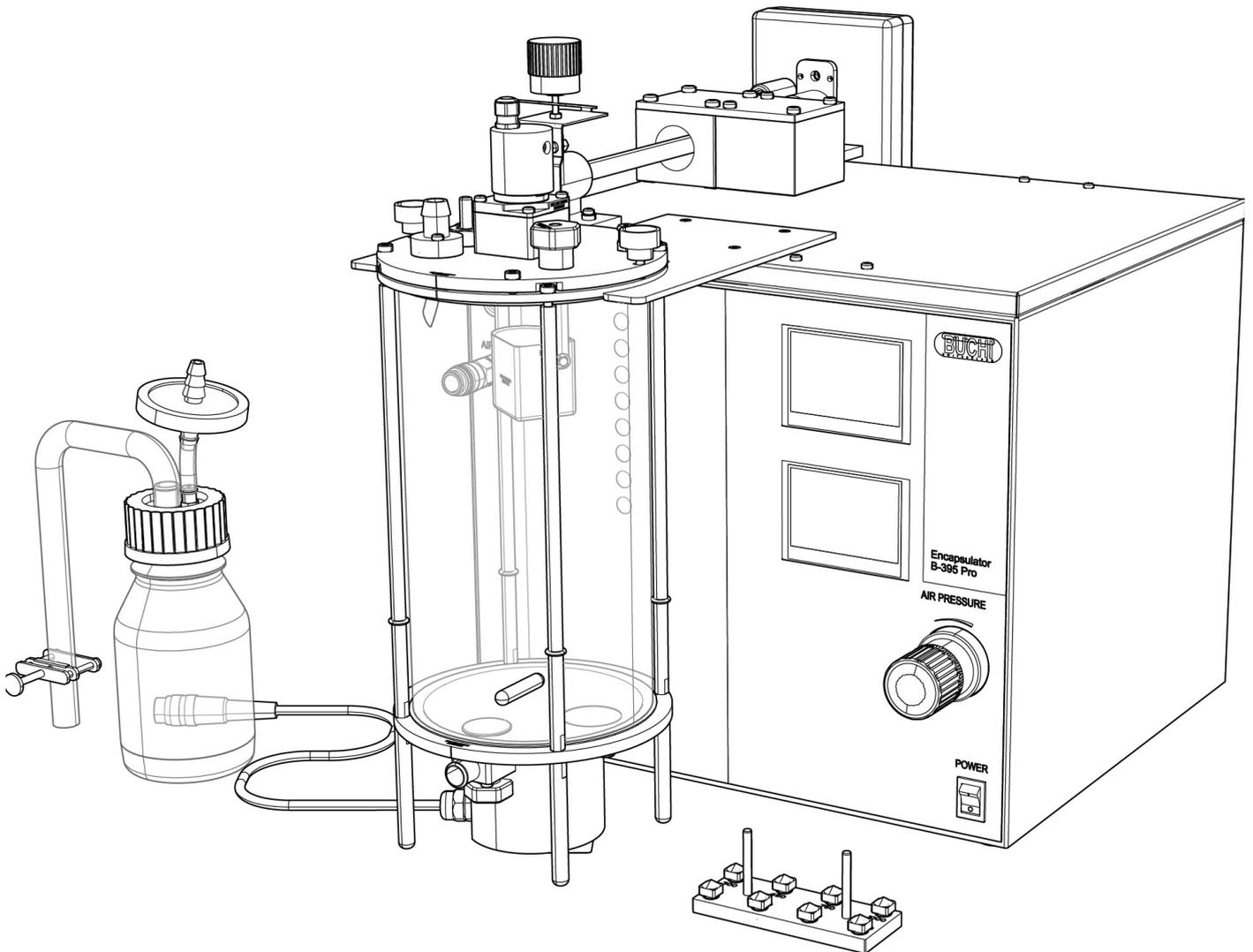




Encapsulator B-395 Pro

Bedienungsanleitung



Impressum

Produktidentifikation:
Bedienungsanleitung (Original), Encapsulator B-395 Pro

11593485E de

Publikatumsdatum: 05.2016

BÜCHI Labortechnik AG
Meierseggstrasse 40
Postfach
CH-9230 Flawil 1

E-Mail: quality@buchi.com

BÜCHI behält sich das Recht vor, diese Anleitung auf Grund künftiger Erfahrungen nach Bedarf zu ändern. Dies gilt insbesondere für Aufbau, Abbildungen und technische Details.

Diese Bedienungsanleitung ist urheberrechtlich geschützt. Darin enthaltene Informationen dürfen nicht reproduziert, vertrieben oder für Wettbewerbszwecke verwendet oder Drittparteien zur Verfügung gestellt werden. Es ist ebenfalls untersagt, mit Hilfe dieser Anleitung irgendeine Komponente ohne vorherige schriftliche Zustimmung herzustellen..

Table of contents

1	Info zu dieser Bedienungsanleitung	5
2	Sicherheit	6
2.1	Qualifikation der Benutzer	6
2.2	Ordnungsgemäße Verwendung	6
2.3	Nicht ordnungsgemäße Verwendung	6
2.4	Verwendete Sicherheitswarnungen und Sicherheitssignale	7
2.5	Produktsicherheit	9
2.5.1	Allgemeine Gefahren	9
2.5.2	Sicherheitsmaßnahmen	10
2.5.3	Integrierte Sicherheitselemente und -vorkehrungen	10
2.6	Allgemeine Sicherheitsregeln	11
2.7	Haftungsausschluss	11
3	Technische Daten	12
3.1	Anwendungsbereich und Lieferumfang	12
3.1.1	Standardgerät	12
3.1.2	Standard-Zubehör	13
3.1.3	Optionales Zubehör	14
3.1.4	Empfohlene Ersatzteile	14
3.2	Technische Daten	15
3.3	Verwendete Materialien	15
4	Funktionsbeschreibung	16
4.1	Funktionsprinzip	16
4.2	Anschlüsse am Encapsulator B-395 Pro	18
5	Installation und Inbetriebnahme	19
5.1	Installationsort	19
5.2	Installation des Encapsulator B-395 Pro	20
5.3	Elektrische Anschlüsse	21
5.4	Montieren des Reaktionsgefäßes	22
5.4.1	Deckplatte	23
5.4.2	Grundplatte	27
5.4.3	Kugelernteflasche	29
5.5	Pumpsysteme	30
5.5.1	Spritzenpumpe	30

Lesen Sie diese Bedienungsanleitung vor der Installation und Inbetriebnahme Ihres Systems sorgfältig durch und beachten Sie insbesondere die Sicherheitshinweise in Kapitel 2. Bewahren Sie die Bedienungsanleitung in unmittelbarer Nähe des Gerätes auf, damit Sie jederzeit darin nachschlagen können. An dem Gerät dürfen ohne vorheriges schriftliches Einverständnis durch BÜCHI keine technischen Veränderungen vorgenommen werden. Nicht genehmigte Änderungen können die Systemsicherheit beeinflussen, die Einhaltung von EU-Bestimmungen beeinträchtigen oder zu Unfällen führen. Diese Bedienungsanleitung ist urheberrechtlich geschützt. Darin enthaltene Informationen dürfen nicht reproduziert, vertrieben oder für Wettbewerbszwecke verwendet oder Drittparteien zur Verfügung gestellt werden. Es ist ebenfalls untersagt, mit Hilfe dieser Bedienungsanleitung irgendeine Komponente ohne vorherige schriftliche Zustimmung herzustellen.

Die englische Version ist die Ausgangssprachliche Version und dient als Basis für alle Übersetzungen in andere Sprachen.

5.5.2	Druckflasche	31
5.5.3	Installation der Druckflasche.	32
5.6	Option: Konzentrisches Düsensystem (CN)	33
5.6.1	Installieren von CN-Düsen.	35
5.7	Alle Teile des Encapsulator B-395 Pro.	36
5.8	Abschließende Installationsprüfung	36
6	Betrieb und Bedienung	37
6.1	Inbetriebnahme des Gerätes	37
6.2	Hauptbildschirme	37
6.3	Menüstruktur der Steuerungseinheit.	38
6.4	Menüfunktionen des oberen Touchscreens	39
6.5	Menüfunktionen des unteren Touchscreens	41
6.5.1	Menü für die Kalibrierung der Spritzenpumpe	42
6.5.2	Auswählen einer kalibrierten Spritze	43
6.6	Manuelle Steuerung des Luftdrucks	44
6.7	Handhabung der Spritzenpumpe	45
6.7.1	Kalibrierung der Spritzenpumpe.	45
6.7.2	Auswählen einer vorkalibrierten Spritze	45
6.8	Üben mit dem Encapsulator unter Verwendung von Wasser.	46
6.8.1	Verwendung der Spritzenpumpe	46
6.8.2	Verwendung der Druckflasche.	49
6.9	Üben mit dem Encapsulator unter Verwendung einer nicht-sterilen AlginateLösung	52
6.9.1	Herstellen einer 1,5 % Na-AlginateLösung.	52
6.9.2	Arbeiten mit der Spritzenpumpe.	53
6.9.3	Arbeiten mit der Druckflasche	56
6.10	Üben mit dem Encapsulator – Arbeiten mit dem kompletten Reaktionsgefäß	58
6.11	Hitzesterilisation des Reaktionsgefäßes	60
6.12	Sterilisation der Druckflasche	60
6.13	Verkapselungsverfahren zur Immobilisierung von Mikroorganismen in Ca-Alginat-Kugeln	61
6.14	Verkapselungsprotokoll für Alginat-PLL-Alginat-Membrane	63
6.15	Theorie	66
6.15.1	Kugelproduktivität und Zelldichte	68
7	Wartung und Reparaturen	71
7.1	Kundendienst	71
7.2	Gehäusezustand	71
7.3	Zustand der Dichtungen.	71
7.4	Reinigen.	72
7.4.1	Reinigen der Düse nach jedem Verkapselungsexperiment.	72
7.4.2	Reinigen einer verstopften Düse.	73
7.4.3	Reinigen des Reaktionsgefäßes und der anderen Gefäße	73
8	Fehlerbehebung	74
8.1	Fehler und deren Behebung.	74
9	Abschalten, Lagerung, Transport und Entsorgung	75
9.1	Lagerung und Transport.	75
9.2	Entsorgung	76
10	Erklärungen und Normen	77
10.1	FCC-Bestimmungen (für USA und Kanada)	77
10.2	Gesundheits- und Sicherheitserklärung	78

1 Info zu dieser Bedienungsanleitung

Diese Bedienungsanleitung beschreibt den Encapsulator B-395 Pro. Es liefert alle erforderlichen Informationen, um das Gerät sicher betreiben und in einem guten Arbeitszustand halten zu können. Zielgruppe ist insbesondere das Laborpersonal.

Wenn das Gerät auf eine andere Art als in dieser Bedienungsanleitung aufgeführt verwendet wird, können die Schutzfunktionen des Gerätes beeinträchtigt werden.

Abkürzungen

EPDM Ethylenpropylen-Dimonomer

FEP Fluorelastomer

PTFE Polytetrafluoroethylen

2 Sicherheit

In diesem Kapitel wird das Sicherheitskonzept des Gerätes erläutert. Es enthält allgemeine Verhaltensregeln und Warnungen vor direkten und indirekten Gefahren hinsichtlich der Verwendung des Produkts.

Um die Sicherheit der Benutzer zu gewährleisten, müssen alle Sicherheitsanweisungen und Sicherheitsmeldungen in den einzelnen Kapiteln genau beachtet und befolgt werden. Daher muss die Bedienungsanleitung jederzeit allen Personen zur Verfügung stehen, welche die hier beschriebenen Aufgaben durchführen.

2.1 Qualifikation der Benutzer

Das Gerät darf nur von Laborpersonal und anderen Personen benutzt werden, die auf Grund ihrer Ausbildung und fachlichen Erfahrung die Gefahren kennen, die beim Betrieb des Gerätes entstehen können.

Ungeschultes Personal oder Personen, die sich in der entsprechenden Schulung befinden, müssen von einer qualifizierten Person aufmerksam beaufsichtigt werden. Die aktuelle Bedienungsanleitung dient als Grundlage für die Schulung.

2.2 Ordnungsgemäße Verwendung

Der Encapsulator B-395 Pro wurde als Laborgerät konstruiert und gebaut.

Der Encapsulator B-395 Pro ist ein halb-automatisiertes Gerät für die Polymer-Verkapselung von chemischen Substanzen, Bio-Molekülen, Arzneistoffen, Aroma- & Duftstoffen, Pigmenten, Extrakten, Zellen und Mikroorganismen unter sterilen und nicht-sterilen Bedingungen. Die Bildung von Kugeln basiert auf der Tatsache, dass ein kontrollierter, laminarer Flüssigkeitsstrom durch Vibration mit optimaler Frequenz in gleich große Tropfen aufgespalten wird.

Der Encapsulator B-395 Pro bietet genau die kontrollierten Bedingungen, um Kugeln zwischen 0,15 bis 2 mm erzeugen zu können. Das Gerät eignet sich ideal für die Verkapselung von Partikeln < 50 µm.

Wenn bei dem Gerät potenziell toxische oder gefährlichen Substanzen verwendet werden, muss es in einem geschlossenen Luftabzug oder einer Glove-Box installiert werden. In diesem Fall muss der gesamte Prozess und die gesamte Handhabung des Systems innerhalb des Luftabzugsraums erfolgen, um Vergiftungen und andere Gefahrensituationen für den Benutzer und die Umwelt auszuschließen.

2.3 Nicht ordnungsgemäße Verwendung

Anwendungen, die im Abschnitt 2.2 nicht aufgeführt sind, werden als nicht ordnungsgemäß betrachtet. Anwendungen, die mit den technischen Daten (siehe Abschnitt 3 in dieser Bedienungsanleitung) nicht kompatibel sind, werden ebenfalls als nicht ordnungsgemäß betrachtet.

Das Betriebspersonal trägt die alleinige Verantwortung für Schäden oder Gefahren, die durch nicht ordnungsgemäße Benutzung verursacht werden!

Folgende Verwendungen sind ausdrücklich untersagt:

- Installation oder Verwendung des Gerätes in Räumen, für die explosionsgeschützte Geräte erforderlich sind.

2.4 Verwendete Sicherheitswarnungen und Sicherheitssignale

GEFAHR, WARNUNG, VORSICHT und MELDUNG sind standardisierte Signalwörter, die Risikostufen für Verletzungen oder Sachschäden bezeichnen. Alle Signalwörter, die sich auf Verletzungen von Personen beziehen, werden zusammen mit dem allgemeinen Sicherheitssymbol angezeigt.

Es ist für Ihre Sicherheit wichtig, dass Sie die unten aufgeführte Tabelle mit den verschiedenen Signalwörtern und ihren Definitionen lesen und vollständig verstehen!

Sym- bol	Signalwort	Definition	Risikostufe
	GEFAHR	Weist auf eine gefährliche Situation hin, die – ohne entsprechende Reaktion – tödliche oder schwere Verletzungen zur Folge hat.	★★★★
	WARNUNG	Weist auf eine gefährliche Situation hin, die – ohne entsprechende Reaktion – tödliche oder schwere Verletzungen zur Folge haben kann.	★★★☆☆
	VORSICHT	Weist auf eine gefährliche Situation hin, die – ohne entsprechende Reaktion – leichte oder moderate Verletzungen zur Folge haben kann.	★★☆☆☆
kein Sym- bol	MELDUNG	Weist auf mögliche Sachschäden hin, jedoch nicht auf Körperverletzungen.	★☆☆☆☆ (nur Sachschäden)

Zusätzliche Sicherheitsinformations-Symbole können auf einer rechteckigen Fläche links neben dem Signalwort angegeben werden sowie zusätzlicher Text (siehe Beispiel unten).

	 SIGNALWORT
Raum für zusätzliche Sicherheits- informations- symbole.	Zusätzlicher Text, beschreibt die Art und den Umfang der Gefahr/des Risikos. <ul style="list-style-type: none"> • Liste der Maßnahmen zur Vermeidung der hier beschriebenen Gefahr oder gefährlichen Situation. • ... • ...

Tabelle der zusätzlichen Sicherheitsinformationssymbole

Die folgende Referenzliste enthält alle in dieser Bedienungsanleitung verwendeten Sicherheitsinformationssymbole und ihre Bedeutung.

Symbol	Bedeutung
	Allgemeine Warnung
	Gefahr durch Elektrizität
	Explosive Gase, explosive Umgebung
	Schädlich für Lebensformen
	Geräteschaden
	Unter Druck stehendes Gas/Druckluft
	Labormantel tragen
	Schutzbrille tragen
	Schutzhandschuhe tragen

Zusätzliche Information für den Benutzer

Absätze, die mit HINWEIS beginnen, enthalten nützliche Informationen für das Arbeiten mit dem Gerät/der Software oder den Zusatzkomponenten. HINWEISE beziehen sich nicht auf Gefahren oder Schäden (siehe Beispiel unten).

HINWEIS

Nützliche Tipps für eine einfache Bedienung/Benutzung des Gerätes/der Software.

2.5 Produktsicherheit

Die Sicherheitswarnungen in dieser Bedienungsanleitung (wie in *Abschnitt 2.4* beschrieben) sollen den Benutzer aufmerksam machen, und sie sollen durch Angabe geeigneter Gegenmaßnahmen gefährliche Situationen vermeiden helfen, die von Restrisiken ausgehen. Allerdings können Risiken für Benutzer, Sachwerte und die Umwelt entstehen, wenn das Gerät beschädigt wird, oder nachlässig oder nicht ordnungsgemäß verwendet wird.

2.5.1 Allgemeine Gefahren

Die folgenden Sicherheitsmeldungen zeigen Gefahren allgemeiner Art an, die bei der Handhabung des Gerätes auftreten können. Der Benutzer muss alle aufgeführten Gegenmaßnahmen befolgen, um den niedrigst möglichen Gefahrenlevel zu erreichen und aufrecht zu erhalten.

Zusätzliche Warnmeldungen können immer dann ausgegeben werden, wenn in dieser Bedienungsanleitung beschriebene Aktionen und Situationen mit situativen Gefahren verbunden sind.

 	<p>! Warnung</p> <p>Tödliche oder schwere Verletzungen bei Einsatz in explosionsgefährdeten Umgebungen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Das Gerät nicht in explosionsgefährdeten Umgebungen betreiben. • Das Gerät nicht mit explosiven Gasgemischen betreiben. • Vor dem Betrieb alle Gasverbindungen auf korrekte Installation überprüfen. • Freigesetzte Gase und gasförmige Substanzen direkt durch ausreichende Ventilation ableiten.
 	<p>! Warnung</p> <p>Druck im Einlasssystem nimmt wegen verstopfter Düsen zu. Bersten des Einlasssystems.</p> <p>Tödliche oder schwere Vergiftung durch Kontakt mit oder Aufnahme von eingesetzten schädlichen Substanzen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Düse sofort nach Verwendung reinigen, siehe <i>Abschnitt 7.4</i>.
	<p>! Warnung</p> <p>Tödliche oder schwere Verletzungen durch Kontakt mit Hochspannung.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Das Gehäuse des Produkts nur öffnen, wenn die Maschine abgeschaltet und die Stromversorgung entfernt wurde.

	Meldung
	<p>Risiko von Kurzschlüssen im Gerät und Beschädigung durch Flüssigkeiten.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Keine Flüssigkeiten über dem Gerät oder Teilen von diesem verschütten. • Alle Flüssigkeiten sofort abwischen. • Auf sichere Positionierung des Probengefäßes achten. • Das Gerät nicht bewegen, wenn Flüssigkeit eingefüllt ist. • Das Gerät vor äußeren Vibrationen schützen.

 	Meldung
	<p>Gefahr einer Beschädigung des Gerätes durch falsche Stromversorgung.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Externe Netzstromversorgung muss der auf dem Typenschild angegebenen Spannung entsprechen. • Auf ausreichende Erdung prüfen.

	Meldung
	<p>Gefahr der Beschädigung von Laborgläsern oder Utensilien durch Bewegen der Spritzenpumpeneinheit.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stellen Sie keine Laborgläser oder andere Utensilien auf den Encapsulator.

2.5.2 Sicherheitsmaßnahmen

Beim Arbeiten mit dem Gerät immer persönliche Schutzausrüstung wie z.B. Schutzbrille, Schutzkleidung und -handschuhe tragen.

2.5.3 Integrierte Sicherheitselemente und -vorkehrungen

Hochspannung und elektrostatische Aufladung

- Sicherheitsbegrenzung des Stroms.
- Interne Erdung, um elektrostatische Aufladung zu vermeiden.

Luft/Gas

- Überdruck-Sicherheitsventil (öffnet bei 1,5 bar)

2.6 Allgemeine Sicherheitsregeln

Verantwortlichkeit des Bedienungspersonals

Der Laborleiter ist für die Schulung seines Personals verantwortlich.

Das Bedienungspersonal muss den Hersteller unverzüglich über alle sicherheitsrelevanten Vorfälle unterrichten, die beim Betrieb des Gerätes möglicherweise auftreten. Gesetzliche Bestimmungen wie z.B. Kommunal-, Landes- oder Bundesgesetze, die das Gerät betreffen, müssen strikt eingehalten werden.

Wartungs- und Sorgfaltspflicht

Das Bedienungspersonal ist dafür verantwortlich, dass sich das verwendete Gerät in ordnungsgemäßem Zustand befindet und dass Wartung, Service und Reparaturjobs sorgfältig und plangemäß und nur durch autorisierte Personen durchgeführt werden.

Vorgeschriebene Ersatzteile

Verwenden Sie für die Wartung nur Original-Verbrauchsteile und Original-Ersatzteile, um eine gute Leistung und Zuverlässigkeit des Systems sicherzustellen. Modifikationen der verwendeten Ersatzteile sind nur nach vorheriger schriftlicher Zustimmung durch den Hersteller zulässig.

Modifikationen

Modifikationen am Gerät sind nur nach vorheriger Konsultation und schriftlicher Genehmigung des Herstellers erlaubt. Änderungen und Aufrüstungen dürfen nur von autorisiertem technischem BÜCHI-Personal durchgeführt werden. Der Hersteller schließt jegliche Haftungsansprüche aus, die Folge nicht autorisierter Modifikationen sind.

2.7 Haftungsausschluss

Für Verwendung und Vertrieb aller Materialien, die mit dem Encapsulator produziert werden, trägt das Bedienungspersonal die alleinige Verantwortung.

3 Technische Daten

Dieses Kapitel ist eine Einführung in das Gerät und seine Spezifikationen. Es enthält den Lieferumfang, technische Daten, Anforderungen und Leistungsdaten.

3.1 Anwendungsbereich und Lieferumfang

Der Encapsulator B-395 Pro kann eingesetzt werden

- für sterile Arbeitsbedingungen in einem geschlossenen Reaktionsgefäß
- mit einer integrierten Spritzenpumpe.

Der Lieferumfang kann nur anhand des individuellen Lieferscheins und der aufgeführten Bestellnummern überprüft werden.

HINWEIS

Zusätzliche Informationen über die aufgelisteten Produkte finden Sie unter www.buchi.com oder wenden Sie sich an Ihren lokalen Händler.

3.1.1 Standardgerät



Tabelle 3-1: Standardgerät

Produkt	Bestellnr.
Encapsulator B-395 Pro 50 – 60 Hz, 100 – 240 V	11058220
Encapsulator B-395 Pro 50 – 60 Hz, 100 – 240 V mit Materialzertifikaten	11058230
Komplettes Encapsulator B-395 Pro-System für sterile Verfahren mit integrierter Spritzenpumpe, Magnetrührer und geschlossenem Reaktionsgefäß.	

3.1.2 Standard-Zubehör

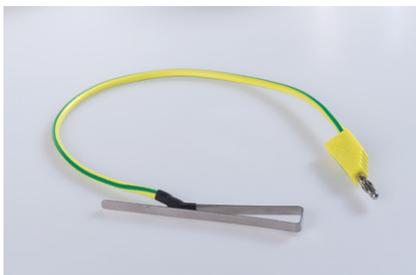


Tabelle 3-2: Standard-Zubehör

Produkt	Bestellnr.
Reaktionsgefäß	11057890
Reaktionsgefäß mit Materialzertifikaten	11057879
Kompletter autoklavierbarer Reaktor aus Glas und Edelstahl für die sterile Produk- tion und das Auffangen von Mikrokapseln, 2 Liter Arbeitsvolumen	
Satz von 8 Einzeldüsen	11057918
Satz von 8 einzelnen Düsen mit Präzisi- onsöffnung von 0,08, 0,12, 0,15, 0,20, 0,30, 0,45, 0,75 und 1,00 mm, aus Edel- stahl 316L einschließlich Düsenständer	
Druckflasche 500 mL	11058190
Druckflasche 1000 mL	11058191
Glasflaschen mit Verschraubungen, Schläuchen und Luftfilter, Arbeitsdruck bis zu 1,5 bar, autoklavierbar	
Erdungskabel	11058189
Bedienungsanleitung Deutsch	11593484

3.1.3 Optionales Zubehör



Tabelle 3-3: Optionales Zubehör

Produkt	Bestellnr.
Konzentrisches Düsenset	11058051
Satz von 7 äußeren Düsen mit Präzisionsöffnung von 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 und 0,9 mm, aus Edelstahl, konzentrische Pulsationskammer einschließlich 1000 ml Druckflasche	

3.1.4 Empfohlene Ersatzteile

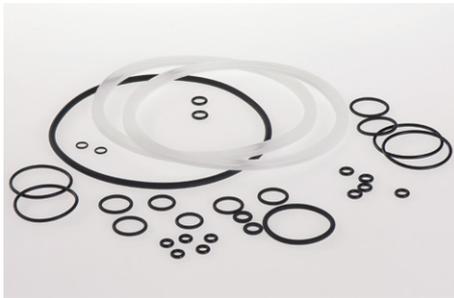


Tabelle 3-4: Empfohlene Ersatzteile

Produkt	Bestellnr.
Satz O-Ringe für Einzeldüse	11057954
Satz O-Ringe für konzentrische Düse	11057955
Satz O-Ringe für Reaktionsgefäß	11057970



Vorfilter für Düse, Durchmesser 7 mm (10 Stk.)	11057957
Ablaufilter für Reaktionsgefäß, Durchmesser 35 mm (10 Stk.)	11057958

3.2 Technische Daten

Tabelle 3-5: Technische Daten Encapsulator B-395 Pro

Stromverbrauch	max. 150 W	
Anschlussspannung	100 – 240 VAC	
Netzspannungsschwankungen	bis zu ± 10 % der Nennspannung	
Frequenz	50/60 Hz	
Sicherung	3,15 A	
Abmessungen (B×H×T)	32×38×48 cm	
Gewicht	11 kg	
Düsendurchmesser von Einzeldüsen (= Innendüse)	0,08, 0,12, 0,15, 0,20, 0,30, 0,45, 0,75 und 1,00 mm	
Düsendurchmesser von Aussendüsen	0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70 und 0,90 mm	
Größenbereich der Tröpfchen	0,15 bis 2,00 mm	
Vibrationsfrequenz	40 bis 6000 Hz	
Elektrodenspannung	250 bis 2500 V	
Pumprate Spritzenpumpe	0,01 bis 50 mL/min	
Pumprate bei Luftdruckbetrieb	0,5 bis 200 mL/min	
Maximal zulässiger Luftdruck im System	1,5 bar	
Reaktor-Bruttovolumen	4,5 Liter	
Reaktor-Arbeitsvolumen	2 Liter	
Mit Medium in Kontakt stehende Teile	autoklavierbar	
Sterile Arbeitsbedingungen	vollständig	
Überspannungskategorie	II	
Verschmutzungsgrad	2	
Umgebungsbedingungen:		
Temperatur	5 – 40 °C	nur für Einsatz im Innenbereich
Höhe über NN	bis zu 2000 m	
Max. relative Luftfeuchtigkeit (Kurvenparameter)	Maximale relative Luftfeuchtigkeit 80 % bis zu 31 °C, danach lineare Abnahme auf 50 % relative Luftfeuchtigkeit bei 40 °C	

Tabelle 3-6: Materialien und Zulassungen

Material in Kontakt mit Probe	Edelstahl, Silikon, Glas, FEP, PTFE
Zulassungen	CE, CSA

3.3 Verwendete Materialien

Tabelle 3-7: Verwendete Materialien

Komponente	Materialbeschreibung
Reaktor	Edelstahl, 3.3 Borosilikatglas, FEP, PTFE Dichtungen: Silikon, EPDM
Düsen	Edelstahl, Dichtungen: EPDM
Druckflasche	Edelstahl, 3.3 Borosilikatglas, FEP, PTFE Dichtungen: Silikon, EPDM

4 Funktionsbeschreibung

In diesem Kapitel wird das grundlegende Funktionsprinzip des Encapsulator B-395 Pro erläutert. Außerdem wird gezeigt, wie das Gerät aufgebaut ist, und wie es allgemein funktioniert.

