

Entwicklung eines neuartigen, nicht invasiven
insitu Kombi-Sensors (ISICOM) zur
Überwachung des metabolischen Zustandes
von Kultivierungsprozessen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Katharina Dahlmann, M.Sc.

2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Sascha Beutel

Tag der Promotion: 18.10.2023

„Der Teufel steckt im Detail.“

Vielleicht kann man ihn ja auch messen? Es ist ein Versuch wert, dies rauszufinden.

Abstract

According to the PAT guideline of the food and Drug Administration (FDA) in the USA from 2004, a continuous real time quality analysis is necessary. The deeper understanding should clarify how the product formulation in biotechnology and the manufacturing process are interrelated and how the product quality is influenced (Food and Drug Administration 2004).

Most modern biotechnological processes have the classic sensor trio of temperature, pH and oxygen. This trio is suitable for process control but does not meet the requirements of the Food and Drug Administration for real time quality analysis or the need to generate a deeper understanding of the process. Since the processes are determined by cells, the knowledge of what is going on in the cells is important and crucial for the process. The metabolism of the cells is known in most cases, together with the exceptions or the conditions under which the cells switch their metabolism. What is missing is a way to observe the change in metabolism in real time in the process. For example, the change in metabolism may be characterized by a decoupled increase in CO₂ concentration associated with a low oxygen demand. The sensor trio mentioned above is not able to provide this information and thus the information about the metabolism of the cells in the process remains bent.

The sensors presented in this work expand the classical sensor trio by an *insitu* combi sensor (ISICOM) and a microfluidic sensor platform (miniCOM), which offer the possibility to monitor the metabolic activity of the cells in real time in the process. Sensors are being developed for use in different reactor scales and reactor types for multi- and single-use applications. The sensors measure representative volume elements of the reactor volume, using the dynamic method. These sensors provide real-time process variables such as oxygen uptake rate (OUR), carbon dioxide emission rate (CER), respiratory quotient (RQ), oxygen transport coefficient (k_{La}) and cell-specific oxygen uptake rate (qOUR). They provide the opportunity to collect valuable information in an early process development stage and to establish new process control strategies early and then scale up as the process development progresses.

Further characterization of preliminary work on the sensors was able to show that no stirring mechanism is required in the measuring chamber of the ISICOM. At the same time, sterile integration of the miniCOM into different reactor systems could be demonstrated.

When using the two sensors in biotechnological processes with yeasts and animal cells, oxygen uptake rates above 50 mmol L⁻¹ h⁻¹ could be measured. Furthermore, carbon dioxide emission rates up to 6 mmol L⁻¹ h⁻¹ could be measured. In addition, the cell-specific oxygen uptake could be used selectively to expand process knowledge, and the oxygen transport coefficient k_{La} could be made available online over the entire process. The combination of the sensors of the miniCOMs and the ISICOMs form a promising basis for the development and scaling of new control strategies in process development and characterization.

Keywords: Oxygen, Oxygen uptake rate, metabolic activity

Kurzfassung

Laut der PAT-Guideline der Food and Drug Administration (FDA) in den USA aus 2004 ist eine kontinuierliche real time Qualitätsanalyse notwendig. Durch das tiefere Verständnis soll aufgeklärt werden, wie in der Biotechnologie die Produktformulierung und der Herstellungsprozess zusammenhängen und wie die Produktqualität beeinflusst wird (Food and Drug Administration 2004).

Die meisten modernen biotechnologischen Prozesse verfügen dabei über das klassische Sensoren-Trio aus Temperatur, pH und Sauerstoff. Dieses Trio eignet sich für die Prozesssteuerung, erfüllt aber nicht die Anforderungen der Food and Drug Administration für Real-Time-Qualitätsanalyse bzw. den Anspruch, ein tieferes Prozessverständnis zu generieren. Da die Prozesse durch Zellen bestimmt werden, ist das Wissen, was in den Zellen vorgeht, wichtig und entscheidend für den Prozessverlauf. Der Metabolismus der Zellen ist in den meisten Fällen bekannt, zusammen mit den Ausnahmen bzw. den Bedingungen, unter denen die Zellen ihren Metabolismus umstellen. Was fehlt, ist eine Möglichkeit, die Änderung des Metabolismus in Echtzeit im Prozess beobachten zu können. So kann die Änderung des Metabolismus gekennzeichnet sein durch einen entkoppelten Anstieg der CO_2 -Konzentration in Zusammenhang mit einem geringen Sauerstoffbedarf. Das oben genannte Sensor-Trio ist nicht dazu in der Lage, diese Informationen zur Verfügung zu stellen und damit bleiben die Informationen zum Metabolismus der Zellen im Prozess verborgen.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Sensoren erweitern das klassische Sensor-Trio um einen *in situ* Kombisensor (ISICOM) bzw. eine Mikrofluidik-Sensorplattform (miniCOM), die die Möglichkeit bieten, die metabolische Aktivität der Zellen in Echtzeit im Prozess zu überwachen. Dabei werden Sensoren für den Gebrauch in unterschiedlichen Reaktorskalen und Reaktortypen für den Multi- und Single-use-Bereich entwickelt. Die Sensoren messen dabei ein repräsentatives Volumenelement des Reaktorvolumens, mittels der dynamischen Methode. Durch diese Sensoren stehen Prozessgrößen wie Sauerstoffaufnahme (OUR), Kohlendioxidemissionsrate (CER), respiratorischer Quotient (RQ), Sauerstofftransportkoeffizient (k_{la}) und die zellspezifische Sauerstoffaufnahme (q_{OUR}) in Echtzeit zur Verfügung. Sie bieten die Möglichkeit, bereits im frühen Stadium der Prozessentwicklung wertvolle Informationen zu sammeln und neuartige Prozessregelungsstrategien früh zu etablieren und dann im Laufe der Prozessentwicklung zu skalieren.

Die weiterführende Charakterisierung von Vorarbeiten der Sensoren konnte zeigen, dass es keinen Rührmechanismus in der Messkammer des ISICOMs benötigt. Gleichzeitig konnte eine sterile Integration in des miniCOMs in unterschiedliche Reaktorsysteme gezeigt werden.

Beim Einsatz der beiden Sensoren in biotechnologischen Prozessen mit Hefen und Tierzellen konnten Sauerstoffaufnahme über $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gemessen werden. Des Weiteren konnten Kohlenstoffdioxidemissionsraten bis $7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gemessen werden. Zusätzlich konnte die zellspezifische Sauerstoffaufnahme punktuell zur Erweiterung des Prozesswissens genutzt werden, sowie der Sauerstofftransportkoeffizient k_{la} *Online* über den gesamten Prozess zur Verfügung gestellt werden. Die Kombination der Sensoren des miniCOMs und des ISICOMs bilden eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung und Skalierung neuer Regelungsstrategien in der Prozessentwicklung und -charakterisierung.

Schlagwörter: Sauerstoff, Sauerstoffaufnahme, metabolische Aktivität

5	Anwendung zur Bioprozessüberwachung.....	50
5.1	Hefe Kultivierung.....	50
5.1.1	Saccharomyces.....	52
5.1.2	Non-Saccharomyces.....	56
5.2	Tierzellkultivierung.....	60
5.2.1	Schüttelkolbenversuche.....	61
5.2.2	Mikrobioreaktor – Ambr250®.....	66
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	74
7	Literatur.....	76
8	Anhang.....	I
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	I
8.2	Tabellenverzeichnis.....	III
8.3	Geräte.....	IV
8.4	Kultivierungsmedien.....	VI
8.5	Verwendete Software.....	VI
8.6	Ergänzenden Formeln und Berechnungen.....	VI
8.6.1	Bestimmung der Henry Konstante in Abhängigkeit der Temperatur.....	VI
8.6.2	Bestimmung Todvolumen miniCOM.....	VII
8.6.3	Funktionen für die Fehlerfortpflanzung.....	VII
8.7	Ergänzende Graphen.....	IX
8.7.1	CHO Kultivierung mit miniCOM im Ambr250.....	IX
8.8	Technische Zeichnungen.....	X
8.9	Elektrotechnische Schaltpläne.....	XIII
8.10	Unterstützende Arbeiten.....	XIII
8.11	Veranstaltungsbeiträge.....	XIII
8.12	Danksagung.....	XV
9	Lebenslauf.....	XVII
10	Publikationen.....	XVIII

Abkürzungen

Table 1 – Abkürzungsübersicht

Abkürzung	Bedeutung englisch	Bedeutung deutsch
BPOH	BioPhorum Operations Group	
CER	carbon dioxid emission rate	KohlendioxidEmissionsrate
CHO	Chinese hamster ovary	
CIP	Cleaning in Place	
CPR	Carbondioxid Production Rate	Kohlendioxid Produktionsrate
CSV	Comma seperated value	
ESIP		Eppendorf – steril- <i>inline</i> Probenahme
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	-
ICH	International Conference on Harmonization	
ISICOM	In situ combi sensor	
k_{La}		Sauerstofftransportkoeffizient
miniCOM	mini combi sensor	
OTR	Oxygen Transfer Rate	Sauerstofftransferrate
OUR	Oxygen Uptake Rate	Sauerstoffaufnahme rate
PAT	Processanalyticaltechnology	Prozessanalysetechnik
pCO_2	Partial CO_2 Pressure	Gelöst Kohlendioxidpartialdruck
pO_2	Partial O_2 Pressure	Gelöst Sauerstoffpartialdruck
QbD	Quality by Design	Qualität durch Design
qOUR	Cell specific oxygen uptake rate	Zellspezifische Sauerstoffaufnahme rate
qPCR	Quantitative Polymerase Chain reaction	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
RQ	Respiration Quotient	Respiratorischer Quotient
SIP	Sterilization in Place	-
SuB	Single-use bioreactor	
TCD	Total Cell Density	Totale Zelldichte
VCD	Viable Cell Density	Viable Zelldichte

1 Einleitung und Zielsetzung

Einatmen – Ausatmen. Unser Atem begleitet uns tagtäglich im Leben und sichert uns damit das Überleben. Unser Körper braucht Sauerstoff; unsere Zellen können zwar ohne Sauerstoff trotzdem Energie gewinnen, vergiften sich aber zunehmend selbst, wenn sie zu lange anaerob betrieben werden. Wir nutzen die heutige Technik zum Überwachen unserer Atemfrequenz beim Sport oder im Schlaf. Es gibt diverse Atemtechniken, die uns dabei helfen sollen, zur Ruhe zu kommen und den Stress zu reduzieren, um am Ende volle Leistung zu erbringen. Im Rückschluss können wir an der Atmungsrate sehen, wie aktiv wir über den Tag waren. Dies lässt sich auch auf andere Fachbereiche übertragen, wie die Biotechnologie. Auch hier brauchen Zellen Sauerstoff für die Energiegewinnung und die Produktion wertvoller Erzeugnisse wie Enzyme für die Käseproduktion in der Lebensmittelindustrie oder Antikörper für die Krebstherapie. Um hier die Leistungsfähigkeit der Zellen beurteilen zu können, um daraus Regelstrategien für die Prozesssteuerung zu erreichen, mangelt es bisher an Messtechniken und Methoden. Das Ziel hier: höchste Produktqualität gepaart mit einer hohen Produktausbeute. Die Food and Drug Administration veröffentlichte 2004 eine Guideline für Prozessanalysetechnik, um eine Qualitätsanalyse in Echtzeit zu ermöglichen. Durch das tiefere Verständnis, welches mithilfe der Prozessanalysetechnik erlangt wird, soll aufgeklärt werden, wie die Produktformulierung und der Herstellungsprozess zusammenhängen und wie die Produktqualität beeinflusst wird (Food and Drug Administration 2004). Ergänzt wird dieses Dokument durch die Veröffentlichung von der Vereinigung des BioPhorums zum Thema „*Inline Monitoring and real-time release*“ (Swann et al. 2017). Die meisten modernen biotechnologischen Prozesse verfügen über das klassische Sensoren-Trio aus Temperatur-, pH- und Sauerstoffsensoren. Dieses Trio eignet sich für die Prozesssteuerung, erfüllt aber nicht die Anforderungen der Food and Drug Administration für Real-Time-Qualitätsanalyse bzw. den Anspruch, ein tieferes Prozessverständnis zu generieren. Das BioPhorum unterstützt dabei mit den Anforderungen, die Hersteller erfüllen müssen, um die Technologie von morgen zu entwickeln. Da die Prozesse durch Zellen bestimmt werden, ist das Wissen, was in den Zellen vorgeht, wichtig und entscheidend für den Prozessverlauf. Der Metabolismus der Zellen ist in den meisten Fällen bekannt, zusammen mit den Ausnahmen bzw. den Bedingungen, unter denen die Zellen ihren Metabolismus umstellen. Was fehlt, ist eine Möglichkeit, die Änderung des Metabolismus in Echtzeit im Prozess beobachten zu können. So kann die Änderung des Metabolismus gekennzeichnet sein durch einen entkoppelten Anstieg der CO₂-Konzentration in Zusammenhang mit einem geringen Sauerstoffbedarf. Das oben genannte Sensor-Trio ist nicht dazu in der Lage, diese Informationen zur Verfügung zu stellen und damit bleiben die Informationen zum Metabolismus der Zellen im Prozess verborgen.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Sensor-Trio zu erweitern und über einen Kombisensor bzw. eine Sensorplattform die Möglichkeit zu geben, die metabolische Aktivität der Zellen in Echtzeit im Prozess zu überwachen. Dabei werden Sensoren für den Gebrauch in unterschiedlichen Reaktorskalen und Reaktortypen für den Multi- und Single-use-Bereich entwickelt. Die Sensoren messen dabei ein repräsentatives Volumenelement des Reaktorvolumens mittels der dynamischen Methode. Durch diese Sensoren stehen Prozessgrößen wie Sauerstoffaufnahme (OUR), Kohlendioxidemissionsrate (CER), respiratorischer Quotient (RQ), Sauerstofftransportkoeffizient (k_La) und die zellspezifische Sauerstoffaufnahme (qOUR) in Echtzeit zur Ver-

fügung. Sie bieten die Möglichkeit, bereits im frühen Stadium der Prozessentwicklung wertvolle Informationen zu sammeln und neuartige Prozessregelungsstrategien früh zu etablieren und dann im Laufe der Prozessentwicklung zu skalieren.

2 Theoretische Grundlagen

Biotechnologische Prozesse sind heute in den unterschiedlichsten Industriezweigen zu finden. Sie finden Anwendung in der pharmazeutischen Biotechnologie sowie der Lebensmittelindustrie und sind hier nicht mehr wegzudenken. Die Biotechnologiebranche hat vor mehr als 10 Jahren mit der Etablierung von Einwegsystemen begonnen, den sog. Single-use-Systemen. Auch heute sind diese, gerade im Bereich der pharmazeutischen Biotechnologie, nicht mehr wegzudenken. Der Bedarf der Branche fordert die Hersteller von Sensoren und Reaktoren. Im Folgenden wird der Stand der Technik der unterschiedlichen Reaktorsysteme, sowie der heutigen Messtechnik für den Multi-use- als auch Single-use- Bereich vorgestellt.

Des Weiteren werden die Methoden und das Vorgehen zur Bestimmung diverser Größen der metabolischen Aktivität vorgestellt und erläutert.

2.1 Kultivierungsstrategien und Reaktorsysteme

Unterschiedliche Produkte erfordern unterschiedliche Prozesse. Je nach Produktkomplexität oder Produktart nutzt die Biotechnologie unterschiedliche Expressions- bzw. Zellsysteme. Um möglichst hohe Ausbeuten zu erreichen, wird zwischen Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen unterschieden. So gilt für eine Batch-Kultivierung, dass alle Nährstoffe zum Start im Reaktor vorgelegt werden und während des Prozesses keine Zufütterung stattfindet. Eine Ausnahme ist hier die Zugabe von Gasen und Fluiden zur Regelung des Sauerstoffgehalts oder des pH-Wertes. Eine Batch-Kultivierung ist dann beendet, wenn das Substrat aufgebraucht ist und das Zellwachstum die stationäre Phase erreicht hat. Im Anschluss wird das Produkt geerntet und zur Aufreinigung überführt.

Bei einer Fed-Batch-Kultivierung wird mit weniger Prozessvolumen gestartet und über die Prozesszeit Substrat und weitere Nährstoffe zugefüttert. Dadurch steigt das Reaktorvolumen auf ein Volumen vergleichbar mit einem Batch-Prozess an. Die Zellen erreichen die stationäre Phase dadurch später und es können höhere Zelldichten erzielt werden, die in der Regel zu höhere Produktkonzentrationen führen. Fed-Batch-Prozesse werden bevorzugt, wenn hohe Substratkonzentrationen zu Beginn des Prozesses das Zellwachstum negativ beeinflussen. Neben Batch- und Fed-Batch-Kultivierung gibt es noch kontinuierliche Kultivierungsstrategien, bei denen ständig Substrat zugeführt und das Produkt, je nach Prozessstrategie, auch die Zellen entnommen werden.

Das Produkt und die Produktionsbedingungen (Organismus, Produktklassifizierung, Zielbranche, u.v.m.) entscheidet oft auch über das Reaktorsystem. So werden pharmazeutische Produkte vorzugsweise in Single-use-Bioreaktoren (SuB) produziert. Die kostenempfindliche Lebensmittelindustrie nutzt in vielen Fällen hingegen weiterhin Edelstahlreaktoren, die unter die Kategorie Multi-use-Bioreaktoren fallen.

Single-use-Bioreaktoren sind für den einmaligen Gebrauch ausgelegte und aus mehr oder weniger flexiblem Plastik gefertigte Reaktoren, die nach jeder Kultivierung ausgetauscht werden. Beispiele unterschiedlicher Skalen an Bioreaktoren sind in Abbildung 1 zu sehen.

Alle Bestandteile (Rührer, Sensoren, Ports, etc.), die für den Prozess gebraucht werden, werden als Plastikkomponente in einem *Bag* oder in Hartplastikreaktoren eingebaut. Über ein Gestell – Baghalter – werden sie mit der Heizung und dem Motor verbunden und bilden eine funktionelle Einheit. Die Bags/Reaktoren werden mit kundenspezifischer Ausrüstung der Sensoren, Rührerdesign und -konfigurationen etc. bestellt und ausgeliefert. Ein spontanes Austauschen von z. B. der Messtechnik ist nur in Ausnahmefällen möglich und mit einem hohen Aufwand verbunden. Zur Auslieferung wird der Bag über Gammastrahlung sterilisiert, eher selten wird das Material autoklaviert oder über Gas sterilisiert (Gruener 2008).



Abbildung 1 - *Single-use-Bioreaktoren der Firma Sartorius Göttingen in unterschiedlichen Größen (Sartorius Göttingen 2023)*

Nach der Kultivierung wird der Inhalt des Bags aufgereinigt, ein neuer Bag eingehängt bzw. installiert und eine neue Kultivierung kann begonnen werden. Zeitaufwendige und teure Reinigungs- und Validierungsphasen entfallen. Zudem werden die aggressiven und teuren Chemikalien für diesen Prozess gespart und das Risiko für Kreuz- und mikrobielle Kontamination gesenkt. Im Allgemeinen stehen SuBs für eine Zeit- und Kostenersparnis (Eibl and Eibl 2019). Bei der Planung von Anlagen muss grundsätzlich die Frage der Kosten, Skalierung und der Sicherheit geklärt werden. SuBs sind bis zu einer Größe von 2 m³ erhältlich (5 m³ Maßstab ist in der Entwicklung) und limitiert in der Druckbelastbarkeit und bei hohen Rührerdrehzahlen. Dies resultiert in einer begrenzten Sauerstofftransferate. Diese Limitierungen betreffen hauptsächlich mikrobielle Kultivierung mit einem hohen Sauerstoffbedarf, daher werden SuBs oft für Tierzellkultivierungen und in der Biopharmabranche eingesetzt (Rogge, Müller, and Schmidt 2015).

Multi-use-Bioreaktoren bestehen aus Edelstahl und Glas. Ein großer Teil wird durch die Stainless-steel-Bioreaktoren abgedeckt. Nur im kleinen Maßstab bis 10 L sind diese Systeme mit einem Glaskessel erhältlich (auch bekannt als Benchtop Bioreaktoren). Ein Beispiel der unterschiedlichen Systeme ist in Abbildung 2 zu finden. Sie sind im Vergleich zu SuBs flexibel in der Bestückung mit Sensoren oder der Änderung des Rührsystems. Vor jeder Kultivierung wird der Reaktor thermisch sterilisiert, entweder im Autoklaven oder über Heißdampf (SIP – sterilisation in place).

Stainless-steel-Reaktoren sind deutlich robuster gegenüber Druck (Sartorius n.d.) und lassen auch hohe Rührerdrehzahlen zu. Somit lassen sich höhere Sauerstofftransferaten erzielen, wodurch sie sich für die Kultivierung von mikrobiellen Systemen besser eignen als SuBs. Nach einer Kultivierung müssen diese Reaktoren aufwendig gereinigt, sterilisiert und über eine Validierung für den nächsten Prozess freigegeben

werden. Dies ist zeit- und kostenintensiv. Trotz ordnungsgemäßer Reinigung besteht noch das Risiko für eine Kreuzkontamination, da z. B. Toträume nicht erreicht worden sein können und sich hier Zellmasse ablagern kann (Eibl and Eibl 2019). Stainless-steel-Reaktoren sind in Reaktorgrößen bis 20 m³ verfügbar, daher sind diese Reaktoren für großvolumige industrielle Produktionsprozesse geeignet (Rogge, Müller, and Schmidt 2015).

Reaktorhersteller, Kunden und Sensorhersteller haben die Aufgabe, bei Neuentwicklung eng zusammenzuarbeiten. Der Kunde muss klar die Systemanforderungen kommunizieren, die dann von den Reaktor- und Sensorherstellern erfüllt werden und entsprechend der geltenden Standards umgesetzt werden.



Abbildung 2 - Beispiel für Multi-use Bioreaktoren als Benchtop und stainless steel Reaktoren der Firma Sartorius Göttingen (Sartorius n.d.)

2.2 Bioprozessüberwachung

Bei Bioprocessen geht es wie bei allen produzierenden Einheiten darum, die Produktion so effizient wie möglich zu gestalten, mit einer hohen Produktqualität. Um genau dies zu erreichen, werden Strategien des 21. Jahrhunderts für die Einhaltung der *Current Good Manufacturing Practice* (cGMP) für die Produktion von biopharmazeutischen Produktion von der *International Conference on Harmonization* (ICH) über die Ansätze von *Quality by Design* (QbD) mithilfe von *Process Analytical Technology* (PAT) eingeführt. Über den QbD-Ansatz wird die Qualität von vornherein in ein Produkt einbezogen. Die Herausforderung ist der Wissensvorsprung über das Produkt, die Produktqualität und die Zusammenhänge zu unterschiedlichen Einflussparametern aus dem Prozess und dem Prozessumfeld. Es wird ein Design Space aufgestellt, in dem Probleme frühzeitig erkannt werden und gezielt entgegen gesteuert werden können, um am Ende ein Produkt höchster Qualität zu erreichen. Dies erfordert Messungen, auf deren Basis zeitkritische Entscheidungen getroffen werden können. Diese Anforderungen erfüllen PAT Tools. Sie stellen zeitlich abhängige Messungen von Rohmaterial und Intermediaten während des Prozesses zur Verfügung. Sie werden in der Produktion und Prozessentwicklung für Batch- und Konti-Kultivierungen systematisch eingesetzt, um Abweichungen zu detektieren und eine Korrekturmaßnahme einzuleiten. Durch PAT-Tools ist eine proaktive Prozess- und Produktqualitätskontrolle gegenüber einer reaktiven Prozess- und Produktqualitätskontrolle möglich (Swarbrick, Gadsby, and Wempen 2018).

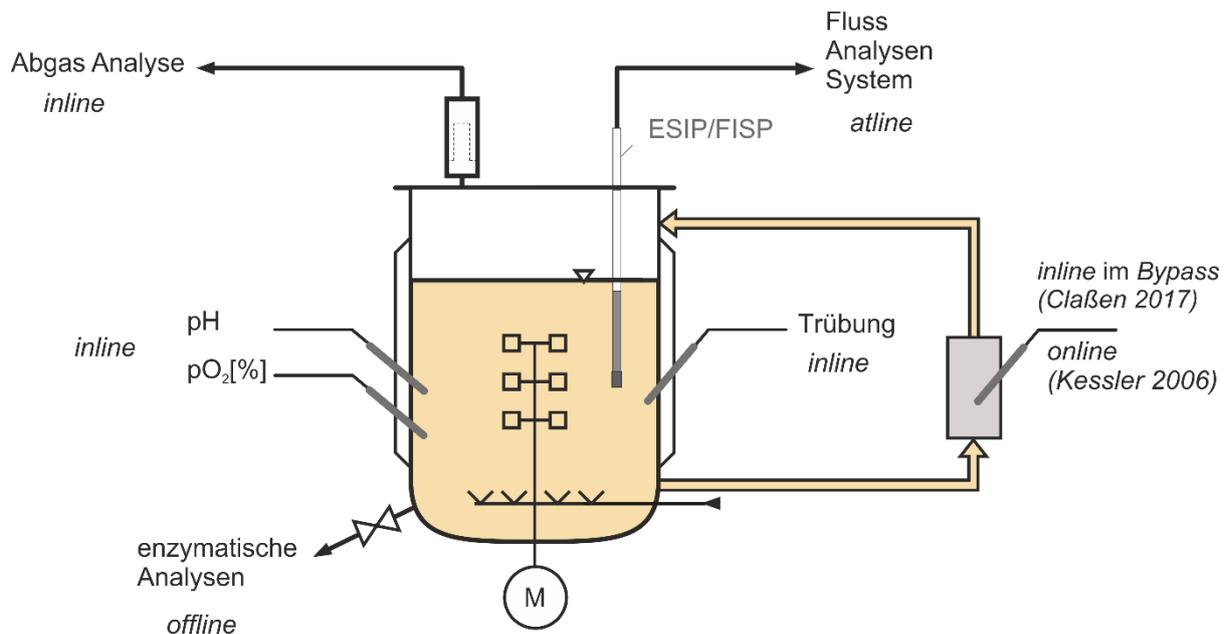


Abbildung 3 - Bioreaktor mit unterschiedlichen Sensoren als Beispiele für die unterschiedlichen Kategorien an Sensorüberwachungstypen (nach Dahlmann, 2017)

Die Prozessanalysetechnik (PAT) setzt Messtechnik der unterschiedlichsten Art ein. In vielen Fällen wird Spektroskopie eingesetzt, im Spektrum von Nahinfrarot (780-3.000 nm) oder im Raman-Spektrum bis 500 nm. Neben optischer Spektroskopie zählen aber auch Impedanzspektroskopie zu mächtigen PAT-Tools. Zu Nichtspektroskopie-Sonden zählen pH-, CO₂- und Sauerstoffsonden sowie viele mehr. Es wird generell unterschieden zwischen *Online*-, *Inline*-, *Atline*- und *Offline*-Analytik. Ein Beispiel an Sonden und deren Zuordnung ist in Abbildung 3 zu sehen.

Online

Proben, die vom Herstellungsprozess abgeleitet werden, jedoch zurück in den Prozess geleitet werden können. Beispiel: Bypass-Analysen oder Abgasanalysen (keine Rückleitung in den Prozessstrom) (Kessler 2012). Sensoren dieser Art ermöglichen ein Monitoring nah am Prozess. Da die Bypässe oft mit Schläuchen oder nicht isolierten Leitungen gebaut werden, herrschen andere Bedingungen wie im Reaktor. Dies kann sich besonders bei temperaturempfindlichen Messungen bemerkbar machen oder durch Sauerstoff, der durch Schläuche in das Bypasssystem diffundiert. Für den Aufbau einer Regelung für Prozessparameter eignen sich Signale dieser Sensoren, da sie innerhalb kürzester Intervalle zur Verfügung stehen.

Inline

Die Probe wird zur Analyse nicht entfernt, sondern *invasiv* oder *nichtinvasiv* im Prozessstrom analysiert (Claßen et al. 2017). Durch die unmittelbare Nähe zum Messort und die Verfügbarkeit des Signals innerhalb weniger Sekunden eignen sich diese Art von Sensoren, um Regelungsstrategien mit empfindlichen Parametern vorzunehmen. Klassischerweise zählen pH- und Sauerstoffsensoren zu den *Inline*-Sensoren. Invasiven Sensoren wird oft ein erhöhtes Kontaminationsrisiko nachgesagt, da sie in direktem Kontakt zum Kulturmedium stehen. Die Sensoren haben hohe Hygiene- und Sterilitätsanforderungen zu erfüllen.

