielen vereinzelte Scaffolds auf, welche in einem zusammenhängenden Agglomerat vorlagen. Dieses Agglomerat bestand sowohl aus kleineren (ca. 92 µm Durchmesser) als auch größeren Scaffolds mit einem Durchmesser von 189 µm.

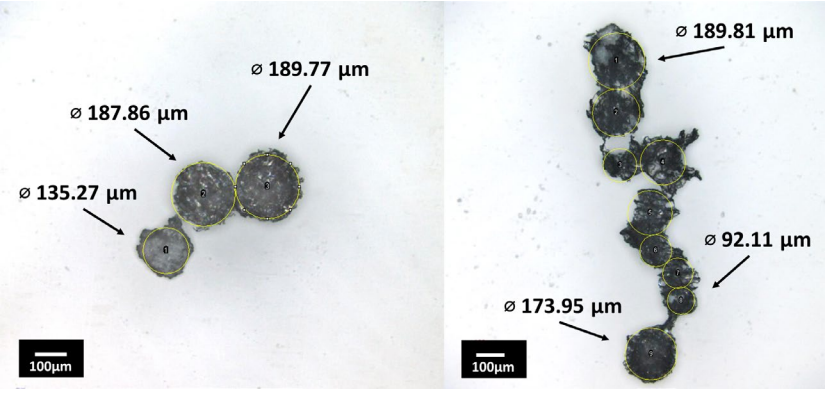

Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahme von vereinzelten Scaffolds (links) und agglomerierten Scaffolds (rechts).

Bei näherer Betrachtung der kryogelierten Mikroträger unter dem Mikroskop mit einer 50-fachen Vergrößerung erscheinen die Scaffolds als transparente Struktur mit einer verschwommenen Oberfläche aufgrund von Schwierigkeiten beim Fokus-Stacking. Dieses Problem konnte umgangen werden, indem die Proben mit Laser-Kontrast aufgenommen wurden, wodurch die Probenränder und die Porosität innerhalb der Mikroträger klar erkennbar sind. Darüber hinaus ist es auch möglich eine dreidimensionale Höhenanalyse des Mikroträgers durchzuführen. Durch die Darstellung mittels Farbgradienten von blau (tief) bis rot (hoch) wird eine quantitative Beurteilung der Oberflächentopographie ermöglicht (siehe Abbildung 15).

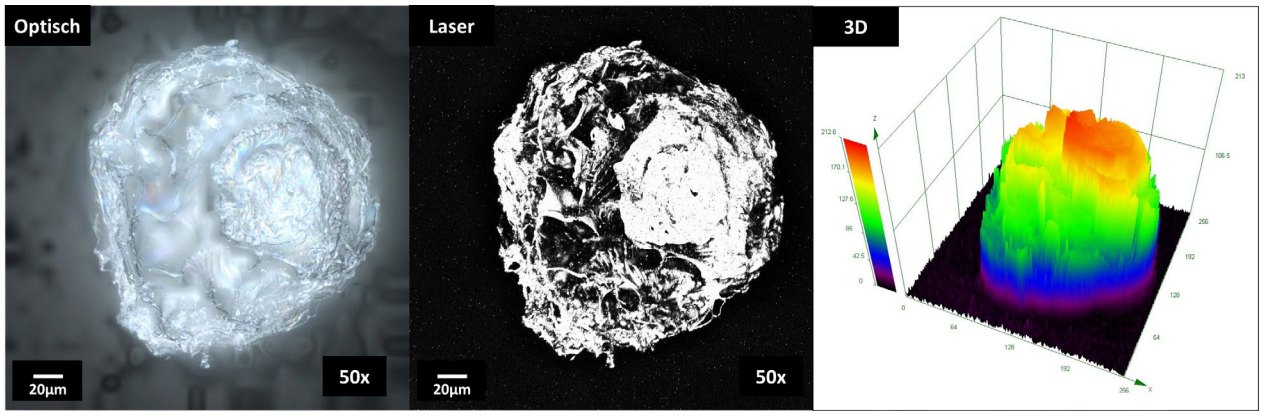

Abbildung 15: Charakterisierung eines kryogelierten Scaffolds mittels optischer Mikroskopie (links), Laser-Mikroskopie (mitte) und 3D-Oberflächenprofil (rechts).

Die höchste Auflösung konnte mittels Rasterelektronenmikroskopie (siehe Abbildung 16) erreicht werden. Dies erlaubt die präzise Analyse der Porengröße, -verteilung und -konnektivität. Die Porengröße der kryogelierten Alginat Scaffolds belief sich dabei im Mittelwert bei 36,73 ± 12,96µm.