4.1 Funktionsprinzip

Das Gerät bietet folgende Schlüsselfunktionen:

Sterile Arbeitsbedingungen in einem geschlossenen Reaktionsgefäß

- Sterile Kapselung in einem autoklavierbaren Reaktionsgefäß.

Kugelgröße von aufeinander folgenden Produktionsserien reproduzierbar

- Einstellbare Parameter (Düsengröße, Fließrate der Flüssigkeit und Vibrationsfrequenz) bestimmen die Größe der Kugeln.

Reproduzierbare Kugelbildung

- Im Bereich von 0,15 mm bis 2,0 mm.

Große Gleichmäßigkeit der Kugelgröße

- Auf Grund der integrierten elektrostatischen Dispersionseinheit (*EDU*); ca. 5 % relative Standardabweichung der Kugelgröße bei Verwendung von reinem Alginat.

Unmittelbare Prozesssteuerung

- Visuelle Überwachung im Licht einer Stroboskoplampe.

Hohe Zell-Viabilität

- Die Kugelbildungstechnik arbeitet unter geringer Scherspannung und unter physiologischen Bedingungen – dies führt zu einer hohen Überlebensrate der Zellen.

Chargengröße

- Bei Verwendung von Spritzen reicht die Chargengröße von 2 mL bis 60 mL und das Totvolumen beträgt ca. 0,5 mL. Wird für den Pumpvorgang Druckluft verwendet, reicht die Chargengröße von 5 mL bis 1000 mL und das Totvolumen beträgt ca. 2 mL.

Satz von 8 Einzeldüsen

- Die 8 Düsengrößen 0,08, 0,12, 0,15, 0,20, 0,30, 0,45, 0,75 und 1,0 mm decken den Kugelgrößenbereich von ca. 0,15 mm bis 2,0 mm ab.

Zuführung der Polymermischung

- Durch die integrierte Spritzenpumpe oder durch Luftdruck mit Flussraten von 70 mL/h (0,08 mm Düse) bis 2500 mL/h (1,0 mm Düse).

Große Kugelproduktion

- Pro Sekunde werden in Abhängigkeit von den Verkapselungsbedingungen und der Polymermischung bis zu 6000 Kugeln produziert.

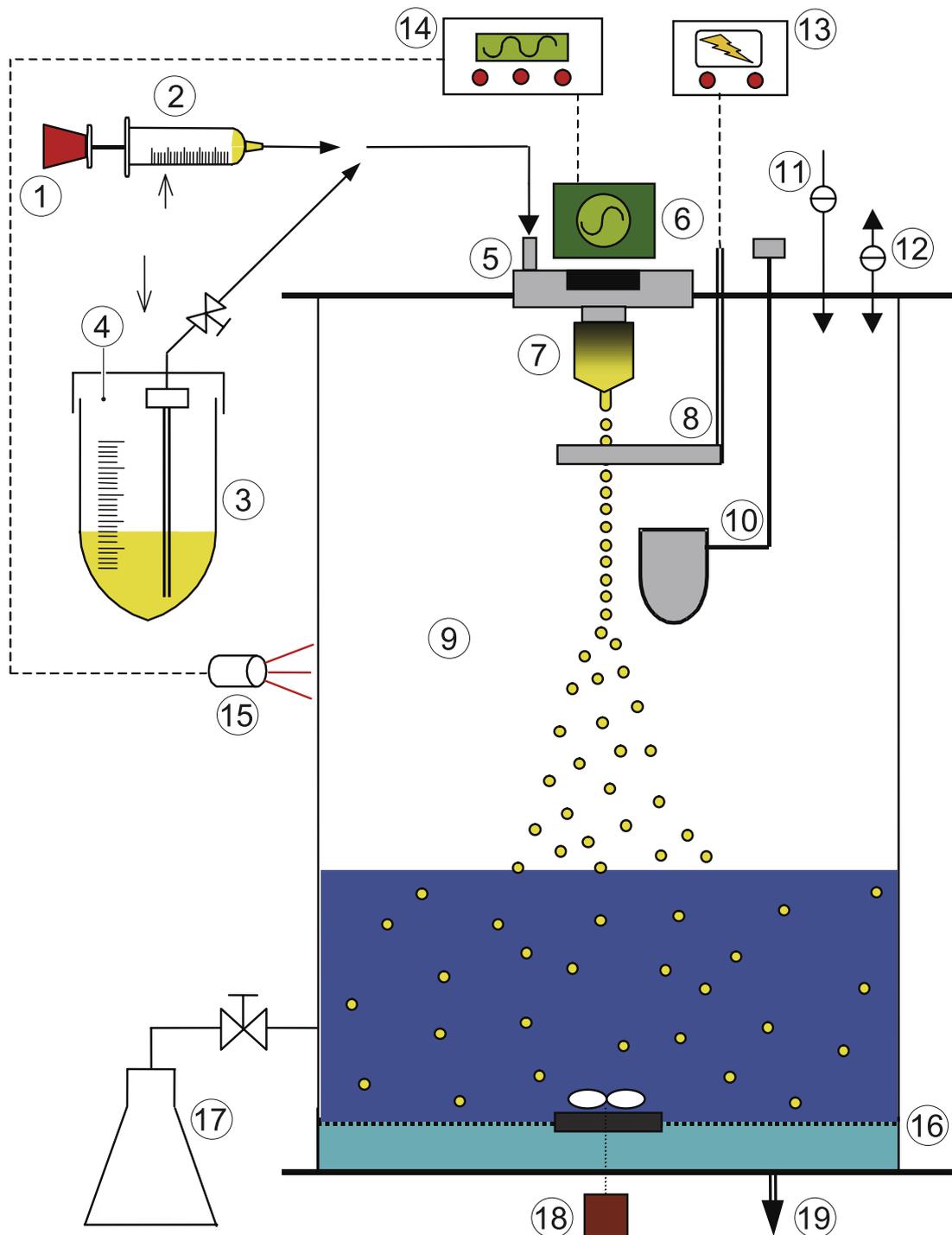


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung des Encapsulator B-395 Pro

- | | |
|----------------------|--------------------------------------|
| ① Spritzenpumpe | ⑪ Flüssigkeitsfilter |
| ② Spritze | ⑫ Luftfilter |
| ③ Druckflasche | ⑬ Elektrostatischer Ladungsgenerator |
| ④ Luftdruckkontrolle | ⑭ Frequenzgenerator |
| ⑤ Pulsationskammer | ⑮ Stroboskoplampe |
| ⑥ Vibrationssystem | ⑯ Filtrierrost |
| ⑦ Düse | ⑰ Kugelernteflasche |
| ⑧ Elektrode | ⑱ Magnetrührer |
| ⑨ Reaktionsgefäß | |
| ⑩ Bypass-Becher | ⑲ Drainageöffnung |

Die Hauptkomponenten des Encapsulator B-395 Pro sind die Steuerungseinheit mit der Spritzenpumpe, die elektrischen und pneumatischen Systeme und das Reaktionsgefäß. Alle Teile des Gerätes, die direkten Kontakt mit den Kugeln haben, können durch Autoklavieren sterilisiert werden.

Das Produkt, welches verkapselt werden soll (Zellen, Mikroorganismen oder andere biologische Komponenten und Chemikalien), wird mit einem Verkapselungspolymer vermengt (üblicherweise Alginate), und die Mischung wird in eine Spritze ② oder eine Druckflasche eingefüllt ③, siehe *Abbildung 4-1*. Das Polymer/Produkt-Gemisch wird entweder durch eine Spritzenpumpe ① oder durch Luftdruck ④ in die Pulsationskammer ⑤ gedrückt. Die Flüssigkeit fließt dann durch eine präzise gebohrte Düse ⑦ und wird beim Austreten aus der Düse in gleich große Tröpfchen getrennt. Diese Tröpfchen durchlaufen ein elektrisches Feld zwischen der Düse ⑦ und der Elektrode ⑧ und erhalten dabei eine Oberflächenladung. Durch elektrostatische Abstoßung werden die Tröpfchen beim Herabfallen in die Aushärtungslösung räumlich voneinander getrennt.

Kugelgröße

Die Kugelgröße hängt von mehreren Parametern ab wie z.B. der Vibrationsfrequenz, Amplitude, Düsengröße, Flussrate und den physikalischen Eigenschaften des Polymer/Produkt-Gemisches. Im Allgemeinen beträgt der Durchmesser von Ca-Alginatkugeln das Doppelte des Düsendurchmessers. Durch Variieren der Strahlggeschwindigkeit und der Vibrationsfrequenz kann der Bereich jedoch um ca. $\pm 15\%$ verändert werden.

Die für die Kugelbildung optimalen Parameter sind in Echtzeit sichtbar im Licht einer Stroboskoplampe ⑮. Wenn optimale Parameter erreicht sind, sieht man eine klare stehende Kette von Tröpfchen. Nachdem die optimalen Parameter gefunden wurden, können diese bei späteren Produktionen mit derselben Verkapselungsmischung voreingestellt werden. Schlecht geformte Kugeln, die zu Beginn und gegen Ende eines Produktionslaufs auftreten, werden durch den Bypass-Becher abgefangen ⑩. In Abhängigkeit von mehreren Variablen werden zwischen 50 und 5000 Kugeln pro Sekunde erzeugt und in einer Aushärtungslösung innerhalb des Reaktionsgefäßes ⑨ aufgefangen. Die Lösungen in dem Reaktionsgefäß werden kontinuierlich durch ein Magnetrührstäbchen ⑰ durchmischt, um das Verklumpen der Kugeln zu verhindern. Das Reaktionsgefäß und/oder die Lösung muss außerdem elektrisch geerdet werden. Am Ende eines Produktionslaufs wird die Aushärtungslösung abgelassen (Drainageöffnung ⑲), wobei die Kugeln durch den Filtrierrost ⑱ zurückgehalten werden. Waschlösungen oder andere Reaktionslösungen werden aseptisch durch einen Sterilfilter ⑪ zugegeben. Die Kugeln können zu Mikrokapseln weiterverarbeitet oder in die Kugelernteflasche ⑰ geleitet werden.

4.2 Anschlüsse am Encapsulator B-395 Pro

Anschlüsse auf der Vorderseite (siehe *Abbildung 5-2*)

- Hauptschalter
- Luftauslass
- Spannung
- Erdung

Anschlüsse auf der Rückseite (siehe *Abbildung 5-1*)

- Stromversorgung
- Lufteinlass
- Magnetrührer
- Vibration
- Optionale Steckerbuchse

5 Installation und Inbetriebnahme

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie das Gerät installiert werden muss. Außerdem enthält es eine Anleitung für die erste Inbetriebnahme.

HINWEIS

Prüfen Sie das Gerät beim Auspacken auf eventuelle Schäden. Erstellen Sie – falls erforderlich – sofort einen Zustandsbericht und informieren Sie das Post-, Bahn- oder Transportunternehmen. Bewahren Sie die Originalverpackung für einen zukünftigen Transport auf.

5.1 Installationsort

Stellen Sie das Gerät auf einer stabilen, horizontalen Oberfläche auf. Berücksichtigen Sie die maximalen Abmessungen und das Gewicht des Instruments. Das Gerät muss so aufgestellt werden, dass der Hauptschalter und die Netzsteckdose jederzeit zugänglich sind.

Beachten Sie die in *Abschnitt 3.2 „Technische Daten“* beschriebenen Umgebungsbedingungen.

 	 Warnung
	<p>Tödliche oder schwere Verletzungen bei Einsatz in explosionsgefährdeten Umgebungen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Das Gerät nicht in explosionsgefährdeten Umgebungen betreiben.

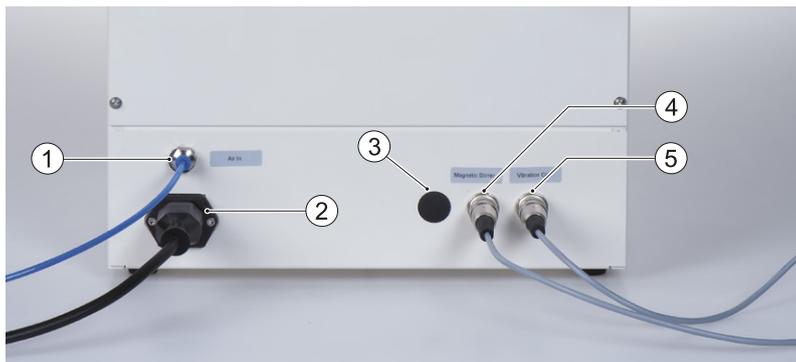
    	 Warnung
	<p>Tödliche oder schwere Vergiftung durch Kontakt mit oder Aufnahme von schädlichen Substanzen.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Schutzbrille tragen. • Sicherheitshandschuhe tragen. • Labormantel tragen.
	<ul style="list-style-type: none"> • Das Gerät und alle Zubehörteile gründlich reinigen, um potenziell gefährliche Substanzen zu entfernen.
	<ul style="list-style-type: none"> • Verstaubte Teile nicht mit Druckluft reinigen. • Das Gerät und seine Zubehörteile an einem trockenen Ort lagern.

5.2 Installation des Encapsulator B-395 Pro

Stellen Sie das Gerät auf einem Labortisch mit gutem Zugang zu einer Steckdose mit Wechselstrom und zu Druckluft auf. Stellen Sie das Gerät so auf, dass der Netzstecker jederzeit abgezogen werden kann.

Installation des Magnetrührers, der Vibrationseinheit und des Erdungskabels

Schließen Sie den Magnetrührer, die Vibrationseinheit und das Erdungskabel gemäß *Abbildung 5-1* und *5-2* an.



- ① Lufteinlass (blauer Schlauch 2,6×4,0 mm)
- ② Stromversorgungs-Steckdose mit eingebauter Sicherung
- ③ Optionale Steckerbuchse
- ④ Buchse für Magnetrührer
- ⑤ Buchse für Vibrationseinheit

Abbildung 5-1: Rückseite der Steuerungseinheit

Alle Steuerungssysteme für die Produktion der Kugeln sind in die Steuerungseinheit integriert. Vibrationsfrequenz, Pumpgeschwindigkeit, Lichtstärke, elektrostatische Dispersion und Drehzahl des Magnetrührers werden über die beiden Touchscreens gesteuert. Der Luftdruck wird über das Druckregelventil gesteuert. Die integrierte Stroboskoplampe erlaubt die Steuerung des Zerfalls des Flüssigkeitsstrahls in Echtzeit. Die Vibrationseinheit wird über ein Kabel auf der Rückseite an die Steuerungseinheit angeschlossen. Das Reaktionsgefäß wird mit zwei Schrauben an der Reaktorhalterung befestigt.



- ① Spritzenpumpe
- ② Reaktorhalterung
- ③ Vibrationseinheit
- ④ Oberer Touchscreen (Vibrationsfrequenz & Elektrode)
- ⑤ Unterer Touchscreen (Spritzenpumpe, Magnetrührersteuerung & Druckanzeige)
- ⑥ Druckregelventil
- ⑦ Stroboskoplampe
- ⑧ Hauptschalter
- ⑨ Magnetrührer
- ⑩ Luftauslass
- ⑪ EDU (Spannungsausgang)
- ⑫ Buchse für Erdungskabel
- ⑬ Regelventil für Flüssigkeitsstrom

Abbildung 5-2: Vorderseite der Steuerungseinheit

Installation der Luftleitung

Jeder Encapsulator wird mit einem 3 m langen Luftschauch (2,6×4,0 mm) geliefert, um ihn an eine externe Druckluft- oder Stickstoffversorgung anzuschließen

1. Bringen Sie den Luftschauch an der Lufteinlassbuchse an.
2. Befestigen Sie das andere Ende des Luftschauchs an der externen Gasversorgung.
3. Führen Sie dem Encapsulator während des Betriebs Gas mit einem Druck von 1,5 bis 2 bar zu.

HINWEIS

Das integrierte pneumatische System (Ventil und Verbindungen) toleriert einen Einlassdruck von bis zu 7 bar. Nach dem Druckregelventil ist ein Überdruck-Sicherheitsventil eingebaut, das sich bei 1,5 bar öffnet, d.h. der maximale Luftdruck am Luftauslass beträgt 1,5 bar. Der Arbeitsbereich liegt jedoch bei 0 bis 1 bar.

5.3 Elektrische Anschlüsse

Vergewissern Sie sich, dass die auf dem Typenschild der Steuerungseinheit angegebenen elektrischen Leistungsdaten des Gerätes der Spannung Ihres lokalen Stromnetzes entspricht. Schließen Sie den Netzstromstecker des Encapsulators an das Stromnetz an.

 	! Vorsicht
	<p>Gefahr der Beschädigung des Gerätes durch falsche Stromversorgung.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Externe Netzstromversorgung muss der auf dem Typenschild angegebenen Spannung entsprechen. • Auf ausreichende Erdung prüfen. • Abhängig von lokalen Gesetzen und Bestimmungen können bezüglich der Elektrik zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen wie z.B. ein Fehlerstrom-Schutzschalter erforderlich sein! Externe Anschlüsse und Verlängerungskabel müssen mit einem geerdeten Leiter (3-polige Kuppelungen, Kabel oder Steckerausrüstung) ausgestattet sein. Alle verwendeten Netzkabel müssen mit angespritzten Steckern ausgestattet sein, um Risiken durch unachtsame, fehlerhafte Verdrahtung zu vermeiden.

5.4 Montieren des Reaktionsgefäßes

Das Reaktionsgefäß bildet eine geschlossene, autoklavierbare Einheit, in der die Kugeln unter sterilen Bedingungen gebildet und bei Bedarf weiter bearbeitet werden.

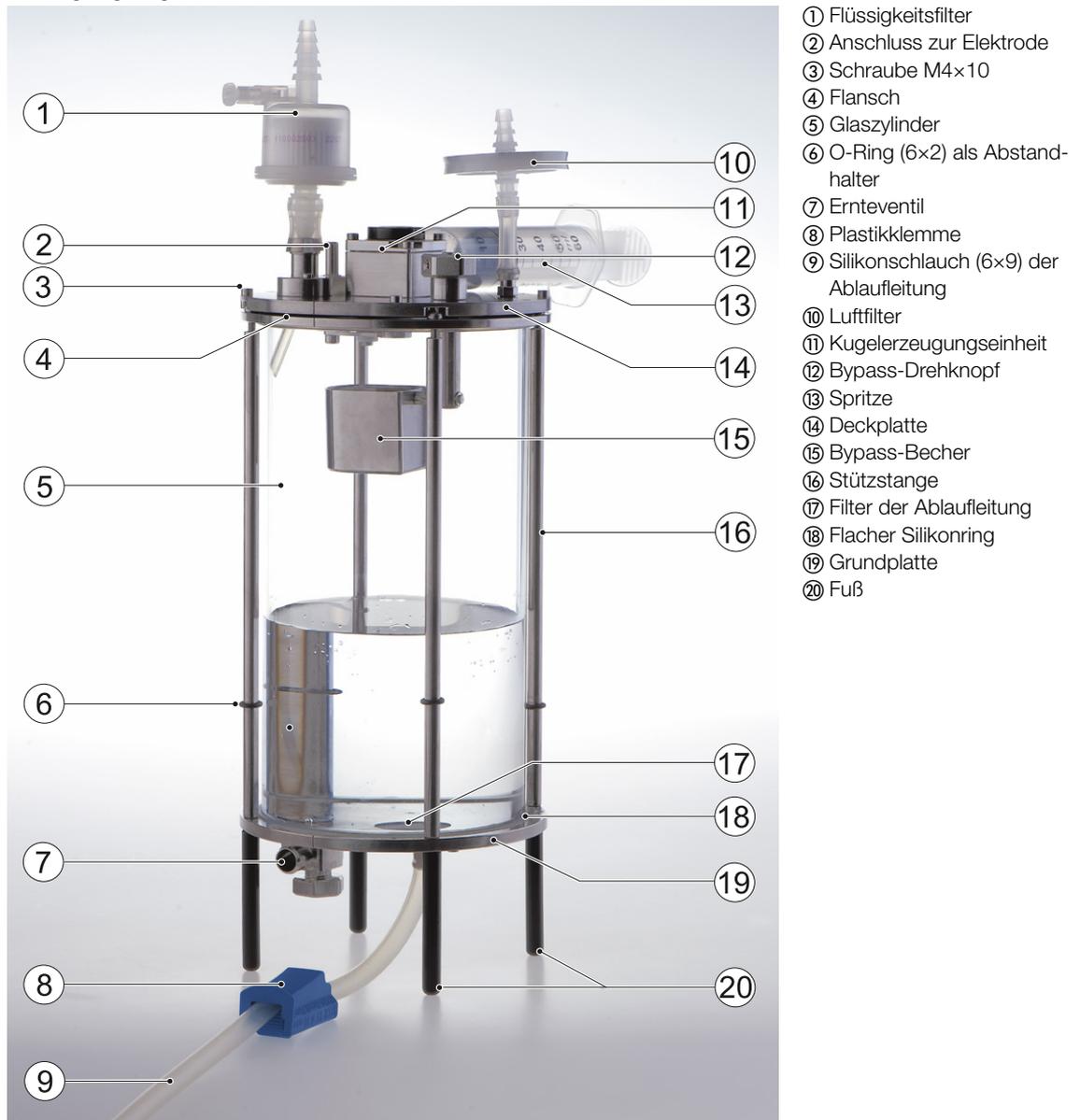


Abbildung 5-3: Gesamtansicht des Reaktionsgefäßes

Die wichtigsten Komponenten des Reaktionsgefäßes sind:

1. Edelstahl-Deckplatte mit Elektrode, Bypass, Flüssigkeitseinlass und Luftaustauschfilter
2. Kugelerzeugungseinheit
3. Düse
4. Glaszylinder
5. Edelstahl-Grundplatte mit Ernte- und Ablaufventil
6. Kugelernteflasche

5.4.1 Deckplatte

Die Deckplatte wird vollständig montiert geliefert. Waschen Sie die Deckplatte vor der Verwendung gründlich. Zerlegen Sie die Kugelerzeugungseinheit und die Düse nach jedem Produktionslauf. Waschen Sie die Teile mit Wasser oder einem geeigneten Reinigungs- oder Lösungsmittel (entsprechend der Art der verwendeten Immobilisierungsmischung), spülen Sie mit Wasser ab und lassen Sie die Teile trocknen. Achten Sie beim Umgang mit der Kugelerzeugungseinheit darauf, die PTFE-Membran nicht zu beschädigen.

Die anderen Teile sollten nur bei Bedarf zerlegt werden. Mit Reinigungsmittel waschen, mit Wasser abspülen und trocknen lassen.

Beim Wiederausammenbau prüfen, ob die flachen Silikonringe und die O-Ringdichtungen unbeschädigt sind – bei Bedarf ersetzen.