Atline

Die Probe wird aus dem Reaktorsystem entfernt und isoliert. Sie wird in der näheren Umgebung des Prozesses analysiert. Beispiel: Fließinjektionsanalyse aus einer ESIP (Eppendorf-steril-*inline*-Probe-nahme), Sonde zur Bestimmung von Glukose- und Laktat über einen Biosensor (Food and Drug Administration 2004). Hier befördern Schläuche die Probe zum Analyseort. Oft werden diese Proben nicht in den Prozessstrom zurückgeführt. Aufgrund der verlängerten Analysezeit werden die Signale dieser Sensoren eher selten für die Steuerung bzw. Regelung von Bioprozessen eingesetzt, da angenommen wird, dass sich die Parameter schon wieder soweit verändert haben, dass die Regelung nicht mehr auf den Echtzeitwert greift. Es gibt einzelne Hersteller, die es trotzdem schaffen, eine Regelung für diese Art der Sensoren bereitzustellen, so gibt es bspw. den Glukose Sensor von TRACE mit einem eingebauten Glukoseregler.

Offline

Ähnlich wie bei der *Atline*-Analytik wird auch bei der *Offline*-Analytik die Probe aus dem Prozessstrom entfernt. Die Analyse erfolgt nicht in der Nähe des Prozesses, sondern häufig weiter entfernt z.B. in einem anderen Labor. Ein erheblicher zeitlicher Versatz zwischen Probennahme und Analyse kennzeichnet diese Analyseart. Es kann sich hier um Stunden oder Wochen handeln. Beispiel: HPLC-Analysen oder oft die Bestimmung der viablen Zellzahl über eine automatisierte Tryphanblau-Färbung.

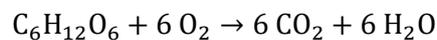
2.2.1 Sensoren

Bei der Kommerzialisierung der Bioprozesse spielt die Optimierung des Prozesses mit dem Ziel von hoher Produktquantität und -qualität eine große Rolle bei der Prozessentwicklung. Um einen Prozess optimieren zu können, braucht es zunächst Prozesswissen und die Möglichkeit, das Geschehen im Prozess beobachten zu können. Um dieses Ziel zu erreichen, eignen sich besonders *Inline*-Sensoren, da diese unmittelbar im Prozessgeschehen lokalisiert sind und Daten in kurzen Zeitintervallen weiterreichen können. Die wichtigsten Parameter für einen Bioprozess sind Gelöstsauerstoff, pH-Wert und Temperatur (Biechele et al. 2015). Sie sind als kritische Prozessparameter allgemein bekannt. Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen sind weitere Parameter wie Kohlenstoffdioxid und die Zellmasse von Interesse. In diesem Kapitel wird kurz der Stand der Technik und die unterschiedlichen Möglichkeiten der *Inline*-Bestimmung dieser Größen vorgestellt.

2.2.1.1 Sauerstoff-Sensorik

Für die Kultivierung aerober Zellen ist Sauerstoff unerlässlich. Über Diffusion wandert Sauerstoff von der Gas- in die Flüssigphase und steht somit den Zellen für die Zellatmung zur Verfügung. Um die Zellen mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, wird der Sauerstoffgehalt in der Flüssigphase gemessen und auf diesem Signal eine Regelstrecke aufgebaut. Über die Anpassung unterschiedlicher Parameter wird der Sauerstoff in der Flüssigphase eingestellt (z.B. Rührerdrehzahl, Druck, Sauerstoffanteil in der Zuluft, Begasungsrate und der Substratanteil im Feed).

Sauerstoff ist ein essenzieller Bestandteil für die Zellatmung und daher eine der Grundvoraussetzungen für aerobe Kultivierungen. Mithilfe von Sauerstoff wird über die Zellatmung Glukose in Energie, Wasser und CO₂ umgewandelt. Sauerstoff stellt dabei den Startpunkt des Metabolismus der Zellen dar.



Um die Zellatmung in ihrer Gesamtheit zu überwachen, ist die Produktionsrate des CO₂ genauso wichtig, wie die Verbrauchsrate des O₂. Über das Verhältnis aus der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidabgabe lassen sich über den Respiratorischen Quotienten weitere Aufschlüsse ziehen (weitere Details siehe Kapitel 2.2.6). Die Messung von CO₂ erfolgt selten *inline*. CO₂ wird hauptsächlich im Abgasstrom gemessen, um im Anschluss die Produktionsrate zu bestimmen.

Dabei folgt die Konzentration der gelösten Gase dem Henry-Gesetz:

$$c_Y^* = c_{YL}^* = \frac{p_{Y,G}^*}{H_Y} \cong \frac{p_{Y,G}}{H_Y} \quad (1)$$

c_Y^*	-	Konzentration des Gases Y z.B. Sauerstoff oder Kohlendioxid im Gleichgewichtszustand	$[mol_{O_2} L^{-1} ; g_{O_2} L^{-1}]$
c_{YL}^*	-	Konzentration des Gases Y z.B. Sauerstoff oder Kohlendioxid in der Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand	$[mol_{O_2} L^{-1} ; g_{O_2} L^{-1}]$
$p_{Y,G}^*$	-	Partialdruck des Gases Y im Gleichgewichtszustand in der Gasphase	$[Pa; bar]$
$p_{Y,G}$	-	Partialdruck des Gases Y in der Gasphase	$[Pa; bar]$
H_Y	-	Henry-Koeffizient für das Gas Y	$[Nm kg^{-1}]$

Es beschreibt die Abhängigkeit der Konzentration in der Flüssigphase im Zusammenhang mit dem Druck der Gasphase und der charakteristischen Henry-Konstante für die entsprechende Komponente. Die Henry-Konstante steht dabei in Abhängigkeit zur Temperatur und wird in demineralisiertem Wasser mit einem Massenspektrometer bestimmt (weitere Details dazu sind im Anhang zu finden in Kapitel: 8.6.1).

Die amperometrische Sauerstoffmessung beruht auf einer elektrochemischen Reaktion. Sie ist auch als Clark-Elektrode bekannt. Das Messergebnis wird entweder als Partialdruck in [mbar] angegeben oder als Sättigung in Prozent, im Verhältnis zum Partialdruck bei der Kalibration [%]. Sauerstoff wird in Multi-use-Reaktoren über Clark-Elektroden bestimmt, in Single-use-Reaktoren haben sich vorwiegend Optoden etabliert, es lassen sich aber auch immer wieder Clark-Elektroden finden.

Bei der Messung wird der Sauerstoff über einer Redox-Reaktion und einer klassischen Gleichstrommessung bestimmt.

Der schematische Aufbau ist in Abbildung 4 zu sehen. Der Messaufbau besteht aus zwei Elektroden: Einer Silber-Anode und einer Platin-Katode. Die Katode ist bis auf die Spitze von Glas eingefasst. Eine semipermeable Teflon-Membran trennt das mit Sauerstoff angereicherte Medium von den Elektroden und der Elektrolytlösung. Durch das Anlegen einer negativen Spannung an der Platinelektrode wird Sauerstoff an dieser Oberfläche reduziert. Gleichzeitig werden an der Silber-Silber-Chlorid-Anode Elektroden durch Oxidation frei und wandern zur Katode, was in Form von Strom messbar ist.



Über eine Kalibration mit definierten Ausgangsbedingungen kann das Stromsignal gegen die Kenngröße des Sauerstoffpartialdrucks in [mbar] oder [%] korreliert werden.

Im täglichen Gebrauch müssen Sensoren mit dieser Messtechnik regelmäßig kalibriert und gewartet werden. Neben dem Austausch der Elektrolytlösung wird die Sensorkappe mit der semipermeablen Membran regelmäßig ausgetauscht. Beim Wechsel ist darauf zu achten, die empfindliche Glaselektrode nicht zu beschädigen. Diese Art des Messaufbaus ist dadurch gekennzeichnet, dass sie einen langen Diffusionsweg bis zur Elektrode hat, sowie einen hohen Widerstand an der Membran (Busse et al. 2017; Gupta et al. 2014). Bei zeitkritischen Messungen wird daher gerne auf ein optisches Messsystem zurückgegriffen. Zudem ist dieses System nur schwierig in Single-use-Reaktortechnik zu integrieren.

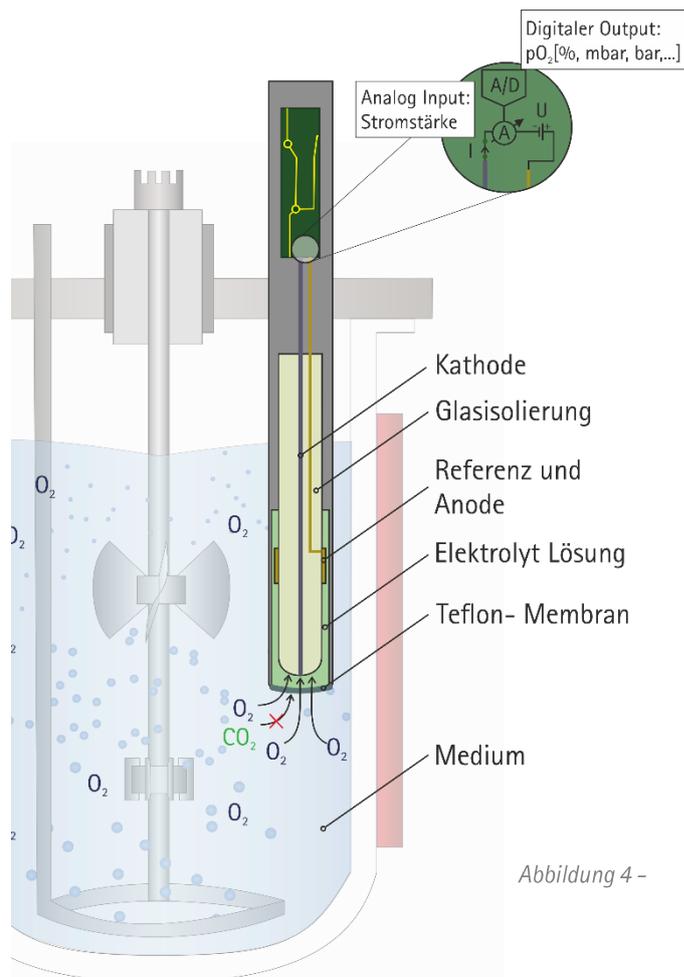
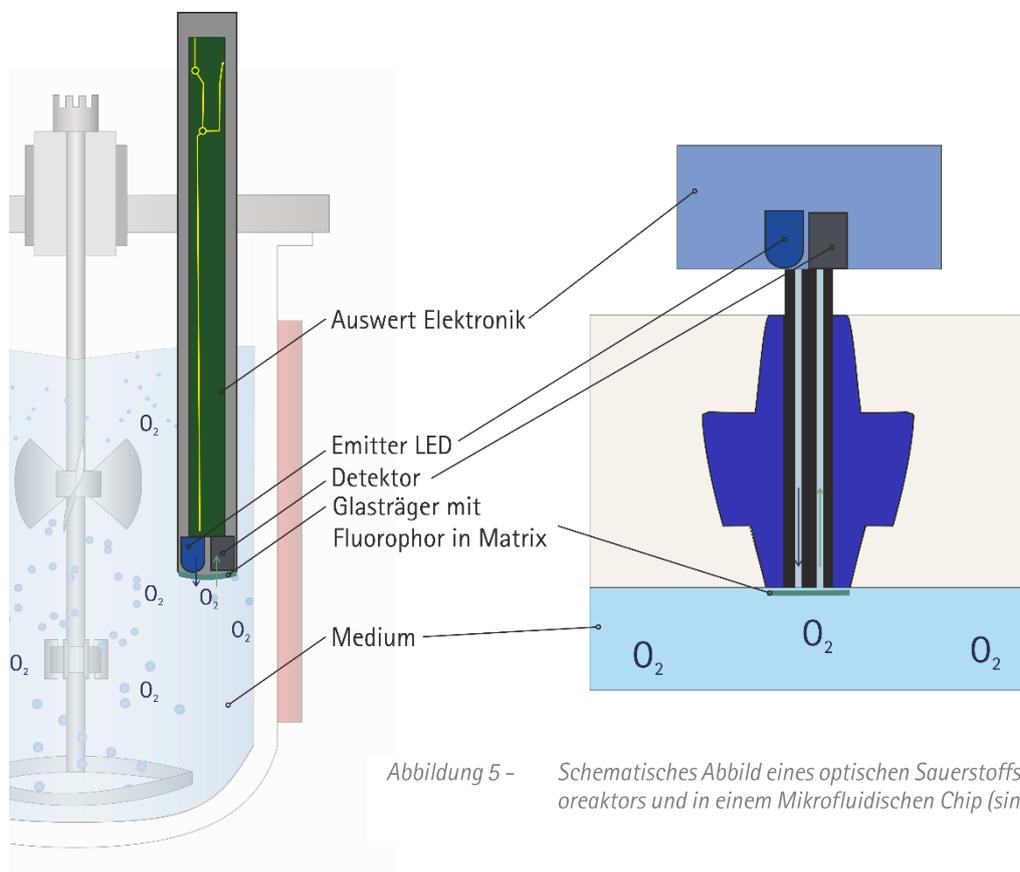


Abbildung 4 – Schematischer Aufbau einer Clark Elektrode

Das Messprinzip chemooptischer Sensoren basiert auf der Änderung optischer Eigenschaften eines in eine Matrix eingelassenen Indikators (vgl. Abbildung 5). Der in die Matrix eingebettete Indikator wird auf einer Scheibe aufgebracht. Dieser Spot befindet sich auf der medienberührenden Seite innerhalb des Reaktors. Von der Außenseite werden Lichtleiter an den Spot geführt und bestrahlen diesen von hinten mit Licht einer definierten Wellenlänge. Bei der Anwesenheit des Analyten verändert der Indikator seine optischen Eigenschaften. Dies kann eine Änderung in Form der Photolumineszenz, Absorption oder Reflexion sein. Nicht alle dieser Indikatoren lassen sich thermisch sterilisieren (SIP) oder chemisch reinigen (CIP). Die gängigen Optoden sind jedoch gammasterilisierbar und daher insbesondere für Single-use-Bioreaktoren geeignet.

Für die Messung von Sauerstoff in der Gas- oder Flüssigphase wird unter anderem der Metallkomplex Tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin)-ruthenium(II) verwendet. Dieser folgt bei Anwesenheit von Sauerstoff dem Messprinzip des Fluoreszenz-Quenching (Beutel and Henkel 2011). Hierbei reagiert der Fluorophor auf Sauerstoff über eine Änderung der Abklingzeit (X. Wang and Wolfbeis 2015). Um Kreuzempfindlichkeiten mit unerwünschten Ionen zu vermeiden, sind oft hydrophobe Matrizen in das Silikon des Spots eingelassen. Charakteristisch für dieses Messprinzip ist, dass bei der Messung der Sauerstoff nicht verbraucht wird und diese Sensoren ihren Einsatz auch in Versuchsaufbauten finden, die unter 5% Sauerstoffgehalt aufweisen. Zusammen mit der guten Skalierbarkeit der Spotgröße kann ein Monitoring auch in kleinen Experimenten gewährleistet werden. Geringe Reaktionszeiten im Sekundenbereich, hohe Sensitivität und Selektivität ergänzen die oben genannten Vorteile (Biechele et al. 2015; X. Wang and Wolfbeis 2015). Über eine längere Nutzung leidet die Signalqualität durch den Photobleaching-Effekt, dem durch die Zugabe von mehrfach fluorierten Planitium-Porphyrine entgegen gewirkt werden kann (Biechele et al. 2015).



2.2.1.2 Gelöst Kohlenstoffdioxid

Gelöstes Kohlenstoffdioxid (CO_2) hat über die letzten Jahre immer mehr Bedeutung als Prozessparameter gewonnen. Es wird in den meisten biotechnologischen Prozessen für die Bilanzierung der Atmungskette genutzt. Oft wird hierfür eine Bestimmung in der Abgasstrecke des Bioreaktors eingesetzt, bei der die Interaktion von CO_2 bei Infrarotlicht genutzt wird.

Eine weitere Methode zur Bestimmung des gelösten CO_2 direkt in der Kultivierungsumgebung funktioniert über das Messprinzip von Severinghaus und mittels Infrarot (X. Wang and Wolfbeis 2015; Hamilton Bonaduz AG 2021). Wenn eine pH-Kontrolle über CO_2 -Begasung im Prozess etabliert ist, eignen sich diese *Inline*-Sensoren für die Regelung der CO_2 -Konzentration. Die *Inline*-Sonden eignen sich zusätzlich für die *Inline*-Bestimmung der Kohlendioxidemissionsrate (Carbon Dioxid Emission Rate – CER) im Prozess. Weitere Informationen hierzu sind in Kapitel 2.2.5 zu finden.

Das Messprinzip der Severinghaus-Elektrode basiert auf der Änderung des pH-Wertes. Die CO_2 -Anwesenheit in einem Elektrolyten kann mittels einer Spannungsänderung zwischen Mess- und Referenzelektrode bestimmt werden. Eine semipermeable Membran, die ausschließlich CO_2 passieren lässt, hält weitere Moleküle von der Interaktion im Elektrolyten ab (vgl. Abbildung 6 links).

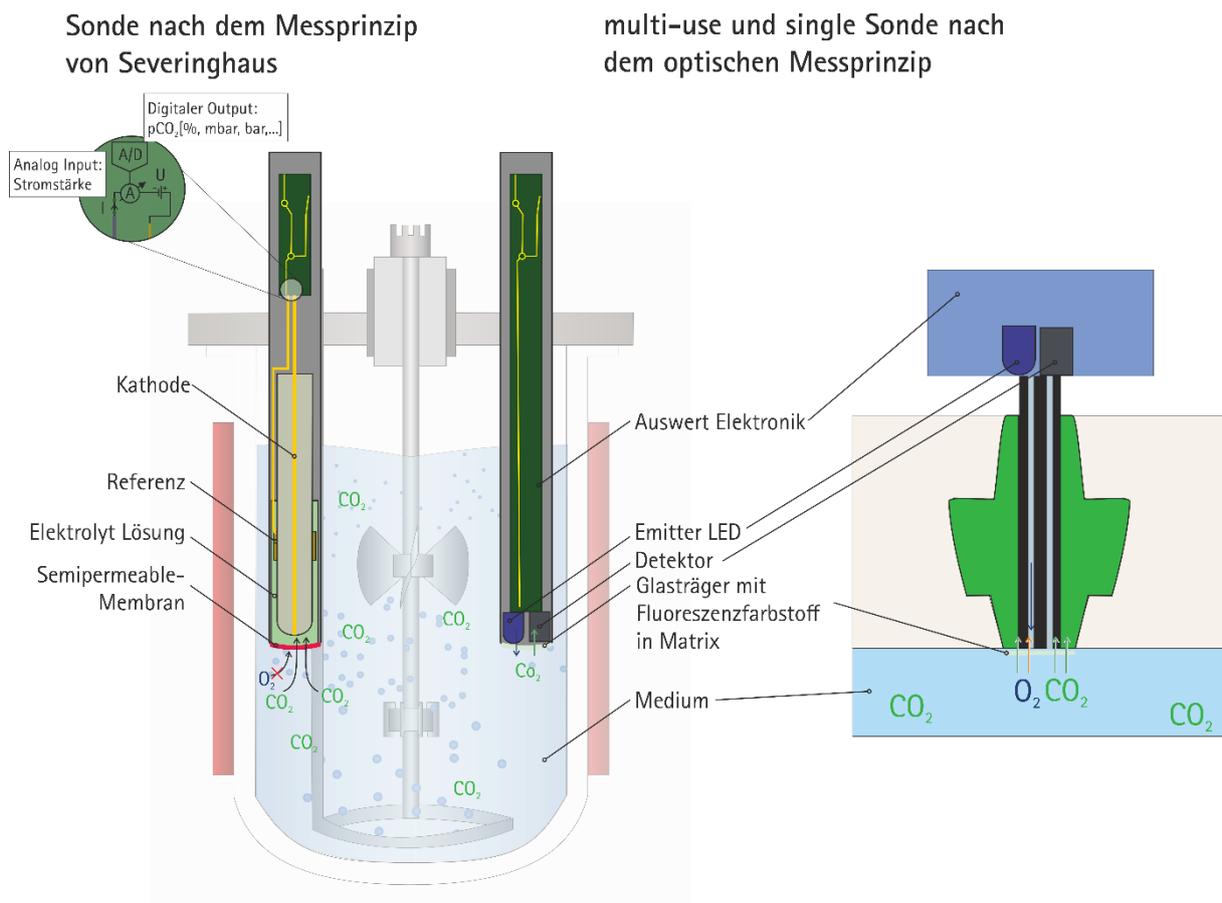


Abbildung 6 – Schematisches Messprinzip der Kohlendioxidbestimmung nach Severinghaus, Mittlerem Infrarotlicht und optisch mit Fluoreszenzfarbstoff – angelehnt an (Hamilton Bonaduz AG 2021; Steinwedel et al. 2019)

Eine Erweiterung der chemooptischen pH-Sensoren um eine semipermeable Membran lässt eine Messung von CO₂ zu. Ähnlich wie bei den chemooptischen Sauerstoffsensoren kann hier der pH-Wert bzw. die CO₂-Konzentration über eine Änderung der Photolumineszenz, Absorption oder Reflexion bestimmt werden. Im Gleichgewichtszustand kann die CO₂-Konzentration bestimmt werden. Diese Sensoren sind sehr empfindlich gegenüber starken Änderungen des pH-Wertes, der Temperatur und der Ionenstärke (Biechele et al. 2015; Busse et al. 2017). Diese Art des Sensoraufbaus ist unter anderem für den Einsatz in Single-use-Applikationen geeignet (vgl. Abbildung 6 Mitte und rechts).

Bei der Messung der CO₂-Konzentration mit mittlerem Infrarotlicht diffundieren die CO₂-Moleküle durch eine Membran. Ähnlich wie bei der Bestimmung von CO₂ in der Abluftstrecke wird hier die Korrelation zwischen der CO₂-Konzentration und der Änderung des infraroten Lichts genutzt (Hamilton Bonaduz AG 2021).

2.2.1.3 Biomasse Bestimmung

Das Hauptaugenmerk bei der Auslegung biotechnologischer Prozesse dreht sich um das Wohl der Zellen. Geht es den Zellen gut, steigen in der Regel die Produktausbeute, die Qualität und der Gewinn an Produkt.

Unter anderem Beurteilung der Ausbeute, Unterscheidung der Prozessphasen und Regelung des Prozesses sind Aktionen und Ziele, die sich aus dem Wissen einer *Online*- bzw. *Inline*-Messung der Biomasse ableiten lassen. Bei den Messprinzipien zur Bestimmung der Biomasse wird zwischen lebender und toter Biomasse unterschieden. Prozesse mit Zellkultur sind an der Prozessgröße der Lebenszellzahl interessiert. Die totale Zelldichte hat hier wenig Bedeutung und wird nur zu Rate gezogen, um die Viabilität der Zellen abzuleiten. Die schnelllebigen Fermentationsprozesse der Mikrobiologie hingegen beziehen sich fast ausschließlich auf die totale Zelldichte, da sie von einer konstant hohen Viabilität im Prozess ausgehen können.

Tabelle 2 – Übersicht der optischen Messanordnungen im Zusammenhang mit der Zellkonzentration

	Transmission <i>Detektor im 0°-Winkel zum Emitter</i>	Streulicht <i>Detektor im 90°-Winkel zum Emitter</i>	Reflexion <i>Detektor im 180°-Winkel zum Emitter</i>
Niedrige Bio- massekonzent- ration.	<ul style="list-style-type: none"> - Wenig Streuung an Zellen, das Licht kommt fast unverändert am Detektor an - Geringe Unterschiede in der Zellkonzentration bewirken vergleichsweise hohe Signaldifferenzen - Hohe Signalsensitivität 	<ul style="list-style-type: none"> - Mittlere Signalsensitivität - Wenig Streuung an Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> - Geringe Signalsensitivität, durch lange Strecken zwischen Zellen und Detektor - Wenig Streuung an Zellen
Mittlere Bio- massekonzent- ration.	<ul style="list-style-type: none"> - Das Signal wird stärker gestreut - Mittlere bis schlechte Signalsensitivität 	<ul style="list-style-type: none"> - Das Licht wird stärker an den Zellen gestreut - Nur noch kleine Signaländerung bei steigender Biomassekonzentration, da das gestreute Licht vermehrt unter den Zellen streut - Mittlere bis schlechte Signalsensitivität 	<ul style="list-style-type: none"> - Höhere Signalsensitivität, da sich der Abstand zwischen Zellen und Detektor durch die steigende Zellkonzentration verringert
Hohe Bio- massekonzent- ration.	<ul style="list-style-type: none"> - Licht wird so stark an den vielen Zellen gestreut, dass es kaum bis zum Detektor gelangt - Verhältnismäßig schlechte Signalsensitivität 	<ul style="list-style-type: none"> - Licht wird so stark gestreut, dass es kaum bis zum Detektor gelangt - Schlechte Signalsensitivität 	<ul style="list-style-type: none"> - Zellen lassen kaum noch Licht durch, das meiste wird an der Zelloberfläche direkt reflektiert - Bei besonders hohen Zelldichten kann auch mit diesem Messprinzip nur noch nah an der Oberfläche um den Detektor gemessen werden - Gute Signal Sensitivität.

2.2.1.3.2 Bestimmung der viablen Zellzahl

Die Bestimmung der lebenden Zelldichte wird mit der Permittivitätsmessung, auch Impedanzspektroskopie genannt, vorgenommen. Lebende unterscheiden sich von toten Zellen unter anderem dadurch, dass sie keine intakte Zellmembran mehr haben. Dies ist ein Effekt, der sich hier zunutze gemacht wird.

Jede Zelle besteht aus gelösten geladenen Ionen und Molekülen, die in einem elektrischen Feld beweglich sind. Die Zellmembran hindert die Ionen, sich weiter in der Flüssigkeit außerhalb der Zelle zu bewegen. Durch ein angelegtes Feld bewegen sich die geladenen Teilchen zu den entgegengesetzten Polen. Es entsteht eine Ladungsteilung innerhalb der Zelle mit einem Feld, welches dem Ursprungsfeld (extern angelegtes Feld) entgegengerichtet ist (siehe Abbildung 8). Die Permittivität repräsentiert dabei das Volumen der lebenden Zelle. Die Messung wird im Wechselfeld vorgenommen in einer Frequenz zwischen 0,5 kHz und 20 MHz (Hamilton Bonaduz 2021; Carvell et al. 2016). Über die Messungen lassen sich zusätzlich zum Biovolumen noch weitere Informationen extrahieren, wie die Leitfähigkeit des Mediums, die Zellgröße oder, ob die Zellen apoptotisch sind. Das Signal des Biovolumens kann gegen das Signal der Zellzahl korreliert werden (Busse et al. 2017; Biechele et al. 2015; Carvell et al. 2016).