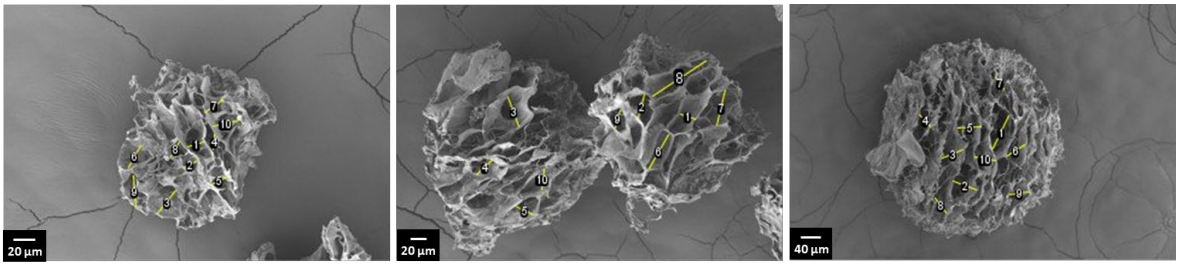

Abbildung 16: Rasterelektronenmikroskopie von kryogelierten Alginat-Scaffolds mit visualisierten Messbereichen zur Vermessung der Porengröße.

Neben der optischen Analyse wurden die kryogelierten Proben mittels Gaspyknometrie zur präzisen Erfassung der wahren Dichte und Volumens untersucht. Das Messprinzip basiert auf der Verdrängung eines Inertgases, wobei die Druckänderung in zwei kalibrierten Volumina gemessen wird. Aus dieser Messung lässt sich das exakte Volumen der Probe ermitteln, welches zusammen mit der Masse die Berechnung der Reindichte ermöglicht. Als Messgas wurde Helium eingesetzt, da es aufgrund seiner geringen Molekülgröße in Nanoporen eindringen kann und somit eine vollständige Erfassung der Porenstruktur erfassen kann. Für die kryogelierten Scaffolds aus Alginat wurde eine Dichte von 2.2203 g/cm³ und ein durchschnittliches Volumen von 0.0088cm³ erreicht.

AP 3 Untersuchung der Performance finaler Scaffolds aus AP 1 und AP 2 an den entwickelten Zelllinien

Die systematische Charakterisierung der entwickelten Scaffolds aus AP 1 und AP 2 erfolgte durch eine umfassende Evaluierung ihrer Leistungsfähigkeit im direkten Vergleich mit kommerziell verfügbaren Referenzsystemen. Die Scaffolds wurden zunächst hinsichtlich ihrer Eignung als Trägermaterial für die etablierten Zelllinien untersucht, wobei die maximal erreichbare Zelldichte als primärer Parameter diente. Im Rahmen der Zusammenarbeit stellte der Lehrstuhl für Mikrofluidik dem Projektpartner mehrere elektrogesponnene Scaffolds zur Verfügung, die auf der Grundlage der in AP1 identifizierten Prozess- und Lösungsmittelparameter erstellt wurden. Scaffolds aus reinen (Bio-)Polymeren, als auch mit Annatto-modifizierten Polymere wurden bereitgestellt. Dabei zeigten die Scaffolds mit einem höheren Polymeranteil einen größeren Faserdurchmesser und erhöhte Porosität, was ein leichteres Einwachsen der Zellen in das Vlies ermöglicht, und eine Proliferation durch die Durchgangslöcher fördert.
Um die Porosität der elektrogesponnenen Scaffolds weiter zu steigern, könnte in zukünftigen Experimenten die Zugabe eines wasserlöslichen Polymers in Kombination mit dem Hauptpolymer während des Spinnprozesses in Betracht gezogen werden. Nach dem abgeschlossenen Electrospinnen kann dann das Opferpolymer ausgewaschen werden, und somit größere Poren im Scaffold hinterlassen. Die im Rahmen des AP1 gewonnenen Erkenntnisse zum wasserlöslichen Polymers PVA (Polyvinylalkohol) hinsichtlich optimierter Mischungsverhältnisse und Prozessparameter können dafür in Betracht gezogen werden.

Es fand eine gute Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner statt. Die Projektbearbeitung konnte in die studentische Ausbildung integriert werden und führte am LFM zu Studien- und Abschlussarbeiten.