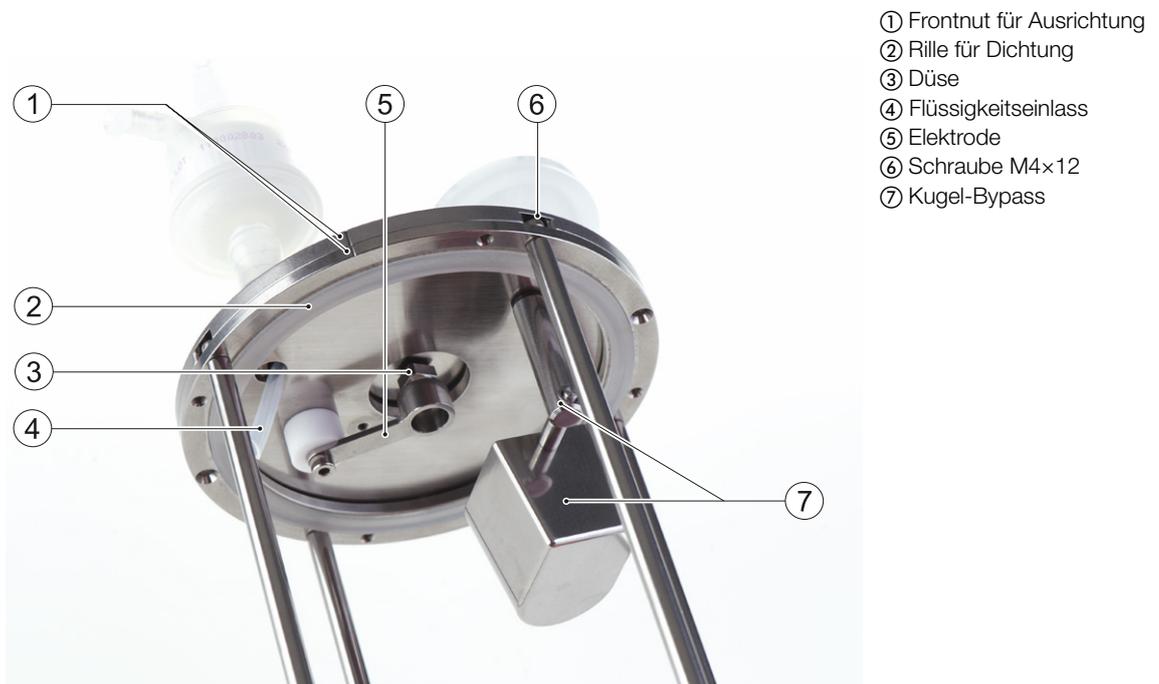


Abbildung 5-4: Ansicht der montierten Deckplatte von unten

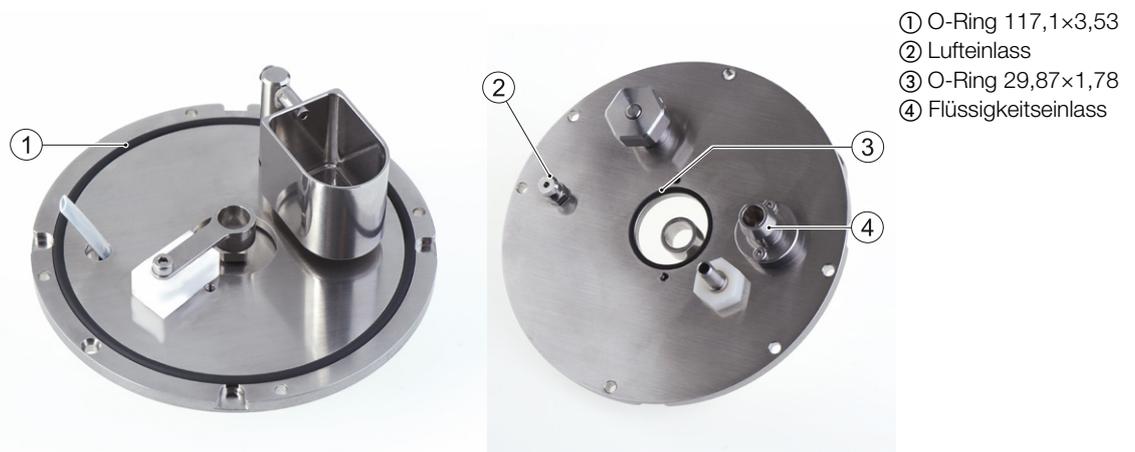
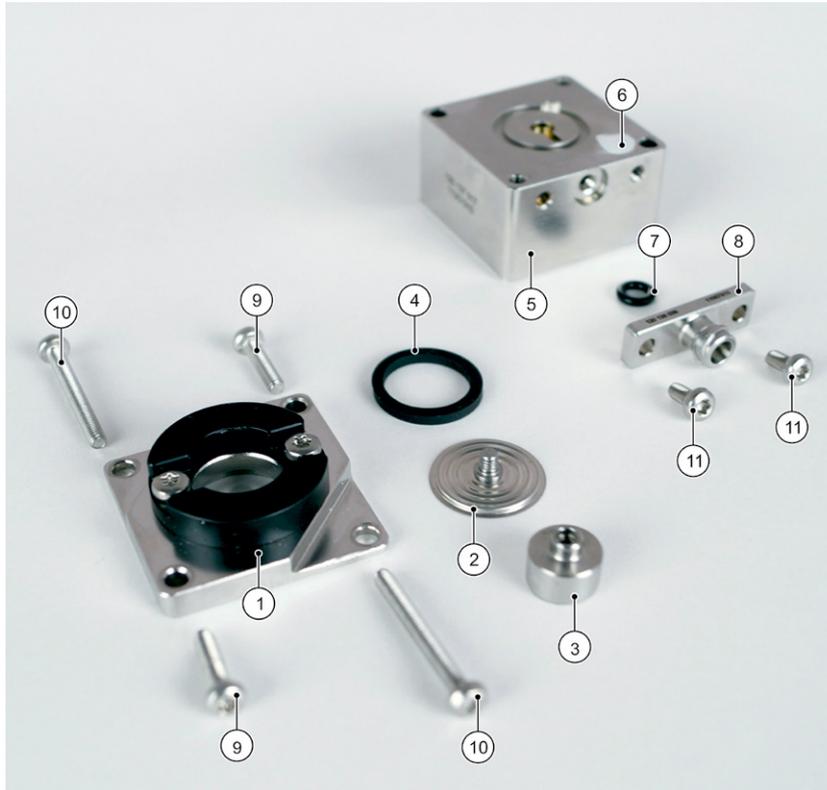


Abbildung 5-5: Ansicht der Deckplatte von unten (links) und von oben (rechts)

5.4.1.1 Kugelerzeugungseinheit und Düsen



- ① Magnethalterung *
- ② Membran
- ③ Magnet
- ④ O-Ring (14×1,78)
- ⑤ Pulsationskammer
- ⑥ Vorfilter mit 50 µm Maschenweite
- ⑦ O-Ring (3,68×1,78)
- ⑧ Luer-Lock-Verbindung
- ⑨ Schraube M3×8
- ⑩ Schraube M3×25
- ⑪ Schraube M3×6

*mit befestigtem Fixierring und Schrauben M3×5. Der Fixierring kann zum Reinigen entfernt werden.

Abbildung 5-6: Teile der Kugelerzeugungseinheit

Eine qualitativ hochwertige Düse ist für eine homogene Kugelerzeugung von entscheidender Bedeutung. Die Löcher der Encapsulator-Düsen sind mit modernster Technologie präzise gebohrt. Jeder Encapsulator B-395 Pro wird mit einem Satz von 8 Düsen geliefert. Die Düsenöffnungen haben die Durchmesser 80, 120, 150, 200, 300, 450, 750 µm und 1,0 mm. Die Düsen bestehen vollständig aus Edelstahl.



Abbildung 5-7: Satz von 8 Düsen auf dem Düsenständer

Der Düsenständer enthält 8 Düsen (80, 120, 150, 200, 300, 450, 750 µm und 1,0 mm). Die Größe des O-Rings beträgt 4,47×1,78.

5.4.1.2 Elektrode



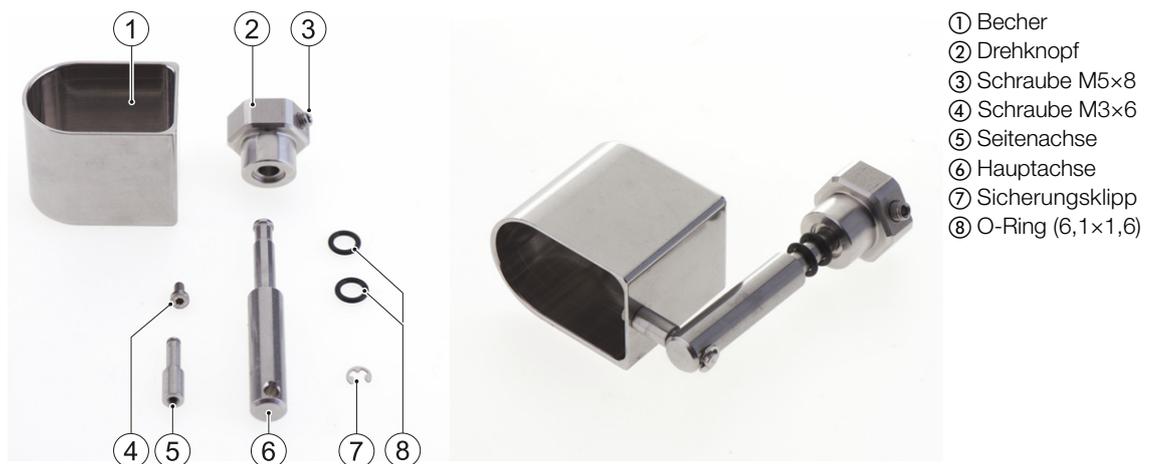
- ① Schraubenmutter M10 (Polyamid)
- ② O-Ring (10,82×1,78)
- ③ Isolator
- ④ Elektrode
- ⑤ Verbindungsstück
- ⑥ Schraube M4×12

Abbildung 5-8: Elektrode mit Verbindungselementen

Die Elektrode wird entweder mit nach unten oder nach oben gerichtetem verlängertem Ring angebracht. Dadurch kann der Abstand zwischen Düse und Elektrode variiert werden. Der kurze Abstand zwischen Düse und Elektrode wird für die Erzeugung kleiner Kugeln und bei Verwendung von Lösungen mit geringer Viskosität empfohlen. Der große Abstand wird für die Erzeugung großer Kugeln empfohlen (ca. > 800 µm). Die Abtrennung der Tropfen vom Flüssigkeitsstrahl sollte innerhalb des Elektrodenrings erfolgen – hier ist das elektrostatische Feld am stärksten – oder alternativ in dem Raum zwischen der Elektrode und der Düse. Dies ist abhängig von den Eigenschaften Ihres Materials.

5.4.1.3 Kugel-Bypass-System

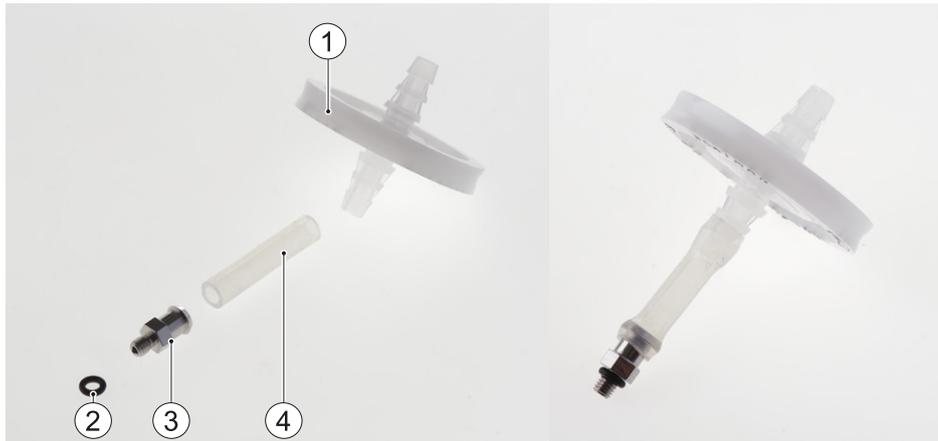
Das Kugel-Bypass-System wird bei Beginn und am Ende des Verkapselungsprozesses verwendet, um unerwünschte Kugeln zu eliminieren, die durch einen instabilen Strom erzeugt werden.



- ① Becher
- ② Drehknopf
- ③ Schraube M5×8
- ④ Schraube M3×6
- ⑤ Seitenachse
- ⑥ Hauptachse
- ⑦ Sicherungsklipp
- ⑧ O-Ring (6,1×1,6)

Abbildung 5-9: Kugel-Bypass-System – Explosionsdarstellung (links), montierte Darstellung (rechts)

5.4.1.4 Luftfilter



- ① HEPA-Luftfilter
- ② O-Ring
3,68×1,78
- ③ Nippel
- ④ Silikonschlauch
5×8 mm

Abbildung 5-10: Luftfilter – Explosionsdarstellung (links), montierte Darstellung (rechts)

5.4.1.5 Flüssigkeitsfilter



- ① Flüssigkeitsfilter
(z.B. Sartobran 150)
- ② Flüssigkeitseinlass
- ③ Silikonschlauch
(3×5) Länge
35 mm
- ④ Schraube M3×12
- ⑤ O-Ring
(10,82×1,78)
- ⑥ Silikonschlauch
(10×14), Länge
40 mm

Abbildung 5-11: Flüssigkeitsfilter – Explosionsdarstellung (links), montierte Darstellung (rechts)

5.4.2 Grundplatte

Die Grundplatte hat zwei Auslassöffnungen, die zwei verschiedene Funktionen haben. Eine Öffnung verfügt über einen Filter, der die Kugeln im Reaktionsgefäß zurückhält, während Verkapselungsreaktionen ausgetauscht werden. Die andere Öffnung ist ein Ablaufventil, durch das die Kugeln geerntet werden können ohne die Sterilität zu beeinträchtigen.

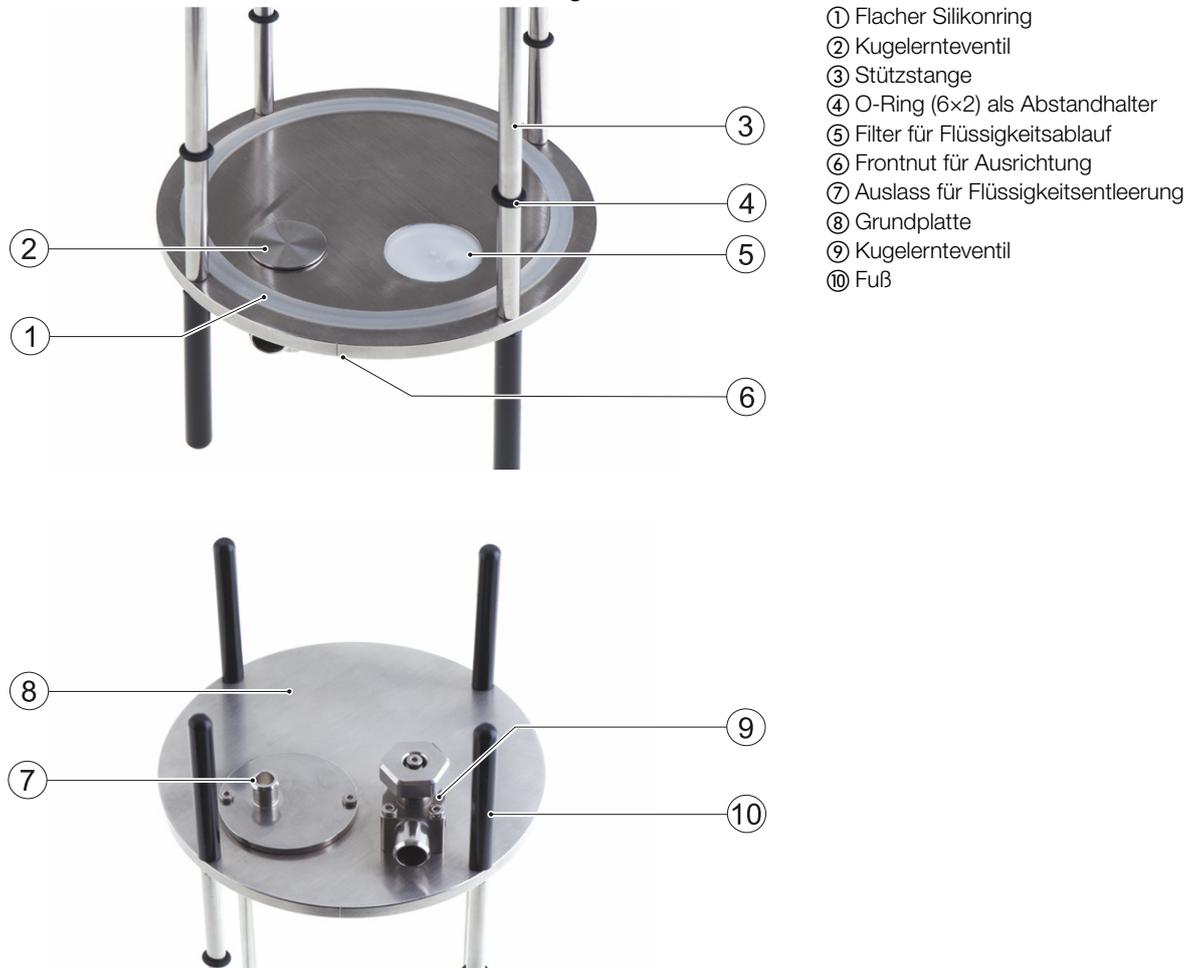
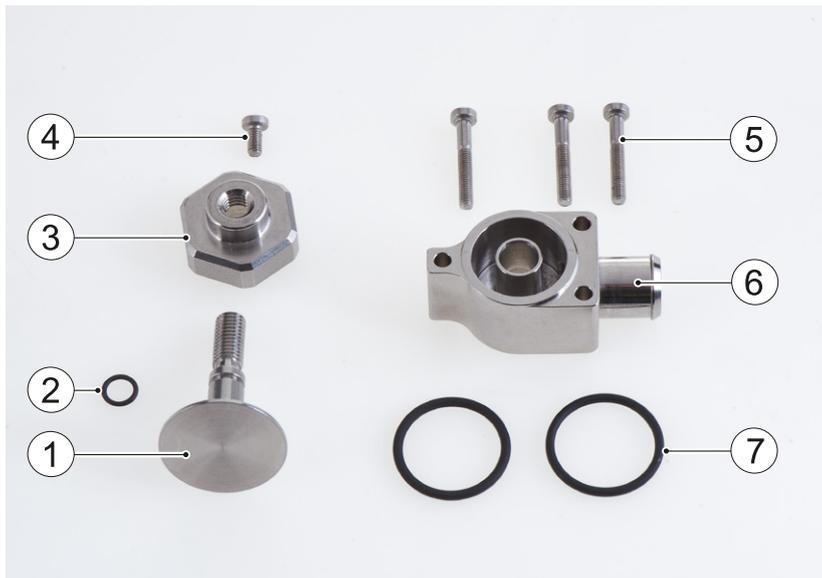


Abbildung 5-12: Grundplatte Ansicht von oben (oben) und unten (unten)

5.4.2.1 Kugelernteventil



- ① Plunger-Kolben
- ② O-Ring (5×1)
- ③ Knopf für Ventil
- ④ Schraube M3×6
- ⑤ Schraube M3×20
- ⑥ Ernteventil (BT 14)
- ⑦ O-Ring (18,77×1,78)

Abbildung 5-13: Teile des Kugelernteventils

5.4.2.2 Flüssigkeitsablaufsystem



- ① Flüssigkeitsablaufplatte
- ② O-Ring (34,65×1,78)
- ③ Schraube M3×6
- ④ Filterrost, Durchmesser 35 mm, 100 µm Maschenweite

Abbildung 5-14: Teile des Flüssigkeitsablaufsystems

HINWEIS

Der Filterrost schrumpft bei der ersten Autoklavierung um 1 % bis 2 %. Danach bleiben seine Abmessungen konstant.

5.4.3 Kugelernteflasche

Nach Abschluss der Kugelerzeugung und -bearbeitung werden die Kugeln direkt durch das *Kugelausbringungsventil* in die Kugelernteflasche geleitet. Die Kugeln können danach aseptisch in jeden anderen Behälter verbracht werden. *Abbildung 5-15* zeigt die Kugelernteflasche in zerlegtem und zusammengebautem Zustand.



Abbildung 5-15: Kugelernteflasche für steriles Ernten und sterilen Transport der erzeugten Kugeln und Kapseln. Die Kugelernteflasche ist am Ernteventil des Reaktionsgefäßes befestigt.

- | | |
|-------------------------------|---------------------------|
| ① 250 mL-Flasche | ⑤ Platte der Ernteflasche |
| ② Luftfilter, siehe Abb. 5-10 | ⑥ O-Ring (31,42×2,62) |
| ③ Schlauchklemme | ⑦ Deckel mit Öffnung |
| ④ Silikonschlauch 10×14 | |

5.5 Pumpsysteme

Der Encapsulator B-395 Pro bietet zwei Systeme für das Pumpen der Immobilisierungsmischung:

- mittels einer volumetrischen Spritzenpumpe
- mittels Luftdruck aus Druckflaschen

Die Spritzenpumpe wird hauptsächlich verwendet:

1. Für kleine Volumina (< 60 mL).
2. Wenn die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit bei jeder Serie sehr exakt kontrolliert werden muss.
3. Wenn ein sehr geringes Totvolumen erforderlich ist (ca. 0,5 mL).

Das Pumpen mittels Luftdruck wird empfohlen:

1. Wenn große Volumina (> 60 mL) benötigt werden.
2. Wenn große Fließgeschwindigkeiten verwendet werden sollen, um große Kugeln zu erzeugen. Dies wäre z.B. der Fall, wenn Düsen > 300 µm eingesetzt werden.

Beide Systeme können mit dem konzentrischen Düsensystem eingesetzt werden. Die Kernflüssigkeit wird mit der Spritzenpumpe gepumpt und die Mantelflüssigkeit wird mit Luftdruck gepumpt. Sie können natürlich auch zwei Luftdruckflaschen verwenden, indem Sie die Luftleitung zu den Flaschen mit einem „T“- oder „Y“-Verbindungsstück verzweigen.

5.5.1 Spritzenpumpe

Die Spritzenpumpe wird als volumetrisches Zuführsystem verwendet. Diese Pumpe gewährleistet eine sehr exakte Zuführung der Immobilisierungsmischung. Hierbei können Plastikspritzen der meisten Hersteller eingesetzt werden. (Von der Verwendung von Glasspritzen ist abzuraten!) Jeder Spritzentyp kann individuell mit dem integrierten Spritzen-Kalibriersystem kalibriert werden (siehe Kapitel 6 „Betrieb und Bedienung“). Das Angebot an vorsterilisierten Spritzen vereinfacht die Handhabung unter aseptischen Bedingungen.

Die Pumprate kann in Abhängigkeit von der Spritzengröße von 0,01 mL/min bis 50 mL/min variieren.



Abbildung 5-16: Spritzenpumpe

Die Spritze ist mit der Luer-Lock-Verbindung an der Kugelerzeugungseinheit befestigt. Der Kolben der Spritze wird durch den Bewegungsarm der Spritzenpumpe nach vorne gestoßen ①.

5.5.2 Druckflasche

Die Druckflasche ist ein autoklavierbarer Behälter, welcher dazu gebraucht wird, um das Immobilisierungsgemisch mit Luftdruck zu pumpen. *Abbildung 5-17* zeigt die verschiedenen Teile der Druckflasche.



Abbildung 5-17: Druckflasche mit HEPA-Filter für steriles Pumpen der Immobilisierungsmischung mittels Luftdruck

- | | |
|---|--|
| ① Druckstabile Flasche, 500 mL oder 1000 mL | ⑥ Luer-Lock-Verbindung (Stecker), 4,8 mm ID |
| ② HEPA-Luftfilter | ⑦ Nippel für Schnellkupplung |
| ③ PTFE-Schlauch (4x6) | ⑧ Deckel mit zwei Öffnungen |
| ④ Silikonschlauch für Flüssigkeit (4x7) | ⑨ Kapsel mit PTFE-Anschluss für 6 mm-Schläuche |
| ⑤ Silikonschlauch für Luft (5x8) | |

Die **Luft** strömt durch einen Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 5 mm (5x8 mm). Der Hepa-Filter verhindert die Kontamination der sterilen Immobilisierungsmischung. Dieser ist gemäß den Vorgaben des Herstellers auszutauschen oder wenn Anzeichen für einen geringeren Luftdurchlass festgestellt werden.

Die **Flüssigkeit** strömt aus dem Inneren der Flasche durch einen PTFE-Schlauch (3x6 mm) in den Silikonschlauch ④ außerhalb der Flasche. Dieser Silikonschlauch wird mittels Luer-Lock-Steckverbindung an der Kugelerzeugungseinheit befestigt ⑥.

5.5.3 Installation der Druckflasche



Abbildung 5-18: Installierte Druckflasche

1. Die Druckflasche zusammensetzen und – falls erforderlich – autoklavieren.
2. Die Flasche mit der Immobilisierungsmischung befüllen.
3. Den Silikon Schlauch der Druckflasche am Luer-Lock-Einlass der Kugelerzeugungseinheit anbringen.
4. Den Silikon Schlauch in das Regelventil für den Flüssigkeitsfluss einführen. Diesen zusammendrücken, damit keine Flüssigkeit durchfließen kann.
5. Den Nippel ⑦ des Luftschlauchs in die Schnellkupplung des Luftauslasses der Steuerungseinheit einfügen.

5.6 Option: Konzentrisches Düsensystem (CN)

Das konzentrische Düsensystem (CN-System) ist eine optionale Ausrüstung zusätzlich zum Einzeldüsensystem. Mit ihm können Kapseln in einem einzigen Produktionsschritt hergestellt werden. Das System besteht aus einer CN-Kugelerzeugungseinheit, einem Satz von 7 Manteldüsen (0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70 und 0,90 mm) und einer Druckflasche mit 1000 mL. Die Aussenflüssigkeit wird aus einer Druckflasche mit Luftdruck gepumpt.



Abbildung 5-19: Kapselbildung

Die Hauptkomponenten der konzentrischen Düseneinheit sind (siehe *Abbildung 5-20*):

- das Düsenpaar mit Mantel- ① und Kerndüse ②.
- CN-Kugelerzeugungseinheit mit CN-Pulsationsgehäuse ③ und Magnethalter ④.

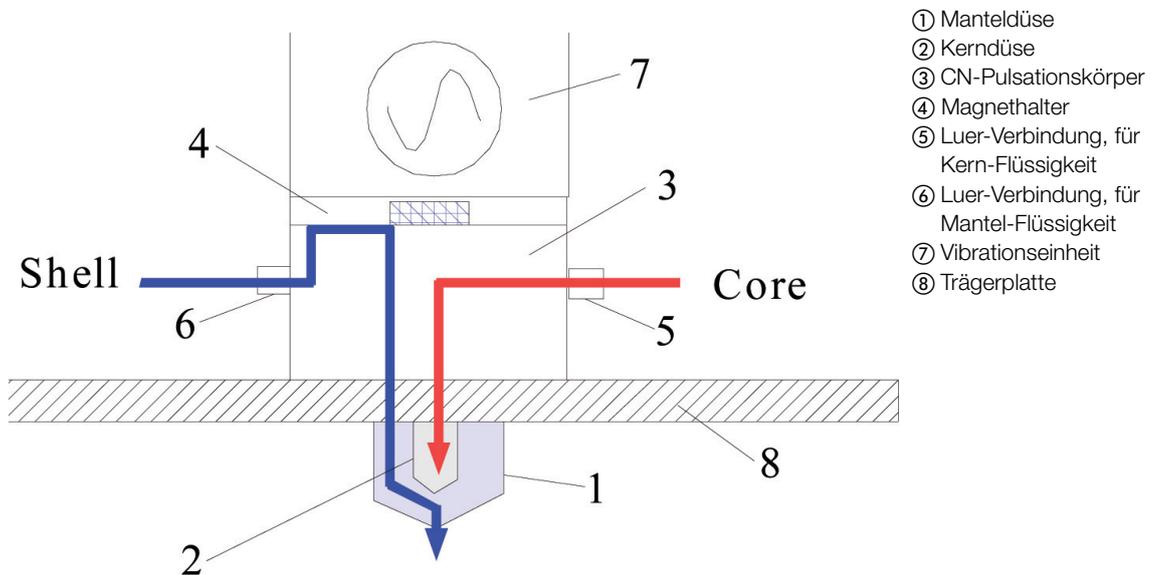


Abbildung 5-20: Schema des konzentrischen Düsensystems



Abbildung 5-21: CN-Kugelerzeugungseinheit mit einem Satz von 7 Manteldüsen. Standarddurchmesser der Düsenöffnungen: 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70 und 0,90 mm.