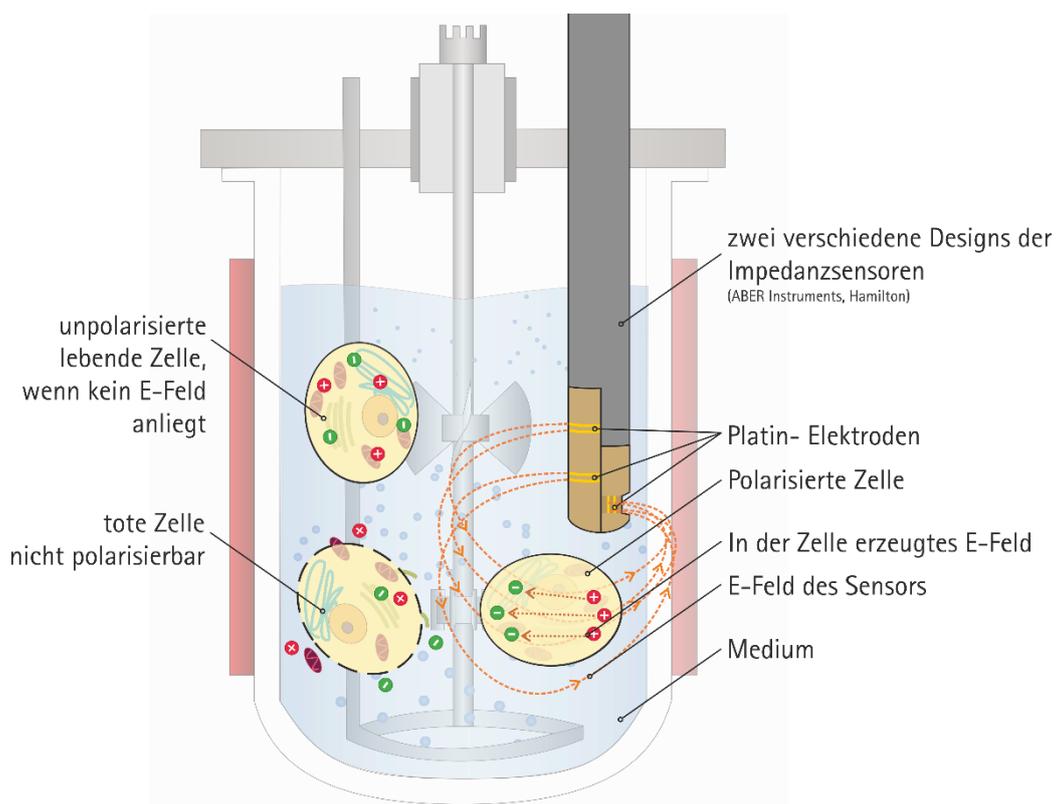


Abbildung 8 – Messprinzip zur Bestimmung der viablen Zellzahl

2.2.2 Methoden zur Bestimmung der metabolischen Aktivität in Bioprozessen

Die Sauerstoffaufnahme (OUR) bietet die Möglichkeit, die metabolische Aktivität von Zellen zu überwachen. Ähnlich wie bei der menschlichen Atmung kann von der Atmungsrate auf die Aktivität geschlossen werden. Misst man z. B. die Atemfrequenz einer Person während eines Marathons, so ist sie deutlich höher, als wenn die gleiche Person beim Mittagessen am Tisch sitzt oder auf dem Sofa einen Film ansieht. Eine Messung zur *Online*-Überwachung der Zellaktivität könnte das Verständnis des Prozesses vertiefen und es ermöglichen, in Echtzeit auf die Rückmeldungen des Prozesses zu reagieren. Besonders im Bereich der Prozessentwicklung ist die *Online*-Bestimmung der OUR ein mächtiges Werkzeug. Vielfach konnte gezeigt werden, dass die OUR eng mit der Wachstumsrate der Zellen und mehr mit dem Biovolumen als der Zellzahl in Verbindung steht (Valero and López-Santín 2017; Pappenreiter et al. 2019). Die Messung dieser Variable über verschiedene Bioreaktorskalen hinweg schafft eine Vergleichbarkeit und ist ein Maß für den Transfer des Prozesses. Üblicherweise wird die Gasmassenbilanzmethode zur Bestimmung der OUR verwendet. Bei dieser Methode wird die Differenz zwischen dem einströmenden und dem ausströmenden Gas gemessen. Der hohen Auflösung dieser Messtechnik und der Möglichkeit der *Online*-Messung stehen die hohen Anschaffungskosten von Massenspektrometern gegenüber, die für die Auswertung dieser Methode benötigt werden, sowie die Schwierigkeiten bei der Schnittstelle zum Bioprozess und der Anschaffung eines geeigneten Probenahmesystems. Insbesondere bei niedrigen Sauerstoffverbrauchsraten ist das Signal durch starkes Signalrauschen gekennzeichnet (Valero and López-Santín 2017; Coppella and Dhurjati 1987; Schügerl 2001; Garcia-Ochoa et al. 2010).

Die *Online*-Messung der OUR stellt viele Herausforderungen dar. Es ist möglich, die OUR mithilfe eines Softsensors, der dynamischen Methode oder der Gasmassenbilanz zu bestimmen. Zur Entwicklung eines Softsensors wird ein Modell zur Charakterisierung des Prozesssystems über den $k_L a$ -Wert entwickelt (mehr Details zu dieser Größe in Kapitel 2.2.3). Dieses Modell kann dann zur Bestimmung der OUR während der Kultivierung verwendet werden (Pappenreiter et al. 2019). Diese Methode setzt eine gute und detaillierte $k_L a$ -Charakterisierung voraus und lässt sich nicht ohne Weiteres auf andere Prozesse oder andere Reaktoren übertragen (Dahlmann 2017).

Wie bereits erwähnt, kann die OUR mit der dynamischen Methode gemessen werden. Jan Dries zeigt in seiner Veröffentlichung, dass die Stoffwechselaktivität mit der dynamischen Methode erfolgreich überwacht und charakterisiert werden kann. Dries kultiviert Abwasserproben für seine Experimente (Dries 2016). Ob diese Messmethode auf empfindliche Zellen, wie z. B. tierische Zellen, übertragen werden kann, müsste noch genauer untersucht werden.

Außerdem gibt es verschiedene Systeme, die die OUR online in Mikroplatten messen können (Super et al. 2016). Ob diese Systeme für Bioreaktoren verschiedener Größenordnungen geeignet sind und ob ein steriler Betrieb möglich ist, wurde bisher nicht abschließend geklärt.

Zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme werden im Folgenden drei Methoden vorgestellt: Gasmassenbilanz, Flüssigphasenbilanz in Form eines Softsensors, dynamische Methode und Softsensor. Die Methoden unterscheiden sich in der Herangehensweise, dem Aufwand der Messtechnik und der Genauigkeit, mit der die OUR bestimmt werden kann.

Für die meisten Arten der Bestimmung gilt folgende Bedingung bzw. Annahme:

$$\frac{d c_{O_2}}{d t} = OTR - OUR \quad (2)$$

$$\frac{d c_{O_2}}{d t} = 0 \rightarrow OTR = OUR \quad (3)$$

OUR	-	Sauerstoffaufnahme	$[mol_{O_2} L^{-1} h^{-1}; g_{O_2} L^{-1} h^{-1}]$
OTR	-	Sauerstofftransfer	$[mol_{O_2} L^{-1} h^{-1}; g_{O_2} L^{-1} h^{-1}]$
c_{O_2}	-	Sauerstoffkonzentration	$[mol_{O_2} L^{-1}]$

Dabei wird die Änderung der gelösten Sauerstoffkonzentration dargestellt als OTR, also der dem System zur Verfügung gestellte Sauerstoff, der über die Gasphase in die Flüssigphase diffundieren kann und der durch die Zellen aufgenommene Sauerstoff, repräsentiert durch die OUR (vgl. Formel (2)). Ändert sich die Sauerstoffkonzentration über die Zeit nicht, ist der Wert der Änderung null und der transferierte Sauerstoff gleich dem aufgenommenen Sauerstoff (siehe (3)).

2.2.2.1 Gasmassenbilanz

Die Sauerstofftransferate (OTR) kann über die Bilanzierung des Sauerstoffanteils in den Gasströmen der Zu- und Abluftstrecke bestimmt werden. Die Genauigkeit zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration ist die Herausforderung bei dieser Bilanzierung. In vielen Fällen werden hierfür Massenspektrometer benutzt. Es gibt mittlerweile auch spezialisierte Messtechnik für die Abluftstrecke mit der diese Bilanzierung möglich ist (L. Wang et al. 2014). In der Zuluftstrecke wird die Begasungsrate F_{nG_in} und die Sauerstoffkonzentration $x_{O_2_in}$ bestimmt. Über das Begasungssystem verteilt sich die Luft im Reaktor, diffundiert in

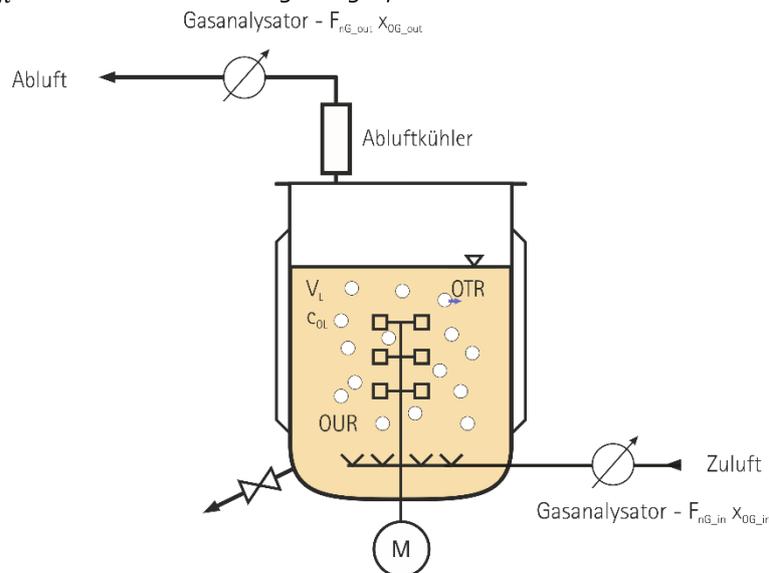


Abbildung 9 - Übersicht der Prozessgrößen, des Aufbaus und Messstellen zur Bestimmung der OUR über die Gasmassenbilanz (Dahlmann 2017; Yoon and Konstantinov 1994)

die Flüssigphase und wird von den Zellen verbraucht. Die Gasblasen sammeln sich im Kopfbereich des Reaktors und verlassen das System über die Abluftstrecke, wo erneut die Begasungsrate F_{nG_out} und die Sauerstoffkonzentration x_{OG_out} bestimmt wird (vgl. Abbildung 9) (Yoon and Konstantinov 1994). Diese Methode zur Bestimmung hat einen hohen zeitlichen Verzug zwischen dem, was im Reaktor passiert und was in der Abgasanalytik gemessen wird, da es verhältnismäßig lange dauert, bis das Gasvolumen durch den gesamten Reaktor in die Abgasstrecke gewandert ist (Meyer and Beyeler 1984).

Für die OTR gilt dabei die globale Massenbilanz über die Flüssig- und die Gasphase.

$$OTR = \frac{F_{nG_in} \cdot x_{OG_in} - F_{nG_out} \cdot x_{OG_out}}{V_L} \quad (4)$$

OTR	-	Sauerstofftransferrate	$[mol_{O_2} L^{-1} h^{-1}; g_{O_2} L^{-1} h^{-1}]$
$F_{nG_in/out}$	-	Begasungsrate in der Zuluft- (in) bzw. Abluftstrecke (out)	$[mol_{O_2} h^{-1}]$
$x_{OG_in/out}$	-	Sauerstoffanteil in der Zuluft- (in) bzw. Abluftstrecke (out)	$[-]$
V_L	-	Flüssigvolumen des Reaktors	$[L]$

Bei konstanter Sauerstoffkonzentration bzw. ohne Änderung der Konzentration über die Zeit, gilt das der eingetragene Sauerstoff über den Transfer, gleich dem aufgenommenen Sauerstoff durch die Zellen ist (vgl. Formel (3)) $\left(\frac{d c_{O_2,L}}{d t} = 0 ; \frac{d c_{O_2,G}}{d t} = 0 \rightarrow OTR = OUR\right)$. Somit kann über OTR auch die OUR bestimmt werden. Voraussetzung ist eine konstante Sauerstoffkonzentration, die vorliegt, wenn z.B. der pO_2 geregelt wird.

2.2.2.2 Flüssigphasenbilanz mittels Softsensor

Um preiswerte Messsysteme nutzen können, kann die Bilanzierung der Sauerstoffaufnahme rate auch über die Flüssigphase vorgenommen werden. Über einen Softsensor lässt sich diese Bilanzierung auch als On-line-Monitoring-Tool der OUR nutzen. Ein Softsensor verbindet im Allgemeinen das Signal eines oder mehrerer Sensoren mit dem Wissen aus vorherigen Prozessen über einen funktionalen Zusammenhang und ermöglicht damit den Zugang zu neuen Prozessgrößen in Echtzeit (Valero and López-Santín 2017).

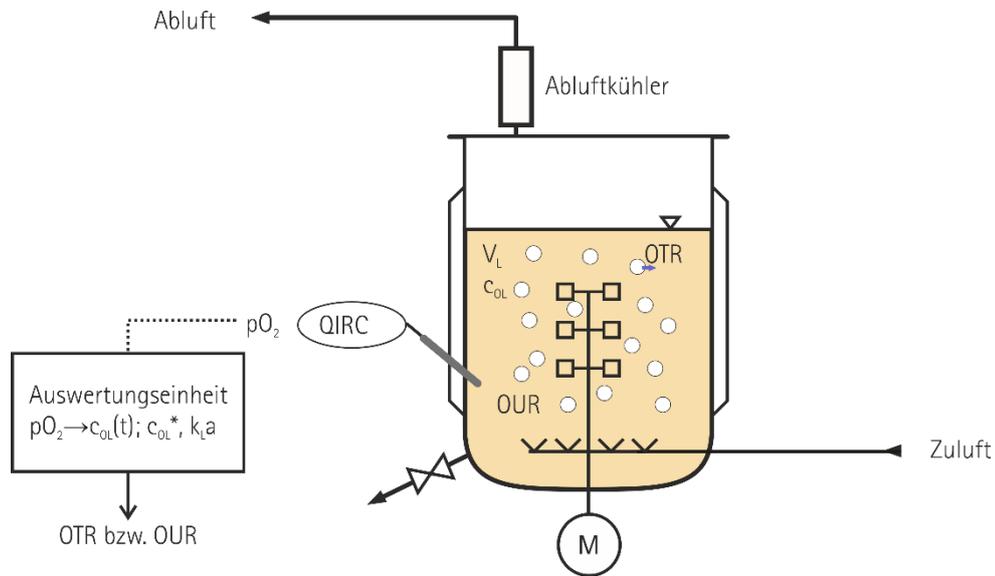


Abbildung 10 - Übersicht der Prozessgrößen, des Aufbaus und Messstellen zur Bestimmung der OUR über die Flüssigphasenbilanz zur online Bestimmung der OUR

Die OTR wird dabei über die Charakterisierung der physikalischen Reaktoreigenschaften mittels des k_La -Wertes und der Differenz der Sauerstoffkonzentrationen bestimmt:

$$OTR = k_La \cdot (c_{OL}^* - c_{OL}(t)) \quad (5)$$

k_La	-	Sauerstofftransportkoeffizient	$[h^{-1}]$
c_{OL}^*	-	Maximale Gelöstsauerstoffkonzentration	$[mol_{O_2} L^{-1}]$
$c_{OL}(t)$	-	Sauerstoffkonzentration zum Zeitpunkt t	$[mol_{O_2} L^{-1}]$

Da $c_{OL}(t)$ direkt mit dem pO_2 -Wert korreliert kann dieser funktionale Zusammenhang recht schnell und einfach genutzt werden (siehe Formel (1)). Die maximal Gelöstsauerstoffkonzentration c_{OL}^* bleibt über den gesamten Prozess konstant, solange sich die Temperatur im Reaktor nicht ändert. Über den Prozess hängt die OTR daher hauptsächlich vom k_La und der Gelöstsauerstoffkonzentration im Reaktor ab. Es erfordert die Charakterisierung des k_La -Wertes für das angewendete System (Garcia-Ochoa et al. 2010; Ruffieux, von Stockar, and Marison 1998). Systematische Fehler entstehen bei dieser Methode vor allem bei der Wahl der Henry-Konstante und Näherung des k_La -Wertes.

2.2.2.3 Dynamische Methode

Zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme mit der dynamischen Methode wird während der Kultivierung im Bioprozess die Begasung der Zuluftstrecke geschlossen. Die Zellen, die sich im Reaktor befinden, verbrauchen den Sauerstoff, der sie umgibt, ohne dass neuer Sauerstoff zugegeben wird. Dies hat zur Folge, dass der Sauerstoffgehalt in der Flüssigphase und damit das pO_2 -Signal sinkt. Um die Zellen nicht in eine Sauerstofflimitierung zu treiben und zu schädigen, wird die Zuluftstrecke bei einem Schwellenwert (pO_{2_lim}) oder nach einer definierten Zeit wieder geöffnet. Die Steigung des fallenden Sauerstoffsignalverlaufs steht für die Sauerstoffaufnahme der Zellkonzentration im Reaktor – vgl. Abbildung 11. Dieses Vorgehen wird in der Regel einmal während des Prozessverlaufs vorgenommen, um die Zellen nicht zu sehr zu schädigen. Für mehr als einen Messpunkt während der Kultivierung sind auch Installationen im Bypass zu finden (Behr et al. 2012).

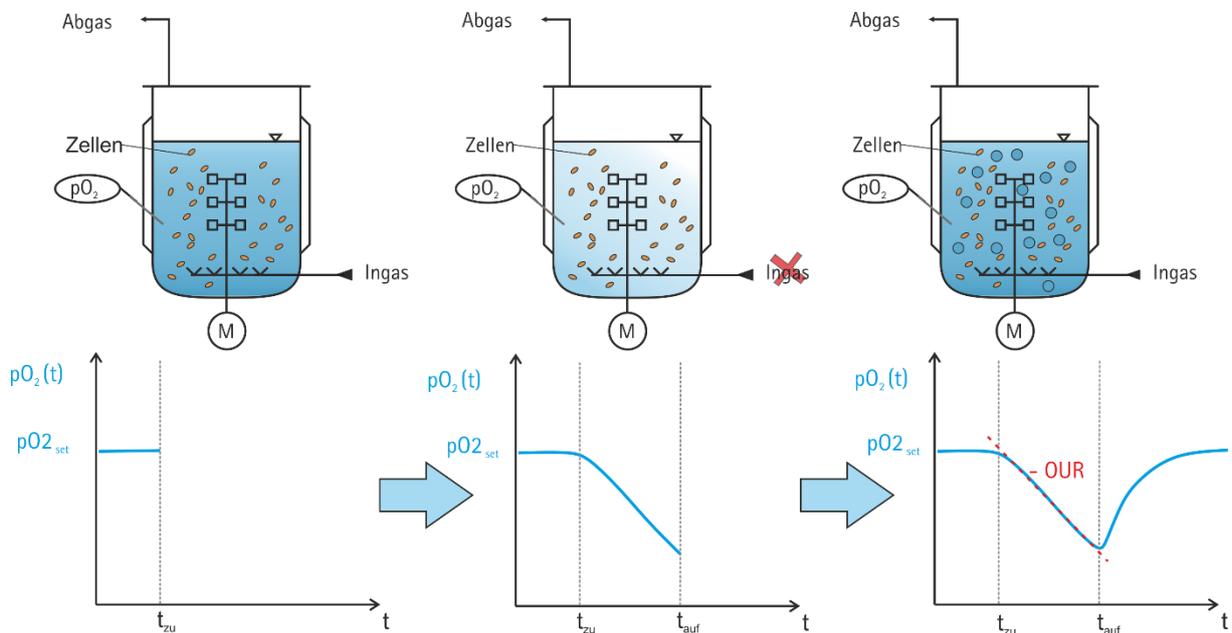


Abbildung 11 – Schrittweiser Verlauf der dynamischen Methode in einem Bioreaktor während der Kultivierung

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme erfolgt nach dem folgenden Ansatz:

$$OUR = \frac{1}{\Delta t} \cdot (c_{O_2,L,Ende} - c_{O_2,L,Anfang}) \quad (6)$$

$$OUR = \frac{1}{100\% \cdot H_{O_2}(T) \cdot \Delta t} \cdot (p_{O_2,Ende} - p_{O_2,Anfang}) \cdot p_{Gcal}$$

Δt	-	Zeit der Messung	[h]
$c_{O_2,L,Ende/Anfang}$	-	Sauerstoffkonzentration am Ende bzw. Anfang des Messzyklus	[mol L ⁻¹ ; g L ⁻¹]
$H_{O_2}(T)$	-	Henry-Konstante für Sauerstoff in Abhängigkeit der Temperatur T	[L bar mol ⁻¹]
$p_{O_2,Ende/Ende}$	-	Sauerstoffanteil am Ende bzw. Anfang des Messzyklus	[%]
p_{Gcal}	-	Druck im Reaktor	[bar]

Mit dem angewendeten Henry-Gesetz zur 100 % Sauerstoffsättigung (vgl. Formel (7)) und Formel (8) lässt sich der Messwert der Sauerstoffsonde als Partialdruck in die Konzentration umrechnen und damit direkt die OUR bestimmen.

$$c_{OL\ 100} = \frac{p_{G,cal} \cdot x_{OG,cal}}{H_{O_2}(T)} \quad (7)$$

$c_{OL\ 100}$	-	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase (L) bei 100 % Sauerstoffpartialdruck bzw. Sauerstoffsättigung	[mol L ⁻¹ ; g L ⁻¹]
$p_{G,cal}$	-	Druck in der Gasphase bei Kalibrierungsbedingungen	[bar]
$x_{OG,cal}$	-	Sauerstoffanteil in der Gasphase zu Kalibrierungsbedingungen	[-]
$H_{O_2}(T)$	-	Henry-Konstante für Sauerstoff in Abhängigkeit von der Temperatur (T)	[L bar mol ⁻¹]

$$p_{O_2}(t) = \frac{p_{O_L}(t)}{p_{O_L \text{ cal}}} = \frac{p_{O_L}(t)}{p_{G \text{ cal}} \cdot x_{G \text{ cal}}} = \frac{c_{O_L}(t)}{c_{O_L 100}} \quad (8)$$

p_{O_2}	-	Gelöstsauerstoff-Anteil	[–]
p_{O_L}	-	Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase	[bar]
$p_{O_L \text{ cal}}$	-	Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase zu Kalibrierungsbedingungen	[bar]
$p_{G \text{ cal}}$	-	Druck der Gasphase zu Kalibrierungsbedingungen	[bar]
c_{O_L}	-	Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase	[mol L ⁻¹ ; g L ⁻¹]

Die Bestimmung der OUR mit dieser Methode lässt sich mit einem geringen technischen Equipment umsetzen. Sie eignet sich jedoch nicht für ein Online-Monitoring der OUR, da es durch eine ständige Sauerstofflimitierung zu einer Zellschädigung kommen kann oder die Zellen so stark beeinflusst werden, dass sie nicht die gewünschten Ausbeuten erreichen bzw. die Messung das Messumfeld beeinflusst (Ruffieux, von Stockar, and Marison 1998).

2.2.3 Bestimmung des Sauerstofftransportkoeffizienten (k_{La})

Auf dem Weg von der Gasphase in der Zuluftstrecke zu den Zellen muss der Sauerstoff die Phasengrenze von den Gasblasen zur Flüssigkeit überwinden. Dies geschieht ausschließlich über den Prozess der molekularen Diffusion. Dabei muss der Sauerstoff diverse Widerstände überwinden (vgl. Abbildung 12). Diese werden nach dem Modell der Zweifilmtheorie unter dem Wert des Sauerstofftransportkoeffizienten k_{La} zusammengefasst. Der k_{La} -Wert hängt von diversen Prozessgrößen und Bedingungen ab.

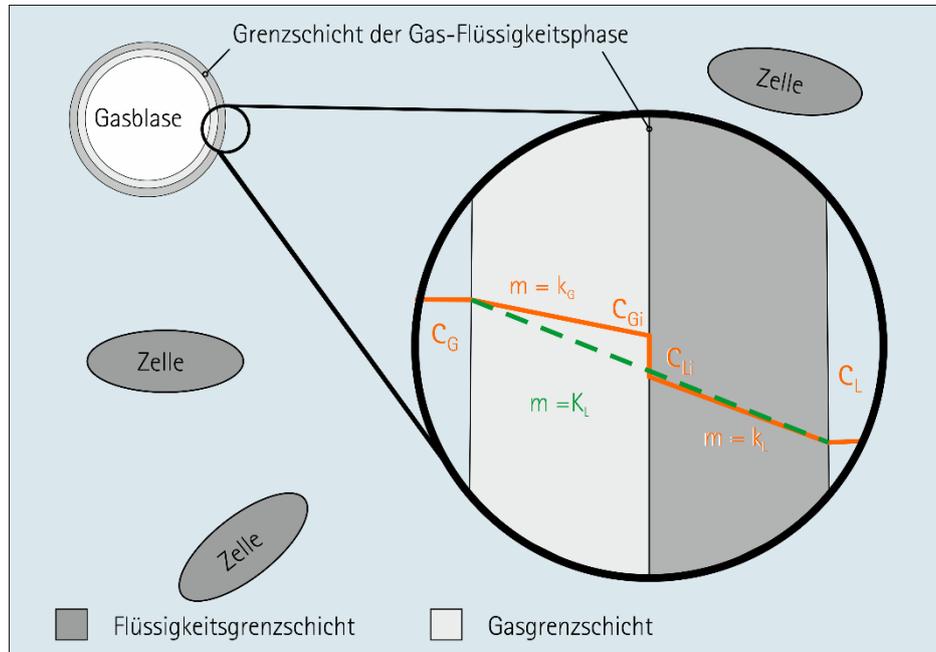


Abbildung 12 – Zweifilm Model mit schematischer Darstellung des Übergangs von Sauerstoff von der Gas- in die Flüssigphase (Chmiel 2006) nach (Dahlmann 2017)

So haben neben Rührerdrehzahl, Rühreranordnung oder Rührertyp auch der Salzgehalt im Medium, Viskosität, Temperatur oder die Begasungsrate einen Einfluss auf den Widerstandswert. Alle weiteren Widerstände, z.B. auf Seiten der Zelle, werden in diesem Modell vernachlässigt. Der k_{La} kann dafür genutzt werden, um einen direkten Zusammenhang mit der Sauerstofftransferrate OTR zu erkennen (vgl. Formel (5)). Beide Größen sind wichtig, um eine gute Sauerstoffversorgung für die Zellen zu gewährleisten. Über den k_{La} -Wert lassen sich unterschiedliche Begasungs- und/oder Reaktorsysteme miteinander vergleichen (Hass and Pörtner 2011) .

Der k_La kann über die OTR aus Formel (5) bestimmt werden:

$$k_La = \frac{OTR}{(c_{OL}^* - c_{OL}(t))} \quad (9)$$

k_La	-	Sauerstofftransportkoeffizient	$[h^{-1}]$
c_{OL}^*	-	Maximale gelöst Sauerstoffkonzentration	$[mol_{O_2} L^{-1}]$
$c_{OL}(t)$	-	Sauerstoffkonzentration zum Zeitpunkt t	$[mol_{O_2} L^{-1}]$
OTR	-	Sauerstofftransferrate	$[mol_{O_2} L^{-1} h^{-1}; g_{O_2} L^{-1} h^{-1}]$

2.2.4 Bestimmung der zellspezifischen Sauerstoffaufnahme (qOUR)

Die Größe der zellspezifischen Sauerstoffaufnahme ergibt sich aus der OUR und der Zelldichte des Messzeitpunktes. Sie kann über die Division der Messgrößen ermittelt werden, vgl. Formel (10).

$$qOUR = \frac{OUR}{c_{XL}} \quad (10)$$

$qOUR$	-	Zellspezifische Sauerstoffaufnahme	$[mol_{O_2} h^{-1} g_{Zellen}^{-1}; g_{O_2} h^{-1} g_{Zellen}^{-1}]$
OUR	-	Sauerstoffaufnahme	$[mol_{O_2} L^{-1} h^{-1}; g_{O_2} L^{-1} h^{-1}]$
c_{XL}	-	Zellkonzentration	$[g_{Zellen} L^{-1}]$

Die zellspezifische Sauerstoffaufnahme gibt die mittlere metabolische Aktivität der Zelle wieder. Über sie lassen sich Prozesse vergleichbar machen, da die Effizienz oder Leistung eines Prozesses auf die kleinste Einheit runtergebrochen wird (Garcia-Ochoa et al. 2010).