2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Personalausgaben für den wissenschaftlichen Mitarbeiter (TV-L E13) stellen den wichtigsten Ausgabeposten während der Projektlaufzeit dar. Dieser war mit der Bearbeitung der einzelnen Arbeitsziele und der Koordination mit dem beteiligten Projektpartner vertraut. Die weiteren Ausgabepositionen und –beträge sind im zahlenmäßigen Nachweis aufgeführt.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Ohne die Zuwendung hätte die erfolgreiche Erforschung eines Electrospinning-Prozesses zur Herstellung von Scaffolds für die Myozyten-Gewebezüchtung nicht stattfinden können. Die Einstellung eines wissenschaftlichen Mitarbeiters mit abgeschlossenem Masterstudium erwies sich als entscheidend, um die Projektziele zu erreichen.

Die Forschungsaufgaben erforderten sowohl fundierte Methodenkenntnisse als auch die Fähigkeit, Lösungen nach aktuellen wissenschaftlichen Standards zu entwickeln. Gleichzeitig ermöglichte die Qualifikation der Stelle innehabenden Person, Studierende fachlich kompetent bei empirischen Arbeiten zu begleiten – von der Themensetzung bis zur Ergebnisauswertung.

2.4 Voraussichtliche Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplan

Die vielversprechenden Projektergebnisse ermöglichen eine erfolgreiche Weiterverwendung in zukünftigen Forschungsvorhaben sowie einen effektiven Transfer in die wirtschaftliche Praxis durch den Industriepartner Innocent Meat GmbH.

2.5 Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im letzten Jahr der Projektlaufzeit publizierten Dos Santos et al. einen Artikel zum Thema Scaffold Herstellung mittels Electrospinning für kultiviertes Fleisch. Als Polymer wurde dabei ebenfalls Cellulose Acetat verwendet, jedoch in Kombination mit dem toxischen Lösungsmittel Dimethylformamid (DMF). Der Neuheitswert der eigenen Untersuchungen war durch diese Entwicklung jedoch nicht beeinträchtigt, da die Versuche im Projekt mit dem alternativen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Verarbeitung von Celluloseacetat mit DMSO anstelle von DMF bietet mehrere Vorteile. DMSO ist weniger toxisch und mutagen, wodurch es eine sicherere Alternative darstellt. Zudem gilt DMSO als umweltfreundlicher und nachhaltiger.

Quelle der Publikation: Dos Santos et al. (2024): Random cellulose acetate nanofibers: a breakthrough for cultivated meat production. In: Frontiers in Nutrition 10, S. 1297926. DOI:10.3389/fnut.2023.1297926.

2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Publikationen im Berichtszeitraum

Referierte Veröffentlichungen

[1] Dreier, Tim, Neukirch, Florian, Priebe, Hannes and Seitz, Hermann. "Electrospinning of annatto-loaded cellulose acetate scaffolds using acetone/DMSO as solvent" Current Directions in Biomedical Engineering, vol. 10, no. 4, 2024, pp. 208-211. https://doi.org/10.1515/cdbme-2024-2050

[2] Neukirch, Florian, Dreier, Tim, Priebe, Hannes and Hermann, Seitz. „Investigation of cellulose acetate nanofibers using an DMSO based solvent system" Transactions on Additive Manufacturing Meets Medicine, 6(1), 2024, 1848. https://doi.org/10.18416/AMMM.2024.24091848

Nichtreferierte Veröffentlichungen/Tagungsbeiträge

[1] *Poster*, "Investigation of cellulose acetate nanofibers using a DMSO based solvent system", Neukirch, Florian, Dreier, Tim, Priebe, Hannes and Hermann, Seitz. Additive Manufacturing Meets Medicine Conference, Lübeck, 2024

[2] *Poster*, "Electrospinning of annatto-loaded cellulose acetate scaffolds using acetone/DMSO as solvent", Dreier, Tim, Neukirch, Florian, Priebe, Hannes and Seitz, Hermann. 58th DGBMT Annual Conference on Biomedical Engineering, 2024

Abgeschlossene studentische Arbeiten, Doktorarbeiten und Habilitationen

[1] Bachelorarbeit, Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Prozessparametern zur Herstellung von Scaffold-Strukturen für kultiviertes Fleisch, Leif Thorge Meyer, Universität Rostock, 2023

[2] Studienarbeit, Optimierung der Faserausrichtung im „Electrospinning"-Prozess mittels Integration eines rotierenden Kollektors, Marian Rath, Universität Rostock, 2023

[3] Masterarbeit, Optimierung von Electrospinning-Prozessparametern mittels statistischer Versuchsplanung zur Herstellung von Scaffolds für kultiviertes Fleisch, Hannes Priebe, Universität Rostock, 2024