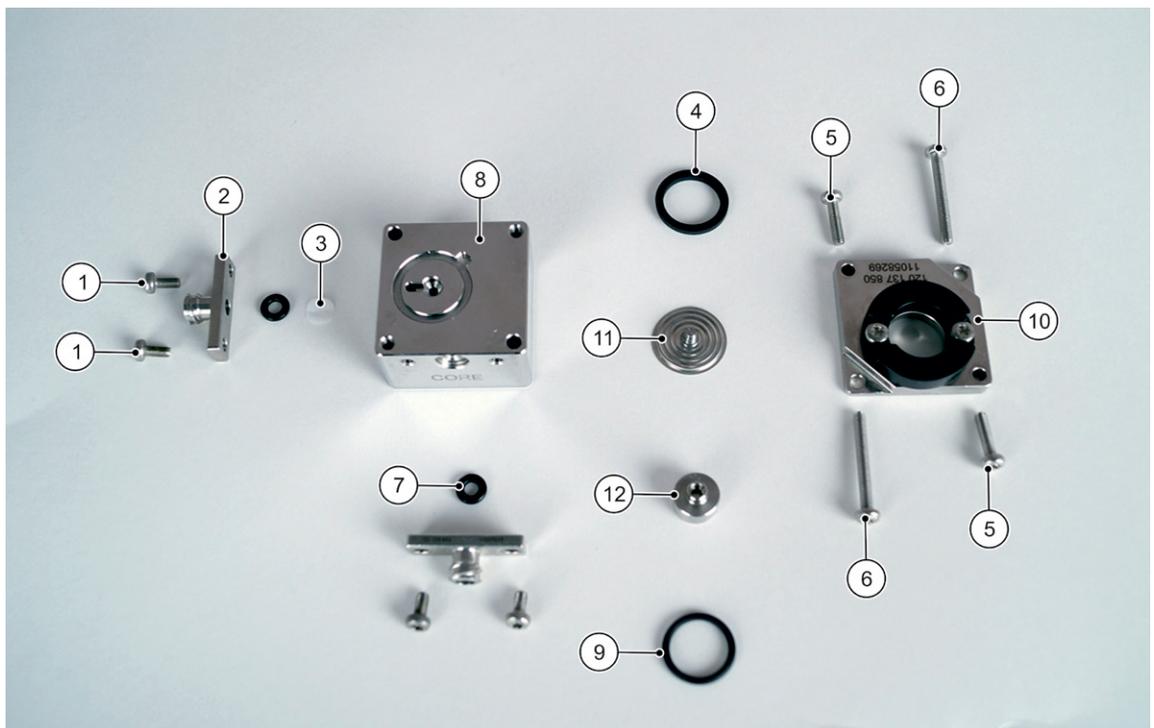
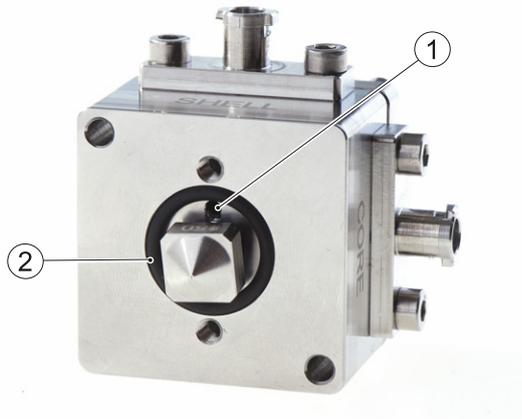


Abbildung 5-22: Einzelteile der CN-Kugelerzeugungseinheit

- | | |
|---|-----------------------|
| ① Schraube M3x6 | ⑦ O-Ring 3,68x1,78 |
| ② Luer-Lock-Buchse | ⑧ CN-Pulsationskörper |
| ③ Vorfilternetz 50 µm Maschenweite, D= 7 mm | ⑨ O-Ring 12,42x1,78 |
| ④ O-Ring 14,0x1,78 | ⑩ CN-Membranhalterung |
| ⑤ Schraube M3x8 | ⑪ Membran |
| ⑥ Schraube M3x25 | ⑫ Magnet |

5.6.1 Installieren von CN-Düsen



Den O-Ring 12,42×1,78 in die Rille der CN-Kugelerzeugungseinheit einsetzen. Die innere Düse (mit installiertem O-Ring) in die Öffnung der CN-Kugelerzeugungseinheit einsetzen. Es ist kein Gewinde vorhanden. Die innere Düse wird durch die Manteldüse zentriert und fixiert.

① Austritt der Mantelflüssigkeit

② O-Ring 12,42×1,78

Abbildung 5-23: Installieren der inneren Düse



Die Manteldüse vorsichtig über die innere Düse setzen. Die Manteldüse mit zwei Schrauben (M3×6) befestigen. Die Manteldüse zentriert und fixiert die innere Düse.

Abbildung 5-24: Installieren der Manteldüse



Abbildung 5-25: Installation des CN-Systems mit einer Spritzenpumpe und einer Druckflasche

5.7 Alle Teile des Encapsulator B-395 Pro



Abbildung 5-26: Abbildung aller Teile des Encapsulator B-395 Pro

5.8 Abschließende Installationsprüfung

Diese Prüfung muss nach jeder Installation und vor dem ersten Verkapselungsvorgang durchgeführt werden. Alle angeschlossenen Versorgungsmedien (z.B. Netzspannung und Gasdruck) müssen mit den technischen Daten des installierten Systems oder des Systemaufbaus übereinstimmen.

- Alle Glaskomponenten auf Beschädigungen prüfen.
- Alle anderen elektrischen Anschlüsse auf ordnungsgemäße Verbindung prüfen. Hierzu gehören optionale oder externe Komponenten, z.B. die Verkabelungen des Magnetrührers, der Vibrations-einheit und der Spritzenpumpe.

6 Betrieb und Bedienung

Dieses Kapitel führt Beispiele für typische Anwendungen des Gerätes auf und gibt Anweisungen, wie das Gerät ordnungsgemäß und sicher zu betreiben ist. Siehe auch die allgemeinen Warnungen in *Abschnitt 2.5 „Produktsicherheit“*.

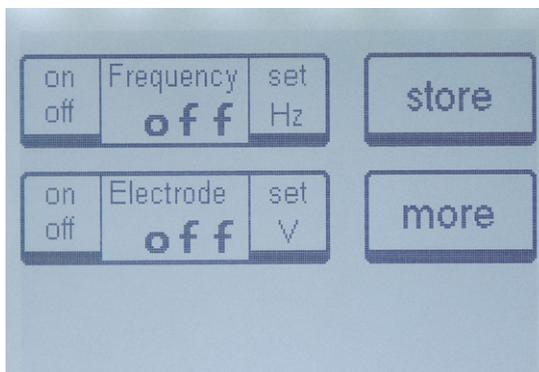
6.1 Inbetriebnahme des Gerätes

- Vergewissern Sie sich, dass der Encapsulator B-395 Pro ordnungsgemäß an die Hauptstromversorgung angeschlossen ist.
- Führen Sie vor jeder Kugelproduktion eine abschließende Installationsprüfung durch (siehe *Abschnitt 5.8*).
- Schalten Sie den Encapsulator B-395 Pro ein. Das System führt eine interne Prüfung durch.

6.2 Hauptbildschirme

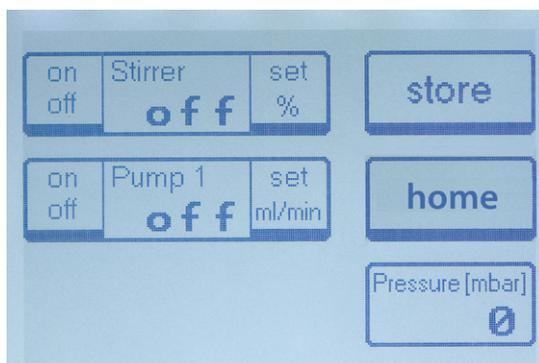
Alle Steuerungssysteme für die Produktion der Kugeln sind in die Steuerungseinheit integriert. Vibration, Pumpgeschwindigkeit, Lichtstärke und elektrostatische Dispersion werden über zwei Touchscreens gesteuert. Der Luftdruck wird über das Druckregelventil gesteuert. Die integrierte Stroboskoplampe erlaubt die Steuerung des Strahlzerfalls in Echtzeit.

Nach der internen Systemprüfung zeigen die beiden Touchscreens folgende Hauptbildschirme an:



Bildschirm 6-1: Oberer Touchscreen

Der obere Touchscreen dient der Steuerung der Vibrationsfrequenz und der Elektrodenspannung.



Bildschirm 6-2: Unterer Touchscreen

Der untere Touchscreen dient der Steuerung der Spritzenpumpe und der Drehzahl des Magnetrührers.

Außerdem zeigt dieser Bildschirm den Luftdruck an. Allerdings wird dieser manuell über das Druckregelventil gesteuert.

HINWEIS

Symbole mit einem schwarzen unteren Balken, z.B.  aktivieren/stoppen einen Prozess oder rufen einen anderen Bildschirm auf.

6.3 Menüstruktur der Steuerungseinheit

Die Abbildung unten gibt einen schematischen Überblick über alle Menüs des Encapsulator B-395 Pro mit der jeweils verfügbaren Funktionalität.

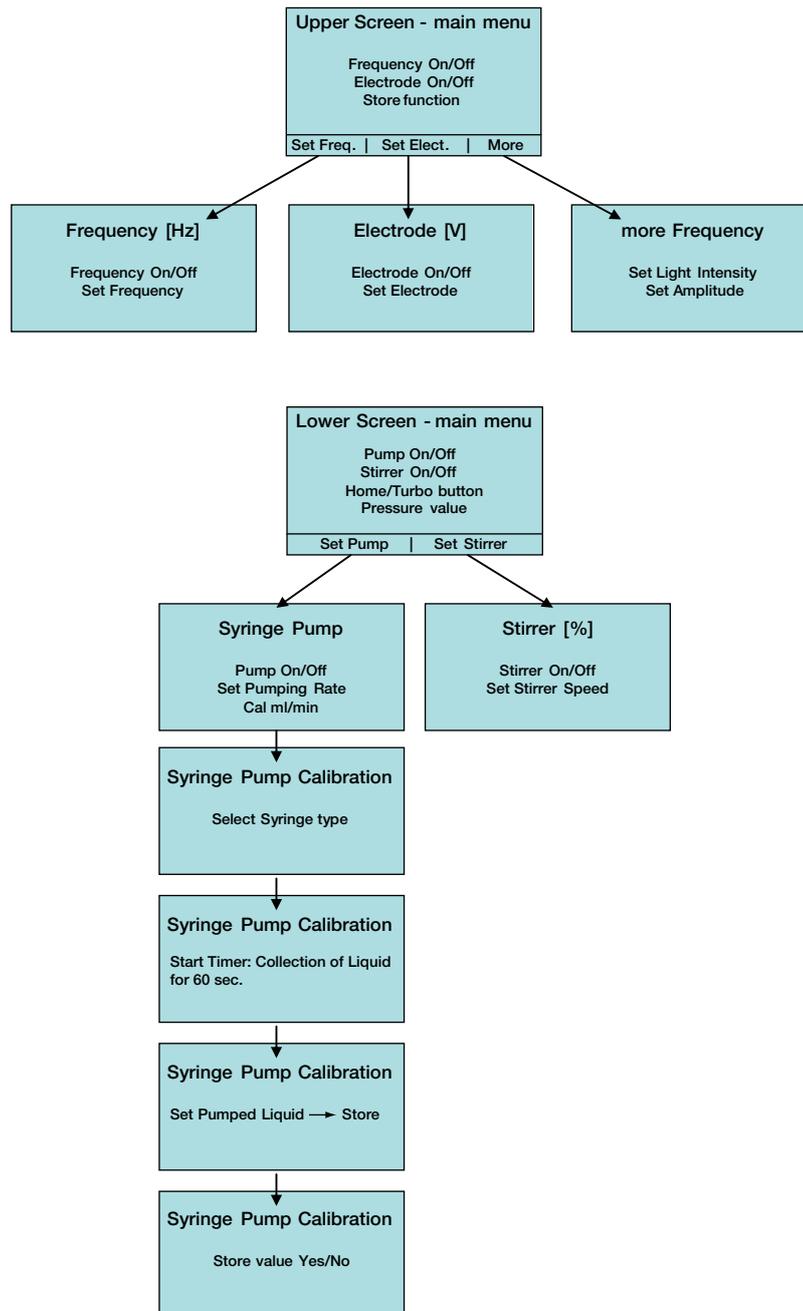
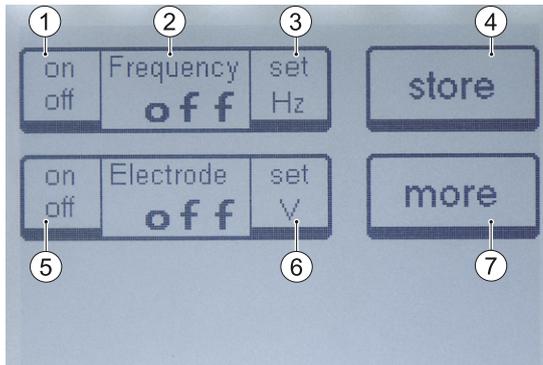


Abbildung 6-1: Menüstruktur der Steuerungseinheit

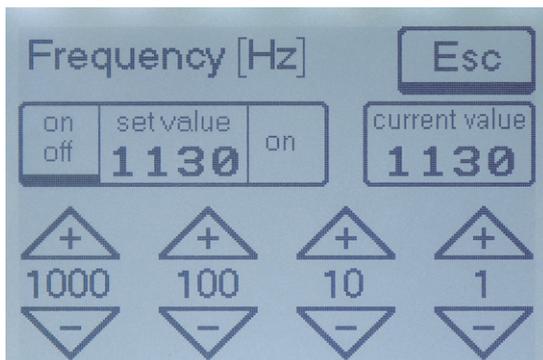
6.4 Menüfunktionen des oberen Touchscreens

Vibration (Frequenz und Amplitude), elektrostatische Dispersion (Spannung) und Lichtstärke der Stroboskoplampe werden über den oberen Touchscreen gesteuert. Wenn der Encapsulator eingeschaltet wird, führt der Touchscreen einige Sekunden lang ein Initialisierungsprogramm aus. Danach erscheint auf dem Bildschirm das Startmenü (*Bildschirm 6.3*) mit drei Unterbereichen (siehe *Bildschirm 6-4* bis *6-6*) für Frequenz, Elektrode und weitere Optionen für Frequenz und Lichtstärke.



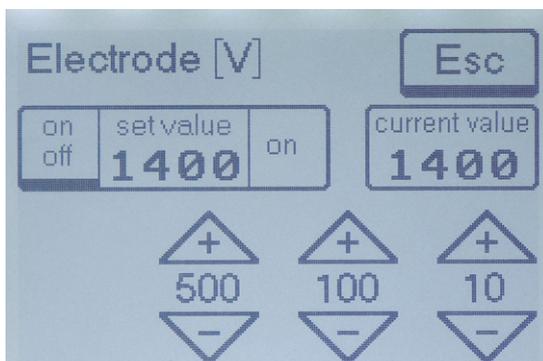
Bildschirm 6-3: Startmenü des oberen Touchscreens

- ① On/Off-Schaltfläche (Ein/Aus) für Frequenzsteuerung.
- ② Anzeige des Steuerungsparameters und Status der Steuerung (Wert oder off (aus)).
- ③ Schaltfläche für das Aufrufen des Bildschirms 6-4 zur Einstellung der Frequenzparameter.
- ④ Schaltfläche für die Speicherung der eingestellten Werte: zweimal innerhalb einer Sekunde drücken. Ein Tonsignal zeigt an, dass die Werte gespeichert wurden.
- ⑤ On/Off-Schaltfläche (Ein/Aus) für Elektrodensteuerung.
- ⑥ Schaltfläche für das Aufrufen des Bildschirms 6-5 zur Einstellung der Elektrodenparameter.
- ⑦ Schaltfläche für das Aufrufen des Bildschirms 6-6 zur Einstellung weiterer Frequenzparameter.



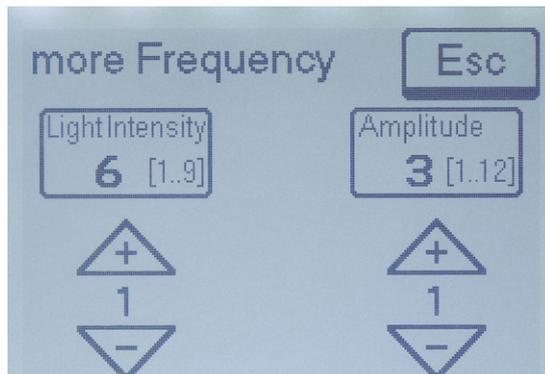
Bildschirm 6-4: Frequenzregulierung

Die Frequenzregulierung generiert in der Vibrationseinheit die geeignete elektrische Schwingung. Durch Drücken der Schaltflächen (+) und (-) wird die Frequenz geändert. Durch Drücken der Schaltfläche „on/off“ (ein/aus) wird die Frequenzfunktion aktiviert bzw. deaktiviert. Durch Drücken von „Esc“ kehren Sie zum Startmenü zurück und der eingestellte Wert wird beibehalten.



Bildschirm 6-5: Elektrostatische Dispersionseinheit

Die elektrostatische Dispersionseinheit wird verwendet, um die Oberfläche der Tröpfchen aufzuladen. Die durch die gleichartige Oberflächenladung bedingten Abstoßungskräfte verhindern, dass die Tröpfchen während des Herabfallens in die Aushärtungslösung miteinander kollidieren. Die angelegte Spannung liegt oft in einem Bereich von 500 bis 2000 V. Diese hängt vor allem von der Tröpfchengröße und der Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstroms ab. Auf diese Weise kann der Encapsulator B-395 Pro routinemäßig Kugelchargen mit einer Homogenität von über 95 % erzeugen. Durch Drücken der Schaltflächen (+) und (-) wird der elektrostatische Dispersionsparameter geändert. Das System benötigt etwas Zeit, um den eingestellten Wert zu erreichen. Durch Drücken von „Esc“ kehren Sie zum Startmenü zurück und der eingestellte Wert wird beibehalten.

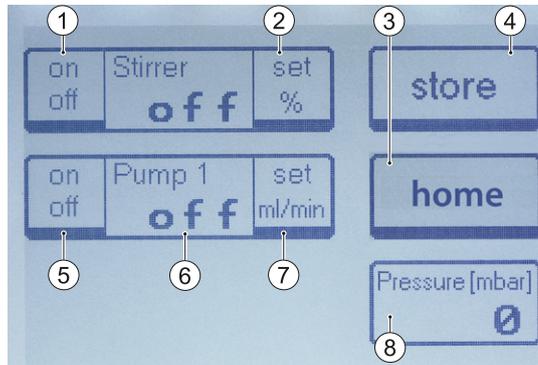


Bildschirm 6-6: Weitere Optionen für Amplitude der Vibration und für die Lichtstärke (Light Intensity) der Stroboskoplampe.

Die Lichtstärke (Light intensity) der Stroboskoplampe und die Amplitude (= Intensität) der Vibration kann von 1 bis 9 eingestellt werden. Oberhalb einer Frequenz von 1500 Hz kann die Amplitude von 1 bis 12 eingestellt werden. Durch die Erhöhung der Amplitude wird die Vibration stärker. Werte über 3 werden hauptsächlich für Lösungen mit Viskositäten > 100 mPa s verwendet. Durch Drücken der Schaltflächen (+) und (-) werden die Parameter sofort geändert. Durch Drücken der Schaltfläche „Esc“ kehren Sie zum Startmenü zurück und der eingestellte Wert wird beibehalten.

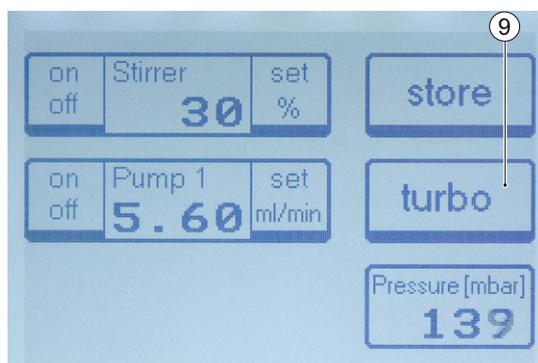
6.5 Menüfunktionen des unteren Touchscreens

Die Spritzenpumpe (Pumpgeschwindigkeit und Kalibrierung) und der Magnetrührer werden über den unteren Touchscreen gesteuert. Wenn der Encapsulator eingeschaltet wird, führt der Touchscreen einige Sekunden lang ein Initialisierungsprogramm aus. Danach erscheint auf dem Bildschirm das Startmenü mit zwei Unterbereichen (siehe *Abbildung 6-7 bis 6-10*).



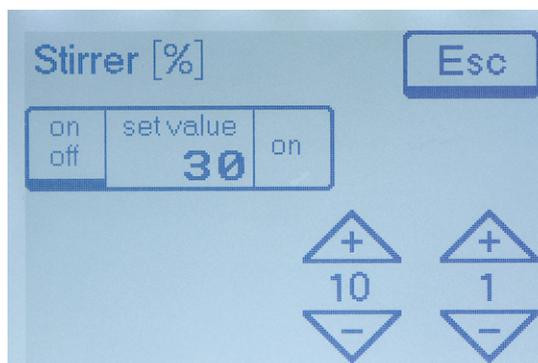
Bildschirm 6-7: Startmenü des unteren Touchscreens

- ① On/Off-Schaltfläche (Ein/Aus) für Magnetrührersteuerung.
- ② Schaltfläche für das Aufrufen des *Bildschirms 6-9* zur Einstellung der Drehzahl des Magnetrührers.
- ③ Schaltfläche für das Zurückfahren des Spritzenpumpenarms. Diese Schaltfläche wird nur angezeigt, wenn der Arm nicht bereits in der „Home-Position“ (Ausgangsstellung) ist. Wenn sich die Pumpe nach vorn bewegt, wird diese Schaltfläche zur „turbo“-Schaltfläche, siehe *Bildschirm 6-8*.
- ④ Schaltfläche für die Speicherung der eingestellten Werte: zweimal innerhalb einer Sekunde drücken. Ein Tonsignal zeigt an, dass die Werte gespeichert wurden.
- ⑤ On/Off-Schaltfläche (Ein/Aus) für Steuerung der Spritzenpumpe.
- ⑥ Anzeige des Steuerungsparameters und Status der Steuerung (Wert oder off (aus)).
- ⑦ Schaltfläche für das Aufrufen des *Bildschirms 6-10* zur Einstellung der Spritzenpumpenparameter.
- ⑧ Anzeige des Druckwertes am Luftauslass, von 0 bis 1000 mbar.



Bildschirm 6-8: Unterer Touchscreen mit turbo-Schaltfläche

- ⑨ Durch drücken der „turbo“-Schaltfläche wird die aktuelle Pumprate verdoppelt.

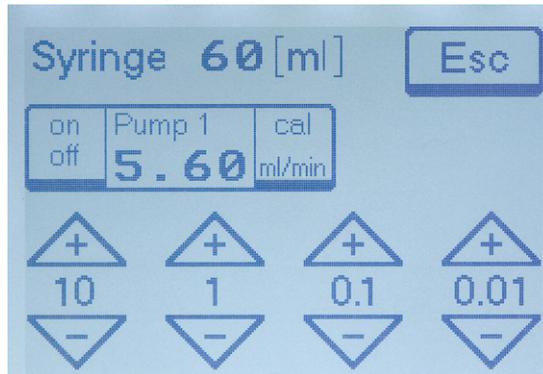


Bildschirm 6-9: Drehzahlregelung des Magnetrührers

Durch Drücken der Schaltflächen (+) und (-) wird die Drehzahl des Rührers geändert. Durch Drücken von „Esc“ kehren Sie zum Startmenü zurück und der eingestellte Wert wird beibehalten.

HINWEIS

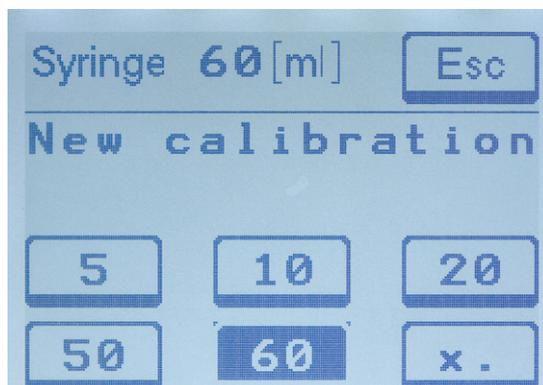
Die Werte sind willkürlich gewählt, jedoch reproduzierbare Werte, sie entsprechen nicht U/min.



Bildschirm 6-10: Drehzahlregelung der Spritzenpumpe

Durch Drücken der Schaltflächen (+) und (-) wird die Pumprate geändert. Durch Drücken von „Esc“ kehren Sie zum Startmenü zurück und der eingestellte Wert wird beibehalten. Wird die Schaltfläche „cal mL/min“ während des Pumpenbetriebs gedrückt, wird der Bildschirm 6-11 angezeigt, in dem Sie die aktuelle Spritze kalibrieren können. Wenn die Pumpe abgeschaltet ist, fordert der Bildschirm Sie auf, eine kalibrierte Spritze auszuwählen.