2.2.5 Bestimmung der Kohlendioxidemissionsrate (CER)

Sauerstoff wird über die Zellatmung zusammen mit der C-Quelle zu Energie und CO_2 verstoffwechselt. Diese kann in der Zelle über die unterschiedlichsten Prozesse ablaufen. Z.B. wird im Zitronensäurestoffwechsel über den Pentose-Phosphat-Weg über die Decarboxylase ein Anteil von 30-50 % der gesamten Kohlstoffumsetzung in einer aeroben Fermentation umgesetzt (Chmiel, Takors, and Weuster-Botz 2018). Neben der Sauerstoffaufnahme können weitere Informationen aus der Kohlendioxidemissionsrate (Carbon dioxide emission rate – CER oder Carbon dioxide production rate – CPR) zum Verständnis des Stoffwechselprozesses zu Rate gezogen werden. Diese Größe wird in dieser Arbeit analog zu OUR über die dynamische Methode (Kapitel 2.2.2.3) bestimmt, über die folgende Formel:

$$CER = \frac{\Delta c_{CO_2 L}}{\Delta t}$$

$$CER = \frac{1}{100\% \cdot H_{CO_2}(T) \cdot \Delta t} \cdot (p_{CO_2,Anfang} - p_{CO_2,Ende}) \cdot p_{Gcal} \quad (11)$$

<i>CER</i>	-	Kohlendioxidemissionsrate	$[mol L^{-1} h^{-1}; g L^{-1} h^{-1}]$
Δt	-	Zeit der Messung	$[h]$
$\Delta c_{CO_2 L}$	-	CO ₂ Konzentrationsdifferenz in der Flüssigphase	$[mol L^{-1}; g L^{-1}]$
$p_{CO_2,L,Ende/Anfang}$	-	CO ₂ Anteil in der Flüssigphase am Ende bzw. Anfang der Messung	$[-]$
$H_{CO_2}(T)$	-	Henry-Konstante für CO ₂ in Abhängigkeit von der Temperatur (T)	$[L bar mol^{-1}]$

Des Weiteren kann die CER auch über die Gasmassenbilanz im Abgas bestimmt werden. Sie funktioniert analog zu den in Kapitel 2.2.2.3 Methode.

Allgemein ist die Bilanzierung von CO₂ deutlich anspruchsvoller, da sich CO₂ je nach Dissoziationsgleichgewicht in unterschiedlichen Formen im Prozess finden lässt: Kohlensäure (H₂CO₃), Bicarbonat (HCO₃⁻) oder Carbonat (CO₃⁻) (Chmiel, Takors, and Weuster-Botz 2018).

2.2.6 Bestimmung des Respiratorischen Quotienten (RQ)

Der respiratorische Quotient (RQ) bezeichnet das Verhältnis zwischen dem während der Zellatmung gebildeten CO₂ zum aufgenommenem Sauerstoff. Dabei kann aus diesem Wert Rückschluss auf den in der Zelle vorgehenden Metabolismus gezogen werden. Der RQ-Wert wird aus der CER und OUR berechnet, siehe Formel (12).

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (12)$$

<i>RQ</i>	-	Respiratorischer Quotient	$[-]$
<i>OUR</i>	-	Sauerstoffaufnahme	$[mol_{O_2} L^{-1} h^{-1}; g_{O_2} L^{-1} h^{-1}]$
<i>CER</i>	-	Kohlendioxidemissionsrate	$[mol_{CO_2} L^{-1} h^{-1}; g_{CO_2} L^{-1} h^{-1}]$

Wird z.B. Zucker über den Zellmetabolismus umgesetzt, so werden sechs Sauerstoff Moleküle zu sechs CO₂-Molekülen umgesetzt und der RQ-Wert liegt bei eins.

Es ist zudem bekannt, dass bei Fetten und Proteinen der Wert zwischen 0,71 und 0,8 liegt. Werden sauerstoffreiche Säuren wie Weinsäure oder Apfelsäure veratmet, liegt der RQ-Wert über dem Wert von eins. Im Rückschluss vom RQ-Wert kann daher näherungsweise auf die Art der Substratverwertung geschlossen

werden (Chmiel 2006). Bei *Saccharomyces cerevisiae* liegt der RQ-Wert bei der aeroben Kultivierung von Glukose bei eins, steigt bei der Kultivierung von Glukose unter dem Crabtree-Effekt auf neun und sinkt wiederum bei der areoben Ethanolverstoffwechselung auf 0,66 (Hass and Pörtner 2011).

2.2.7 Bestimmung von Kontamination

Die schnelle Erkennung mikrobieller Kontaminationen in Bioprozessen stellt immer noch eine große Herausforderung dar (BioPhorum Operations Group 2020). Derzeitige Methoden sind entweder von aufwändigen *Offline*-Experimenten (z. B. Sequenzierung oder qPCR) abhängig oder haben lange Vorlaufzeiten, so dass die Kontamination in frühen Stadien eines Bioprozesses nicht online erkannt werden kann. Daher könnte eine weitere Untersuchung der kontaminationsbedingten Veränderungen der OUR in frühen Stadien von Bioprozessen einen völlig neuen Ansatz zur frühzeitigen Erkennung von Kontaminationen in der pharmazeutischen Industrie bieten. Durch eine frühzeitige Erkennung können Betriebskosten und Zeit gespart werden.

Wie von der BioPhorum Operations Group in ihrer BPOG Technology Roadmap (BioPhorum Operations Group 2020) beschrieben, besteht eine der größten Herausforderungen für die Bioprozessanalytik in der Integration mehrerer *Online*-Sensoren in eine einzige moderne Sensorplattform.

3 Konzept und Design

Die Messtechnik und die Methoden zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme in Bioprozessen sind vorhanden und gut etabliert. Die etablierte Herangehensweise zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme scheidet jedoch bei dem Versuch die Daten für ein Online-Monitoring während der Kultivierung zur Verfügung zu stellen. Das Konzept des *in situ* Kombisensors ISICOM und des miniCOMs lassen zu, dass die Messung der dynamischen Methode für ein *Inline*- bzw. *Online*-Monitoring in Multi- und Single-use-Bioreaktoren zur Verfügung steht. Im Weiteren werden der Aufbau und der Messablauf der Sensoren vorgestellt und beschrieben.

Da das ISICOM ausführlich durch Busse charakterisiert und beschrieben worden ist, wird in dieser Arbeit nur auf einzelne weitere Punkte eingegangen, weitere Details sind dieser Arbeit zu entnehmen: (Busse 2017).

Im Folgenden wird der Mini-Kombisensor "miniCOM" vorgestellt. Dieses neue Messsystem wurde von der oben genannten Arbeitsgruppe konzipiert und entwickelt. Mit dem miniCOM kann derzeit die metabolische Aktivität einer CHO-Kultur in einem Einwegreaktor online über die Sauerstoffaufnahme (OUR) und die CO₂-Emissionsrate (CER) bestimmt werden. Darüber hinaus ist eine frühzeitige Erkennung von Kontaminationen nach der Inokulation im Bioreaktor möglich. Das Design des miniCOM erlaubt eine Erweiterung eines Bioreaktors mit zusätzlichen Sensoren. Mit unserem System als Sensorplattform wird es in Zukunft möglich sein, Bioreaktoren mit Sensoren auszustatten, für die bisher kein Platz oder kein geeigneter Anschluss vorhanden war.

3.1 ISICOM

Das ISICOM ist für den Gebrauch in Multi-use-Bioreaktoren designt. Bei der Installation wird der Sensor am Ingoldport mit 15° Neigung eines Edelstahlbioreaktors montiert (vgl. Abbildung 13).

Das ISICOM ist aus Edelstahl gefertigt. Der vordere runde, geschlossene Schaft wird ins Reaktorinnere montiert wird. Nach der Montage schaut man von außen auf den Aufbau, der die Sterilgrenze zur Umgebung bildet.

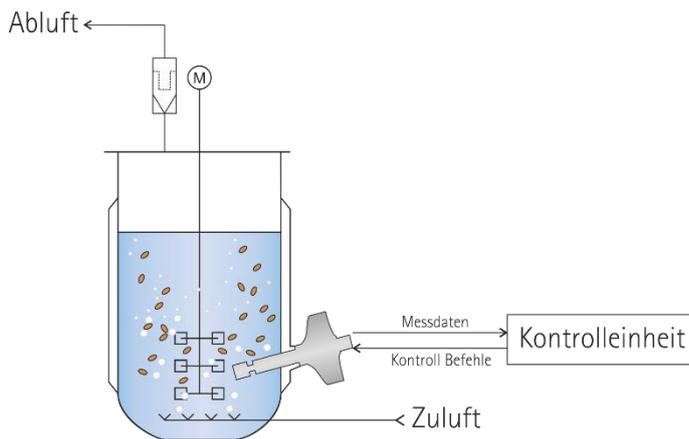


Abbildung 13 – ISICOM eingebaut in Bioreaktor im Ingoldport (Dahlmann et al. 2020)

Am vorderen Ende des Schafts befindet sich die Messkammer, die in das Kulturmedium im Reaktor ragt. Durch Schlitze im Schaft wird das Medium mit den Zellen von den Rührern des Reaktors in die Messkammer gespült. Im Inneren der Messkammer befindet sich ein kleiner Magnetführer, um das Sedimentieren der Zellen zu verhindern. Ein Motor im vorderen Ende des Sensors lässt den Magnetführer drehen. Die Messkammer schließt ein repräsentatives Volumenelement ein.

Im Inneren des Schaftes befindet sich ein weiterer Schaft, der sich unabhängig zum äußeren Schaft vor- und zurückbewegen kann. Dieser Aufbau stellt eine Analogie zum Verschließen der Zuluft Strecke der dynamischen Methode im Bioreaktor. Ein Motor am hinteren Ende des Sensors fährt den inneren Schaft vor und zurück. Es sind zwei O-Ringe zwischen den Schäften eingebaut. Der vordere O-Ring, der näher am Sensorkopf ist, schließt die Zellen in der Messkammer sauerstoffdicht von der Umgebung ab. Der hintere O-Ring stellt die Sterilgrenze zum hinteren Sensorteil da, indem er verhindert, dass Medium und Zellen zwischen die beiden Schäfte gelangen können.

Der innere Schaft ist am vorderen Ende abgeschrägt. Durch diesen Aufbau werden Gasblasen, die ins Innere der Messkammer kommen, entlang der Schräge aus der Messkammer hinausgeleitet. Auf der Schräge des Schaftes ist eine Glasscheibe geklebt. Auf ihr kleben die Sensorpatches (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg) zur Messung von Sauerstoff und pH. Der innere Schaft ist innen hohl, damit die Lichtleiter der Sensorpatches montiert werden können. Die Lichtleiter sind vom restlichen Aufbau getrennt, da diese

hitzeempfindlich sind und nicht für eine Sterilisation im Reaktor geeignet sind. Sie werden nach der Sterilisation und dem Abkühlen auf Kultivierungstemperatur von hinten in den Sensor geschoben. Dies betrifft alle drei Lichtleiter für die Messung von pH, pO_2 und für die Bestimmung des Streulichts.

Um eine sterile Messung zu ermöglichen, wird sichergestellt, dass der komplette Sensor thermisch sterilisiert wird. Der vordere Teil des Sensors wird über die Sterilisation des Reaktors sterilisiert. Der hintere Teil wird durch eine externe Dampfleitung über Heißdampf sterilisiert. Eine große, runde EPDM-Membran im hinteren Sensorteil sorgt für eine Trennung des sterilen Sensorinneren und der Umgebung. Bewegt sich der

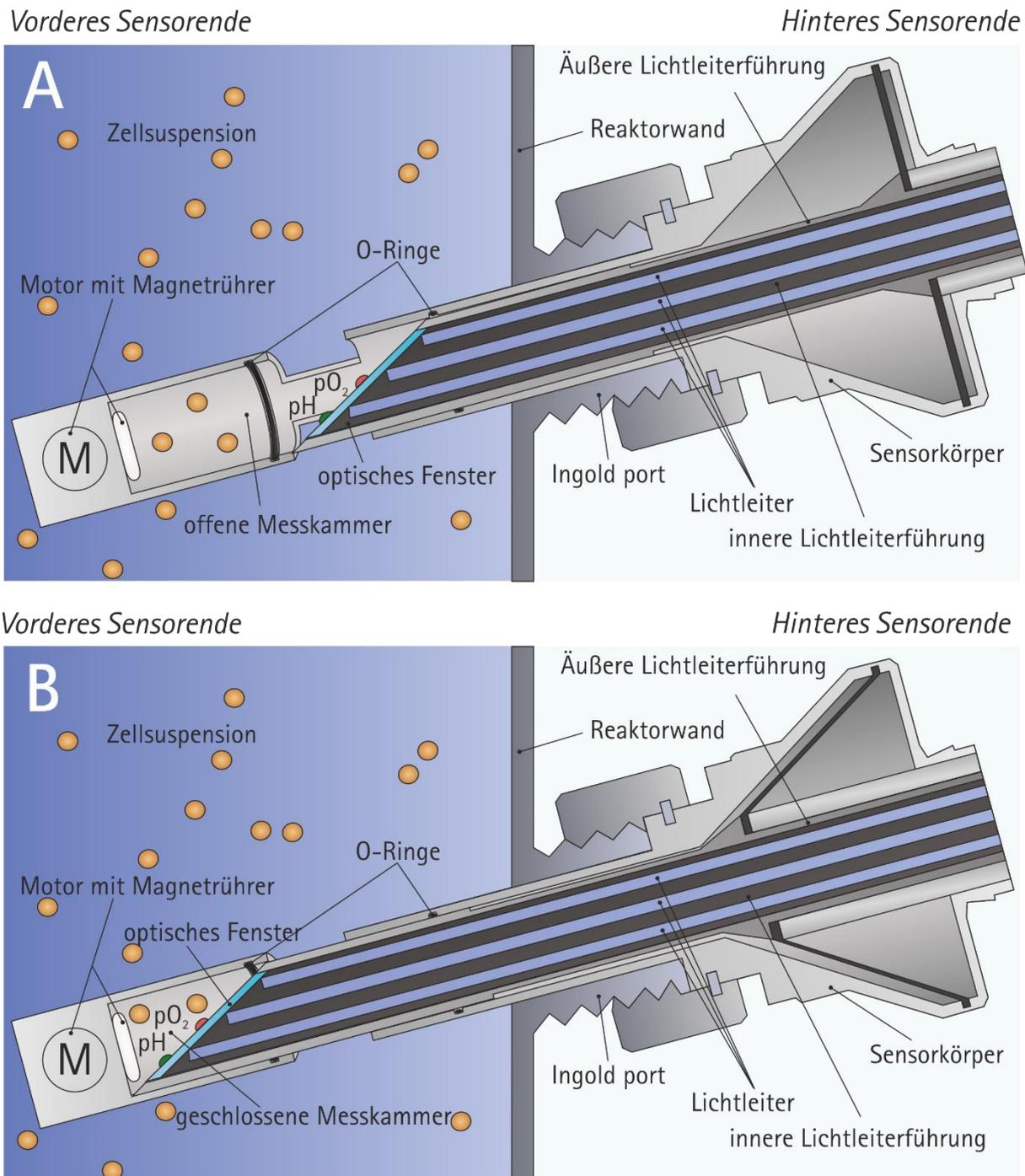


Abbildung 14 - Querschnitt durch den ISICOM Sensor

innere Schaft nach vorne, wird die Membran gedehnt. Bewegt sich der Schaft zurück, entspannt sich die Membran wieder (vgl. Zustand A und B aus Abbildung 14). Eine genauere Beschreibung des Sensors und der Charakteristika ist hier zu finden: (Busse 2017).

3.2 miniCOM

Es gibt Möglichkeiten, Multi-use-Sensoren in Multi-use-Bioreaktoren zu integrieren, dies ist aber nur über bestimmte Schnittstellen möglich (Bsp. über einen Probe Assembly mit Kleenpak Connector). Die Multi-use-Sensoren müssen von dem Plastik des Single-use-Reaktoren gehalten werden können. Eine Voraussetzung, die das ISICOM mit mehr als 1 kg Gewicht nicht erfüllen kann, da es zu schwer ist. Daher wurde für das *Online*-Monitoring der Sauerstoffaufnahme im Single-use-Bioreaktor wurde das miniCOM (mini combi sensor) entwickelt.

3.2.1 Aufbau und Fertigung

Der Aufbau des Sensors variiert, je nachdem in welchen Reaktortyp der Sensor eingebaut werden soll, hat aber immer die gleichen Komponenten: Sensoreinheiten und ihre Haltevorrichtung, Messkanal und Konnektoren für die Schläuche (vgl. Abbildung 15). Die Zellsuspension wird über ein Schlauchsystem mit einer Pumpe aus dem Inneren des Reaktors in den mikrofluidischen Chip geführt. Der Messkanal ist mit Sensorplugs (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg) zur Messung von pH, O₂ und CO₂ ausgestattet. Diese Sensorplugs können beliebig ausgetauscht werden, um sich ggf. den Anforderungen anderer Messaufgaben anzupassen. Um die Sensorplugs dicht und steril zu montieren, sind sie über O-Ringe, Unterlegscheiben und Konnektoren mit dem mikrofluidischen Chip verbunden. Die hier verwendeten mikrofluidischen Chips wurden über ein hochauflösendes Multijet-Verfahren mit einem 3D-Drucker hergestellt. Das hier verwendete 3D-Druckmaterial besteht aus Polyacrylate, da es sterilisierbar und biokompatibel ist (Siller et al. 2019). Das Verfahren und Material ist gut geeignet für ein rapid prototyping. Der Konnektor

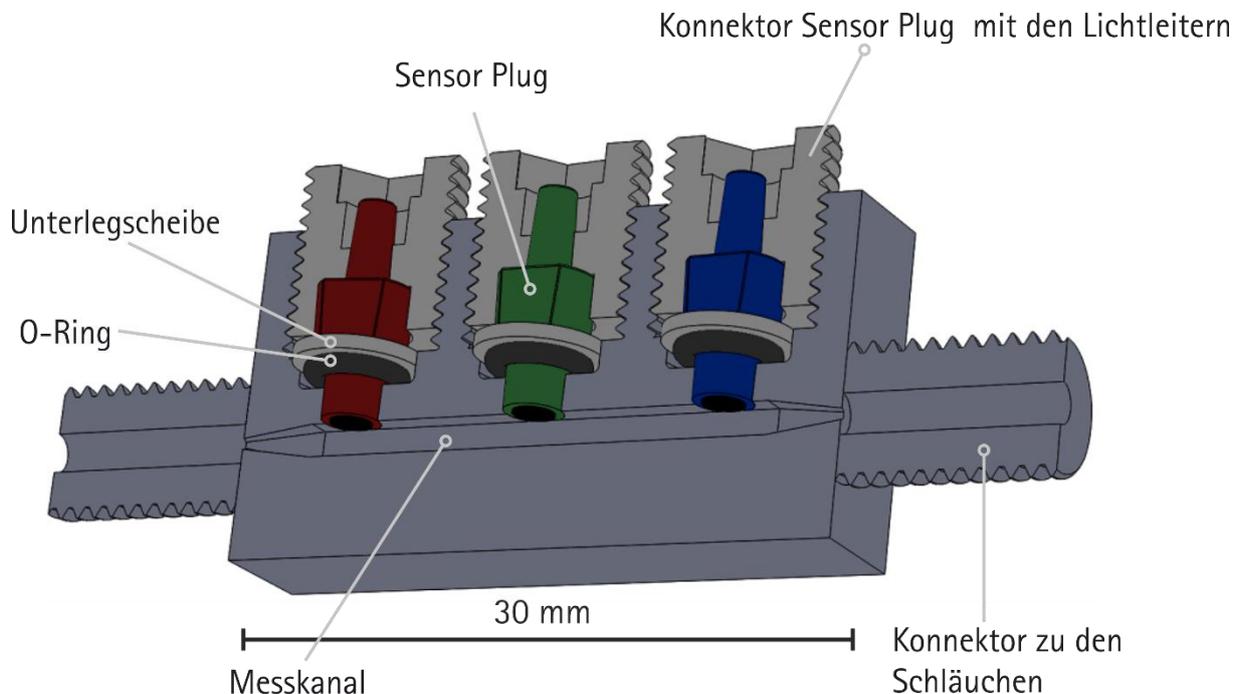


Abbildung 15 - Querschnitt des miniCOM mit eingebauten Sensorplugs für die Anwendung im Schüttelkolben

fixiert die Sensorplugs über ein metrisches Gewinde mithilfe eines Imbusschlüssels im Chip. An den beiden Enden des Chips ist das Verbindungsstück zu den Konnektoren, um hier unterschiedliche Schläuche zu montieren. Diese können ohne großen Aufwand angepasst werden, um den Schlauchdurchmesser oder die Schlauchlänge zu variieren.

Entsprechend dem Verschleiben der Zuluftstrecke aus der gängigen dynamischen Methode wird die Transportpumpe des miniCOMs zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme im Stop-Flow betrieben. Sobald die Messung beendet ist, geht die Pumpe wieder an und die Zellen werden aus dem Schlauch transportiert und durch neue ersetzt.

Die Signalleitung des Sensorplugs (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg) wird über Lichtleiter realisiert. Diese werden von oben auf die Sensorplug (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg) gesteckt und über einen Signalwandler in ein digitales Signal überführt.

Der Messkanal des miniCOMs für den Schüttelkolben (siehe Abbildung 15) fasst ein Volumen von 115 μL , während der Chip ein Gesamtvolumen von 220 μL fasst und über Standard-HPLC-Schläuche ($d_i = 0,5 \text{ mm}$) mit dem Bioreaktor verbunden ist. Zwischen Bioreaktor und miniCOM ist ein Tygonschlauch geschaltet, der die Zellsuspension mittels einer Peristaltikpumpe vom Bioreaktor zum miniCOM leitet.

Der miniCOM kann als Point-of-Use-Sensorplattform für verschiedene Arten von Bioreaktoren verwendet werden. Er kann leicht in verschiedene Einweg-Bioreaktorsysteme oder Schüttelkolben integriert werden.

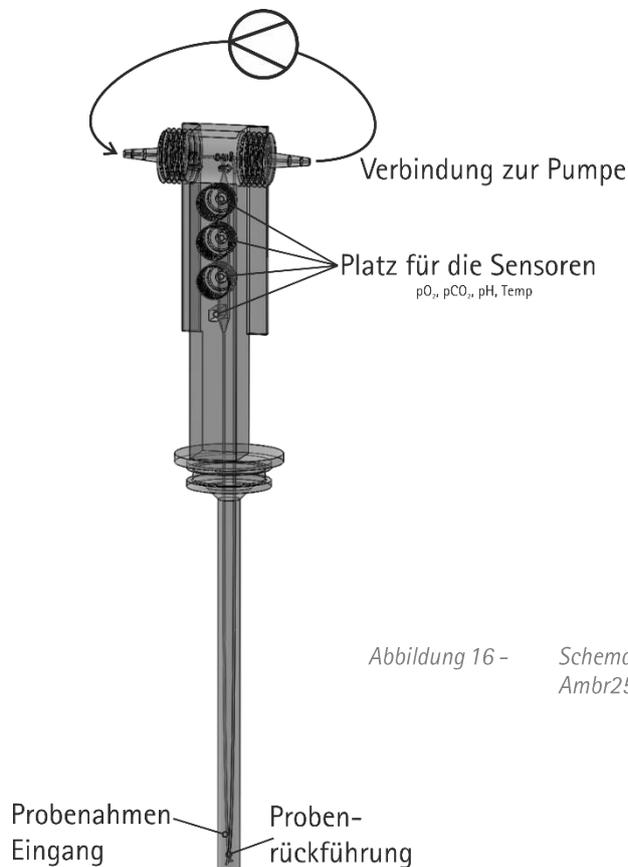


Abbildung 16 - Schematische Zeichnung des miniCOMs für den Einbau ins Ambr250®

Als Proof-of-Concept wurde der miniCOM in den Ambr250® von Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, implementiert. Die Zellsuspension wird kontinuierlich durch den Chip gepumpt. Der Pumpschlauch ist direkt mit dem Chip verbunden.

Das miniCOM für den Aufbau im Ambr250® (Sartorius AG, Göttingen) (siehe Abbildung 16) weicht optisch von dem miniCOM des Schüttelkolbens ab, hat aber die gleichen Funktionen und Komponenten. Dieses miniCOM hat eine im mikrofluidischen Chip enthaltene Führung bis auf den Reaktorboden und braucht keine Schläuche um die Probe zu entnehmen, dadurch wird das Probenvolumen noch kleiner. Am oberen Ende des miniCOMs befinden sich die Konnektoren für die Pumpschläuche der Schlauchquetschpumpe. Die Zellsuspension wird durch einen feinen Kanal in das miniCOM gezogen, durch die Pumpschläuche an der Pumpe vorbei, zurück ins miniCOM und zuletzt an den Sensoren vorbei geleitet, bis die Zellsuspension durch den zweiten feinen Kanal wieder zurück in den Reaktor fließt. Diese Wegrichtung wurde gewählt, damit es beim Einsaugen des Mediums an der Spitze des miniCOMs nicht zur Blasenbildung durch den Unterdruck kommt.

3.3 Systemintegration

Der Aufbau und das Konzept des miniCOM erlaubt eine sterile Installation des Sensors im Single-use-Bioreaktor als auch Multi-use-Bioreaktor oder im Schüttelkolben, um z.B. die Vorkultur zu überwachen. Auch im Falle des miniCOMs wird ein repräsentatives Volumenelement in der Sensoreinheit vermessen.

Wie der Sensor im Allgemeinen aussieht und wie er in die Systeme integriert wird, ist im folgenden Kapitel erklärt.

3.3.1 Sterilisation

Grundsätzlich werden alle Komponenten die im Single-use-Bereich eingesetzt werden über Beta- oder Gammastrahlung sterilisiert. Die hier verwendeten Sensorplugs (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg) sind vor der Auslieferung durch Betastrahlung sterilisiert worden. Da für die Prototypen Entwicklung eine Sterilisation über Strahlung aus unterschiedlichen Gründen ausgeschlossen wurde, wurde eine thermische Sterilisation als Zwischenlösung etabliert.

Der 3D gedruckte mikrofluidische Chip des miniCOMs wird nach dem Reinigungsprozess der Fertigung mit einem ebenfalls 3D gedruckten Sensorplug-Dummy, O-Ringen und Unterlegscheibe mittels Konnektor in den Chip montiert. Ebenso wie das Schlauchsystem, welches im Hinblick auf Schlauchlänge und Durchmesser auf die entsprechende Anwendung angepasst wurde. Nach der Montage werden die Komponenten

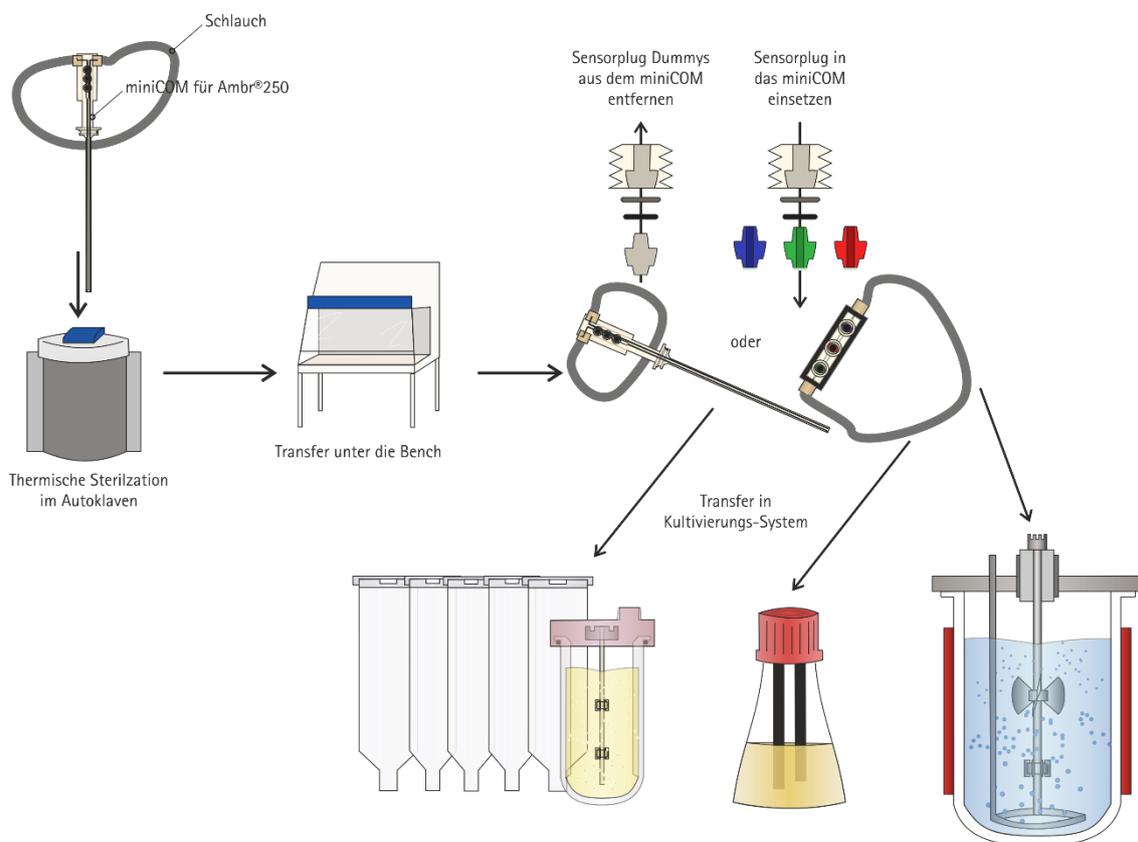


Abbildung 17 - Vorgehen zum sterilen Einsatz des miniCOMs in diverse Reaktorsystem wie das Ambr® 250, Schüttelkolben oder ein Bench-top-Bioreaktor

in einen Autoklavierbeutel eingepackt und thermisch im Autoklaven sterilisiert (15 min, 121°C; 1 bar Stützdruck beim Abkühlen). Im Anschluss an die Sterilisation wird der mikrofluidische Chip mit dem Sensordummy und den montierten Schläuchen unter die Clean Bench / Laminar Flow Hood überführt. Unter der Bench werden die Dummies demontiert und gegen die Sensorplugs (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg) ausgetauscht.