6.5.1 Menü für die Kalibrierung der Spritzenpumpe



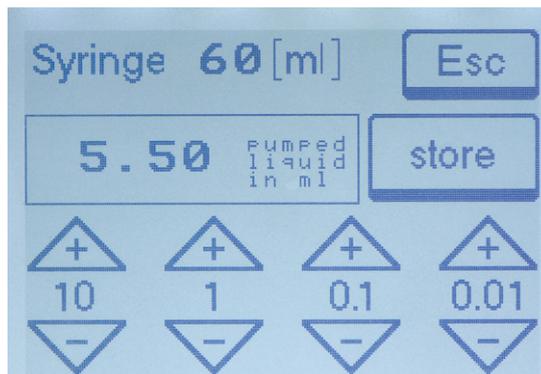
Bildschirm 6-11: Kalibrierung der Spritzenpumpe – Auswahl des Sprizentyps

Durch Drücken der entsprechenden Schaltfläche das gewünschte Spritzenvolumen wählen. Sie gelangen zum Bildschirm 6-12 (wenn die Pumpe in Betrieb ist) oder zum Hauptbildschirm (wenn die Pumpe nicht in Betrieb ist).



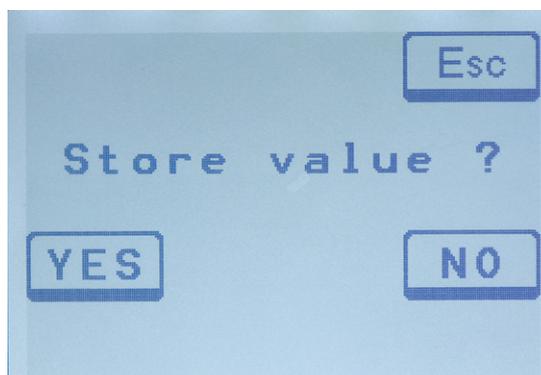
Bildschirm 6-12: Kalibrierung der Spritzenpumpe – Timer

Durch Drücken der Schaltfläche „on“ (ein) wird der Timer gestartet. Der Timer zählt 1 Minute von 60 auf 0 Sekunden herunter. Während dieser Zeit wird die Flüssigkeit des Strahls in einem vorgewogenen Gefäß aufgefangen. Die letzten drei Sekunden werden durch ein kurzes Tonsignal angezeigt. Eine Sekunde später hält die Spritzenpumpe an und der Bildschirm 6-13 wird angezeigt.



Bildschirm 6-13: Kalibrierung der Spritzenpumpe – Einstellen der gepumpten Flüssigkeit

Über die Schaltflächen (+) und (-) die Flüssigkeitsmenge eingeben, die in 1 Minute gepumpt wurde. Danach die Schaltfläche „store“ (speichern) drücken. Sie gelangen zum *Bildschirm 6-14*.

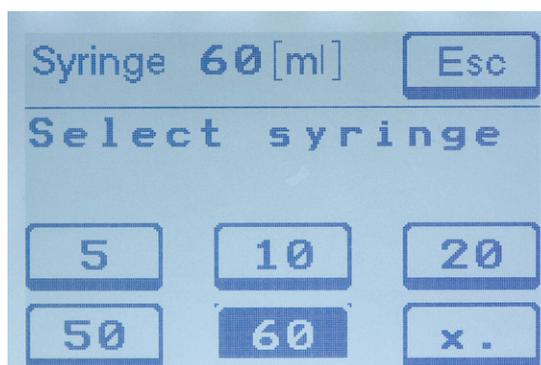


Bildschirm 6-14: Kalibrierung der Spritzenpumpe – Wert speichern

„Yes“ (Ja) drücken, um die Werte zu speichern. Das Startmenü wird angezeigt. Wenn nun die „on“-Schaltfläche der Pumpensteuerung gedrückt wird, läuft die Spritzenpumpe mit der neuen Kalibrierung.

6.5.2 Auswählen einer kalibrierten Spritze

Stoppen Sie die Pumpe. Drücken Sie im *Bildschirm 6-10* die Schaltfläche „cal mL/min“. Sie gelangen zum *Bildschirm 6-15*.



Bildschirm 6-15: Auswählen der Spritzengröße

Wählen Sie die gewünschte Spritze, indem Sie auf die entsprechende Schaltfläche drücken. Die Spritze wird gespeichert und das Startmenü wird angezeigt.

HINWEIS

Der *Bildschirm* kann aus dem Startmenü nur dann aufgerufen werden, wenn die Pumpe gestoppt ist.

6.6 Manuelle Steuerung des Luftdrucks

In der Steuerungseinheit wird der Luftdruck von Hand über ein Druckregelventil geregelt, das in die Frontabdeckung der Steuerungseinheit integriert ist (siehe *Abbildung 6-2*). Stellen Sie den Luftdruck auf einen Wert ein, der um 0,2 bis 0,3 bar über dem Maximalluftdruck liegt, der für den Verkapselungsprozess benötigt wird – jedoch nicht höher als 1 bar. Wird der Knopf des Druckregelventils im Uhrzeigersinn gedreht, erhöht sich der Druck. Drehen entgegen dem Uhrzeigersinn vermindert den Druck. Der Knopf des Druckregelventils verfügt über zwei Stellungen. Wenn er hineingedrückt wird, ist er gesperrt. Wenn er herausgezogen wird, ist er entsperrt. Beim Drehen des Knopfes entgegen dem Uhrzeigersinn wird der Druck über ein selbst entlüftendes System im Ventil reduziert. Der Druck wird auf dem Touchscreen angezeigt (siehe *Bildschirm 6-7*).

HINWEIS

- *Der Druck der Luft oder des Stickstoffs, der auf der Rückseite der Steuerungseinheit des Encapsulators zugeführt wird, muss unter 7 bar liegen. Der empfohlene Bereich liegt zwischen 1,5 und 2 bar.*
- *Beachten Sie, dass das Druckregulierungssystem relativ langsam reagiert, da die Bewegung der Luft durch das Quetschventil (in beiden Richtungen) mit Verzögerung erfolgt.*
- *Die Gasversorgungsleitung sollte nicht geöffnet sein, wenn der Encapsulator nicht verwendet wird. Das selbst entlüftende System des Ventils würde den Gasbehälter entleeren.*
- *Der Maximaldruck am Luftauslass beträgt 1,5 bar. Dieser Wert wird durch ein integriertes Überdruck-Sicherheitsventil kontrolliert, welches sich bei 1,5 bar öffnet. Der Arbeitsbereich liegt jedoch bei 0 bis 1 bar.*



Abbildung 6-2: Luftdruckreguliersystem für manuelle Luftdrucksteuerung – durch Drehen des Druckregelventils im Uhrzeigersinn wird der Druck **erhöht**.

6.7 Handhabung der Spritzenpumpe

Wenn die Spritzenpumpe das erste Mal nach dem Einschalten der Steuerungseinheit verwendet wird, die „home“-Schaltfläche auf dem unteren Touchscreen drücken, um den Pumpenarm zurückzufahren. Den Arm vollständig zurückfahren lassen, bis er den Mikroschalter-Endstift berührt (siehe *Abbildung 6-3*) und automatisch anhält. Auf diese Weise erkennt der Computer der Steuerungseinheit die genaue Position des Spritzenarms. Bringen Sie die gefüllte Spritze (wir empfehlen Kunststoffspritzen mit einem Luer-Lock-System) an der Kugelerzeugungseinheit an.

Lassen Sie den Spritzenarm durch Starten der Pumpe nach vorn fahren (siehe *Bildschirm 6-10*). Wenn Sie die Schaltfläche „turbo“ drücken, bewegt sich der Arm mit doppelter Geschwindigkeit. Sie können die Geschwindigkeit der Vorwärtsbewegung erhöhen, indem Sie vorübergehend höhere Pumpraten einstellen. Reduzieren Sie die Geschwindigkeit, wenn sich der Pumpenarm dem Kolben der Spritze nähert. Stoppen Sie die Pumpe, wenn der Arm den Kolben der Spritze berührt. Stellen Sie die gewünschte Fließrate der Flüssigkeit ein (siehe *Bildschirm 6-10*). Starten Sie den Pumpvorgang durch Drücken der on/off-Taste (Ein/Aus). Um das System betriebsbereit zu machen, die Schaltfläche „turbo“ drücken – die Pumpe bewegt sich mit doppelter Geschwindigkeit – bis an der Düse ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl entsteht. Drücken Sie dann erneut die „turbo“-Schaltfläche, um zum voreingestellten Wert zurückzukehren. Stellen Sie bei Bedarf die Pumpgeschwindigkeit neu ein, um im Licht des Stroboskops klar getrennte Tropfen zu erhalten.

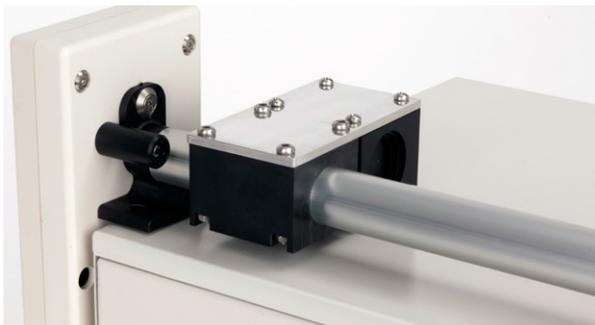


Abbildung 6-3: Spritzenpumpen-Endstift

6.7.1 Kalibrierung der Spritzenpumpe

Füllen Sie die Spritze mit Wasser oder mit dem Immobilisierungsgemisch und bringen Sie diese an der Kugelerzeugungseinheit an. Wiegen Sie den Auffangbehälter für die Flüssigkeit (die innerhalb einer Minute gepumpt wird) und beginnen Sie den Pumpvorgang. Stellen Sie die Pumprate so ein, dass eine gute Kugelbildung erreicht wird. Starten Sie den Kalibriervorgang, indem Sie die Schaltfläche „cal mL/min“ drücken (siehe *Bildschirm 6-10*). Wählen Sie die entsprechende Spritzengröße (siehe *Bildschirm 6-11*).

Drücken Sie die Schaltfläche „on/off“ (siehe *Bildschirm 6-12*) und fangen Sie 60 Sekunden lang die Flüssigkeit, die aus der Düse strömt, in dem gewogenen Behälter auf. Die letzten drei Sekunden werden durch ein Tonsignal angezeigt. Eine Sekunde nach dem letzten Ton stoppt die Pumpe automatisch. Wiegen Sie die gepumpte Flüssigkeit. Geben Sie den Wert ein (siehe *Bildschirm 6-13*) und speichern Sie ihn. Dieser Sprizentyp ist nun kalibriert.

6.7.2 Auswählen einer vorkalibrierten Spritze

Die kalibrierten Sprizentypen können nach Bedarf abgerufen werden. Stoppen Sie die Pumpe, drücken Sie die Schaltfläche „cal mL/min“ (siehe *Bildschirm 6-10*) und Sie gelangen zum *Bildschirm 6-15*. Wählen Sie die gewünschte Spritze aus. Danach wird das Startmenü angezeigt. Damit ist die Auswahl abgeschlossen.

6.8 Üben mit dem Encapsulator unter Verwendung von Wasser

Bevor Sie mit Verkapselungspolymeren arbeiten, sollten Sie am Encapsulator mit Wasser üben, um sich mit den Steuerungsvorgängen vertraut zu machen. Nehmen Sie die Deckplatte des Reaktionsgefäßes und bringen Sie die Kugelerzeugungseinheit und eine 200 µm- oder 300 µm-Düse an. Setzen Sie die zusammengebaute Deckplatte auf die Steuerungseinheit. Befestigen Sie diese mit den beiden Rändelschrauben. Setzen Sie die Vibrationseinheit auf die Kugelerzeugungseinheit. Stellen Sie ein großes Becherglas (ca. 600 mL) unter die Düse. Schließen Sie die Elektrode mit dem roten Kabel an die elektrostatische Dispersionseinheit (EDU) an.

6.8.1 Verwendung der Spritzenpumpe

1. Füllen Sie eine 60 mL-Spritze mit destilliertem Wasser und installieren Sie diese wie in Abschnitt 5.5 beschrieben. Stellen Sie die Pumprate der Spritzenpumpe auf 4 mL/min ein. Aktivieren Sie das Vibrationssteuerungssystem und stellen Sie die Vibration auf 1500 Hz ein. Aktivieren Sie die Spritzenpumpe. Das Wasser tritt in großen Tropfen aus der Düse aus. Erhöhen Sie die Pumpgeschwindigkeit bis sich ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl bildet. Ändern Sie die Pumpgeschwindigkeit und beobachten Sie die „Tropfenkette“ im Licht des Stroboskops. Die korrekten Arbeitsbedingungen sind erreicht, wenn die Tropfen innerhalb der Kette 3 bis 5 mm unterhalb der Düse über eine Länge von mehreren Zentimetern klar getrennt sind. Notieren Sie die Einstellungen der Vibration, Spannung und Spritzenpumpe bevor Sie die Pumpe stoppen.

HINWEIS

Wenn Sie Schwierigkeiten haben, die Tropfenkette zu erkennen, sollten Sie die Helligkeit im Umfeld des Encapsulators reduzieren und aus einer Entfernung von 20 bis 30 cm (8" bis 12") so in den Flüssigkeitsstrahl blicken, so dass sich das schwarze Gehäuse des Stroboskops direkt hinter dem Strahl befindet.

2. Starten Sie die Pumpe erneut und drücken Sie die „turbo“-Schaltfläche – die Pumpe bewegt sich mit doppelter Geschwindigkeit, und es bildet sich ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl. Drücken Sie die „turbo“-Schaltfläche erneut, und der Strahl stabilisiert sich bald mit der voreingestellten Fließrate. Die „turbo“-Schaltfläche ist eine sehr nützliche Funktion, um das System bei viskosen Polymerlösungen zu starten und kleine Verstopfungen zu lösen, die das Fließen behindern.
3. Erhöhen Sie die Vibrationsfrequenz bis die Tropfenkette instabil wird. Erhöhen Sie dann die Pumpgeschwindigkeit, bis sich wieder eine gute Kette gebildet hat. Wiederholen Sie den Vorgang in entgegengesetzter Richtung, indem Sie die Pumpgeschwindigkeit reduzieren und dann die Vibrationsfrequenz verringern. Wenn Sie diese Übung einige Male durchführen, entwickeln Sie ein Gespür für die Beziehung zwischen diesen beiden Parametern. Tragen Sie die Werte, die Sie für die optimale Tropfenkette gefunden haben, in die *Tabelle 6-1* ein.

HINWEIS

Die Pumpgeschwindigkeit und die Vibrationsfrequenz beeinflussen sich innerhalb eines gegebenen Arbeitsbereichs gegenseitig. Der Arbeitsbereich selbst ist hauptsächlich vom Durchmesser der Düse und von der Viskosität des Polymergemischs abhängig.

Allgemeine Regeln:

- **Höhere Frequenzen erzeugen kleinere Kugelgrößen.**
- **Geringere Fließraten der Flüssigkeit erzeugen kleinere Kugelgrößen.**
- **Je kleiner die Tropfen umso geringer die elektrostatische Spannung, die für das Trennen des Tropfenstroms erforderlich ist.**
- **Kleinere Düsen erzeugen kleinere Kugelgrößen. Der endgültige Kugeldurchmesser beträgt etwa das Doppelte des Düsendurchmessers.**

4. Stellen Sie die Pumpgeschwindigkeit und die Vibrationsfrequenz auf die von Ihnen bestimmten Werte ein, mit welchen eine gute, klare Tropfenkette erzeugt wird. Aktivieren Sie die elektrostatische Dispersionseinheit mit 300 V und erhöhen Sie die Spannung schrittweise um 100 V bis die eindimensionale Tropfenkette in einen trichterartigen, mehrstrahligen Strom übergeht. Je höher die elektrostatische Ladung, umso früher trennt sich die Tropfenkette auf. Dies verhindert, dass die Tropfen beim Herabfallen und beim Eintritt in die Aushärtungslösung miteinander kollidieren, da sie nun Partikel mit gleichgerichteter Ladung sind und sich gegenseitig abstoßen. Mit Hilfe dieser einzigartigen Funktion kann der Encapsulator serienmäßig Kugelchargen mit einer Homogenität von mehr als 95 % erzeugen.
5. Ändern Sie die Vibrationsfrequenz und die Pumpgeschwindigkeit und beobachten Sie deren Einfluss auf die elektrostatische Spannung, die für das Trennen des Tropfenstroms erforderlich ist. Die Verwendung der elektrostatischen Dispersionseinheit erweitert den Arbeitsbereich. Es kann vorkommen, dass die Tropfen nach einiger Zeit nicht mehr in den Auffangbecher fallen oder wieder aus ihm herausspringen. Dies geschieht, weil sich die elektrostatischen Ladungen in dem elektrisch isolierten Becherglas akkumuliert haben. Um dieses Phänomen zu vermeiden, müssen Sie die mitgelieferte Edelstahlklemme des Erdungskabels am Rand des Becherglases so anbringen, dass diese bis in die Auffangflüssigkeit reicht. Schliessen Sie das andere Ende des grün-gelben Kabels an die Erdungsbuchse in der Frontabdeckung der Steuerungseinheit an (siehe Abbildung 6-4). Wenn Sie mit dem kompletten Reaktionsgefäß arbeiten, werden die elektrostatischen Ladungen automatisch neutralisiert, d.h. es ist kein Erdungskabel erforderlich.



Abbildung 6-4: Erdung des offenen Polymerisationsbades

6. Ändern Sie die Amplitude der Vibration: Sie werden nur geringe Veränderungen in der Tropfenkette feststellen. Generell sind Werte zwischen 1 und 3 optimal für Lösungen mit geringer Viskosität. Wenn Immobilisierungsgemische mit hoher Viskosität ($> 150 \text{ mPa s}$) verwendet werden, erzielen Werte über 3 möglicherweise bessere Ergebnisse.
7. Wiederholen Sie dieses Experiment mit einer anderen Düsendröße.

6.8.2 Verwendung der Druckflasche

1. Setzen Sie die Kugelerzeugungseinheit zusammen, schrauben Sie die 0,30 mm Einzeldüse an die Kugelerzeugungseinheit und befestigen Sie diese mit der Schraube (M3×25) auf der Deckplatte. Setzen Sie die Vibrationseinheit auf die Kugelerzeugungseinheit. Schließen Sie die Elektrode mit dem roten Kabel an die elektrostatische Dispersionseinheit (EDU) an.
2. Füllen Sie die Druckflasche mit 200 bis 300 mL destilliertem Wasser und schrauben sie den zusammengebauten Deckel auf. Führen Sie den Silikonschlauch (4×7 mm) zwischen den Blättern des Regelventil für Flüssigkeiten hindurch und befestigen Sie den Luer-Lock-Verbindungsstecker des Silikonschlauchs in der Luer-Lock-Verbindungsbuchse der Kugelerzeugungseinheit. Drücken Sie das Ventil zusammen, indem Sie den Drehknopf im Uhrzeigersinn drehen, so dass der Silikonschlauch dadurch geschlossen wird.
3. Öffnen Sie die externe Druckluftversorgung. Der optimale Lufteinlassdruck liegt bei 1,5 bis 2 bar. Das System toleriert jedoch Lufteinlassdrücke von bis zu 7 bar.
4. Stellen Sie den Luftauslassdruck mit dem Druckregelventil auf 0,2 bar ein. Überprüfen Sie den angezeigten Wert regelmäßig um sicherzustellen, dass der Luftdruck immer noch dem eingestellten Wert entspricht. Aktivieren Sie das Vibrationssteuerungssystem und stellen Sie die Frequenz auf 800 Hz ein.
5. Öffnen Sie das Regelventil für Flüssigkeiten (durch Drehen des Drehknopfes entgegen dem Uhrzeigersinn) bis das Wasser durch den Silikonschlauch und die Kugelerzeugungseinheit zur Düse fließt, und dort ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl austritt. Stellen Sie den Flüssigkeitsstrom und/oder die Frequenz so ein, dass im Licht der Stroboskoplampe eine gute Tropfenkette zu sehen ist. Die gewünschten Bedingungen sind erreicht, wenn die Tropfen innerhalb der Kette ab 3 bis 5 mm unterhalb der Düse über eine Länge von mehreren Zentimetern klar getrennt sind. Notieren Sie die Stellung des Regelventil für Flüssigkeiten für diese Einstellung.
6. Erhöhen Sie die Vibrationsfrequenz bis die Tropfenkette instabil wird. Erhöhen Sie danach langsam den Luftdruck und damit die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit bis wieder eine einheitliche Tropfenkette erreicht wird. Wiederholen Sie den Vorgang in entgegengesetzter Richtung, indem Sie die Fließgeschwindigkeit reduzieren und dies durch Verringerung der Vibrationsfrequenz ausgleichen. Dies können Sie durchführen, bis Sie mit der wechselseitigen Beeinflussung dieser beiden Einstellungsmöglichkeiten vertraut sind. Notieren Sie die Werte in *Tabelle 6-2*.

HINWEIS

- *Die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit und die Vibrationsfrequenz beeinflussen sich innerhalb eines gegebenen Arbeitsbereichs gegenseitig. Der Arbeitsbereich selbst ist hauptsächlich vom Durchmesser der Düse und von der Viskosität des Polymergemischs abhängig.*
- *Eine Luftdruckeinstellung zwischen 0,05 bis 0,15 bar ist für das Pumpen von destilliertem Wasser ausreichend. **Größere Arbeitsdrücke weisen auf Probleme wie z.B. eine verstopfte Düse hin.***

Allgemeine Regeln:

- **Höhere Frequenzen erzeugen kleinere Kugelgrößen.**
- **Geringere Fließraten der Flüssigkeit erzeugen kleinere Kugelgrößen.**

7. Stellen Sie die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit und die Vibrationsfrequenz auf einen Wert ein, bei dem eine klare Tropfenkette erzeugt wird. Aktivieren Sie die elektrostatische Dispersionseinheit mit 300 V und erhöhen Sie die Spannung schrittweise um 100 V bis der eindimensionale Flüssigkeitsstrahl in einen trichterartigen, mehrstrahligen Strom übergeht. Je höher die elektrostatische Ladung, umso früher trennt sich die Tropfenkette auf. Dies verhindert, dass die Tropfen beim Herabfallen und beim Eintritt in die Aushärtungslösung miteinander kollidieren. Daher kann der Encapsulator routinemäßig Kugelchargen mit einer Homogenität von über 95 % erzeugen. Wenn keine Reaktion erfolgt, sollten Sie überprüfen, ob die Elektrode an die Steuerungseinheit angeschlossen ist.
 8. Ändern Sie die Vibrationsfrequenz und die Fließrate und beobachten Sie deren Einfluss auf die elektrostatische Spannung, welche für die Aufspaltung des Strahls erforderlich ist. Die Verwendung der elektrostatischen Spannung erweitert den Arbeitsbereich.
Es kann vorkommen, dass die Tropfen nach einiger Zeit nicht mehr in das Becherglas fallen oder wieder aus ihm herausspringen. Dies geschieht, weil sich die elektrostatischen Ladungen in dem elektrisch isolierten Becherglas akkumuliert haben. Um dieses Phänomen zu vermeiden, müssen Sie die mitgelieferte Edelstahlklemme des Erdungskabels am Rand des Becherglases so anbringen, dass sie bis in die Auffangflüssigkeit reicht. Schliessen Sie das grün-gelbe Kabel an die Erdungsbuchse in der Frontabdeckung der Steuerungseinheit an. Wenn Sie mit dem kompletten Reaktionsgefäß arbeiten, werden die elektrostatischen Ladungen automatisch neutralisiert, d.h. es ist kein Erdungskabel erforderlich.
- Allgemeine Regel:**
Je größer die Tropfen, umso höher die für die Aufspaltung des Strahls erforderliche elektrostatische Spannung.
9. Ändern sie die Amplitude der Vibration. Sie werden nur geringe Veränderungen der Tropfenkette beobachten. Sehr oft sind Werte zwischen 1 und 3 optimal für Lösungen mit geringer Viskosität. Wenn Immobilisierungsgemische mit höherer Viskosität (> 150 mPa s) verwendet werden, erzielen Werte über 3 möglicherweise bessere Ergebnisse.
 10. Wiederholen Sie diesen Prozess mit einer anderen Düsengröße.

Allgemeine Regel:

- **Kleinere Düsen erzeugen kleinere Kugelgrößen.**
- **Der endgültige Kugeldurchmesser beträgt etwa das Doppelte des Düsendurchmessers.**

6.9 Üben mit dem Encapsulator unter Verwendung einer nicht-sterilen Alginatlösung

Nachdem Sie sich mit den Steuerungsfunktionen der Tropfenbildung vertraut gemacht haben, können Sie nun Testläufe mit nicht-sterilen Alginatlösungen durchführen. Natriumalginat ist das am häufigsten verwendete Polymer. Es werden jedoch auch andere Polymere mit anderen Eigenschaften verwendet. Wir empfehlen das niederviskose Alginat. Die Alginatkonzentration hat einen starken Einfluss auf die Viskosität, und dies beeinflusst wiederum den Druckabfall in der Düse. Daher ist die Konzentration der Alginatlösung eine Funktion des Düsendurchmessers (siehe folgende Tabelle).

Tabelle 6-3: Empfohlene Alginatkonzentration (bezogen auf Trockengewicht) für verschiedene Düsendurchmesser

Düsendurchmesser	Konzentration von niederviskosem Alginat	
	Arbeitsbereich	Empfohlene Konzentration
80 bis 120 µm	0,75 bis 1,4 %	1,1 bis 1,2 %
120 bis 200 µm	1,0 bis 1,6 %	1,3 bis 1,4 %
200 bis 300 µm	1,2 bis 1,8 %	1,5 bis 1,6 %
300 bis 500 µm	1,5 bis 2,5 %	1,8 bis 2,0 %

HINWEIS

Unter normalen Lagerungsbedingungen enthält das Alginatpulver 10 – 12 % Wasser. Wir geben daher die Alginatkonzentration auf Basis des Trockengewichts an.

6.9.1 Herstellen einer 1,5 % Na-Alginatlösung

1. Nehmen Sie ein 400 mL-Becherglas und wiegen Sie 3,3 g niederviskoses Na-Alginatpulver ein.
2. Geben Sie 200 mL deionisiertes Wasser hinzu und mischen Sie mit einem Labormixer 1 bis 2 Minuten kräftig.
3. Alginat neigt zu Klumpenbildung. Entfernen Sie die Alginatklumpen mit einem Spatel vom Becherglas und den Flügeln des Mixers, und mischen Sie erneut 1 bis 2 Minuten. Wenn sich weiterhin Klumpen in der Flüssigkeit befinden, den Mischvorgang wiederholen.
4. Lassen Sie dann die Mischung stehen, um die eingeschlossenen Luftblasen aus der Flüssigkeit entweichen zu lassen.
5. Entgasen Sie die Mischung bei Bedarf durch Unterdruck oder in einem Ultraschallbad.
6. Das Auflösen von Alginat mit einem Magnetrührer nimmt sehr viel mehr Zeit in Anspruch und sollte deshalb über Nacht erfolgen.

HINWEIS

Alginatlösungen begünstigen das Wachstum von Mikroorganismen. Sie sind in einem Kühlschrank über ca. 2 Wochen stabil. Ein Hinweis auf mikrobielle Kontamination ist eine Verringerung der Viskosität der Mischung. Alginatlösungen können wesentlich länger gelagert werden – sogar bei Zimmertemperatur – wenn Sie sterilisiert oder wenn Konservierungsmittel zugesetzt werden, z.B. 0,05 % NaN₃.

6.9.2 Arbeiten mit der Spritzenpumpe

1. Bringen Sie eine 200 μm - oder 300 μm -Düse an der Kugelerzeugungseinheit an. Setzen Sie die montierte Deckplatte auf die Steuerungseinheit. Befestigen Sie diese mit den beiden Rändelschrauben. Setzen Sie die Vibrationseinheit auf die Kugelerzeugungseinheit. Schließen Sie die Elektrode mit dem roten Kabel an die elektrostatische Dispersionseinheit (EDU) an. Stellen Sie den Magnetrührer unterhalb der Düse auf, und setzen Sie ein großes Becherglas auf den Rührer. Geben Sie 100 mM CaCl_2 in das Becherglas, so dass dieses mindestens 2 cm hoch mit der Polymerisationsflüssigkeit gefüllt ist. Geben Sie ein Magnetrührstäbchen in das Becherglas und stellen Sie den Rührer so ein, dass ein leichter Wirbel zu sehen ist. Ein Wirbel in der Flüssigkeit erzeugt Scherkräfte, welche die Kugeln verformen können. Es wird empfohlen, ein Rührstäbchen ohne Spinning (im Lieferumfang enthalten) zu verwenden, da der Spinning das Rührstäbchen anhebt und so möglicherweise die darunter befindlichen Kugeln zerbricht. Bringen Sie außerdem die geerdete Klemme am Rand des Becherglases so an, dass sie in die Flüssigkeit eintaucht. Decken Sie jetzt das Becherglas z.B. mit einer Petrischale ab, oder stellen Sie das Glas und den Rührer zur Seite und platzieren Sie an deren Stelle ein anderes Becherglas mit Wasser (und der Erdungsklemme) unter die Düse.
2. Füllen Sie eine 60 mL-Spritze mit der oben beschriebenen 1,5 % AlginateLösung und setzen Sie diese in den Encapsulator ein.
3. Aktivieren Sie das Vibrationssteuerungssystem und stellen Sie die Vibrationsfrequenz auf 1200 Hz für die 200 μm -Düse bzw. auf 900 Hz für die 300 μm -Düse ein. Aktivieren Sie die Spritzenpumpe und stellen Sie die Pumprate auf 5 mL/min für die 200 μm -Düse bzw. auf 8 mL/min für die 300 μm -Düse ein. Drücken Sie die „turbo“-Schaltfläche. Sobald sich ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl gebildet hat, drücken Sie erneut die „turbo“-Schaltfläche. Der Strahl stabilisiert sich bald mit der voreingestellten Fließrate. Stellen Sie die Pumprate und/oder die Frequenz so ein, dass Sie unter der Elektrode eine klar sichtbare Tropfenkette erhalten.
4. Aktivieren Sie die elektrostatische Dispersionseinheit mit 500 V. Erhöhen Sie die Spannung schrittweise um 100 V bis Sie 3 bis 10 cm unterhalb der Elektrode eine kreisförmige Streuung des Tropfenstroms erhalten. Ein Abstand von ca. 5 cm unterhalb der Elektrode ist optimal. Wenn keine Reaktion erfolgt, sollten Sie sich vergewissern, dass die Elektrode an die Steuerungseinheit angeschlossen ist.

HINWEIS

Je stärker die kreisförmige Streuung des Tropfenstroms, umso homogener die Kugeln. Dies ist nicht nur von der elektrostatischen Spannung, sondern auch von der Fließrate der Flüssigkeit und von der Vibrationsfrequenz abhängig. Sie beeinflussen die Art und Weise, wie die Tropfen vom Flüssigkeitsstrahl im elektrostatischen Feld zwischen Düse und Elektrodenende abgetrennt werden. Kleinere Tropfen werden oft näher an der Düse vom Flüssigkeitsstrahl abgetrennt als größere.

5. Sobald ein symmetrisches und stabiles Streumuster erreicht ist, das Becherglas durch das Becherglas ersetzen, das die Polymerisationslösung enthält. Fangen Sie ca. 1 Minute lang Kugeln auf. Notieren Sie die Prozessparameter in *Tabelle 6-4*, während sich die Kugeln ansammeln. Decken Sie das Becherglas ab (oder tauschen Sie es gegen den vorher benutzten „Abfall“-Becher aus) und stoppen Sie die Kugelerzeugung, indem Sie die Spritzenpumpe, Vibrationssteuerung und elektrostatische Spannung abschalten.

HINWEIS

Reinigen Sie die Düse nach jedem Produktionslauf gründlich mit destilliertem Wasser, um das Verstopfen oder ein teilweises Verschließen der Düse durch eingetrocknetes Polymergemisch zu vermeiden.

Tabelle 6-4: Encapsulator-Arbeitsblatt Versuchslauf (Spritzenpumpe)

Spritzengröße [ml]					
Düsengröße [μm]					
Alginat-Konz. [%]					
Pumpgeschwindigkeit [ml/min]					
Vibrationsfrequenz [Hz]					
Amplitude					
Tropfengröße ca. [μm]					
Homogenität [%]					
Bemerkungen					

- Prüfen Sie die Kugeln unter einem Mikroskop mit einem Mikrometerokular und notieren Sie die Beobachtungen bezüglich Durchmesser, Einheitlichkeit und Form in *Tabelle 6-4*.
- Wiederholen Sie diesen Ablauf bei jeder Änderung der Prozessparameter.

HINWEIS

Bei der Erzeugung kleiner Kugeln mit einem Durchmesser $< 500 \mu\text{m}$ kann es vorkommen, dass die Form nicht kugelförmig sondern eher oval ist. Dies ist im Wesentlichen eine Folge der Oberflächenspannung der Polymerisationslösung. Ein kritischer Punkt für die Kugel ist das Eintauchen in die Polymerisationslösung. Wenn die Oberflächenspannung hoch ist, wird die Kugel an der Oberfläche teilweise zurückgehalten und die Polymerisation beginnt, bevor die Kugel wieder ihre runde Form annehmen kann. Dieses Problem kann gelöst werden, indem dem Polymerisationsgemisch eine kleinen Menge eines Tensids – wie z.B. Tween 20 – zugegeben wird.

- Vergleichen Sie den Einfluss der elektrostatischen Dispersionseinheit, indem Sie Kugeln bei identischer Vibrationsfrequenz und Pumprate mit und ohne Aktivierung der Elektrostatikfunktion erzeugen.
- Ändern Sie zur Bestimmung des Arbeitsbereichs die Pumpgeschwindigkeit schrittweise von der niedrigsten Fließrate, bei der gerade ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl erzeugt wird, zu einer Fließrate, bei der über den gesamten Vibrationsfrequenzbereich keine klare Kugelkette mehr zu sehen ist. Notieren Sie die jeweils niedrigsten und höchsten Frequenzen in *Tabelle 6-5*.

6.9.3 Arbeiten mit der Druckflasche

1. Bringen Sie eine 200 µm- oder 300 µm-Düse an der Kugelerzeugungseinheit an. Setzen Sie die montierte Deckplatte auf die Steuerungseinheit. Befestigen Sie diese mit den beiden Rändelschrauben. Setzen Sie die Vibrationseinheit auf die Kugelerzeugungseinheit. Schließen Sie die Elektrode mit dem roten Kabel an die elektrostatische Dispersionseinheit (EDU) an. Stellen Sie den Magnetrührer unter die Düse und setzen Sie ein großes Becherglas auf den Rührer. Geben Sie 100 mM CaCl₂ in das Becherglas, so dass dieses mindestens 2 cm hoch mit der Polymerisationsflüssigkeit gefüllt ist. Geben Sie ein Magnetrührstäbchen in das Becherglas und stellen Sie den Rührer so ein, dass ein leichter Wirbel zu sehen ist. Bringen Sie außerdem die geerdete Klemme am Rand des Becherglases so an, dass sie in die Flüssigkeit eintaucht. Decken Sie jetzt das Becherglas (mit einer Petrischale) ab oder stellen Sie das Glas und den Rührer zur Seite und platzieren Sie an deren Stelle ein anderes Becherglas mit Wasser (und der Erdungsklemme) unter die Düse.
2. Füllen Sie die Druckflasche mit der oben beschriebenen 1,5 % Alginat-Lösung und schrauben Sie den zusammengebauten Deckel auf. Führen Sie den Silikonschlauch (4x7 mm) zwischen den Blättern Flüssigkeitsregelventils hindurch und befestigen Sie den Luer-Lock-Verbindungsstecker des Silikonschlauchs in der Luer-Lock-Verbindungsbuchse der Kugelerzeugungseinheit. Drücken Sie das Ventil zusammen, indem Sie den Drehknopf im Uhrzeigersinn drehen, so dass der Silikonschlauch dadurch geschlossen wird.
3. Öffnen Sie die externe Druckluftversorgung. Der optimale Lufteinlassdruck liegt bei 1,5 bis 2 bar. Das System toleriert jedoch Lufteinlassdrücke von bis zu 7 bar.
4. Stellen Sie den Luftdruck am Druckreguliersystem auf 0,4 bar ein. Überprüfen Sie den angezeigten Wert regelmäßig um sicherzustellen, dass der Luftdruck immer noch dem eingestellten Wert entspricht. Aktivieren Sie das Vibrationssteuerungssystem und stellen Sie die Vibrationsfrequenz auf 1100 Hz für die 200 µm-Düse bzw. auf 800 Hz für die 300 µm-Düse ein.
5. Öffnen Sie das Flüssigkeitsregelventils (durch Drehen des Drehknopfes entgegen dem Uhrzeigersinn) bis die Flüssigkeit durch den Silikonschlauch und die Kugelerzeugungseinheit zur Düse fließt und dort ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrahl austritt. Stellen Sie den Flüssigkeitsstrom und/oder die Frequenz so ein, dass im Licht der Stroboskoplampe eine gute Tropfenkette zu sehen ist. Die gewünschten Bedingungen sind erreicht, wenn die Tropfen innerhalb der Kette ab 3 bis 5 mm unterhalb der Düse über eine Länge von mehreren Zentimetern klar getrennt sind. Notieren Sie die Stellung des Flüssigkeitsregelventils für diese Einstellung.
6. Erhöhen Sie die Vibrationsfrequenz bis die Tropfenkette instabil wird. Erhöhen Sie danach die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit durch langsames Erhöhen des Luftdrucks oder durch langsames Öffnen des Flüssigkeitsregelventils, bis wieder eine einheitliche Tropfenkette erreicht wird. Wiederholen Sie den Vorgang in entgegengesetzter Richtung, indem Sie die Fließgeschwindigkeit reduzieren und dies durch Verringerung der Vibrationsfrequenz ausgleichen. Dies können Sie durchführen, bis Sie mit der wechselseitigen Beeinflussung dieser beiden Einstellungsmöglichkeiten vertraut sind. Notieren Sie die Werte in *Tabelle 6-5*.

HINWEIS

Eine Luftdruckeinstellung zwischen 0,1 und 0,8 bar ist für das Pumpen des Polymergemisches normalerweise ausreichend. Arbeitsdrücke über 1,0 bar sollten vermieden werden. Sie sind ein Hinweis auf Probleme wie z.B.:

- *Verstopfte Düse,*
 - *Zu hohe Viskosität des Polymergemisches,*
 - *Ein für die verwendete Polymermischung zu kleiner Düsendurchmesser.*
7. Aktivieren Sie die elektrostatische Dispersionseinheit mit 500 V. Erhöhen Sie die Spannung schrittweise um 100 V bis Sie 3 bis 10 cm unterhalb der Elektrode eine kreisförmige Streuung der Tropfenkette erhalten. Ein Abstand von ca. 5 cm unterhalb der Elektrode ist optimal.

HINWEIS

Je stärker die kreisförmige Streuung der Tropfenkette, umso homogener werden die Kugeln. Diese ist nicht nur von der elektrostatischen Spannung, sondern auch von der Fließrate der Flüssigkeit und von der Vibrationsfrequenz abhängig. Im Idealfall sollte sich der Tropfen innerhalb des elektrostatischen Feldes, welches sich zwischen der Düse und dem Elektrodenende befindet, vom Flüssigkeitsstrahl abtrennen.

- Sobald ein symmetrisches und stabiles Streumuster erreicht ist, die Abdeckung vom Becherglas entfernen, welches die Polymerisationslösung enthält, oder das Becherglas mit Wasser durch das Becherglas mit der Polymerisationslösung (mit Erdungsklemme) ersetzen. Schieben Sie einen Magnetrührer unter das Becherglas und sammeln Sie die Tropfen ca. 1 Minute lang. Notieren Sie die Prozessparameter in *Tabelle 6-5*, während sich die Kugeln ansammeln. Decken Sie das Becherglas zu oder tauschen Sie es aus. Dann stoppen Sie die Tropfenerzeugung, indem Sie die elektrostatische Spannung, die Vibration und den Flüssigkeitsstrom abschalten.

HINWEIS

Reinigen Sie die Düse nach jedem Produktionslauf gründlich mit destilliertem Wasser, um das Verstopfen oder ein teilweises Verschließen der Düse durch eingetrocknetes Polymergemisch zu vermeiden.

- Prüfen Sie die Kugeln unter einem Mikroskop mit einem Mikrometerokular und notieren Sie die Beobachtungen bezüglich Durchmesser, Einheitlichkeit und Form in *Tabelle 6-6*.
- Wiederholen Sie diesen Vorgang bei jeder Änderung der Prozessparameter.

Tabelle 6-6: Encapsulator-Arbeitsblatt Versuchslauf (Druckflasche)

Düsengröße [μm]					
Alginat-Konz. [%]					
Stellung des Flüssigkeitsregelventils					
Vibrationsfrequenz [Hz]					
Amplitude					
Kugelgröße ca. [μm]					
Homogenität [%]					
Bemerkungen					

HINWEIS

Bei der Erzeugung kleiner Kugeln mit einem Durchmesser $< 500 \mu\text{m}$ kann es vorkommen, dass die Form nicht kugelförmig sondern eher oval ist. Dies ist im Wesentlichen eine Folge der Oberflächenspannung der Polymerisationslösung. Ein kritischer Punkt für die Kugel ist das Eintauchen in die Polymerisationslösung. Wenn die Oberflächenspannung hoch ist, wird die Kugel an der Oberfläche teilweise zurückgehalten und die Polymerisation beginnt, bevor die Kugel wieder ihre runde Form annehmen kann. Dieses Problem kann gelöst werden, indem dem Polymerisationsgemisch eine kleinen Menge eines Tensids – wie z.B. Tween 20 – zugegeben wird.

- Vergleichen Sie den Einfluss der elektrostatischen Spannung, indem Sie Kugeln bei identischer Vibrationsfrequenz und Pumprate mit und ohne Aktivierung der elektrostatischen Spannung erzeugen.

6.10 Üben mit dem Encapsulator – Arbeiten mit dem kompletten Reaktionsgefäß

Nachdem Sie sich mit der Erzeugung von Ca-Alginatkugeln vertraut gemacht haben, sollten Sie nun Testläufe mit dem kompletten Reaktionsgefäß durchführen, um sterile Arbeitsbedingungen zu simulieren. Sie werden hierbei jedoch nicht-sterile Alginatlösungen verwenden.

Bei sterilen Arbeitsbedingungen haben Sie zusätzlich das Problem, dass in einem autoklavierten Reaktionsgefäß oft keine Änderungen ohne eine Beeinträchtigung der Sterilität vorgenommen werden können, z.B. wenn ein Teil vergessen oder falsch montiert wurde. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass das Reaktionsgefäß vor der Sterilisation ordnungsgemäß vorbereitet wird. Folgen Sie den in *Abschnitt 5* aufgeführten Anweisungen für die Montage und Sterilisation des Reaktionsgefäßes. Falls Sie Änderungen vornehmen, müssen Sie dies als separaten Prozess notieren.

1. Stellen Sie alle erforderlichen Verkapselungsreagenzien her (ein Beispiel für das Verkapseln tierischer Zellen finden Sie im Abschnitt 6.14).

Für diesen Lauf:

60 mL	1,5 % Alginat-Lösung
500 mL	100 mM CaCl ₂ -Polymerisationslösung
600 mL	0,9 % NaCl + 10 mM CaCl ₂ -Waschlösung

Setzen Sie eine Druckflasche zusammen.

2. Bringen Sie das autoklavierte Reaktionsgefäß an der Steuerungseinheit an. Vergewissern Sie sich, dass der Silikonschlauch am Flüssigkeitsablaufport der Grundplatte des Reaktors mit einer Klemme abgeklemmt ist. Stellen Sie sicher, dass das Kugelernteventil am Reaktionsgefäß geschlossen ist, dass sich der Magnetrührer unter dem Reaktor und das Rührstäbchen über dem Magnetrührer befindet.
 - Schließen Sie die elektrostatische Dispersionseinheit mit dem roten Kabel an das Reaktionsgefäß an.
 - Drehen Sie den Auffangbecher der Kugel-Bypass-Vorrichtung unter die Düse.
3. Geben Sie 500 mL Polymerisationslösung in die Druckflasche. Bringen Sie den Silikonschlauch am Flüssigkeitsmembranfilter an. Schließen Sie die Druckflasche am Luftauslass der Steuerungseinheit an. Schalten Sie die Steuerungseinheit ein. Stellen Sie den Luftdruck auf 0,3 bis 0,7 bar ein. Nachdem die gewünschte Flüssigkeitsmenge gepumpt wurde, den Luftdruck ablassen.

HINWEIS

Die Aushärtungslösung sollte das 8- bis 10-fache Volumen des Polymergemisches haben. Die Polymerisationslösung im Reaktionsgefäß sollte eine Höhe von wenigstens 2 cm haben (Minimum 200 mL).

4. Stellen Sie die Vibrationsfrequenz, die elektrostatische Spannung und – falls die Spritzenpumpe verwendet wird – die Pumprate auf die entsprechenden Werte ein, die zuvor bestimmt wurden. Stellen Sie die Drehzahl des Magnetrührers so ein, dass gerade ein Wirbel zu erkennen ist.

5. Füllen Sie eine 60 mL-Spritze mit der Alginat/Proben-Lösung und bringen Sie diese am Encapsulator an. Aktivieren Sie das Vibrationssteuerungssystem und stellen Sie die Vibrationsfrequenz auf die Werte ein, die in *Abschnitt 6-9* bereits bestimmt wurden. Aktivieren Sie die Spritzenpumpe und stellen Sie die Pumpgeschwindigkeit gemäß den zuvor bestimmten Werten ein. Drücken Sie auf die „turbo“-Schaltfläche. Sobald ein Flüssigkeitsstrahl entstanden ist, drücken Sie erneut auf die „turbo“-Schaltfläche. Aktivieren Sie das elektrostatische Dispersionssystem. Passen Sie bei Bedarf die Pumprate und/oder die Frequenz so an, dass Sie bis hinunter zum Auffangbecher eine klar sichtbare Tropfenkette erhalten.
6. Sobald die Tropfenkette stabil ist, den Auffangbecher aus dem Flüssigkeitsstrahl heraus-schwenken, um mit dem eigentlichen Tropfenherstellprozess zu beginnen. Der Tropfenstrom sollte 3 bis 10 cm unterhalb der Elektrode zu streuen beginnen. Ein Abstand von ca. 5 cm unterhalb der Elektrode ist optimal. Um dies zu erreichen, müssen Sie die elektrostatische Spannung anpassen und möglicherweise eine Feinabstimmung der Vibrationsfrequenz und der Pumpgeschwindigkeit vornehmen.
7. Notieren Sie die genauen Prozessparameter. Überprüfen Sie die Tropfenproduktion im Licht der Stroboskoplampe, um die Einstellungen zu verifizieren.
8. Kurz bevor die Spritze leer ist, muss der Auffangbecher der Bypass-Vorrichtung in den Tropfenstrom zurück gedreht werden. Dadurch wird verhindert, dass große, am Ende des Produktionsprozesses auftretende Tropfen, die homogene Produktion kontaminieren. Stoppen Sie die Pumpe. Schalten Sie die elektrostatische Dispersionseinheit und das Vibrationssteuerungssystem ab. Oder drücken Sie auf „home“, um den Arm der Spritzenpumpe zurückzufahren. Dadurch wird auch die elektrostatische Dispersionseinheit und das Vibrationssystem deaktiviert.
9. Lassen Sie die Kugeln 5 Minuten aushärten.
10. Um die Aushärtungslösung aus dem Reaktionsgefäß abzulassen, die Ablaufklemme so langsam öffnen, dass das Ablassen der 500 mL etwa 1 bis 2 Minuten dauert. Schalten Sie den Magnetrührer aus, nachdem ca. $\frac{3}{4}$ der Flüssigkeit abgelaufen ist. Schließen Sie die Ablaufklemme sobald der Flüssigkeitsspiegel die abgesetzten Kugeln erreicht.

HINWEIS

Die Kugeln immer mit Lösung leicht bedeckt halten, um Klumpenbildung zu vermeiden.

11. Füllen Sie die Flasche des Flüssigkeitstransfer-Sets mit 400 mL Waschlösung und pumpen Sie diese in das Reaktionsgefäß. Starten Sie den Magnetrührer erst, wenn das Magnetrührstäbchen mit Flüssigkeit bedeckt ist, damit die Kugeln nicht beschädigt werden. Waschen Sie die Kugeln 5 Minuten und lassen Sie dann die Flüssigkeit wie oben beschrieben ab (Punkt 10).
12. Pumpen Sie die verbleibenden 200 mL Waschlösung in das Reaktionsgefäß. Schwemmen Sie die Kugeln durch Einschalten des Magnetrührers erneut auf.
13. Öffnen Sie das Kugelernteventil und lassen Sie die Kugeln in die Kugelernteflasche abfließen. Wenn sich im Reaktionsgefäß noch Kugeln befinden, Flüssigkeit aus der Kugelernteflasche in das Reaktionsgefäß zurückfließen lassen (die Kugelernteflasche über die Höhe des Reaktionsgefäßablaufs anheben). Schwemmen Sie die verbleibenden Kugeln mit der Flüssigkeit nochmals auf und spülen Sie diese zurück in die Kugelernteflasche (Flasche wieder unter der Höhe des Reaktionsgefäßes positionieren).
14. Klemmen Sie den Silikonschlauch, der vom Reaktionsgefäß zur Kugelernteflasche führt, mit der Klemme ab. Trennen Sie die Kugelernteflasche vom Reaktionsgefäß und prüfen Sie unter einem Mikroskop die Qualität der Kugeln.
15. Füllen Sie unmittelbar nach Abschluss des Kugelerzeugungprozesses eine Spritze mit destilliertem Wasser, bringen Sie sie an der Kugelerzeugungseinheit an und spülen Sie die Düse durch. So wird vermieden, dass das Polymer trocknet und das System verstopft, und dadurch ein Wartungsproblem verursacht. Reinigen Sie das Reaktionsgefäß gründlich, einschließlich der verschiedenen Ein- und Auslassöffnungen.

6.11 Hitzesterilisation des Reaktionsgefäßes

1. Setzen Sie das Reaktionsgefäß wie in Abschnitt 5.4 beschrieben zusammen.
2. Geben Sie 2 bis 5 mL Wasser in das Reaktionsgefäß.
3. Stellen Sie sicher, dass folgende Komponenten korrekt angeschlossen bzw. vorbereitet sind:
 - Die Düse hat die korrekte Größe
 - Die Elektrode ist unter der Düse zentriert
 - Sind die Luft- und Flüssigkeitsfilter angebracht?
 - Befindet sich im Reaktionsgefäß ein Magnetrührerstäbchen?
 - Ist die Kugelernteflasche angebracht?
 - Ist der Verbindungsweg vom Reaktionsgefäß zur Kugelernteflasche geöffnet (Ernteventil geöffnet)?
 - Ist der Ablaufschlauch mit der Klemme abgeklemmt?
 - Ist die Luer-Lock-Verbindung der Kugelerzeugungseinheit mit einem Luer-Lock-Blindstopfen verschlossen?
4. Stellen Sie das zusammengesetzte Reaktionsgefäß in den Autoklaven und führen Sie bei 121 °C eine 20-minütige Dampfsterilisation bzw. eine Sterilisation gemäß den Bedingungen Ihres Protokolls durch.
5. Nehmen Sie das heiße Reaktionsgefäß nach dem Autoklavieren möglichst umgehend aus dem Autoklaven um zu vermeiden, dass im Luftfilter Wasser kondensiert. Da ein vollständig durchnässter Luftfilter keine Luft mehr durchlässt, wäre es schwierig, Flüssigkeiten aus dem Reaktionsgefäß abzulassen, da sich dabei darin ein Unterdruck bildet. Um den Zustand des Luftfilters zu prüfen, eine 60 mL-Spritze am Filter anbringen. Wenn Sie den Kolben der Spritze vor- und zurückbewegen, sollte nur wenig Widerstand vorhanden sein.
6. Schließen Sie das Kugelernteventil erst nachdem das Reaktionsgefäß auf Raumtemperatur abgekühlt ist.

6.12 Sterilisation der Druckflasche

1. Setzen Sie die Druckflasche zusammen und verschließen Sie die Luer-Lock-Verbindung mit einem Luer-Lock-Blindstopfen.
2. Geben Sie 1 bis 2 mL Wasser in die Druckflasche. Stellen Sie die zusammengesetzte Druckflasche in den Autoklaven und führen Sie bei 121 °C eine 20-minütige Dampfsterilisation bzw. eine Sterilisation gemäß den Bedingungen Ihres Protokolls durch.