Ein Video zu diesem Prozess ist hier zu finden:



Oder: <https://seafile.cloud.uni-hannover.de/f/db03f65b9cfa4a93ba31/>

Bei der Nutzung des miniCOMs im Schüttelkolben werden die Glaskolben direkt mit autoklaviert. Bei der Nutzung des miniCOMs im Ambr250® wurde das miniCOM unter der Bench im ambr250® montiert. Der Aufbau zu den entsprechenden Versuchen wird in den nachfolgenden Kapiteln gezeigt und beschrieben.

3.3.2 Schüttelkolben

Die Vorkultur wird meistens in Schüttelkolben kultiviert. Schüttelkolben sind einfach in der Handhabung bieten aber wenig Möglichkeiten, das Wachstum und die Nährstoffversorgung der Zellen im Inneren zu überwachen.

Für den Einsatz des miniCOMs werden die Schläuche zum Führen der Zellsuspension durch den Deckel bis an den Boden des Schüttelkolbens gelegt und über die Pumpe mit dem Chip verbunden. Nach der Sterilisation und dem Austauschen der Sensorplugs (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg) kann der

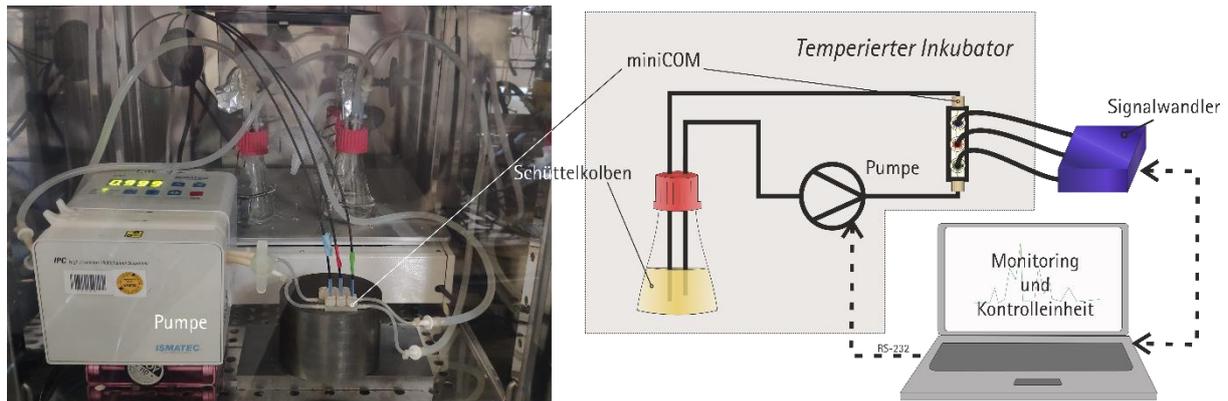


Abbildung 18 - Schematischer Versuchsaufbau – Schüttelkolben mit miniCOM, Pumpe, Signalwandler (PreSens GmbH, Regensburg) und Monitoring und Kontrolleinheit Schüttelkolben, Pumpe und miniCOM befinden sich im temperierten Inkubator

gesamte Aufbau aus der Clean Bench steril in den Inkubator überführt werden. Der Schüttelkolben, das miniCOM und die Pumpe befinden sich im Inkubator. Als einer der letzten Schritte des Aufbaus werden die Lichtleiter auf die Sensorplugs des miniCOMs aufgesteckt und aus dem Inkubator auf die Signalwandler geleitet. Neben den Lichtleitern wird ein Temperatursensor montiert um eine Temperaturkompensation der pH-, pO₂- und CO₂-Signale zu gewährleisten. Über die Signalwandler kann der Messwert am angeschlossenen Laptop überwacht werden. Die Pumpe wird über ein Protokoll regelmäßig angesteuert, um die Messung zu starten und zu stoppen (vgl. Abbildung 18). In dem über die Pumpe und den Chip erzeugten Bypass werden aus dem Kolben 3,25 % des Flüssigkeitsvolumens zirkuliert (siehe Kapitel 8.6.2).

3.3.3 Ambr250®

Nachdem das Medium in das Ambr250® (Sartorius AG, Göttingen) vorgelegt wurde, wird das miniCOM statt der Septumkappe in den Deckel eingebaut. Ein O-Ring dichtet das miniCOM zum Deckel des Ambr250® (Sartorius AG, Göttingen) (vgl. Abbildung 19 links). Nachdem das Ambr250® (Sartorius AG, Göttingen) dann in das Benchtopsystem eingesetzt wurde, kann eine starre Abdeckung über den Reaktoren montiert werden, auf dem die Pumpe steht, um die Zellsuspension im Kreis zu fördern. Das Volumen im Chip beträgt 51 μL und das Volumen im Pumpschlauch 467 μL . Bei einem Reaktorvolumen von 225 mL und einer Pumprate von 1 mL min^{-1} wird das gesamte Reaktorvolumen etwa 6,4 Mal pro Tag durch die Pumpe geführt und dabei etwa 2.880 Mal durch das miniCOM.

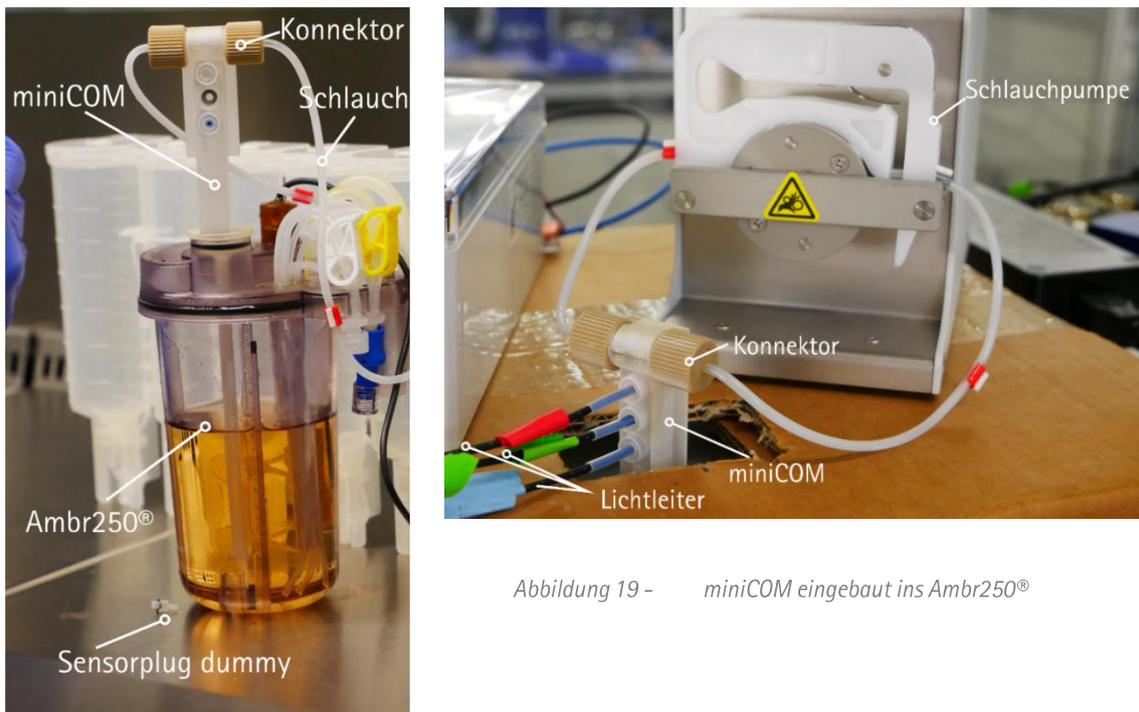


Abbildung 19 - miniCOM eingebaut ins Ambr250®

Die Lichtleiter werden auch hier vorne auf die Sensorplugs (PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg) gesteckt und auf den Signalwandler geführt, von dem das Signal auf die Monitoringeinheit gesendet wird (siehe Abbildung 20).

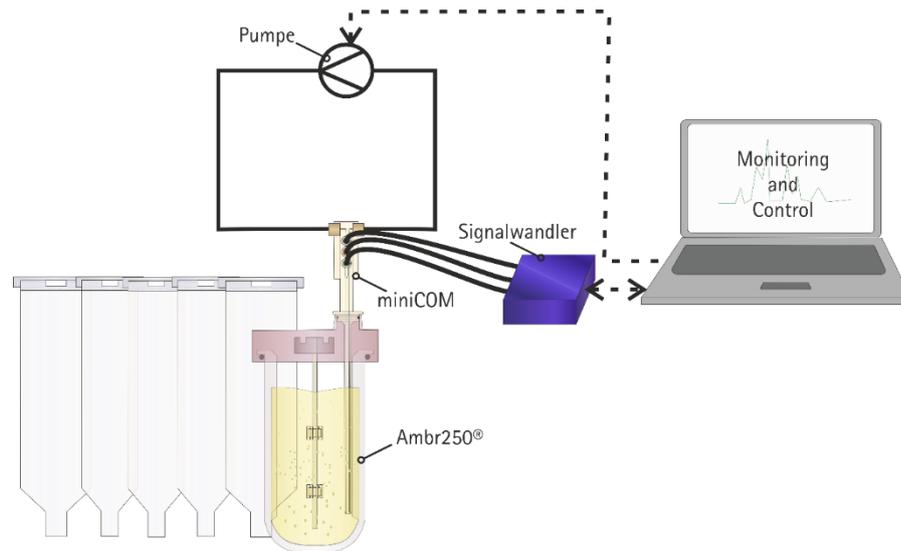


Abbildung 20 - Schematischer Versuchsaufbau – Ambr250® mit miniCOM, Pumpe, Signalwandler (PreSens GmbH- Regensburg) und Monitoring und Kontrolleinheit

3.4 Kommunikationskonzept und Nutzeroberfläche

Die Messungen des ISICOMs und des miniCOMs sollen während der Kultivierung unmittelbar für den Nutzer oder die Kontrolleinheit für die Prozessregelung zur Verfügung stehen. Gleichzeitig sollen alle Schritte überwacht und dokumentiert werden, die die Sensoren vornehmen, um alle Messungen nachstellen zu können, oder um ein erleichtertes Troubleshooting zu ermöglichen. Da der Nutzer einen unkomplizierten Workflow haben soll, ist das Ziel, eine einfache und intuitive Nutzeroberfläche für die Bedienung der Sensoren zu entwickeln. Es gilt hier einen, schnellen Überblick zu ermöglichen, um einfach und ohne viele Klicks gewünschte Einstellungen vornehmen zu können. Im nachfolgenden Kapitel wird das Datenmanagement mit der dahinterliegenden Datenbank gezeigt und die Nutzeroberfläche auf dem ISICOM Rechner kurz vorgestellt. Auch das miniCOM bietet in Zukunft die Möglichkeit, über den ISICOM-Rechner gesteuert zu werden. Die bisher verwendete Hardware ließ die Integration nicht zu.

3.4.1 Kommunikationskonzept

Alle Messergebnisse des ISICOMs werden über Modbus-Schnittstellen auf den ISICOM-Rechner übertragen. Hier werden als Erstes die Rohdaten zusammen mit einem Zeitstempel in der Datenbank gespeichert. Somit ist gewährleistet, dass Daten nicht verloren gehen oder andere Auswertungsmöglichkeiten auch nach den Kultivierungen auf die Rohdaten angewendet werden können. Die in Kapitel 2.2.2 vorgestellten Funktionen und Formeln, die das Prozesswissen enthalten, werden genutzt, um die Rohdaten zu prozessieren. Zusätzlich wird beim Prozessieren der Daten auch die Qualität der weiterverarbeiteten Daten dokumentiert. Alle Befehle, die das ISICOM ausführt und/oder Änderungen der Messintervalle werden in einem Statusbericht in der Datenbank auf dem Rechner hinterlegt und in einer Log-Datei für den Nutzer direkt lesbar gemacht. Dieser Statusbericht wird auch auf der Nutzeroberfläche dargestellt (siehe Abbildung 24). Neben dem Statusbericht werden die prozessierten Daten als Graph in der Nutzeroberfläche dargestellt. Eine Übersicht der Datenverwaltung ist in Abbildung 21 abgebildet.

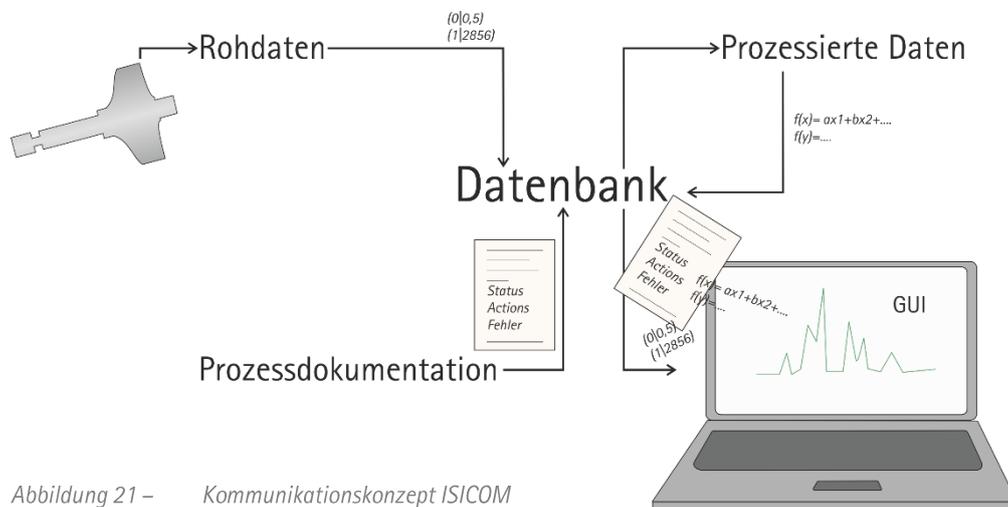


Abbildung 21 – Kommunikationskonzept ISICOM

Bei der Erstellung des Datenbankkonzepts war, neben der Sicherung aller Daten, wichtig, dass die Daten ohne Probleme um weitere Daten ergänzt werden können. Sollte es in Zukunft also weitere Sensoren und Prozessgrößen geben, die in den Kombisensor integriert werden, können diese einfach auch in das Datenbanksystem integriert werden. Die Anbindung in die Datenbank ist dabei nicht auf Größen des ISICOMs beschränkt. Es können auch Größen aus anderen Sensoren über diverse Schnittstellen in die Datenbank integriert werden und stehen damit zur Verfügung, um weiteres Prozesswissen zu extrahieren. Abbildung 22 zeigt eine Übersicht der Datenbank. Die darin gespeicherten Informationen werden in vier Klassen differenziert: Daten (engl. data), Hardwareinformationen (engl. hardware information), Nutzerdaten (engl. user settings) und physikalische Größe (engl. physical quantity). So hat eine physikalische Größe wie z.B. pO_2 eine Hardwareeinheit, das Optomodul (Presens, Regensburg) von der die Daten den Wert 66,2 % bekommen. Diese Informationen werden in der Datenbank getrennt voneinander abgespeichert, sind aber über eine sogenannte Foreign-Key-Verbindung miteinander verknüpft und können damit direkt einander zugeordnet werden. Über diese Art der Organisation der Daten werden diese klassifiziert, eine Übersicht ist

leicht zu erstellen und sie sind jederzeit skalierbar. Über die Klasse der Nutzerdaten kann gespeichert werden, wer welche Änderung vorgenommen oder Operationen ausgeführt hat. Dies kann Vorteile für das Troubleshooting haben.

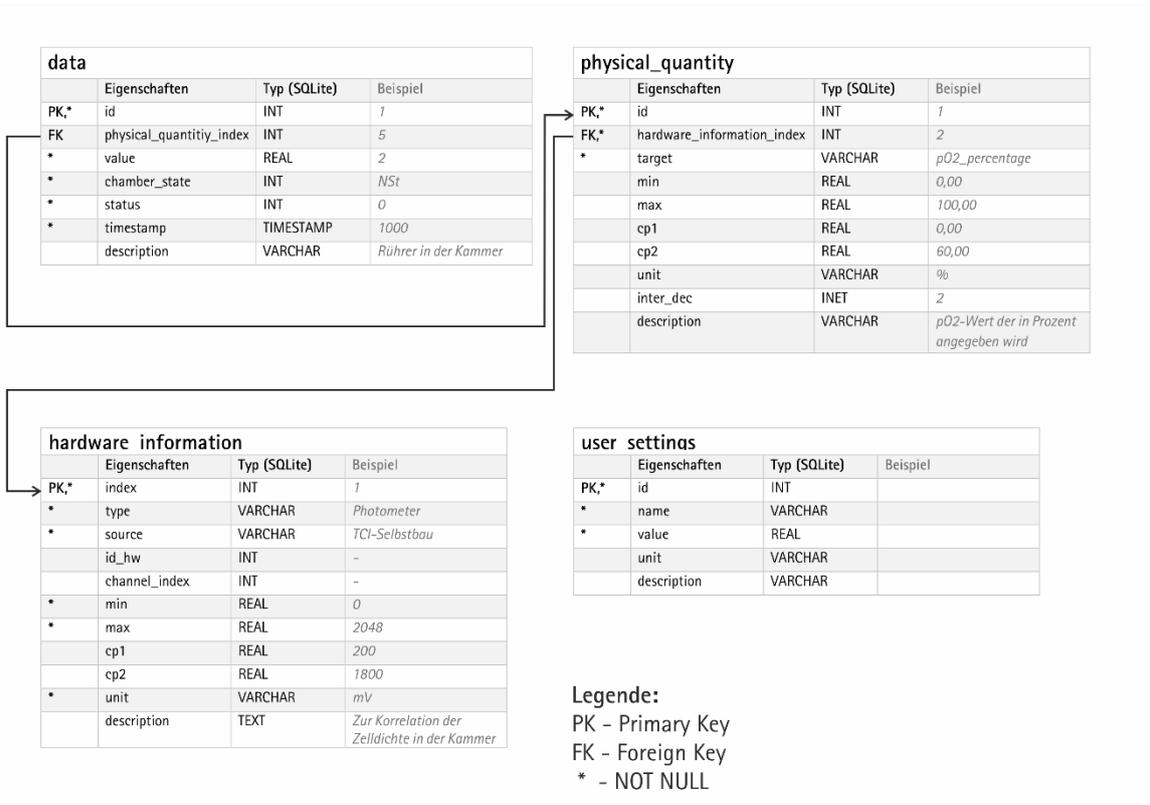


Abbildung 22 – Übersicht der Datenbank im ISICOM-Rechner

3.4.2 Auswertung der Messpunkte

Alle benötigten Messpunkte werden gesammelt und automatisiert über das Post Processing der Daten in die oben genannten Prozessgrößen verarbeitet. Zu jedem Datenpunkt wird eine weitere Größe zur Beurteilung der Datenqualität ermittelt. Dies beschränkt sich aktuell auf die Daten des ISICOMs, kann aber mit geringem Aufwand auf die Datenverarbeitung des miniCOMs übertragen werden.

Da für das miniCOM, aufgrund fehlender Hardware, eine automatische Datenverarbeitung noch nicht möglich ist, wurden die Datenpunkte von Hand ausgewertet. Hierfür wurde die RGP-Funktion von Excel verwendet (Office 2023). Über diese Funktion lässt sich eine Interpolation der Daten nach einem Polynom erster Ordnung vornehmen. Bedingung ist dabei, dass kleinste Fehlerquadrat zu finden. Ausgabeparameter sind die Steigung, der y-Achsenabschnitt und der Regressionskoeffizient bzw. das Bestimmtheitsmaß R^2 .

Im Nachfolgenden werden die Daten zur Beurteilung der Datenqualität aufgelistet und im Detail beschrieben. In dieser Arbeit werden dazu genutzt: Pearson-Koeffizient, Bestimmtheitsmaß und Modell-Fehler.

Allgemein lässt sich sagen, dass der Pearson-Koeffizient als Ausreißertest genutzt werden kann. Sollte die Steigung der pO₂-Werte innerhalb der Messperiode bei geschlossener Messkammer positiv sein, würde dies in einem positiven Pearson-Koeffizienten resultieren und kann direkt aus dem Wertepool eliminiert werden.

Das Bestimmtheitsmaß kann analog zu einem Vertrauensintervall gesehen werden. Es ist allgemein bekannt, dass Messtechnik mit einer höheren Zuverlässigkeit im oberen $\frac{2}{3}$ -Wertebereich misst. Da bei einer neuartigen Messtechnik noch nicht von vornherein der Wertebereich bekannt ist, unterstützt dieser Wert bei der Einschätzung der Datenzuverlässigkeit.

Der Modell-Fehler ist ein Indiz dafür, wie gut die Annahme eines linearen Verlaufs bei der Abnahme des pO_2 -Wertes bei geschlossener Kammer zu den realen Werten während der Messung passt. Durch den Metabolismus der Zellen, der Diffusionsraten zwischen Zellen und Sensor sowie der Übertragung innerhalb des Sensors ist bekannt, dass es oft zu Messungen kommt die, das Aussehen eines Verzögerungssystem zweiter Ordnung ($P-T_2$) aufweisen (vgl. Abbildung 23). Gerade am Anfang und Am Ende des Messintervalls kommt es hier oft zu großen Abweichungen. Über den Modell-Fehler können diese Messpunkte erkannt werden. Für die Zukunft wäre diese Größe eine gute Möglichkeit, um zwischen unterschiedlichen Auswertungsmodellen eine geeignete Wahl zu treffen.

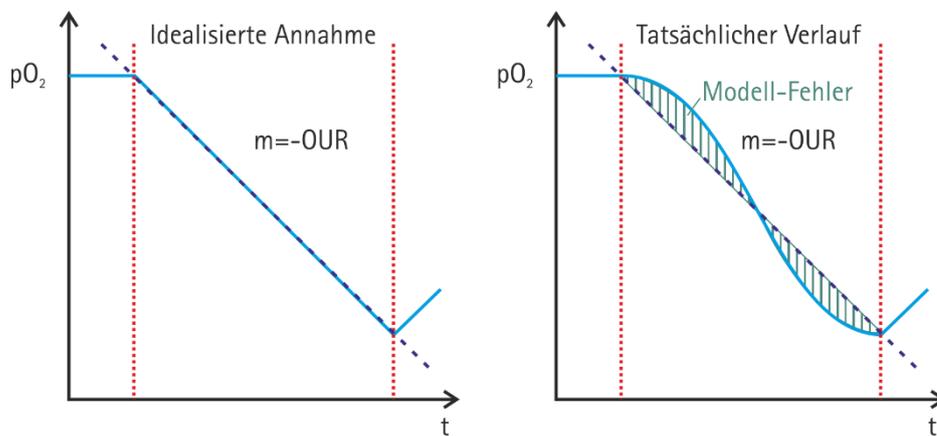


Abbildung 23 - Veranschaulichung des Idealisierten und tatsächlichen Verlaufes des pO_2 -Wertes innerhalb der ISICOM Messkammer zur Verbildlichung des Modell-Fehlers

3.4.3 Nutzeroberfläche

Neben dem Erzeugen von qualitativ hochwertigen Daten zum Erlangen von Prozesswissen sollen auch schon während der Kultivierung die Messergebnisse beobachtet und eingeschätzt werden können. Eine ansprechende und einfache Nutzeroberfläche unterstützt dabei. In Abbildung 24 ist eine Beispieloberfläche während einer Messung des ISICOMs auf dem ISICOM-Rechner zu sehen.

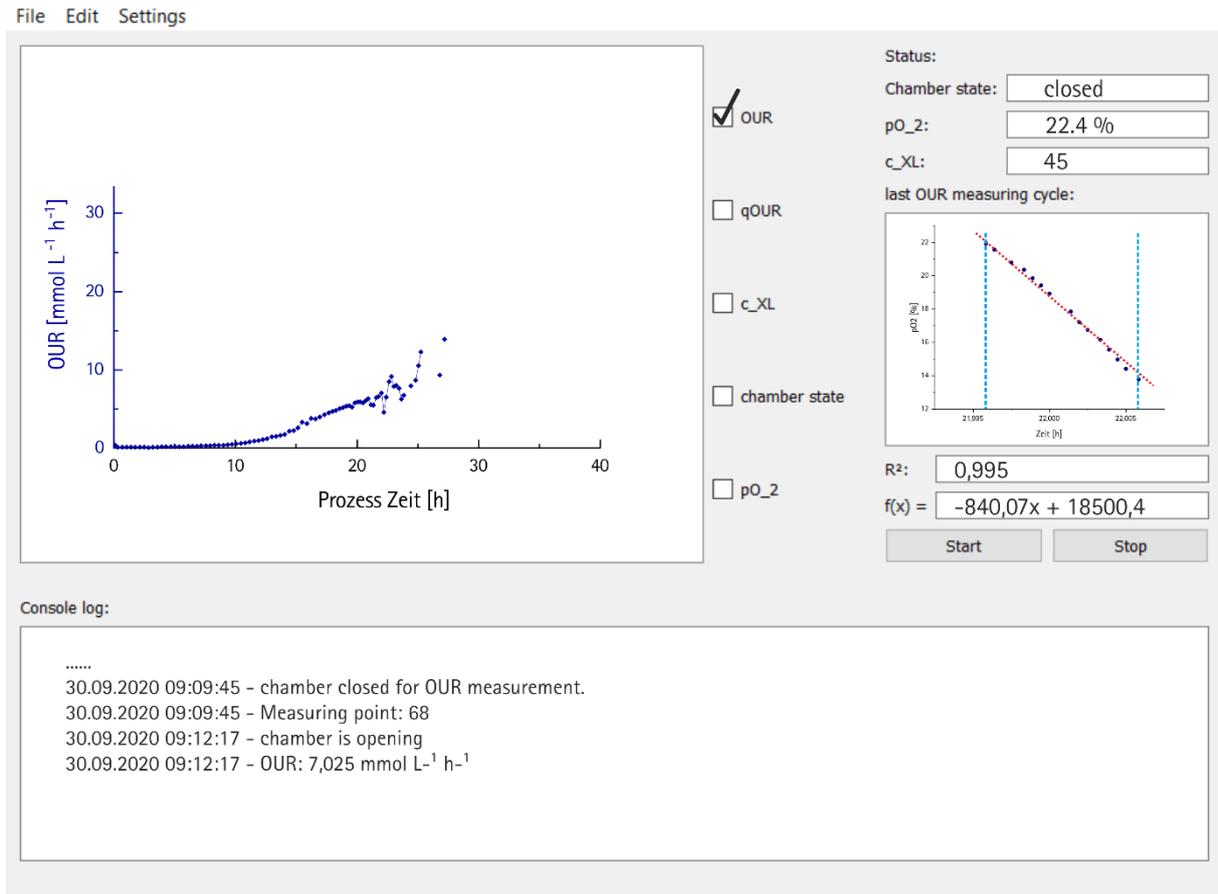


Abbildung 24 – Beispiel der Nutzeroberfläche auf dem ISICOM Rechner inkl. exemplarischer Daten während einer Messung

Auf der Oberfläche lässt sich auswählen, welche Prozessgrößen, die das ISICOM aufnimmt, angezeigt werden sollen. In der rechten oberen Ecke ist der Status der OUR-Messungen zu sehen, zusammen mit den Ergebnissen der letzten Messung. Am unteren Ende sind die Einträge der log-Konsole zu sehen. Diese Daten werden nicht nur in der Benutzeroberfläche angezeigt, sondern auch zu jeder Kultivierung in einer log-Datei gespeichert, um ein Troubleshooting zu erleichtern, oder um zu jedem Zeitpunkt die Messkonditionen nachbilden zu können.