6.13 Verkapselungsverfahren zur Immobilisierung von Mikroorganismen in Ca-Alginat-Kugeln

In diesem Abschnitt wird ein einfaches, jedoch bewährtes Verfahren zur Immobilisierung von Mikroorganismen in Ca-Alginat-Kugeln beschrieben. Die Haltbarkeit dieser Kugeln ist nicht nur abhängig von dem verwendeten Alginat-Typ, sondern auch von den künftigen Bedingungen der Kultur. Die Ca-Ionen in der Aushärtungslösung ersetzen die Na-Ionen in den Tröpfchen und bewirken das Aushärten der Alginat-Kugeln (dies ist eine reversible Reaktion). Wenn Kugeln von größerer Resistenz erforderlich sind (weil einige Kulturmedien Bestandteile enthalten, welche die Kugeln langsam auflösen), können anstelle von Ca-Ionen Ba-Ionen eingesetzt werden, da diese im Vergleich zu Ca-Ionen eine größere Affinität zu Alginat haben und die resultierenden Ba-Alginat-Kugeln stabiler sind.

Die beste Methode für die Sterilisation von Alginatlösungen ist die Verwendung von sterilen Membranfiltern (0,2 µm). Eine Hitzesterilisation führt oft zu einer teilweisen Zersetzung des Alginats und zu nicht vorhersehbaren Änderungen der Viskosität und Polymerisationsfähigkeit.

Für die Verkapselung von tierischen Zellen wird die Verwendung eines anderen Protokolls empfohlen, da die dreidimensionale Struktur von Ca-Alginat bei der Zellteilung die Bildung der neuen Zellmembrane behindert. Für Zellteilungen sind Kapseln besser geeignet. Ein Verfahren zur Erzeugung von Alginat-PLL-Kapseln wird in *Abschnitt 6-14* beschrieben.

1. Bereiten Sie das erforderliche Material wie in *Abschnitt 6-10* beschrieben vor: Reaktionsgefäß, Druckflasche, 60 mL-Spritze, Bechergläser, Messzylinder, usw. Autoklavieren Sie das Reaktionsgefäß.
2. Stellen Sie alle erforderlichen Verkapselungsreagenzien her.

Für diesen Lauf:	50 mL	1,5 % Alginatlösung, niedrige Viskosität, steril filtriert
	500 mL	100 mM CaCl ₂ -Polymerisationslösung (nicht-steril)
	600 mL	0,9 % NaCl + 10 mM CaCl ₂ -Waschlösung (nicht-steril)
3. Schalten Sie die Steuerungseinheit ein. Stellen Sie die Vibrationsfrequenz, die elektrostatische Spannung und die Pumprate auf die entsprechenden Werte, die zuvor bestimmt wurden.
4. Geben Sie 500 mL Polymerisationslösung in die Druckflasche und verschließen Sie diese. Bringen Sie den Silikonschlauch am Flüssigkeitsmembranfilter an. Pumpen Sie die Polymerisationslösung in das Reaktionsgefäß.
5. Entfernen Sie den Silikonschlauch vom Membranfilter und stellen Sie das Reaktionsgefäß in eine Sicherheitswerkbank.
6. Bereiten Sie 10 mL konzentrierte Mikroorganismen-Suspension vor. Die Suspension sollte frei von zwei- oder dreiwertigen Kationen (z.B. Ca, Mg, Al, Fe) sein oder diese nur in sehr geringer Konzentration enthalten, um vorzeitige Polymerisationsreaktionen mit dem Alginat zu vermeiden. Wählen sie die gewünschte Mikroorganismen-Konzentration entsprechend der Konzentration im endgültigen Polymergemisch < 10¹⁰ Zellen/ml (für tierische Zellen < 10⁷ Zellen/ml). Mischen Sie die 10 mL Mikroorganismen-Suspension mit 50 mL 1,5 % steriler Alginatlösung vorsichtig, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden.
7. Füllen Sie aseptisch eine sterile 60 mL-Spritze mit dem Polymer/Produktgemisch. Bringen Sie die Spritze an der Kugelerzeugungseinheit an. Bringen Sie das Reaktionsgefäß (mit der montierten Spritze) an der Steuerungseinheit an. Fahren Sie den Arm der Spritzenpumpe vor, bis er den Kolben berührt. Starten Sie den Magnetrührer so, dass ein leichter Wirbel zu sehen ist. Aktivieren Sie die Vibration und die Spritzenpumpe. Drücken Sie auf die „turbo“-Schaltfläche. Sobald ein Flüssigkeitsstrahl entstanden ist, drücken Sie erneut auf die „turbo“-Schaltfläche. Aktivieren Sie die elektrostatische Dispersionseinheit. Ändern Sie bei Bedarf die Pumprate oder/und die Frequenz so, dass Sie bis hinunter zum Auffangbecher eine klar sichtbare Tropfenkette erhalten.

8. Sobald die Tropfenkette stabil ist, den Auffangbecher aus dem Flüssigkeitsstrahl herausschwenken, um mit dem eigentlichen Tropfenherstellprozess zu beginnen. Stellen Sie sicher, dass der Tropfenstrom 3 bis 10 cm unterhalb der Elektrode zu streuen beginnt. Ein Abstand von ca. 5 cm unterhalb der Elektrode ist optimal. Passen Sie die elektrostatische Spannung an, um diese Vorgabe zu erreichen.
9. Notieren Sie während der Überwachung der Tropfenherstellung die genauen Prozessparameter.
10. Kurz bevor der Kolben der Spritze vollständig durchgedrückt ist, muss der Auffangbecher in den Tropfenstrom zurückgedreht werden. Stoppen Sie die Pumpe. Schalten Sie die elektrostatische Dispersionseinheit und das Vibrationssteuerungssystem ab.
11. Lassen Sie die Kugeln 5 Minuten lang aushärten.
12. Um die Aushärtungslösung aus dem Reaktionsgefäß abzulassen, die Ablaufklemme so langsam öffnen, dass das Ablassen der 500 mL etwa 1 bis 2 Minuten dauert. Schalten Sie den Magnetrührer aus, nachdem ca. $\frac{3}{4}$ der Flüssigkeit abgelaufen ist. Schließen Sie die Ablaufklemme sobald der Flüssigkeitsspiegel die abgesetzten Kugeln erreicht.

HINWEIS

Die Kugeln immer mit Lösung leicht bedeckt halten, um Klumpenbildung zu vermeiden.

13. Füllen Sie die Druckflasche mit 400 mL Waschlösung und pumpen Sie diese in das Reaktionsgefäß. Starten Sie den Magnetrührer, wenn das Magnetrührstäbchen mit Flüssigkeit bedeckt ist, damit die Kugeln nicht beschädigt werden. Waschen Sie die Kugeln 5 Minuten und lassen Sie dann die Flüssigkeit wie oben beschrieben ab (Punkt 12).
14. Pumpen Sie die verbleibenden 200 mL Waschlösung in das Reaktionsgefäß. Schwemmen Sie die Kugeln durch Einschalten des Magnetrührers erneut auf.
15. Öffnen Sie das Kugelernteventil und lassen Sie die Kugeln in die Kugelernteflasche abfließen.
16. Klemmen Sie den Silikonschlauch, der vom Reaktionsgefäß zur Kugelernteflasche führt, mit der Klemme ab. Trennen Sie die Kugelernteflasche vom Reaktionsgefäß und prüfen Sie unter einem Mikroskop die Qualität der Kugeln.
17. Füllen Sie unmittelbar nach Abschluss des Kugelherstellprozesses eine Spritze mit destilliertem Wasser, bringen Sie sie an der Kugelerzeugungseinheit an und spülen Sie die Düse durch. So wird vermieden, dass das Polymer trocknet und das System verstopft, und dadurch ein Wartungsproblem verursacht. Reinigen Sie das Reaktionsgefäß.

6.14 Verkapselungsprotokoll für Alginate-PLL-Alginate-Membrane

Die Alginate-Polylysin-Alginate-Membran ist ein sehr bewährtes Verkapselungssystem für Tierzellen, das erstmals von Lim und Sun¹ beschrieben wurde. Nachfolgend finden Sie ein erprobtes Protokoll.

Erforderliche Lösungen

- | | | |
|----|--------------------------|---|
| 1. | 1,5 % Alginate-Lösung: | 1,5 % geringviskoses Alginate in MOPS-Waschpuffer
pH auf 7,0 bei 25 °C einstellen
sterile Filtrierung mit einem 0,2 µm-Filter |
| 2. | Polymerisationslösung: | 10 mM MOPS (Morpholinpropan-Sulfonsäure)
100 mM CaCl ₂
pH = 7,2 bei 25 °C |
| 3. | PLL-Lösung: | 0,05 % Poly-L-Lysin MG 15.000 – 30.000 in MOPS-Waschpuffer |
| 4. | MOPS-Waschpuffer: | 10 mM MOPS (Morpholinpropan-Sulfonsäure)
0,85 % NaCl
pH = 7,2 bei 25 °C |
| 5. | 0,03 % Alginate-Lösung: | 2 mL 1,5 % Alginate-Lösung.
+ 98 ml MOPS-Waschpuffer. |
| 6. | Depolymerisationslösung: | 50 mM Na ₃ -Citrat
0,45 % NaCl
10 mM MOPS
pH = 7,2 bei 25 °C |

Für eine Verkapselung von 12 mL Polymer-Produktgemisch wird Folgendes benötigt:

- 12 mL 1,5 % Alginate-Lösung (steril filtriert)
- 100 mL 0,03 % Alginate-Lösung (nicht steril)
- 225 mL Polymerisationslösung (nicht steril)
- 75 mL PLL-Lösung (nicht steril)
- 900 mL MOPS-Waschpuffer (nicht steril)
- 200 mL Depolymerisationslösung (nicht steril)

¹Lim F. and Sun A.M. 1980. Microencapsulated Islets as Bioartificial Pancreas. Science 210: S. 908-910.

Verfahren

1. Bereiten Sie das Reaktionsgefäß vor und autoklavieren Sie es wie im *Abschnitt 6.10* und *6.11* beschrieben.
2. Bereiten Sie alle Lösungen und Laborgeräte vor.
3. Füllen Sie das autoklavierte Reaktionsgefäß mit 225 mL Polymerisationslösung.
4. Ein Zellkultur mit ca. 6×10^6 Zellen (oder nach individuellem Bedarf) wird zentrifugiert und das Pellet wird in 2 mL sterilem MOPS-Waschpuffer wieder aufgeschlemmt und mit 10 mL 1,5 % Natriumalginat-Lösung gemischt. Darauf achten, dass während des Mischens keine oder nur wenige Luftblasen eingerührt werden.
5. Füllen Sie eine 20 mL-Spritze mit der Zell-Alginat-Suspension und bringen Sie die Spritze in einer Sicherheitswerkbank an dem Reaktionsgefäß an.
6. Befestigen Sie das Reaktionsgefäß an der Encapsulator-Steuerungseinheit, die auf der Werkbank steht.
7. Beginnen Sie die Tropfenherstellung mit den zuvor festgelegten Parametern.
8. Lassen Sie die Kugeln 5 Minuten aushärten, schalten Sie danach den Rührer ab und lassen Sie die Polymerisationslösung ab.

HINWEIS

Die Kugeln und später die Kapseln sollten immer leicht mit Flüssigkeit bedeckt sein, um Klumpenbildung zu vermeiden. Andernfalls könnte das erneute Aufschwimmen der Kugeln und Kapseln Schwierigkeiten bereiten, und die Membran könnte beschädigt werden.

9. Pumpen Sie 75 mL 0,05 % PLL-Lösung ein und warten Sie 10 Minuten bis sich die PLL-Alginatmembran gebildet hat.
10. Lassen Sie die 0,05 % PLL-Lösung ablaufen.
11. Pumpen Sie 150 mL MOPS-Waschpuffer ein, rühren Sie 1 Minute und lassen Sie diese dann ablaufen.
12. Pumpen Sie nochmals 150 mL MOPS-Waschpuffer ein, rühren Sie 5 Minuten und lassen Sie den Puffer dann ablaufen.
13. Pumpen Sie 100 mL 0,03 % Alginat-Lösung ein und rühren Sie 5 Minuten, damit sich die äußere Alginat-Membran bilden kann, und lassen Sie dann die Alginat-Lösung ab.
14. Pumpen Sie 150 mL MOPS-Waschpuffer ein, rühren Sie 1 Minute und lassen Sie dann den Puffer ab.
15. Pumpen Sie 150 mL Depolymerisationslösung ein und rühren Sie ca. 10 Minuten, um das Alginat des Kugelkerns aufzulösen. Die korrekte Lösungsdauer ist vom Molekulargewicht und der Reinheit des Alginats abhängig, sowie von der Empfindlichkeit des Verkapselungsproduktes gegenüber der Depolymerisationslösung.
16. Lassen Sie die Depolymerisationslösung ablaufen.
17. Pumpen Sie 150 mL MOPS-Waschpuffer ein, schlemmen Sie die Kapseln wieder auf und füllen Sie diese in die Kugelernteflasche.
18. Bringen Sie die Kapseln in ein Kulturmedium und kultivieren Sie diese.

HINWEIS

Gelöstes Alginat diffundiert nur langsam nach außen. In Abhängigkeit von dem verwendeten Alginat und der Stärke der Kapselmembran kann es bis zu 2 Stunden dauern, bis größere Mengen die Kapsel verlassen haben. Um das Auflösen des Kerns zu maximieren können Sie:

- Eine längere Extraktionszeit in MOPS oder in einem Kulturmedium ohne zweiwertige Ionen wählen.
- Die Zellen in einem Medium mit < 50 mg/l Ca-Ionen kultivieren.
- Die Zellen in einem Medium mit einem Verhältnis von einwertigen Ionen (Na^+ , K^+) zu zweiwertigen Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) zwischen 20:1 und 50:1 kultivieren.

Spezielle Empfehlungen für Zellen

Für sich teilende Zellen – lösen Sie das Kernalginat auf, behalten Sie dann im Kulturmedium ein Na/Ca-Verhältnis von $> 20:1$ bei, so dass sich der Kern nicht wieder verfestigt.

Für ruhende Zellen – Sie können die Alginat-Kernstruktur geliert lassen, Sie können sogar Ba^{2+} verwenden, ein stärker gelierendes Ion als Ca^{2+} . Ba-Alginat ist extrem stabil und kann auch über Tage nicht durch eine 50 mM-Citrat-Lösung gelöst werden.

Siehe auch: Gröhn P. et al. 1994. Large-scale production of Ba^{2+} alginate-coated islets of Langerhans for immunoisolation. Exp. Clin. Endocrinol. 102: S. 380-387.

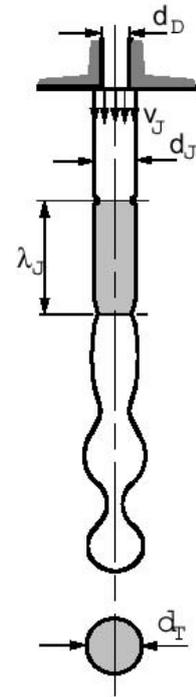
6.15 Theorie

Gleich. 1:
$$f = \frac{v}{\lambda} [\text{Hz}]$$

Wenn ein laminarer Strahl mit der Frequenz f mechanisch gestört wird, bilden sich Tropfen gleicher Größe¹. Die optimale Wellenlänge λ_{opt} für das Aufbrechen ergibt sich nach Weber² durch folgende Gleichung:

Gleich. 2:
$$\lambda_{\text{opt}} = \pi \sqrt{2} D \cdot \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma D}}} [m]$$

wobei: D = Durchmesser der Düse
 η = dynamische Viskosität [Pa s]
 ρ = Dichte [kg/m³]
 (ca. 1000 kg/m³ für Alginatlösungen)
 σ = Oberflächenspannung [N/m]
 (ca. 55×10^{-3} N/m für Alginatlösungen)



λ_{opt} ist die optimale Wellenlänge, um die beste Kugelbildung für den gegebenen Düsendurchmesser und für die gegebene Viskosität der Verkapselungsmischung zu erhalten. Es ist möglich, λ_{opt} um 30 % zu ändern und immer noch eine gute Kugelbildung zu erzielen.

Der Durchmesser einer Kugel = d [m] kann mit Hilfe der Fließrate = V' [m³/s] und der Pulsationsfrequenz f wie folgt berechnet werden:

Gleich. 3:
$$d = \sqrt[3]{\frac{6V'}{\pi f}} [m]$$

Die Geschwindigkeit des Strahls = v [m/s] und der Düsendurchmesser = D [m] korrelieren mit der Fließrate (V') wie folgt:

Gleich. 4:
$$V' = \frac{\pi v D^2}{4} [m^3/s]$$

Abbildung 6-5 zeigt die mit Gleichung 4 berechnete Abhängigkeit der Fließrate von der Geschwindigkeit des Strahls und dem Düsendurchmesser. Da die Flüssigkeit laminar fließen muss, liegt der Arbeitsbereich der Strahlgeschwindigkeit normalerweise zwischen 1,5 und 2,5 m/s – abhängig von der Viskosität der Flüssigkeit und dem Düsendurchmesser.

¹Lord Rayleigh 1878. Proc. London Math. Soc. 10:4.

²Weber C. 1936. Zeitschrift für angewandte Mathematik und Mechanik. 11:136.

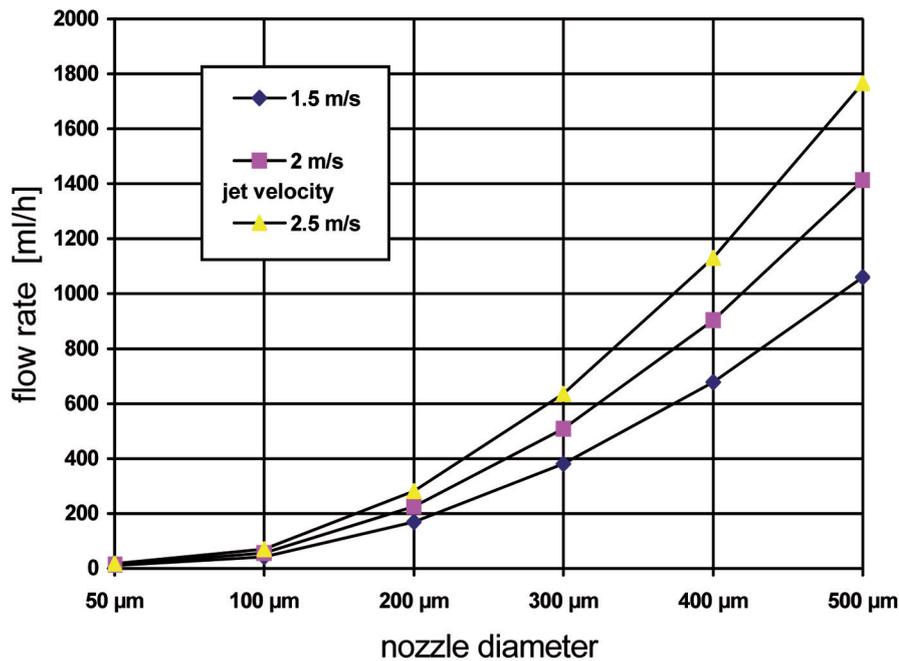


Abbildung 6-5: Nach Gleichung 4 berechneter Einfluss der Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstrahls und des Düsendurchmessers auf die Fließrate.

Abbildung 6-6 zeigt für fünf verschiedene Fließraten die mit Gleichung 4 berechnete Korrelation zwischen der Vibrationsfrequenz und dem Kugeldurchmesser. Geringere Fließraten, die geringeren Pumpraten entsprechen, erzeugen kleinere Kugeln. Höhere Vibrationsfrequenzen erzeugen ebenfalls kleinere Kugeln.

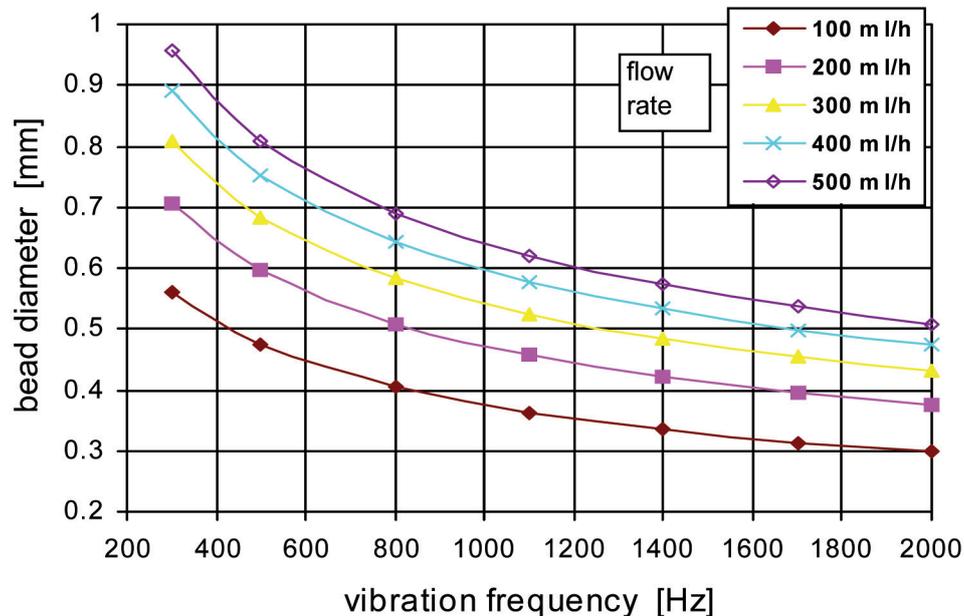


Abbildung 6-6: Nach Gleichung 4 berechneter Einfluss der Vibrationsfrequenz und der Fließrate auf den Kugeldurchmesser.

Tabelle 6-7: Mit Alginatlösung bestimmte optimale Arbeitsbedingungen für den Encapsulator

Düsendurchmesser [µm]	Fließrate * [ml/min]	Frequenzintervall **	Amplitude	Luftdruck [bar]
1,0 mm	30 bis 40	40 bis 220 Hz	2 bis 6	0,3 bis 0,6
750 µm	19 bis 25	40 bis 300 Hz	2 bis 5	0,3 bis 0,5
450 µm	9 bis 14	150 bis 450 Hz	2 bis 5	0,3 bis 0,5
300 µm	5,5 bis 7	400 bis 800 Hz	1 bis 3	0,3 bis 0,5
200 µm	3,5 bis 4,5	600 bis 1200 Hz	1 bis 3	0,4 bis 0,6
150 µm	2,3 bis 2,8	800 bis 1800 Hz	1 bis 3	0,4 bis 0,6
120 µm	1,5 bis 1,8	1000 bis 2500 Hz	1 bis 4	0,5 bis 0,7
80 µm	1,1 bis 1,3	1300 bis 3000 Hz	1 bis 4	0,5 bis 0,7

* Getestet mit niederviskoser 2 % Alginat-Lösung bei der 750 µm- und 1,0 mm-Düse, mit 1,5 % Alginat-Lösung bei den 150 bis 500 µm-Düsen und mit 1,2 % Alginat-Lösung bei der 80- und 120 µm-Düse.

**Obere Werte unter Verwendung von Hochspannung.

HINWEIS

Für Lösungen mit einer anderen Viskosität als die der getesteten Lösungen gilt:

- je höher die Viskosität, umso höher die Mindestgeschwindigkeit des Strahls
- je höher die Viskosität, umso höher die Arbeitsfließrate
- je höher die Viskosität, umso niedriger die optimale Frequenz
- je höher die Viskosität, umso größer die Kugeln

6.15.1 Kugelproduktivität und Zelldichte

In den *Abbildungen 6-7* und *6-8* sind die Kugelmengen dargestellt, die aus 1 ml Flüssigkeit gebildet werden. Bei einem Durchmesser von 0,4 mm werden etwa 30.000 Kugeln gebildet, jedoch nur 2000 Kugeln bei einem Durchmesser von 1 mm.

In den *Abbildungen 6-9* und *6-10* ist die Anzahl von Zellen aufgeführt, die bei einer bestimmten Zelldichte und einem vorgegebenen Kugeldurchmesser in einer Kugel eingekapselt werden. Diese *Abbildungen* können Ihnen helfen, für das Immobilisierungsgemisch die geeignete Zelldichte zu wählen. Wenn das Immobilisierungsgemisch beispielsweise 1×10^6 Zellen pro ml enthält, befinden sich in jeder 0,4 mm-Kugel durchschnittlich ca. 33 Zellen, in jeder 1 mm-Zelle sind jedoch 520 Zellen enthalten.

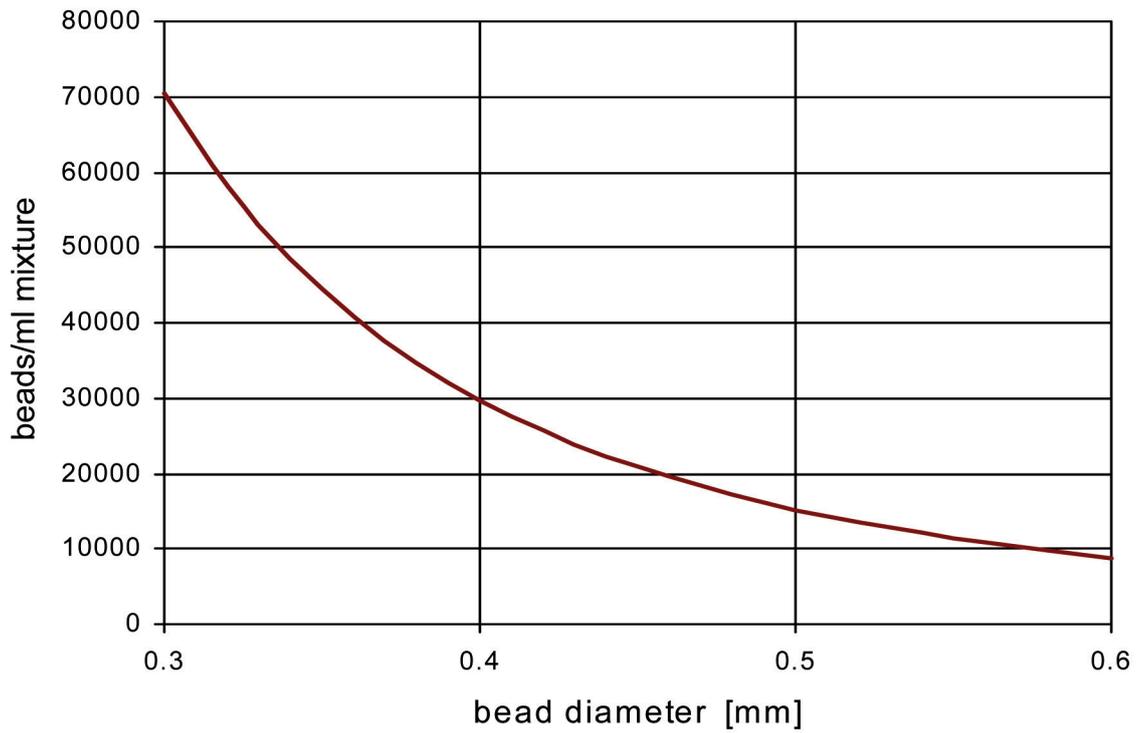


Abbildung 6-7: Anzahl Kugeln mit einem Durchmesser von 0,3 bis 0,6 mm, die aus 1 mL Immobilisierungsgemisch erzeugt werden.