Mit den oben gezeigten Werten wird an dieser Stelle beispielhaft gerechnet, wie die OUR bestimmt wird:

Prozess-Std. [h]	pO ₂ -Wert [%]
Kammer schließt	
21,9958	21,92
21,9964	21,57
...	...
22,0050	14,41
22,0058	13,78
22,0064	13,13
Kammer öffnet	

Aus diesen Messwerten ergibt sich folgende Funktion, die den pO₂-Verlauf beschreibt:

$$pO_2(t) = -840,08 \frac{\%}{h} x + 18500,44 \%$$

Die Steigung -840 % h⁻¹ beschreibt hierbei die OUR und wird nun in die Einheit mmol L⁻¹ h⁻¹ umgerechnet, aus dem Henry-Gesetz (Formel (1)); Details zur Henry-Konstante sind in Kapitel 8.6.1 zu finden):

$$\frac{d c_{O_2}}{d t} = \frac{|m| \cdot p_G}{H_{O_2}(\vartheta)} = \frac{|-8,408 \frac{1}{h}| \cdot 1,013 \text{ bar}}{1,21 \cdot 10^3 \frac{L \text{ bar}}{\text{mol}}} = 7,025 \frac{\text{mmol}}{L h}$$

Über die in Abbildung 24 gezeigte Oberfläche können alle Einstellungen vorgenommen werden, die zur Nutzung des ISICOMs erforderlich sind. So können die maximale Verschlusszeit oder der untere Schwellenwert des pO₂-Wertes zum Öffnen der Kammer über die „Settings“ eingestellt werden.

4 Charakterisierung der Sensoren

Die Messung und das Funktionsprinzip der beiden Sensoren wurden in den vorherigen Kapiteln beschrieben. Bevor die Sensoren in den Betrieb in einer Kultivierung genommen werden, soll gezeigt werden, dass bestimmte funktionale Ansätze auch funktionieren und Probleme, die auftreten können, ausgeschlossen werden können. Hierfür wurden Charakterisierungsversuche vorgenommen, die nun vorgestellt werden.

Viele Punkte zur Charakterisierung wurden bereits von Busse zum ISICOM durchgeführt. Diese Ergebnisse sind dieser Quelle zu entnehmen: (Busse 2017). In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Sedimentationsverhalten innerhalb der Messkammer über einen neuen Ansatz untersucht.

Für das miniCOM wurde der Aspekt des sterilen Einsatzes untersucht. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, ob sich der Stopp-Flow-Betrieb einer Pumpe dafür eignet, um die dynamische Methode zur Bestimmung der OUR nachzustellen.

4.1 ISICOM – Sedimentationsverhalten unterschiedlicher Zellen

Die Messung der metabolischen Aktivität findet innerhalb einer etwa 1 mL großen Messkammer des ISICOMs statt. Für die Messung öffnet und schließt sich der Sensor während der Kultivierung. Wie lange und in welchen Zeitabständen gemessen wird, kann der Nutzer des Systems selbstständig einstellen und definieren. Die Verschlusszeit des ISICOMs ist dabei abhängig von der metabolischen Aktivität der Zellen. Zum Schutz der Zellen vor einer Sauerstofflimitierung geht die Kammer sofort auf, sobald der gemessene pO_2 -Wert einen Schwellenwert von 10 % erreicht hat. Bei geringen Zellkonzentrationen, vorwiegend in Tierzellkultivierungen, kann dies zu Verschlusszeiten von mehreren Minuten führen. Die maximale Verschlusszeit ist auf eine Standardzeit von 10 min gesetzt und kann vom Nutzer angepasst werden. Um eine repräsentative Messung zu ermöglichen, sollten sich die Zellen während der Messung nicht in der Kammer absetzen.

Für diese Untersuchung des Sedimentationsverhaltens verschiedener Zellen wurde ein Sedimentationsphotometer entwickelt. Es funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie ein klassisches Transmissionsphotometer. Für die Sedimentationsbestimmung wurde es in eigener Arbeit mit einem zusätzlichen Strahlengang ausgestattet (inspiriert durch: (Scheffler and Elsholz 2021)), die beiden Strahlengänge sind übereinander und entgegengesetzt zueinander angeordnet (vgl. Abbildung 25). Kommt es zur Sedimentation, bewegen sich die Zellen aus dem oberen Strahlengang hinaus, in den unteren. Eine Änderung der Transmission, in Form eines Signalanstiegs, kann im Falle einer Sedimentation beobachtet werden. Das Signal am unteren Messpfad bleibt so lange konstant, bis die Zellen auch an diesem vorbei sedimentiert sind. Über die Zeit und mit dem definierten Abstand kann hier über das physikalische Weg-Zeit-Gesetz die Sedimentationsgeschwindigkeit angegeben werden. Details zum Signalverhalten hoher bzw. niedriger Streukörperkonzentrationen bei einer Transmissionsmessung sind in Kapitel 2.2.1.3.1 zu finden.

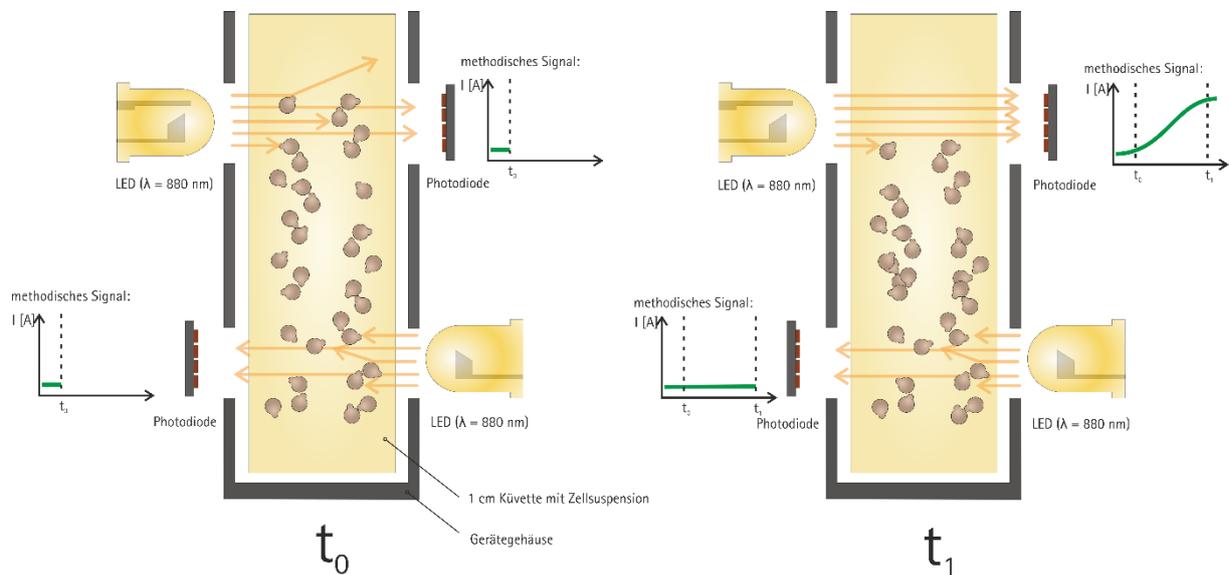


Abbildung 25 - Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Sedimentationsphotometers nach (Nico Ulber 2019). t_0 beschreibt dabei den Anfangszustand der Messung, t_1 beschreibt den Zustand, bei dem die Zellen innerhalb des Photometers sedimentiert sind. Beide Zustände sind beispielhaft mit einem methodischen Signalverlauf der Photodiode über die Zeit dargestellt.

Der umgesetzte Aufbau des Sedimentationsphotometers ist in Abbildung 26 zu sehen. Das Sedimentationsphotometer verfügt über ein WLAN-Modul, über welches sich der Nutzer mit einem WLAN-fähigen Endgerät wie Smartphone, Tablet oder Laptop verbindet. Über den Browser des verbundenen Endgeräts können die Bedienung und die Messdatenerfassung vorgenommen werden. Die Daten können im Anschluss als CSV-Datei exportiert und weiterverarbeitet werden. Weitere Details zum Aufbau, zu Bauteilen und Ergebnissen sind in der dazugehörigen Bachelorarbeit zu finden (siehe (Nico Ulber 2019)).



Abbildung 26 - Sedimentationsphotometer (Nico Ulber 2019)

Für die Versuche wurden alle Zellsysteme, bei denen das ISICOM bisher im Einsatz war und sein wird, untersucht. Es handelt sich hierbei um *E.coli*- (*BL21*), Hefe- (*S. cerevisiae*) und CHO-Zellen. Zur Verifizierung, dass mit dem Aufbau Sedimentation wirklich bestimmt werden kann, wurde Sand als Referenzmessung verwendet. Alle Messungen wurden innerhalb einer Makroküvette mit einem Probenvolumen von 1 mL vorgenommen.

In Abbildung 27 ist die Sedimentation von Sand über 5 Minuten (Referenz) und *E.coli*-Zellen im Vergleich über 20 Minuten dargestellt. Durch den Sand ist in der Küvette eine deutliche Signaländerung an der oberen und an der unteren Messstelle innerhalb von 5 Minuten zu erkennen. Der Sand sedimentiert. *E.coli*-Zellen hingegen sedimentieren über 20 Minuten nicht, obwohl die Zellsuspension nicht durchmischt wird.

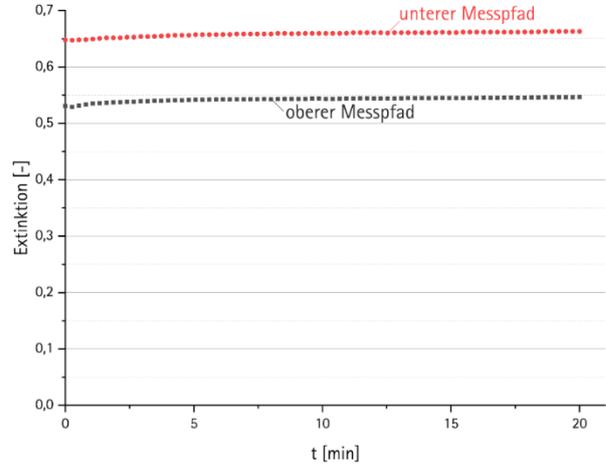
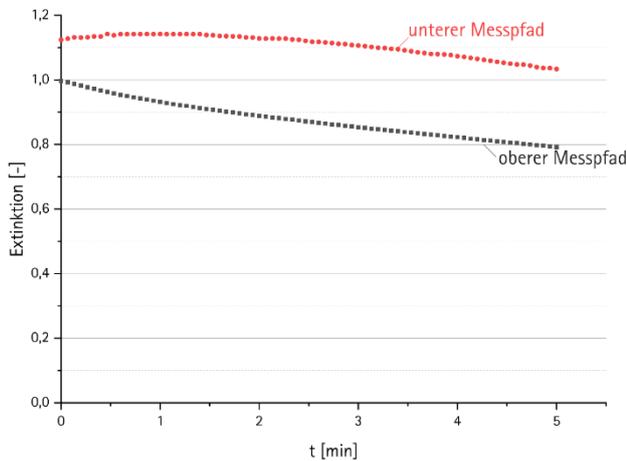


Abbildung 27 – links: Sedimentationsverhalten von Sand über einen Zeitraum von 5 min.
rechts: Sedimentationsverhalten von *E.coli* über einen Zeitraum von 20 min.

Abbildung 28 zeigt die Sedimentation größerer Zelltypen über jeweils 20 min. Über den Messzeitraum kann keine größere Änderung und somit keine Sedimentation bei *S. cerevisiae* festgestellt werden. Bei den CHO-Zellen beginnt das obere Signal nach etwa 5 min zu steigen und nach 10 min zu sinken. Das Signal des unteren Messpfades bleibt über den gesamten Verlauf konstant. Tierzellen, wie CHO-Zellen, beginnen innerhalb von 10 min zu sedimentieren.

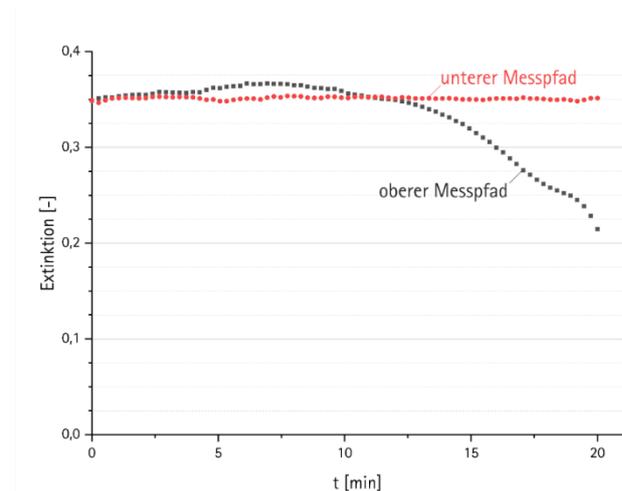
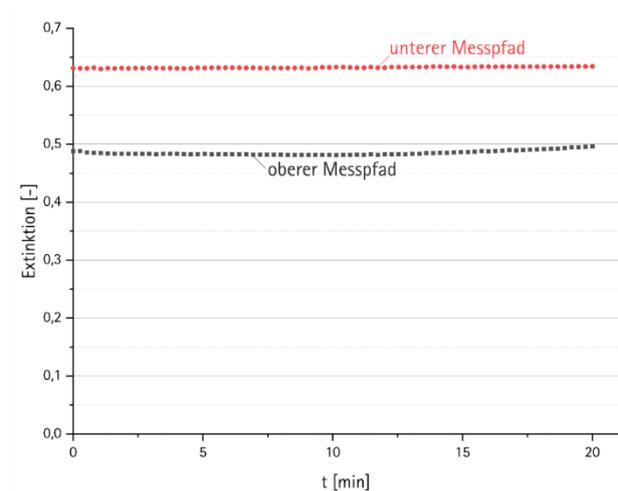


Abbildung 28 – links: Sedimentationsverhalten von 5g L⁻¹ Hefe-Zellen über einen Zeitraum von 20 min.
rechts: Sedimentationsverhalten von CHO-Zellen über einen Zeitraum von 20 min.

Wie durch den Versuch mit Sand gezeigt werden konnte, eignet sich das entwickelte Photometer zur Untersuchung des Sedimentationsverhaltens von Partikeln. In weiteren Versuchen mit Mikroorganismen, Hefe und Tierzellen konnte gezeigt werden, dass nur Zellen, die die Größe von Tierzellen haben, nach einem

Zeitraum von 10 min zu sedimentieren beginnen. Für Messungen mit dem ISICOM bedeutet dies: die maximale Verschlusszeit des ISICOMs wird auf 10 min begrenzt, da in diesem Zeitraum sichergestellt werden kann, dass die Zellen nicht sedimentieren.

Da somit sichergestellt werden konnte, dass keine Konzentrationsgradienten innerhalb der Messkammer während der Messung entstehen, kann auf die Durchmischung verzichtet werden und der Rührer im Kopf des ISICOMs entfernt werden. Dies kommt der Signalqualität der Streulichtsonde zugute, da der rotierende Rührer im Streulichtsignal zu erkennen ist (vgl. (Busse 2017)). Durch das Weglassen des Rührers kann auf den Motor im Sensorkopf verzichtet werden. Der Sensor wird dadurch kürzer und leichter in der Fertigung, da keine komplizierten Stromleitungen mehr in den Kopfteil des Sensors gelegt werden müssen. Gleichzeitig wird dadurch der Einsatz in kleineren Reaktoren ermöglicht, da im aktuellen Design die Sensorspitze sehr nah an die Rührblätter herankommt. Dies kann zur Folge haben, dass Rührmodule versetzt werden müssen, damit sie nicht an den Sensor schlagen. Gleichzeitig werden viele Luftblasen in den Sensor gewirbelt, da er so nah an den Rührblättern ist.

4.2 miniCOM – Sterilität

Um sicherzustellen, dass der Aufbau des miniCOM-Chips über einen längeren Zeitraum steril ist, wurden die drei in Abbildung 29 dargestellten Ansätze getestet. Jeder Ansatz sollte dabei Rückschlüsse auf einen Kontaminationspunkt geben.

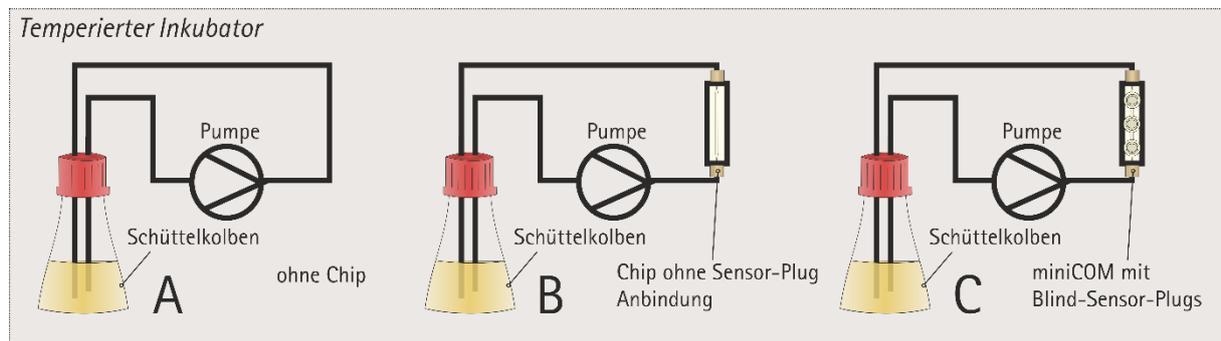


Abbildung 29 – Sterilversuche des miniCOMs
 A: Aufbau ohne Chip - B: Aufbau mit Chip und ohne Sensor-Plugs - C: Aufbau mit Chip und Blind-Sensor-Plugs

Zum Test, ob das Schlauchsystem steril an die Schüttelkolben mit LB-Medium angeschlossen werden kann, diente Versuchsaufbau A aus Abbildung 29. Einen sterilen Anschluss vom Sensor an das Schlauchsystem konnte mit dem Aufbau in B getestet werden. Und eine sterile Integration der Sensor Plugs (PreSens n.d.) in den mikrofluidischen Chip konnte über das Versuchsdesign C untersucht werden.

Alle drei Aufbauten wurden über 4 Tage in einen Inkubator bei 36°C mit einem Stopp-Flow (1 min warten, 10 min pumpen) der Pumpe bei 2 mL min⁻¹ betrieben. Über den gesamten Zeitraum konnte gezeigt werden, dass es kein Zellwachstum in den Kolben gab. Das Chipdesign, der Anschluss des Chips an das Schlauchsystem, die Integration des Sensor-Plugs in den Chip und die Integration der Schläuche an den Schüttelkolben können daher für Versuche mit Zellen eingesetzt werden, ohne dass von dem Sensor ein Kontaminationsrisiko ausgeht.

4.3 miniCOM –Gas-Dichtigkeit

Zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme wird im miniCOM der Sauerstoffabschluss der Zellen über einen Stopp-Flow einer Pumpe erzeugt. Da dies nicht dem gleichen Verschlussmechanismus (Silikonpressdichtung durch O-Ring-Dichtung) wie im ISICOM entspricht, soll in einem Diffusionsversuch untersucht werden, ob ein Stopp-Flow der Pumpe die Zellen sauerstoffdicht abschließt.

Um das Diffusionsverhalten von Sauerstoff im mikrofluidischen Chip zu analysieren, wurde ein optisches Verfahren mit Rhodium B als Referenzstoff gewählt. Zwei Pumpen wurden an einen mikrofluidischen Kanal im Chip angeschlossen, eine mit rotem Rhodium und einer mit Wasser gefüllt. Am Ende des Chips werden die Kanäle über ein Y-Stück zusammengeführt, hier vermischen sich der Farbstoff und Wasser. Die Spritzenpumpen wurden mit gleicher Pumprate betrieben, um die Fluide durch den Chip in den dahinterliegenden Waste zu befördern. An Gabelungspunkt kann die Rückvermischung durch Diffusion beobachtet werden, wenn die Pumpe gestoppt wird. Der Zeitpunkt t_0 definiert sich als Stoppzeitpunkt der Pumpen (vgl. Abbildung 30).

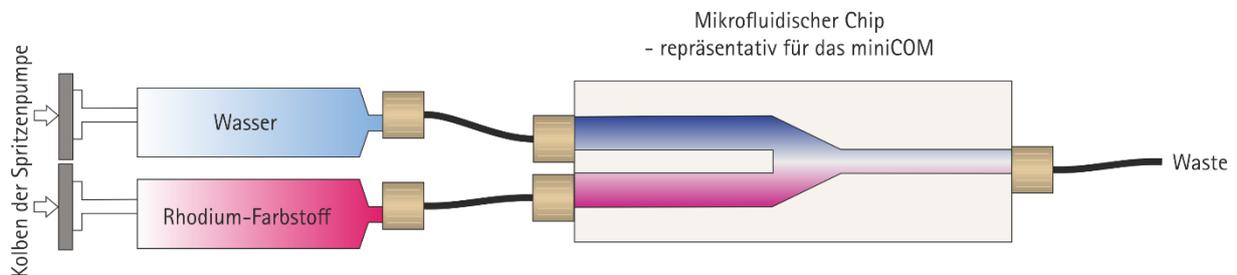


Abbildung 30 – Versuchsaufbau mikrofluidischer Chip zur Analyse des Diffusionsverhaltens

In Abbildung 31 sind die Mikroskopiebilder gezeigt, die nach dem Stoppen der Pumpen von dem Chip gemacht wurden. Betrachtet wurde die Diffusion über einen Zeitraum von 60 min. 25 s nach dem Stoppen sieht man, das bereits ein Teil des Farbstoffss in den mit dem Wasser gefüllten Teil des Chips diffundiert ist (vgl. Abbildung 31 – B). Über den Versuchszeitraum wandert die Farbe immer weiter den Chipkanal entlang. Nach 60 min ist das Y-Profil des Chips nahezu vollständig mit Farbe gefüllt. Dies entspricht einer Diffusionsstrecke von 3,6 mm. Aus dem Verhalten von Rhodium B bei 25°C Raumtemperatur wurde nun auf Sauerstoff bei 35°C rückgeschlossen. Sauerstoff würde unter den genannten Bedingungen innerhalb von einer Stunde eine Strecke von 6,5 mm wandern.

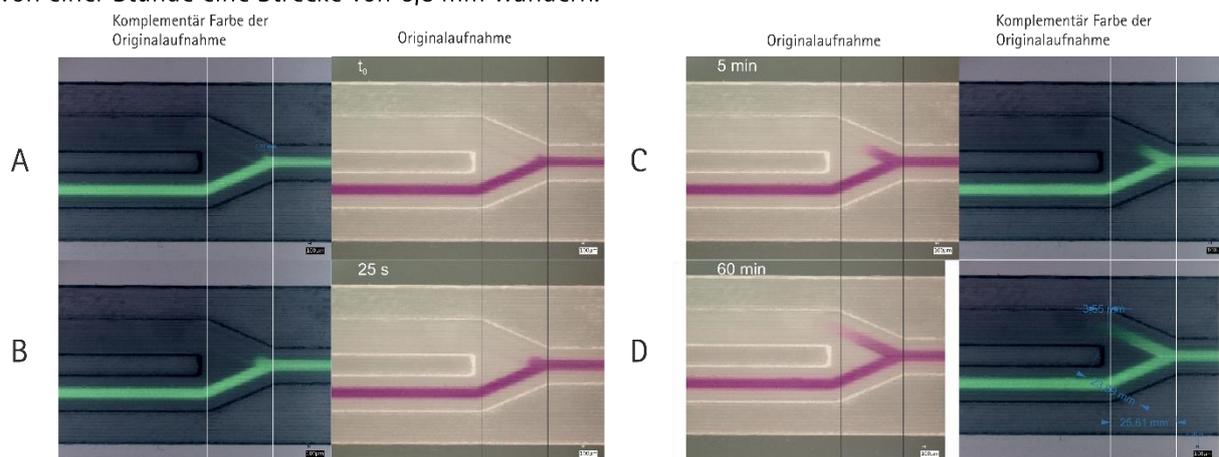


Abbildung 31 – Untersuchung des Rückvermischungs- und Diffusionsverhalten des mikrofluidischen Chips des miniCOMs über einen Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur. Zu Zeitpunkten: Versuchsbeginn t_0 , 25 s nach dem Stoppen der Pumpen, 5 min und 60 min nach dem Stoppen der Pumpe.

Parameter zur Berechnung der Diffusionsstrecke:

$$D_{\text{Sauerstoff}} = 6,0 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$$

Diffusionskonstante Sauerstoff bei 35°C

$$D_{\text{Rhodium B}} = 4,5 \cdot 10^{-6} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$$

Diffusionskonstante Rhodium B bei 35°C

$$U = 111,1 \frac{\mu\text{m}}{\text{mm}}$$

Umrechnungsfaktor der Abbildung zum Maßstab

$$a_{\text{Bild}} = (5,91 + 23,96 + 3,55) \text{mm} \\ = 33,15 \text{mm}$$

Summe aller gewanderten Wegstrecken des Rhodamin B nach 1 h

$$D = \frac{x^2}{2t}$$

$$\left[\frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \right]$$

Einstein-Smoluchowski-Gleichung (Cussler 2009)

(13)

x

[cm]

Wegstrecke zurückgelegt durch Diffusion

t

[s]

Zeit für zurückgelegte Diffusionsstrecke

Umrechnung der ausgemessenen Diffusionsstrecke in Wegstrecke im Chip:

$$\alpha_{Bild} \cdot U = 3,15 \text{ mm} \cdot 111,1 \frac{\mu\text{m}}{\text{mm}} = 3,6 \text{ mm} \quad (14)$$

Berechnung der Diffusionsstrecke von Sauerstoff nach Einstein-Smoluchowski-Gleichung (13):

$$x = \sqrt{2Dt} = \sqrt{2 \cdot 6,0 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \cdot 3600\text{s}} = 0,65 \text{ cm} = 6,5 \text{ mm}$$

Als Vergleich dazu: Rhodium B wandert bei 25°C 33,15 mm innerhalb einer Stunde und hat eine deutlich kleinere Diffusionskonstante. Mit diesem Vergleich und der Rechnung wurde die Schlauchlänge zwischen Chip und Reaktor länger als 6,5 mm dimensioniert und die Messungen auf ein Zeitintervall von maximal 10 min gesetzt. Unter diesen Rahmenbedingungen kann das Konzept mit dem Stopp-Flow der Pumpe als brauchbare Alternative zum Verschlussmechanismus des ISICOMs im miniCOM genutzt werden.

Nach den erfolgreichen Versuchen zur Sterilität und zur Gas-Dichtigkeit kann das miniCOM steril in einen Bioprozess integriert werden und der Stopp-Flow der Pumpe dafür genutzt werden, die Zellen unter Sauerstoffausschluss im miniCOM zu separieren. Damit eignet es sich für erste Prototypenversuche im Bioprozess.

5 Anwendung zur Bioprozessüberwachung

Im Anschluss an die Charakterisierungsversuche von ISICOM und miniCOM wurden die Sensoren nun in unterschiedlichen Bioprozessskalen und Anwendungen mit unterschiedlichen Zellarten getestet. Dazu zählen zwei Hefekultivierungen, bei denen das ISICOM in der Pilotanlage beim Projektpartner Chr. Hansen mit einem *Saccharomyceten* und einem *Non-Saccharomyceten* im Bereich der Lebensmitteltechnologie eingesetzt werden. Das miniCOM wurde in einer CHO-Kultivierung im Single-use-Reaktor Ambr® 250 in der Prozessentwicklung eingesetzt.

5.1 Hefe Kultivierung

Die folgenden Kultivierungen wurden bei dem Projektpartner Chr. Hansen durchgeführt (siehe Abbildung 32). Die hier gezeigten Daten sind von Chr. Hansen freigegeben worden, alle weiteren unterliegen der Geheimhaltung. Bekannt ist, dass es sich bei den Zellen um einen Saccharomyceten und einen Non-



Abbildung 32 – Eingebautes ISICOM mit Auswertungsrechner in der 50 L Pilot Anlage bei Chr. Hansen

Saccharomyceten für die Lebensmittelindustrie handelt. Diese Zellen gewinnen ihre Energie aus Glukose über Respiration ($\text{Glukose} \rightarrow \text{ATP und CO}_2$) oder über anaerobe Fermentation ($\text{Glukose} \rightarrow \text{ATP und Ethanol}$). Je nach Kondition erlangen die Saccharomyces-Zellen bis zu 18 ATP pro Glukose über die Respiration und 2 ATP pro Glukose über die Fermentation, bei der Ethanol als Nebenprodukt gebildet wird. Bei hoher Zuckerkonzentration (bei Saccharomyces $> 150 \text{ mg L}^{-1}$) und der Anwesenheit von Sauerstoff kann es zum sogenannten Crabtree-Effekt (De Deken 1966; Postma et al. 1989; Van Urk et al. 1990) kommen, bei dem

die Zellen trotz Anwesenheit von Sauerstoff in die alkoholische Gärung übergehen. Unter limitierten Glukosekonzentrationen gleicht die CO₂-Produktionsrate der Sauerstoffaufnahme und die Zellen haben eine hohe Zellproduktionsrate (Bsp. 0,5 g g⁻¹). Wenn die Glukosekonzentration steigt und die Zellen mit einem positiven Crabtree-Effekt ihren Metabolismus umschalten, steigen zunächst CO₂-Produktionsrate (CPR) und Sauerstoffaufnahme bis zu einem gewissen Punkt an; ab diesem Punkt entkoppelt sich die beiden Größen und die CPR steigt rasant an, wobei die Sauerstoffaufnahme konstant bleiben kann oder sogar sinkt. Zusätzlich sinkt die Biomasseproduktionsrate (Bsp. auf 0,2 g g⁻¹) (Postma et al. 1989; Van Hoek, Van Dijken, and Pronk 1998; Pfeiffer and Morley 2014).

Neben den Standardprozessgrößen wie Gelöstsauerstoffanteil, Druck und Rührerdrehzahl wurden das Streulicht, Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (CPR=CER) und die Sauerstofftransferrate (OTR) aufgezeichnet. Hieraus lassen sich weitere Prozessgrößen, wie die OUR und der RQ ableiten, die noch weitere Informationen über den Prozesszustand liefern. Während beider Kultivierungen wurden keine Proben zur *Offline*-Messung von z.B. der Zellzahl genommen. Das Signal des ISICOMs kann daher zu keinem *Offline*-Wert referenziert oder korreliert werden und wird daher als dimensionslose Größe zwischen 0 und 10.000 angegeben.

5.1.1 Saccharomyces

Die Saccharomyces-Kultivierung wurde im klassischen Batch-Verfahren durchgeführt (vgl. Abbildung 33). Der Sauerstoffgehalt wurde auf einen konstanten Wert von 30 % in einer zweistufigen Regelkaskade gehalten. Zunächst über die Drehzahl, im Anschluss über den Druck. Die Regelung beginnt nach 12 h Prozesszeit mit dem Anstieg der Rührerdrehzahl von 100 rpm auf den Maximalwert von 500 rpm. Mit dem Erreichen der maximalen Rührerdrehzahl wird der Druck von 0,2 auf 1 bar im Prozesszeitraum von 16,5 – 20 h erhöht. Die gesamte Kultivierung dauerte etwa 22h.

Die OUR-Daten im Prozesszeitraum von 16,5 – 20 h sind daher durch den Druck im Reaktor beeinflusst, da der Sauerstoffsensord im ISICOM nicht darauf ausgelegt ist, das Signal gegen den Druck zu kompensieren

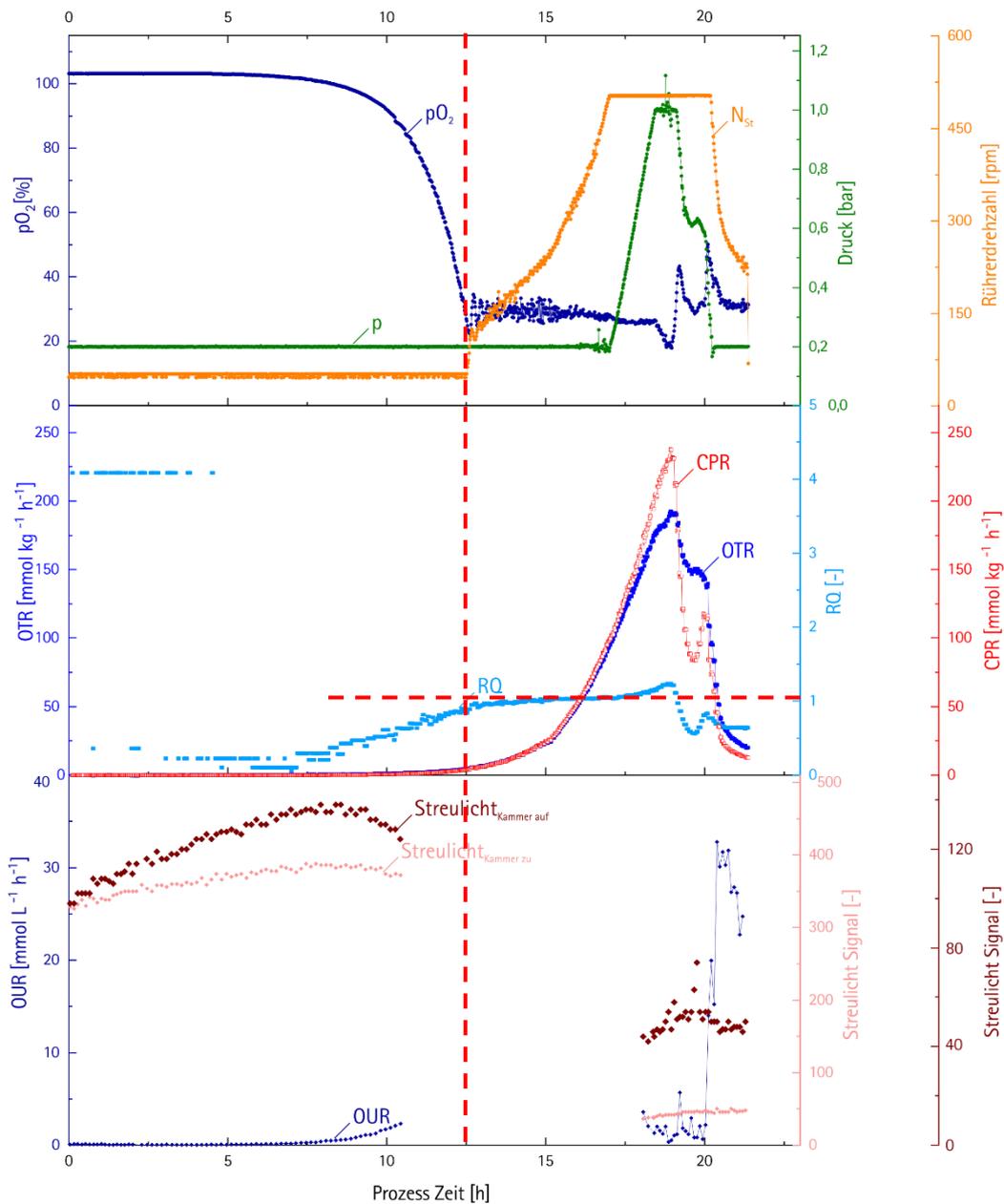


Abbildung 33 – Messung während einer Saccharomyces-Batch-Kultivierung über 22h. Der Sauerstoffgehalt wurde auf einem Sollwert von 30 % über die Rührerdrehzahl und den Druck geregelt

(Abhängig aus Formel (1)). Nach 10 h Prozessdauer trat zusätzlich ein technisches Problem beim ISICOM auf, wodurch eine Datenlücke von etwa 7 h entstand.

Die Daten des Gelöstsauerstoff (pO_2), Rührerdrehzahl (N_{St}) und Druck (p), sowie Respirationskoeffizient (RQ), CO_2 -Produktions-Rate (CPR) und Sauerstofftransferrate (OTR) stammen aus der Abgas Analytik der Anlage des beteiligten Projektpartners Chr. Hansen.

In den ersten 12,5 h sind wenig Änderungen im Prozess zu beobachten, dies ist typisch den die lag-Phase einer Kultivierung. Der Sauerstoffgehalt sinkt exponentiell auf den Regelwert von 30 %, der Beginn der Regelung ist durch eine vertikale rote Linie in Abbildung 33 hervorgehoben. Die Zellen wachsen über diesen Prozessabschnitt verhältnismäßig wenig. Dies lässt sich daraus schließen, da sich das Streulichtsignal des ISICOMs um 15 % bei geöffneter Kammer bzw. 30 % bei geschlossener Kammer innerhalb der ersten 12,5 h ändert. Die Änderung des Signals bei geschlossener Kammer ist dabei größer; dies lässt darauf schließen, dass die geringere Pfadlänge von Vorteil ist und die Änderung mit einer höheren Empfindlichkeit auflösen kann.

Der Respirationsquotient (RQ) bleibt zu Prozessbeginn vorwiegend unter 0.5 und springt sporadisch auf 4. Ob diese Werte in der Anfangsphase des Prozesses zuverlässig sind, müsste weiter untersucht werden. Etwa 7 h nach Prozessbeginn fängt der Wert an, annähernd linear auf den Wert von 1 zu steigen. Mit Beginn der Regelung des pO_2 -Wertes auf 30 % bleibt der Wert auf etwa 1. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im gleichen Verhältnis CO_2 produziert wird, wie Sauerstoff aufgenommen wird. Gleichzeitig lässt sich in den Daten der Saustofftransferrate (OTR) und der CO_2 -Produktionsrate (CPR) ein exponentieller Anstieg auf ihre Maximalwerte von $193 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und $238 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ beobachten. Nach etwa 18 h steigt der RQ kurzzeitig an und sinkt dann wieder, fast im gleichem Moment, wie die Sauerstoffregelung über dem Druck an den Maximalwert des Drucks gelangt. Mit diesem Punkt scheint die Kultivierung auf dem Maximum der Leistungsfähigkeit der Zellen unter den gegebenen Bedingungen angelangt zu sein. Um mehr Leistung zu erbringen, bräuchten die Zellen mehr Sauerstoff. Dies ist unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich, da die Spezifikationen des Reaktors dies nicht hergeben. Der Sauerstoffwert steigt zweimal

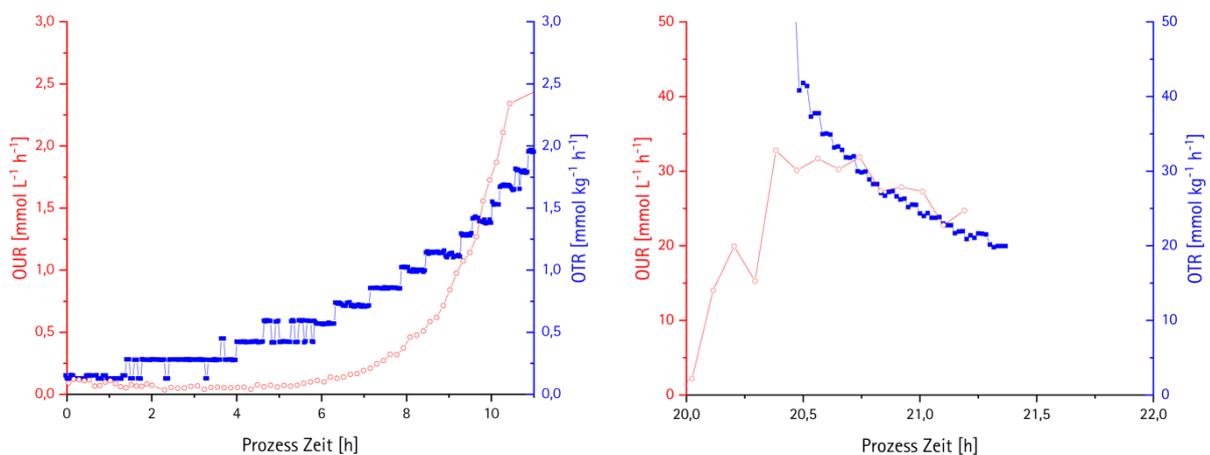


Abbildung 34 - OTR der Abgasanalytik und OUR der ISICOM-Messung am Anfang (links) und am Ende (rechts) der Fermentation in der Detailaufnahme

kurz über den Sollwert und sinkt anschließend wieder, ein typisches Verhalten von Zellen am Ende der Batch-Phase. Von diesem Punkt an sinken Sauerstofftransferrate (OTR), CO₂-Produktionsrate und RQ-Wert bis zum Ende der Kultivierung. Die CPR- und die OUR- bzw. OTR-Läufe sind über den gesamten Prozess parallel und miteinander gekoppelt. Das lässt darauf schließen, dass es sich hier um Crabtree-negative Zellen handelt (Pfeiffer and Morley 2014; Postma et al. 1989).

In Abbildung 34 sind die OUR-Messung des ISICOMs und die OTR-Messung über die Abgasanalytik und das Prozessleitsystem direkt nebeneinander dargestellt. Der linke Teil der Abbildung zeigt den Anfang der Kultivierung über die ersten 12 h. Die Auflösung, in denen der ISICOM-Sensor die Daten zur Verfügung stellt, ist deutlich höher und weniger verrauscht als die der Abgasanalytik. Da die Daten der OTR über das Prozessleitsystem bezogen werden und hier die Zeitpunkte, in denen die Abgasanalytik die Daten liefert und die Zeitpunkte, in denen das Prozessleitsystem sie erfragt, nicht harmonisiert sind, werden die Daten zwar oft abgefragt, zeigen aber nicht die repräsentativen Änderungen im Prozess und eine Stufenform der Daten entsteht. Nichtsdestotrotz zeigen die Daten einen ähnlichen Verlauf in einer ähnlichen Größenordnung (vergleichbar unter der Annahme, dass die Dichte im Reaktor nah 1 kg L⁻¹ ist und die OTR auf das Reaktorvolumen bezogen wurde).

Der rechte Teil der Abbildung zeigt die OTR und OUR am Ende der Kultivierung. Die ersten OUR-Messpunkte, die in diesem Diagramm dargestellt werden, sind noch unter dem Einfluss des Drucks von der Sauerstoffregelung. Ab einer Prozesszeit von 20,75 h ist dieser wieder auf 0,2 bar gesunken und die OUR-Messung und die OTR-Messung zeigen einen annähernd ähnlichen Verlauf auf bis zum Prozessende.

„Alle Modelle sind falsch, aber manche sind nützlich“ *G. E. P. Box*

Frei nach diesem Motto gilt es, das Modell zur Bestimmung der OUR genauer zu analysieren, um die Qualität der Daten zu beurteilen. Um dies zu ermöglichen, wurde das Bestimmtheitsmaß über die Steigung während des Sauerstoffabfalls der OUR-Messintervalle bestimmt, sowie der Modell-Fehler und der Pearson-Koeffizient (weitere Details siehe Kapitel 8.6.3.1.1).

In Abbildung 35 sind die oben genannten Größen über die Prozesszeit mit der OUR aufgetragen. Innerhalb der ersten 5 h schwankt das Bestimmtheitsmaß stark zwischen 0,1 und 0,3. In diesem Zeitraum ist die Zellkonzentration so gering, dass kaum Sauerstoff verbraucht wird und dadurch auch kein bedeutender Abfall des pO₂-Wertes zu erkennen ist. Es wird hier also vorwiegend das Prozessrauschen in Kombination mit dem Signalrauschen gezeigt. Zwischen 5 h und 10 h steigt das Bestimmtheitsmaß auf 0,99 an und liegt auch nach der Datenlücke und während der Zeit des erhöhten Drucks im Reaktor innerhalb eines Werteintervalls von 0,8 und 0,98. Die letzten Werte vor Ende der Kultivierung liegen wieder bei 0,99. Der angegebene Fehlerbalken der OUR-Werte gibt dabei das Größenverhältnis des Bestimmtheitsmaßes in Bezug auf den entsprechenden Messwert an. Der Modell-Fehler gibt an, wie groß die Abweichung der Näherung zum tatsächlichen Messverlauf des pO₂-Signals bei der Steigungsbestimmung bei geschlossener Kammer ist. Dieser Wert schwankt stark über den gesamten Prozess. In dem Zeitraum, in dem der Druck im Reaktor herrscht, ist der Fehler besonders niedrig. Der Modell-Fehler steigt während des gesamten Prozesses nicht über 3,45 µmol L⁻¹ h⁻¹, welches 0,01 % bezogen auf die Messgröße OUR entspricht. Dieser geringe Wert lässt auf ein gutes Modell schließen.

Der Pearson-Koeffizient der Messergebnisse der Kultivierung bleibt über den gesamten Prozess negativ. Dies lässt darauf schließen, dass es sich zu jedem Zeitpunkt um fallende pO_2 -Werte über die Zeit handelt. Die Werte bewegen sich zwischen -0,24 und -0,99. Generell gilt, dass Werte bei |0,3| einen mittelstarken Zusammenhang aufweisen, wohin gegen Werte um |1| einen sehr starken Zusammenhang aufweisen. Für den Messbereich bedeutet dies, dass der negative, lineare Zusammenhang des pO_2 über die Zeit im Laufe des Prozesses zunimmt. Dies ist auf den erhöhten Sauerstoffbedarf zurückzuführen und bestätigt damit die steigenden OUR-Werte über den Prozessverlauf.

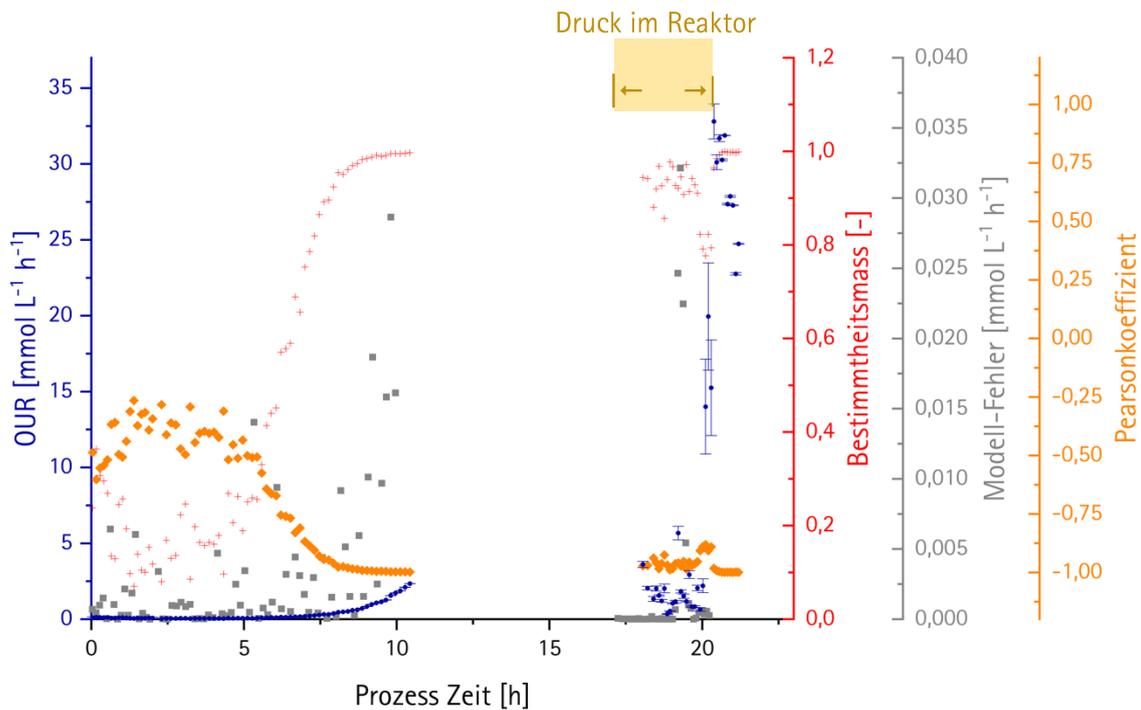


Abbildung 35 – Daten zur Beurteilung der Messqualität während der Saccharomycykultivierung

Abschließend lässt sich festhalten, dass das ISICOM die Möglichkeit bietet, das Zellwachstum in Echtzeit zu beobachten und sich daraus mehr Wissen über den Prozess generieren lässt. Die Messtechnik und die gewählten Modelle zur Auswertung lassen über die meiste Zeit im Prozess eine zuverlässige Aussage über den Prozess zu. Um mehr über die metabolische Aktivität der Zellen aussagen zu können benötigt das ISICOM eine Druckkompensation der Sauerstoffwerte, um repräsentative Aussagen zuzulassen. Die bisherigen Messungen sehen vielversprechend aus.

5.1.2 Non-Saccharomyces

Die Non-Saccharomyceskultivierung wurde im klassischen Batch-Verfahren durchgeführt (vgl. Abbildung 36). Außer der Zuluft und der Fluide für die pH Kontrolle wurde nichts weiter dem System hinzugefügt. Der Sauerstoffgehalt wurde auf einen konstanten Wert von 30 % über den Rührer geregelt. Die Regelung startete nach etwa 20 h und geht von 50 rpm auf eine maximale Rührerdrehzahl von 350 rpm. Der Druck bleibt über die gesamte Kultivierung nahezu konstant bei 0,2 bar. Nach 52 h steigt der Gelöstsauerstoffanteil in zwei Phasen an, da die Zellen die primäre C-Quelle aufgebraucht haben und nun auf die

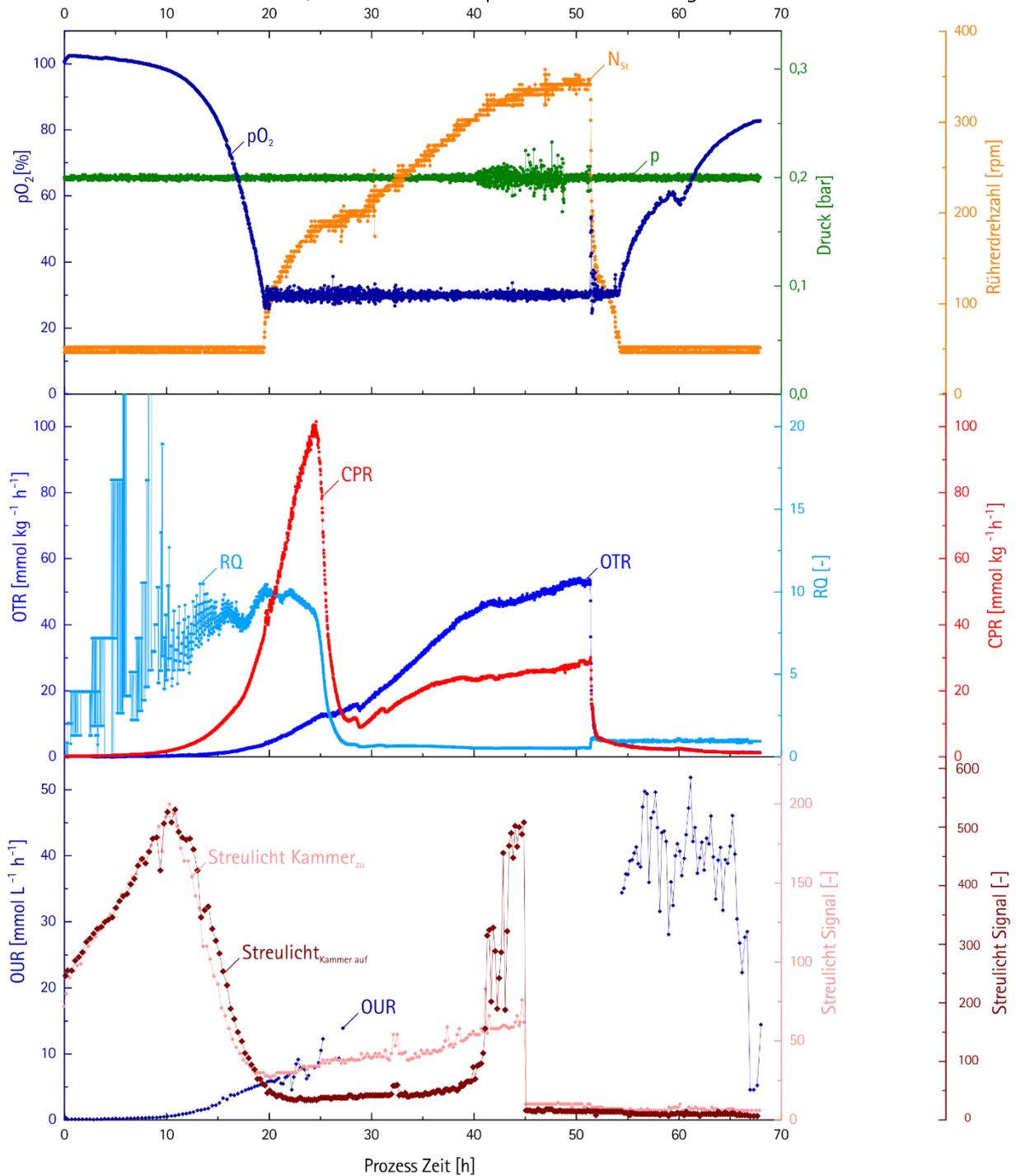


Abbildung 36 - Non Saccharomyces Batch - Kultivierung über 68h. Der Sauerstoffgehalt wurde auf einem Sollwert von 30% über die Rührerdrehzahl geregelt

sekundär bevorzugte C-Quelle umstellen und den Sauerstoff für diese Verstoffwechslung nutzen. Daher steigt der Sauerstoffgehalt zunächst auf 60 % bei 60 h und anschließend auf 80 % zum Ende der Kultivierung. Dies zeigt an, dass nun auch die nichtpräferierte C-Quelle aufgebraucht ist. Die Rührerdrehzahl geht schon zu Beginn der ersten Phase schnell auf 50 rpm zurück, da sie in der Regelkaskade zu diesem Zeitpunkt nicht mehr gebraucht wird. Nach etwa 70 h ist der Prozess beendet.

Das Streulichtsignal des ISICOMs steigt über die ersten 12 h linear an. Dabei steigen beide Signale, der offenen und der geschlossenen Kammer, im gleichen Verhältnis an. Das Signal der geschlossenen Kammer steigt von 100 auf 200. Das Signal der offenen Kammer steigt von 250 auf 550. Anschließend sinken beide Signale linear auf 30. Von 20–40 h bleibt das Signal der geöffneten Kammer bei 30 und steigt dann schlagartig an. Zum gleichen Zeitpunkt beginnt der Druck im Reaktor leicht zu schwanken, da es zur Schaumbildung im Reaktor kommt. Im selben Zeitraum steigt das Signal der geschlossenen Kammer leicht von 30 auf 50. Nach 45 h sinken beide Signale schlagartig auf einen Wert knapp über 0, noch bevor die Rührerdrehzahl sinkt. Es lässt sich vermuten, dass die Schaumbildung für den Signalanstieg verantwortlich ist. Durch die Zugabe von Antischaum kann der Schaum reduziert werden und über das Streulichtsignal ist das reine Signal der Zellen sichtbar.