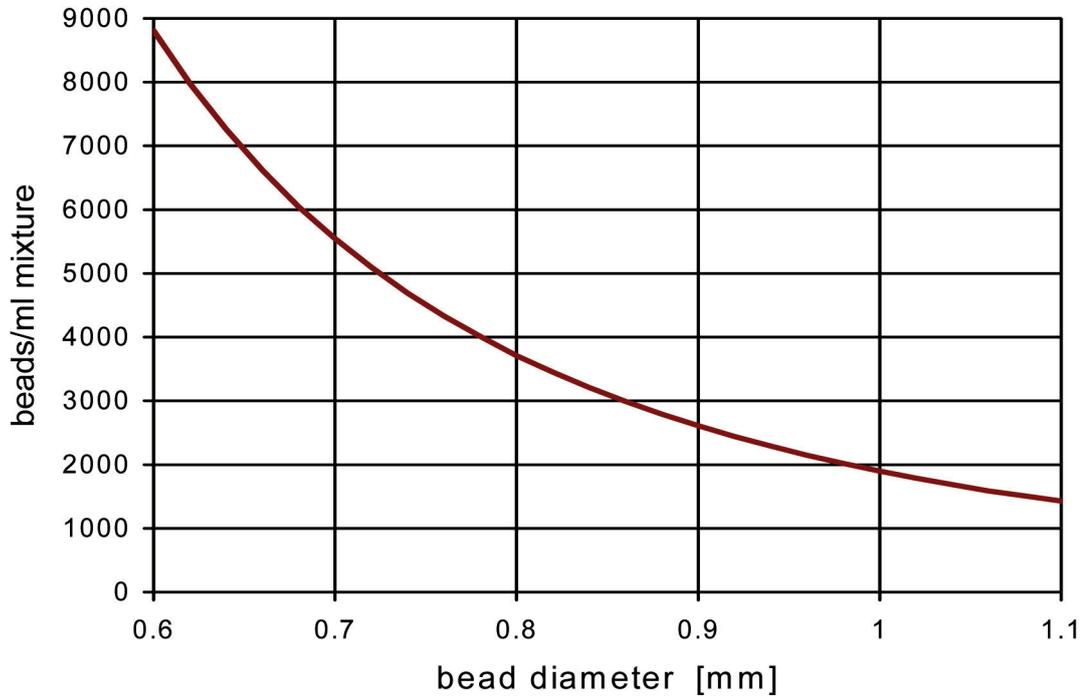


Abbildung 6-8: Anzahl Kugeln mit einem Durchmesser von 0,6 bis 1,1 mm, die aus 1 mL Immobilisierungsgemisch erzeugt werden.

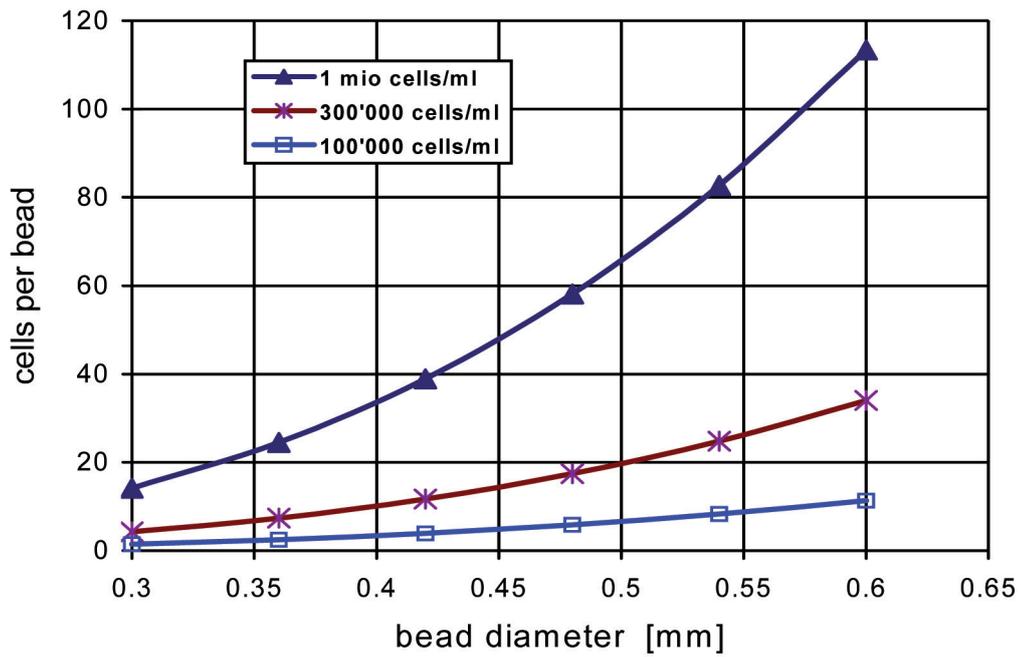


Abbildung 6-9: Anzahl von Zellen pro Kugel für Kugeldurchmesser von 0,3 bis 0,6 mm und verschiedene Zellkonzentrationen.

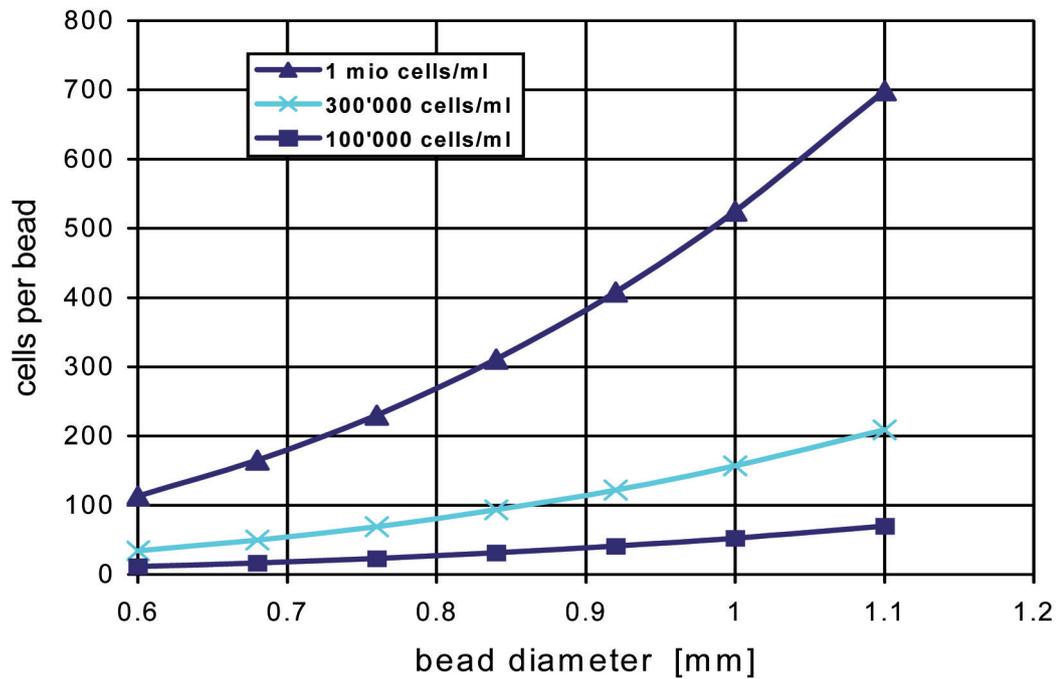


Abbildung 6-10: Anzahl von Zellen pro Kugel für Kugeldurchmesser von 0,6 bis 1,1 mm und verschiedene Zellkonzentrationen.

7 Wartung und Reparaturen

Dieses Kapitel enthält Anleitungen für Wartungstätigkeiten, die durchgeführt werden müssen, um den ordnungsgemäßen und sicheren Arbeitszustand des Gerätes zu gewährleisten. Alle Wartungs- und Reparaturarbeiten, bei denen das Gerätegehäuse geöffnet oder entfernt werden muss, sind von entsprechend geschultem Personal und nur mit für diesen Zweck vorgesehenem Werkzeug durchzuführen.

HINWEIS

Verwenden Sie für Wartung und Reparatur nur Original-Verbrauchsteile und Original-Ersatzteile, um Garantieabdeckung und optimalen Systembetrieb sicherzustellen. Der Encapsulator B-395 Pro und zugehörige Teile dürfen nur nach vorheriger schriftlicher Zustimmung durch den Hersteller modifiziert werden.

7.1 Kundendienst

Das Gerät darf nur von autorisiertem Servicepersonal repariert werden. Voraussetzung für eine solche Autorisierung ist eine umfassende technische Schulung und Kenntnis der potenziellen Gefahren, die beim Arbeiten mit dem Gerät auftreten können. Diese Schulung und Kenntnisse können nur von BÜCHI bereitgestellt bzw. vermittelt werden.

Adressen der offiziellen BÜCHI Kundendienstbüros finden Sie auf der BÜCHI-Website unter: www.buchi.com. Wenn an Ihrem Gerät Störungen auftreten oder wenn Sie Fragen zur Technik oder zu Anwendungen haben, können Sie sich an eines dieser Büros wenden.

Der Kundendienst bietet folgende Leistungen an:

- Ersatzteillieferung
- Reparaturen
- Technische Beratung

7.2 Gehäusezustand

Prüfen Sie das Gehäuse regelmäßig auf sichtbare Schäden (Schalter, Buchsen, Risse) und reinigen Sie es mit einem feuchten Tuch.

Die Steuerungseinheit des Encapsulators sollte wie jede andere elektrische Ausrüstung behandelt werden. Die Frontabdeckung ist mit einer Polyamidschicht überzogen, so dass diese mit einer milden Reinigungsmittellösung oder Alkohol gereinigt werden kann.

7.3 Zustand der Dichtungen

Es wird empfohlen, die Abdichtung regelmäßig auf ordnungsgemäßen Zustand zu prüfen. Dichtungen, O-Ringe und Silikonschläuche müssen in regelmäßigen Abständen ausgetauscht werden (etwa einmal pro Jahr). Alle Teile vor der Verwendung prüfen und bei Bedarf ersetzen.

7.4 Reinigen

  	! Warnung
	<p>Druckzunahme im Einlasssystem wegen verstopfter Düsen. Bersten des Einlasssystems.</p>
	<p>Tödliche oder schwere Vergiftung durch Kontakt mit oder Aufnahme von eingesetzten schädlichen Substanzen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Düse sofort nach Verwendung reinigen, siehe folgender Abschnitt.

	Labormantel tragen
	Schutzbrille tragen
	Schutzhandschuhe tragen

7.4.1 Reinigen der Düse nach jedem Verkapselungsexperiment

Es ist sehr wichtig, dass die Düse sofort nach der Verwendung gereinigt wird, damit das Verkapselungsmedium (Alginat, usw.) nicht eintrocknet und das System verstopft.

1. Belassen Sie die Düse an der Kugelerzeugungseinheit.
2. Bringen Sie eine 20 mL- oder 60 mL-Spritze an der Kugelerzeugungseinheit an und injizieren Sie 20 bis 60 mL destilliertes Wasser oder Lösungsmittel, welches für das Verkapselungspolymer verwendet wurde.
3. Falls erforderlich, die Düse von der Kugelerzeugungseinheit abschrauben, mit deionisiertem Wasser (siehe *Abbildung 7-1*) oder einem geeigneten Lösungsmittel spülen, und die Düse mit Druckluft trocknen.

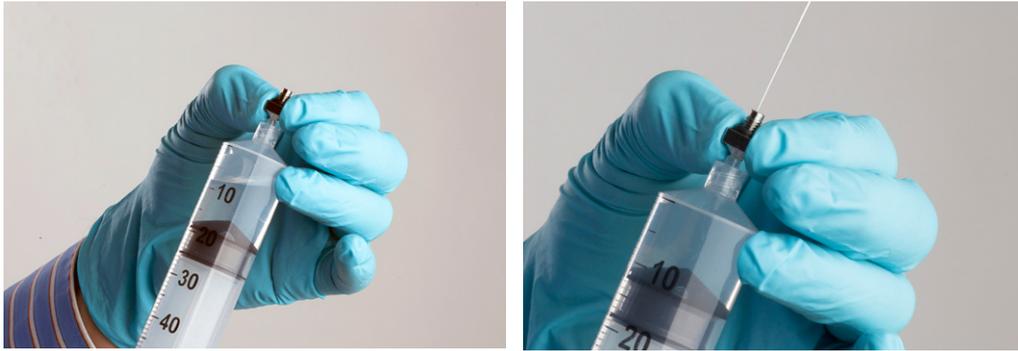


Abbildung 7-1: Reinigen der Düse

- Nehmen Sie eine Spritze, die im oberen Bereich Luft und im unteren Bereich Wasser enthält.
- Drücken Sie die Luft durch die Düse (linke Abbildung).
- Drücken Sie das Wasser unmittelbar danach durch die Düse (rechte Abbildung).
- Untersuchen Sie die Düsen Spitze unter einem Stereomikroskop und vergewissern Sie sich, dass die Öffnung frei und sauber ist.

HINWEIS

Wenn lipophile Immobilisierungslösungen eingesetzt wurden, müssen für das Reinigen entsprechende Lösungsmittel verwendet werden. Verwenden Sie für Alginate keine saure Lösung, da diese eine Fällung erzeugen würde.

7.4.2 Reinigen einer verstopften Düse

Schrauben Sie die Düse ab. Blasen Sie gemäß *Abbildung 7-1* Luft durch die Düse.

Wenn die Spitze/Öffnung der Düse nicht frei ist, die Düse entsprechend der Verkapselungsmischung in Wasser, dem entsprechenden Lösungsmittel, in 1N NaOH oder 1N Schwefelsäure (niemals HCl verwenden) 1 Stunde bei Raumtemperatur „einweichen“ und dabei regelmäßig schwenken. Ultraschallreinigung ist bei reinen Edelstahldüsen ebenfalls ein geeignetes Hilfsmittel. Tragen Sie entsprechende Schutzausrüstung. Mit destilliertem Wasser spülen, mit Druckluft durchblasen und trocknen lassen.

Untersuchen Sie die Düsen Spitze unter einem Stereomikroskop und vergewissern Sie sich, dass die Öffnung frei und sauber ist.

HINWEIS

Wenn lipophile Immobilisierungslösungen eingesetzt wurden, müssen für das Reinigen entsprechende Lösungsmittel verwendet werden. Verwenden Sie für Alginate keine saure Lösung, da diese eine Fällung erzeugen würde.

7.4.3 Reinigen des Reaktionsgefäßes und der anderen Gefäße

Nehmen Sie das Reaktionsgefäß auseinander. Der Magnethalter darf jedoch nicht demontiert werden! Zerlegen Sie das Flüssigkeitstransfersystem.

Waschen Sie alle Teile – ausgenommen die Luftfilter – je nach Eignung mit einer milden Reinigungsmittellösung, 0,01N NaOH oder 0,01N Schwefelsäure (niemals HCl verwenden).

Gründlich mit heißem Wasser, dann mit destilliertem Wasser spülen und trocknen lassen.

8 Fehlerbehebung

8.1 Fehler und deren Behebung

Die nachfolgende Tabelle führt mögliche Funktionsstörungen und deren Ursachen auf. Stellen Sie zu deren Behebung den Parameter schrittweise in die entgegengesetzte Richtung ein oder korrigieren Sie den Fehler.

Tabelle 8-1: Mögliche Ursache

Problem	Mögliche Ursache
Instabiler Flüssigkeitsstrom	Die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit ist zu gering.
	Die Düse wurde nicht ausreichend gereinigt (häufige Ursache).
	Die Frequenz ist zu hoch.
	Die Amplitude ist zu hoch.
Instabile Tropfenkette	Die Frequenz ist zu hoch oder zu niedrig.
	Die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit ist zu hoch oder zu niedrig.
	Die Düse wurde nicht ausreichend gereinigt.
Die Größenverteilung der Kugeln ist nicht homogen	Die Amplitude ist zu niedrig oder zu hoch.
	Die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit ist zu hoch.
	Die Frequenz ist zu hoch.
	Die elektrostatische Spannung ist zu gering.
Die Tropfenkette trennt sich nicht auf	Die Immobilisierungsmischung ist eine nicht-Newton'sche Flüssigkeit, daher Probleme beim Extrudieren oder Prillen.
	Die Elektrode ist nicht an die Steuerungseinheit angeschlossen.
	Die elektrische Spannung ist zu gering.
Im Stroboskoplicht sind keine Tropfen zu erkennen	Die Elektrode ist nicht eingeschaltet.
	Die Vibrationseinheit ist nicht aktiviert.
	Die Vibrationseinheit wurde nicht auf der Kugelerzeugungseinheit angebracht.
	Die Vibrationsfrequenz ist zu niedrig oder zu hoch.
	Die Viskosität der Immobilisierungsmischung ist zu hoch.

9 Abschalten, Lagerung, Transport und Entsorgung

Dieses Kapitel beschreibt, wie das Gerät für Lagerung oder Transport abzuschalten und zu verpacken ist. Außerdem werden die Lagerungs- und Versandbedingungen spezifiziert.

9.1 Lagerung und Transport

Schalten Sie das Gerät ab und ziehen Sie das Netzkabel ab. Beim Demontieren des Encapsulator B-395 Pro die Installationsanleitung in Abschnitt 5 in umgekehrter Reihenfolge befolgen. Vor dem Verpacken des Gerätes alle Flüssigkeiten und Staubablagerungen entfernen.

	<p>! Warnung</p> <p>Tödliche oder schwere Vergiftung durch Kontakt mit oder Aufnahme von schädlichen Substanzen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Schutzbrille tragen • Sicherheitshandschuhe tragen • Labormantel tragen • Das Gerät und alle Zubehörteile gründlich reinigen, um potenziell gefährliche Substanzen zu entfernen • Verstaubte Teile nicht mit Druckluft reinigen • Das Gerät und seine Zubehörteile in seiner Originalverpackung an einem trockenen Ort lagern
--	--

9.2 Entsorgung

Um eine umweltfreundliche Entsorgung des Gerätes sicherzustellen, wurde in *Kapitel 3.3* eine Liste der verwendeten Materialien aufgeführt. Diese soll helfen, die Komponenten korrekt zu trennen und zu recyceln.

Bei der Entsorgung sind die geltenden regionalen und lokalen Gesetze einzuhalten. Wenden Sie sich an die zuständigen lokalen Behörden, wenn Sie hierzu Informationen oder Hilfe benötigen!

HINWEIS

Wenn Sie das Gerät zu Reparaturzwecken an den Hersteller zurückgeben, füllen Sie bitte eine Kopie des Gesundheits- und Sicherheitserklärungsformulars in Abschnitt 10.2 aus und legen Sie diese dem Gerät bei.

10 Erklärungen und Normen

10.1 FCC-Bestimmungen (für USA und Kanada)

English:

This equipment has been tested and found to comply with the limits for a Class A digital device, pursuant to both Part 15 of the FCC Rules and the radio interference regulations of the Canadian Department of Communications. These limits are designed to provide reasonable protection against harmful interference when the equipment is operated in a commercial environment.

This equipment generates, uses and can radiate radio frequency energy and, if not installed and used in accordance with the instruction manual, may cause harmful interference to radio communications. Operation of this equipment in a residential area is likely to cause harmful interference in which case the user will be required to correct the interference at his own expense.

Français:

Cet appareil a été testé et s'est avéré conforme aux limites prévues pour les appareils numériques de classe A et à la partie 15 des réglementations FCC ainsi qu'à la réglementation des interférences radio du Canadian Department of Communications. Ces limites sont destinées à fournir une protection adéquate contre les interférences néfastes lorsque l'appareil est utilisé dans un environnement commercial.

Cet appareil génère, utilise et peut irradier une énergie à fréquence radioélectrique, il est en outre susceptible d'engendrer des interférences avec les communications radio, s'il n'est pas installé et utilisé conformément aux instructions du mode d'emploi. L'utilisation de cet appareil dans les zones résidentielles peut causer des interférences néfastes, auquel cas l'exploitant sera amené à prendre les dispositions utiles pour palier aux interférences à ses propres frais.

10.2 Gesundheits- und Sicherheitserklärung

Health and Safety Clearance

Declaration concerning safety, potential hazards and safe disposal of waste.

For the safety and health of our staff, laws and regulations regarding the handling of dangerous goods, occupational health and safety regulations, safety at work laws and regulations regarding safe disposal of waste, e.g. chemical waste, chemical residue or solvent, require that this form must be duly completed and signed when equipment or defective parts were delivered to our premises.

Instruments or parts will not be accepted if this declaration is not present.

Equipment

Model:

Part/Instrument no.:

1.A Declaration for non dangerous goods

We assure that the returned equipment

- has not been used in the laboratory and is new
- was not in contact with toxic, corrosive, biologically active, explosive, radioactive or other dangerous matters.
- is free of contamination. The solvents or residues of pumped media have been drained.



1.B Declaration for dangerous goods

List of dangerous substances in contact with the equipment:

Chemical, substance	Danger classification

We assure for the returned equipment that

- all substances, toxic, corrosive, biologically active, explosive, radioactive or dangerous in any way which have pumped or been in contact with the equipment are listed above.
- the equipment has been cleaned, decontaminated, sterilized inside and outside and all inlet and outlet ports of the equipment have been sealed.

2. Final Declaration

We hereby declare that

- we know all about the substances which have been in contact with the equipment and all questions have been answered correctly
- we have taken all measures to prevent any potential risks with the delivered equipment.

Company name or stamp: _____

Place, date: _____

Name (print), job title (print): _____

Signature: _____

BÜCHI Tochtergesellschaften:

Europa

<p>Schweiz/Österreich</p> <p>BÜCHI Labortechnik AG CH – 9230 Flawil T +41 71 394 63 63 F +41 71 394 65 65 buchi@buchi.com www.buchi.com</p>	<p>Benelux</p> <p>BÜCHI Labortechnik GmbH Branch Office Benelux NL – 3342 GT Hendrik-Ido-Ambacht T +31 78 684 94 29 F +31 78 684 94 30 benelux@buchi.com www.buchi.be</p>	<p>Frankreich</p> <p>BUCHI Sarl FR – 94656 Rungis Cedex T +33 1 56 70 62 50 F +33 1 46 86 00 31 france@buchi.com www.buchi.fr</p>	<p>Deutschland</p> <p>BÜCHI Labortechnik GmbH DE – 45127 Essen T +800 414 0 414 0 (Toll Free) T +49 201 747 490 F +49 201 747 492 0 deutschland@buchi.com www.buechigmbh.de</p>
<p>Italien</p> <p>BUCHI Italia s.r.l. IT – 20010 Cornaredo (MI) T +39 02 824 50 11 F +39 02 57 51 28 55 italia@buchi.com www.buchi.it</p>	<p>Russland</p> <p>BUCHI Russia/CIS Russia 127287 Moscow T +7 495 36 36 495 F +7 495 981 05 20 russia@buchi.com www.buchi.ru</p>	<p>Grossbritannien</p> <p>BUCHI UK Ltd. GB – Oldham OL9 9QL T +44 161 633 1000 F +44 161 633 1007 uk@buchi.com www.buchi.co.uk</p>	<p>Deutschland</p> <p>BÜCHI NIR-Online DE – 69190 Walldorf T +49 6227 73 26 60 F +49 6227 73 26 70 nir-online@buchi.com www.nir-online.de</p>

Amerika

<p>Brasilien</p> <p>BUCHI Brasil BR – Valinhos SP 13271-570 T +55 19 3849 1201 F +55 19 3849 2907 brasil@buchi.com www.buchi.com</p>	<p>USA/Kanada</p> <p>BUCHI Corporation US – New Castle, DE 19720 T +1 877 692 8244 (Toll Free) T +1 302 652 3000 F +1 302 652 8777 us-sales@buchi.com www.mybuchi.com</p>
---	---

Asien

<p>China</p> <p>BUCHI China CN – 200052 Shanghai T +86 21 6280 3366 F +86 21 5230 8821 china@buchi.com www.buchi.com.cn</p>	<p>Indien</p> <p>BUCHI India Private Ltd. IN – Mumbai 400 055 T +91 22 667 75400 F +91 22 667 18986 india@buchi.com www.buchi.in</p>	<p>Indonesien</p> <p>PT. BUCHI Indonesia ID – Tangerang 15321 T +62 21 537 62 16 F +62 21 537 62 17 indonesia@buchi.com www.buchi.co.id</p>	<p>Japan</p> <p>Nihon BUCHI K.K. JP – Tokyo 110-0008 T +81 3 3821 4777 F +81 3 3821 4555 nihon@buchi.com www.nihon-buchi.jp</p>
<p>Korea</p> <p>BUCHI Korea Inc. KR – Seoul 153-782 T +82 2 6718 7500 F +82 2 6718 7599 korea@buchi.com www.buchi.kr</p>	<p>Malaysia</p> <p>BUCHI Malaysia Sdn. Bhd. MY – 47301 Petaling Jaya, Selangor T +60 3 7832 0310 F +60 3 7832 0309 malaysia@buchi.com www.buchi.com</p>	<p>Singapur</p> <p>BUCHI Singapore Pte. Ltd. SG – Singapore 609919 T +65 6565 1175 F +65 6566 7047 singapore@buchi.com www.buchi.com</p>	<p>Thailand</p> <p>BUCHI (Thailand) Ltd. TH – Bangkok 10600 T +66 2 862 08 51 F +66 2 862 08 54 thailand@buchi.com www.buchi.co.th</p>

BÜCHI Support-Center:

<p>Südostasien</p> <p>BUCHI (Thailand) Ltd. TH-Bangkok 10600 T +66 2 862 08 51 F +66 2 862 08 54 bacc@buchi.com www.buchi.com</p>	<p>Naher Osten</p> <p>BÜCHI Labortechnik AG UAE – Dubai T +971 4 313 2860 F +971 4 313 2861 middleeast@buchi.com www.buchi.com</p>	<p>Lateinamerika</p> <p>BUCHI Latinoamérica Ltda. BR – Valinhos SP 13271-200 T +55 19 3849 1201 F +55 19 3849 2907 latinoamerica@buchi.com www.buchi.com</p>
--	---	---

Wir werden weltweit von mehr als 100 Vertriebspartnern vertreten.
 Ihren Händler vor Ort finden Sie unter: www.buchi.com