Nach einer lag-Phase von etwa 10 h beginnt die CPR (bestimmt aus der Abgasanalytik des Projektpartners) exponentiell auf $100 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zu steigen. Dieses Maximum wird nach etwa 22 h Prozesszeit erreicht. In dieser Zeit wird zehnfach so viel CO_2 umgesetzt, wie Sauerstoff aufgenommen wird. An dieser Stelle müsste eine vertiefte Analyse des Metabolismus des Organismus vorgenommen werden, leider stehen diese Daten durch den Projektpartner nicht zur Verfügung. Innerhalb von weiteren 2,5 h sinkt die CPR wieder auf $15 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und steigt danach nur noch langsam und nicht über den Wert von $22 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die Vermutung liegt nah, dass die Zellen sich in diesem Zeitraum zu Paaren zusammenfinden. Wird das Streulichtsignal hinzugezogen, ist zu beobachten, dass dies zunächst steil ansteigt und dann schlagartig mit ähnlicher Steigung sinkt. Es ist von den Zellen bekannt, dass sie Zellhaufen formen. Es lässt sich vermuten, dass sie dabei wenig Sauerstoff verbrauchen und viel CO_2 produzieren. Die OTR steigt die ersten 30 h vergleichsweise langsam auf $18 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Zwischen den Prozessstunden 30 und 40 steigt sie nahezu linear an auf $5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und anschließend weniger stark auf $60 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, welche nach 50 h erreicht werden. Danach fallen OTR und CPR, bedingt durch die Reduktion der Rührerdrehzahl, fast schlagartig wieder auf Werte unter $5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

RQ schwankt in den ersten 15 h stark. Nach 10 h lässt sich ein Wert von 7 im Rauschen erkennen, der über die Prozessdauer bis 20 h auf 10 steigt. Nach 22 h sinkt der RQ-Wert leicht versetzt zum CPR. Nach einer Prozesszeit von 25 h überschreitet der RQ den Wert 1 nicht mehr.

Die Sauerstoffaufnahme bleibt während der ersten 10 h nahe $0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Im Zeitraum zwischen 10 – 25 h steigt der Wert linear auf $8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nach einem kurzen Schwanken und einem schnelleren Anstieg und über $12 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ hinaus kann das Signal der OUR nicht mehr ausgewertet werden, da die Zellen den Sauerstoff so schnell veratmen, dass sich die Kammer direkt nach dem Schließen wieder öffnet. Erst nach 52 h Prozessdauer schließt die Kammer wieder lang genug, um eine Auswertung der OUR zu ermöglichen. Das Signal beginnt hier bei etwa $35 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und steigt schwankend auf

50 mmol L⁻¹ h⁻¹. Nach 57 h sinkt der Wert auf ein lokales Minimum von 30 mmol L⁻¹ h⁻¹, steigt nochmal auf 50 mmol L⁻¹ h⁻¹ bei einer Prozesszeit von 60 h und sinkt dann bis zum Ende der Kultivierung auf 3 mmol L⁻¹ h⁻¹.

In Abbildung 37 werden die Messdaten der CPR, OTR und OUR dargestellt. Dabei stellen die OUR und die CPR Größen zur Beurteilung der metabolischen Aktivität der Zellen dar. Die OTR gibt an, wie viel Sauerstoff den Zellen zur Verfügung gestellt wird. Alle drei Größen beginnen nach 10 h Kultivierungsdauer, zu steigen. Dabei steigt die CPR am stärksten und erreicht nach etwa 22 h ihr Maximum von 100 mmol kg⁻¹ h⁻¹. Direkt danach bricht die CPR auf einen Wert von 9,27 mmol kg⁻¹ h⁻¹ bei 30 Prozessstunden ein. Anschließend steigt der Wert wieder, deutlich langsamer und nicht über einen Wert von 29 mmol kg⁻¹ h⁻¹ bei 52 Prozessstunden, bei dem die CPR erneut einbricht und bis zum Prozessende bei einem Wert vom 2 mmol kg⁻¹ h⁻¹ bleibt.

Die OTR und die OUR verhalten sich die ersten 30 Prozessstunden ähnlich. Nach einer lag-Phase von 10 h beginnen beide mit einem leichten Versatz zu steigen. Der zur Verfügung stehende Sauerstoff wird eins zu eins von den Zellen aufgenommen. Zwischen dem Prozesszeitraum von 30 h und 52 h liegen leider keine OUR-Daten vor. In diesem Zeitraum steigt der Wert der OTR zunächst stetig und dann immer langsamer auf einen Wert von 53,5 mmol kg⁻¹ h⁻¹. Zum gleichen Zeitpunkt wie die CPR sinkt auch die OTR schlagartig und überschreitet den Wert von 2,6 mmol kg⁻¹ h⁻¹ anschließend nicht mehr. In dem Zeitraum von 55 h und 68 h steigt die OUR von 34,4 mmol L⁻¹ h⁻¹ schwankend auf einen Wert von 51 mmol L⁻¹ h⁻¹. Kurz vor Prozessende sinkt die OUR auf 4,5 mmol L⁻¹ h⁻¹. Der rapide Anstieg der CPR mit dem entkoppelten Verlauf der OTR bzw. OUR sprechen für einen positiven Crabtree-Effekt (Postma et al. 1989; Pfeiffer and Morley 2014); bestätigt wird dies durch die weniger steigende Biomasse.

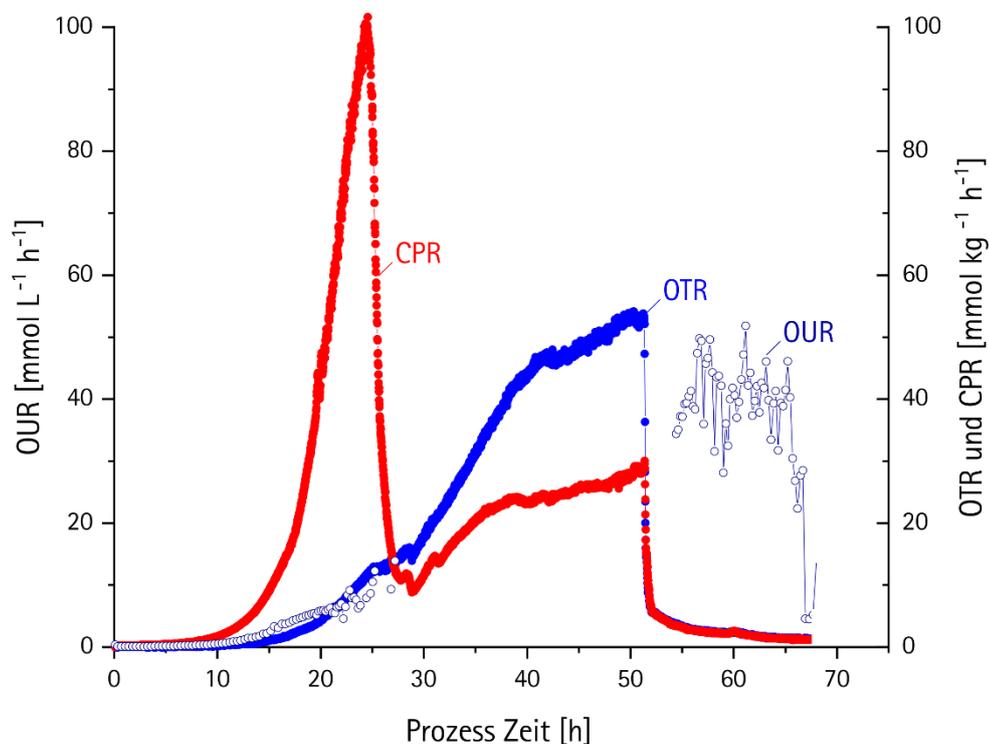


Abbildung 37 – OTR, CPR (Abgas Analytik) und OUR (ISICOM) aus Batch-Kultivierung der *Non-Saccharomyces*

Um die Qualität der OUR-Bestimmung zu beurteilen, wird das Bestimmtheitsmaß über die Steigung während des Sauerstoffabfalls der OUR-Messintervalle bestimmt, sowie der Modell-Fehler und der Pearson-Koeffizient (weitere Details siehe Kapitel 8.6.3.1.1) genauer analysiert.

In Abbildung 38 sind die oben genannten Größen über die Prozesszeit mit der OUR aufgetragen. Innerhalb der ersten 11 h erreicht das Bestimmtheitsmaß einen Wert $> 0,97$ und sinkt bis zum Ende der Kultivierung nicht mehr unter einen Wert von $0,8$. Auch hier ist in den ersten Stunden die Änderung der pO_2 -Werte bei geschlossener Kammer so gering, dass mehr das Prozessrauschen gemessen wird. Nach etwa 5-7 h gewin-

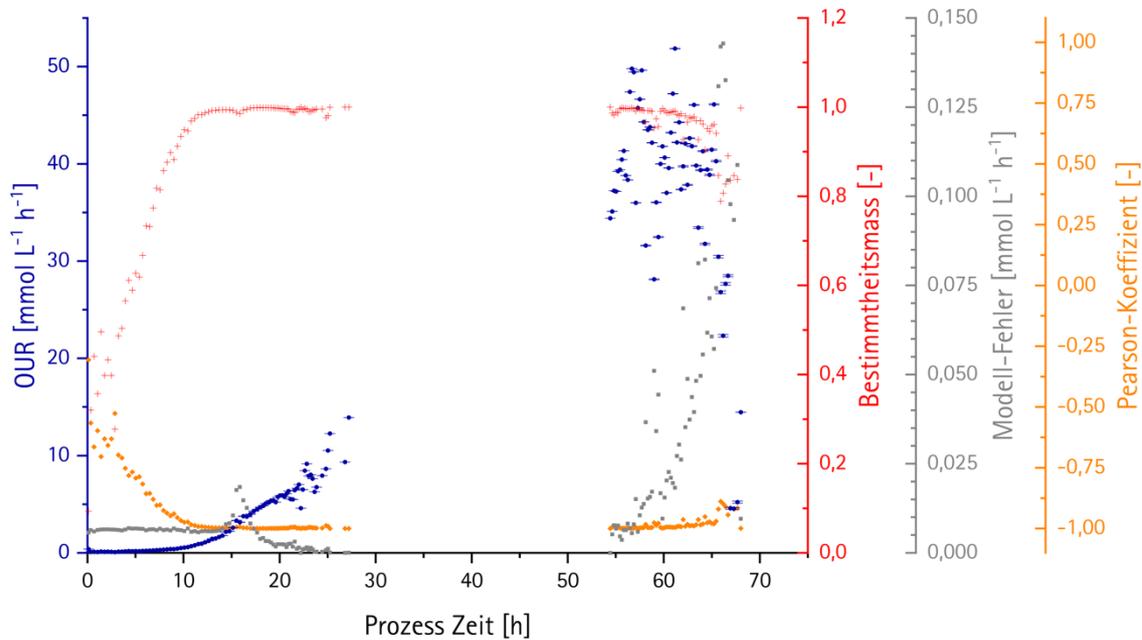


Abbildung 38 - Daten zur Beurteilung der Messqualität während der Non-Saccharomyces-Kultivierung

nen die Werte an Zuverlässigkeit. Der angegebene Fehlerbalken des OUR-Verlaufs gibt dabei das Größenverhältnis des Bestimmtheitsmaßes in Bezug auf den entsprechenden Messwert an. Die Fehler sind über den gesamten Prozess, bedingt durch das hohe Bestimmtheitsmaß, sehr klein. Der Modell-Fehler gibt an, wie groß die Abweichung der Näherung zum tatsächlichen Messverlauf des pO_2 -Signals bei der Steigungsbestimmung bei geschlossener Kammer ist. Diese Größe steigt über die ersten 27 Prozessstunden nicht über einen Wert von $0,018 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Der kleine Peak bei etwa 16 Stunden zeigt an, dass in diesem Bereich ein anderes Auswertungsmodell besser gewesen wäre. Hier ist die Abweichung zwischen Realität und Modellwissen größer, als im restlichen Prozess. Woran dies genau liegt, ist schwer zu sagen. Nach der Datenlücke ab 55 h steigt der Modell-Fehler von nahezu Null auf $0,14 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, welches $0,27 \%$ der OUR entspricht. Dieser geringe Wert lässt auf ein gutes Modell schließen. Der Pearson-Koeffizient der Messergebnisse der Kultivierung bleibt über den gesamten Prozess negativ. Und zeigt, dass es sich zu jedem Zeitpunkt um fallende Werte des pO_2 -Wertes über die Zeit handelt. Die Werte bewegen sich zwischen $-0,3$ und $-0,99$. Für den Messbereich bedeutet dies, dass der negative, lineare Zusammenhang des pO_2 über die Zeit im Laufe des Prozesses zunimmt. Dies ist auf den erhöh-

ten Sauerstoffbedarf zurückzuführen und bestätigt damit die steigenden OUR-Werte über den Prozessverlauf. Gleichzeitig zeigt es, dass der Ansatz einer linearen Auswertung der OUR ein geeigneter Ansatz für diese Auswertungsmethode ist.

Abschließend lässt sich festhalten, dass das ISICOM die Möglichkeit bietet, das Zellwachstum in Echtzeit zu beobachten und sich daraus mehr Wissen über den Prozess generieren lässt. Würden bei weiteren Kultivierungen *Offline* Proben genommen werden, könnten mehr Details über die morphologischen Änderungen bestimmt und diese dann *Online* mit dem ISICOM beobachtet werden. Die Messtechnik und die gewählten Modelle zur Auswertung lassen über die meiste Zeit im Prozess eine zuverlässige Aussage über denselben zu. Um mehr über die metabolische Aktivität der Zellen aussagen zu können, benötigt das ISICOM eine andere Sauerstoffsonde. Es müsste die Abtastrate verringert werden, um mehr Messpunkte in kürzerer Zeit zu erlangen. Zellen mit einer hohen metabolischen Aktivität stellen das ISICOM vor eine Herausforderung, der es noch nicht gewachsen ist. Dennoch sehen auch hier die bisherigen Messungen vielversprechend aus. Für Hefen wäre eine zusätzliche CO₂-Messung von Vorteil, um *Online* den Crabtree-Effekt im Shift zwischen CPR und OUR zu beobachten.

5.2 Tierzellkultivierung

Eine der bedeutendsten Arbeitsbereiche in der pharmazeutischen Biotechnologie ist die Tierzellkultivierung. Durch die Komplexität mittels human-like posttranslationaler Modifikation, die viele Tierzellen für aktive, spezielle Biopharmazeutika umsetzen können, sind diese im letzten Jahrzehnt einer der bedeutendsten Produzenten der Branche gewesen (Amann et al. 2019). Dabei machten Biopharmazeutika 2019 in etwa 195 Milliarden USD Marktanteil aus (Evens 2016). Die hier verwendete Zelllinie CHO DG44 ist ein Abkömmling aus der Chinese-Hamster-Ovary-(CHO)-K1-Linie, die das erste Mal 1957 aus den Ovarien eines weiblichen Hamsters isoliert und immortalisiert wurde. Die Dihydrofolat-Reduktase-(DHFR)-Defizienz sorgt für eine Mutation, durch die eine Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen auf Mangelmedium leichter möglich ist (Urlaub et al. 1983). Somit ist ein Wachstum auf einem speziellen, serumfreien Selektionsmedium möglich mit der Produktion des Ziel-Proteins, welches zusammen mit dem DHFR-Gen eingebracht wird (Wurm and Hacker 2011; Wurm 2004).

Zur Energiegewinnung nutzen diese Zellen Glukose als Kohlenstoffquelle, die über den Katabolismus mittels Glykolyse und Citratzyklus Energie gewinnen. So werden aus Glukose und Wasser Kohlenstoffdioxid und 30-32 ATP-Moleküle produziert. Hierfür wird nur ein sehr kleiner Teil der Glukose genutzt. Die meisten Glukosemoleküle werden über Pyruvat in Laktat umgewandelt und sind im Kulturüberstand zu finden. Durch die daraus resultierende pH-Senkung wirkt dieses Nebenprodukt inhibierend auf die Zellen, über eine pH-Regelung wird diesem Effekt entgegengewirkt (Hu 2020). Der Nutzen von Glukose über diesen Stoffwechselweg bringt den Zellen 4 ATP und wird bei hohen Wachstumsraten beobachtet sowie durch hohe Glukosekonzentration begünstigt (Ahn and Antoniewicz 2012). Dieses Verhalten ist außerdem unter dem Warburg-Effekt bekannt und dient zur Regulierung von NAD⁺ aus NADH zur Verwendung in der Glykolyse (Hu 2020; Otto 1956). Ist der Glukoseverbrauch hoch, wird vermehrt Laktat produziert und damit die Verfügbarkeit von NAD⁺ sichergestellt, welches eine erhöhte Glykolyserate ermöglicht. Die Reversibilität dieser Reaktion ermöglicht es, dass bei geringen Glukosekonzentrationen der Metabolismus rückwärtslaufen und Laktat nun verbraucht werden kann. Dies ist ein typisches Verhalten, welches in der stationären

Phase beobachtet werden kann (Martínez et al. 2013), wobei Laktat wieder in Pyruvat umgewandelt wird, um anschließend in den Citratzyklus überführt zu werden.

Alle in diesem Kapitel gezeigten Versuche wurden mit der CHO-Zelllinie DG44 durchgeführt und zusätzlich mit dem miniCOM überwacht.

5.2.1 Schüttelkolbenversuche

Schüttelkolben sind die klassischen Gefäße für das Rapid Prototyping oder für die Anzucht von Zellen, bevor sie in größere Reaktoren überführt werden. Versuche lassen sich in ihnen schnell und einfach umsetzen, um eine These zu prüfen. Ein Monitoring in diesen Gefäßen, sowie eine einfache Prozesskontrolle, lassen sich in diesen Systemen nur schwer integrieren, ein Monitoring ist meistens nur *non-invasiv* möglich oder über einen eigens entwickelten Zugang. Die Einflussnahme auf weitere Parameter wie Temperatur und Schüttelfrequenz ist bisher nicht möglich. In diesem Kapitel wird gezeigt, welche Möglichkeiten des Prozessmonitorings mit dem miniCOM möglich sind.

Die in diesem Kapitel gezeigten Graphen wurden nach dem beschriebenen Aufbau in Kapitel 3.3.2 auf Seite 34 durchgeführt. Insgesamt wurden zwei Versuche im Schüttelkolben mit dem miniCOM untersucht. Sie sind im Folgenden mit Schüttelkolben eins und Schüttelkolben zwei beschriftet.

Bei beiden Versuchen wurde täglich eine Probe gezogen, zur *Offline*-Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität. Das miniCOM hat kontinuierlich Messungen durchgeführt. In Abbildung 39 sind die Messergebnisse der ersten Schüttelkolbenkultivierung gezeigt.

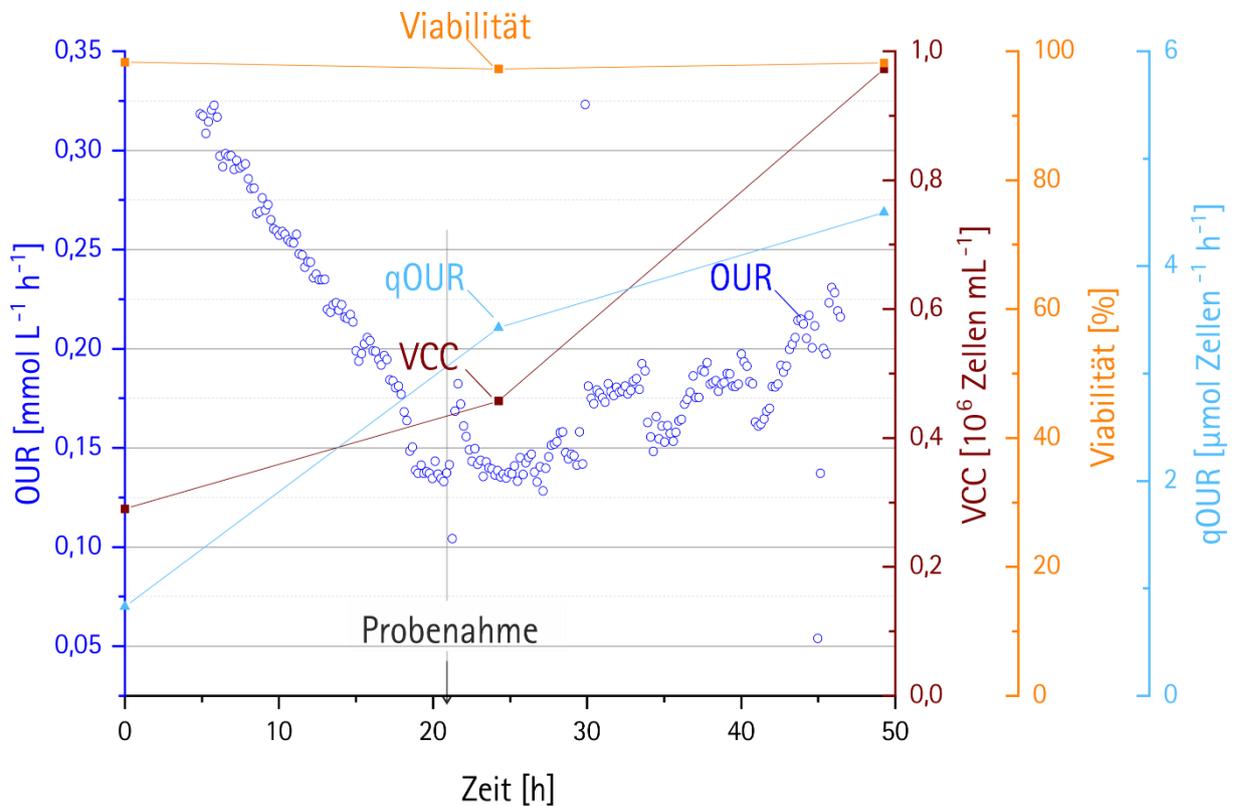


Abbildung 39 – Sauerstoffaufnahme, Viablen-Zellzahl und Viabilität in Schüttelkolben 1 einer CHO-Kultivierung

Die viable Zellzahl (VCC) beträgt zu Versuchsbeginn $0,29 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} und steigt exponentiell auf $0,97 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} über drei Tage. Die Viabilität bleibt in diesem Zeitraum nahezu konstant über 97 %. Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme beginnt etwa 5 h nach Versuchsbeginn bei $0,31 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und sinkt nahezu linear innerhalb der nächsten 15 h auf einen Wert von $0,14 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nach einem kurzen Peak auf $0,18 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ steigt die OUR nur noch schwankend auf einen Wert von $0,21 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ am Versuchsende. Die qOUR beginnt bei $0,83 \mu\text{mol Zell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und steigt nach einem Tag auf $3,5 \mu\text{mol Zell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und erreicht am Ende des Versuchs einen Wert von $4,5 \mu\text{mol Zell}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Der Verlauf der qOUR ist wie erwartet. Das Absinken der OUR mit einem erneuten Anstieg entspricht dem Verhalten von Zellen in der lag-Phase, da sich die Zellen an ihre neue Umgebung gewöhnen und anpassen müssen.

Zur Verifikation wurde ein zweiter Schüttelkolbenversuch durchgeführt. In Abbildung 40 sind die Messergebnisse der zweiten Schüttelkolbenkultivierung gezeigt. Die viable Zellzahl (VCC) beträgt zu Versuchsbeginn $0,25 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} und steigt auf $0,49 \times 10^6$ Zellen mL^{-1} in zwei Tagen. Eine dritte Probe wurde wegen einer Kontamination nicht mehr genommen. Die Viabilität bleibt in den ersten zwei Tagen zwischen 93–98 %. Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme beginnt bei $0,05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, sie sinkt kurz ab, erholt sich dann und steigt innerhalb der ersten 20 h auf einen Wert von $0,21 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nach einem kurzen Peak auf $0,53 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei der Probenahme nach etwa 24 h steigt die OUR anschließend exponentiell bis auf $1,13 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei Prozessstunde 36 h und sinkt dann schnell auf null. Die qOUR sinkt von einem Wert von $4,7 \mu\text{mol Zell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zu Versuchsbeginn auf $1,86 \mu\text{mol Zell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ binnen 24h. Die qOUR ist zu Beginn des Versuchs fast um ein 5-Faches höher als beim ersten Versuch, bei ähnlicher Zellkonzentration. Es sind weitere Versuch nötig, um dieses Verhalten genauer beurteilen zu können.

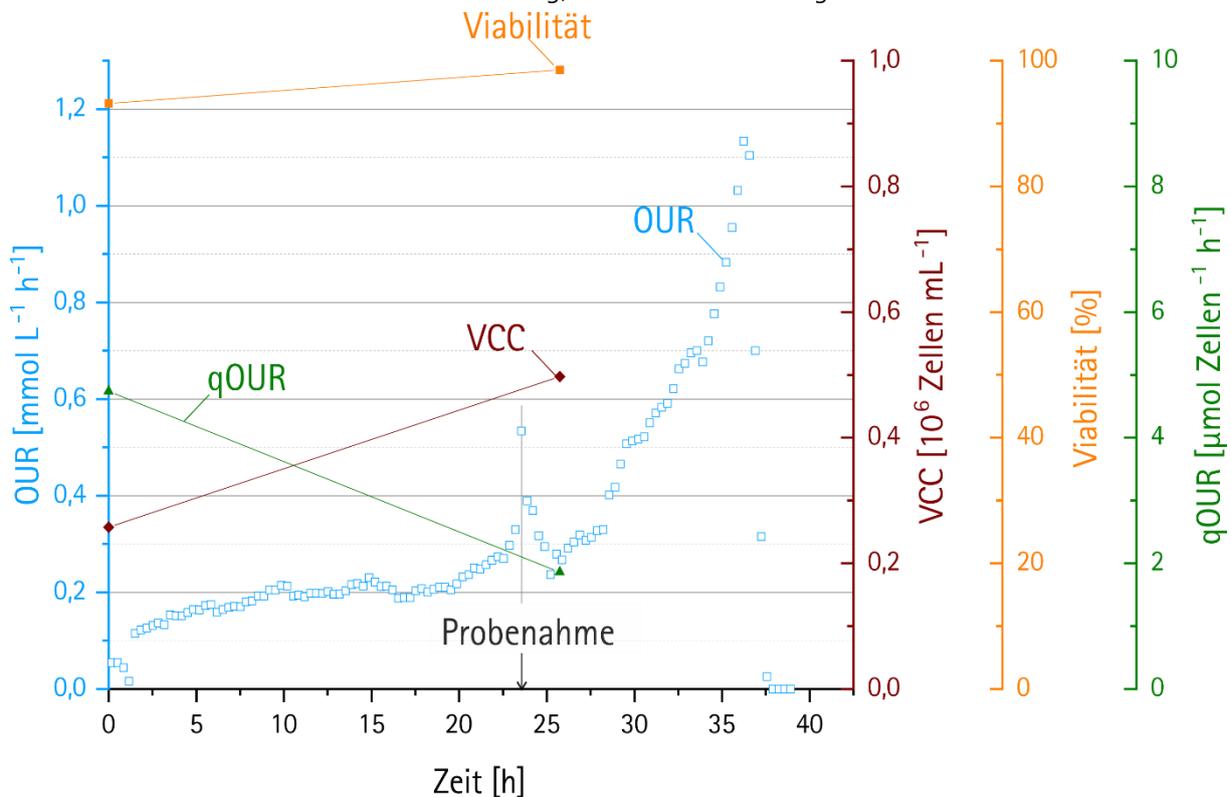


Abbildung 40 - Sauerstoffaufnahme, viable Zellzahl und Viabilität in Schüttelkolben 2 bei einer CHO-Kultivierung

Die Probenahme in Schüttelkolben 2 scheint der Ursprung der Kontamination zu sein, da die OUR im Anschluss exponentiell ansteigt. Am Ende der Schüttelkolbenkultivierung reichen die Nährstoffe für die kontaminierten Zellen nicht mehr aus und die OUR sinkt auf null, die Zellen stellen ihren Stoffwechsel ein und stoppen das Wachstum. Der starke Anstieg der Sauerstoffaufnahme lässt auf eine Kontamination nach der Probenahme schließen (vgl. Abbildung 41). Die mittlere Steigung der ersten 20 Prozessstunden liegt bei $0,0062 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-2}$ und nach der Probenahme zwischen Stunde 25 bis 37 liegt bei $0,0466 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-2}$ und es lässt sich eine Verachtfachung der Steigung feststellen. Höhere Sauerstoffaufnahmeleistungen sind typisch für primitivere Zellsysteme als CHO Zellen, zum Beispiel Hefen oder Bakterien. Über die OUR kann schon recht früh eine Kontamination erkannt werden. So sind 7 h nach der Probenahme

erste Anzeichen einer Kontamination in der OUR zu erkennen. Ohne die OUR läuft die Kultivierung bis zur nächsten Probenahme weiter, bei der die Kontamination dann optisch auffällt. Eine Kontamination lässt sich mit dem miniCOM 17 h früher bestimmen. In Abbildung 42 sind die Verläufe der Sauerstoffaufnahme-

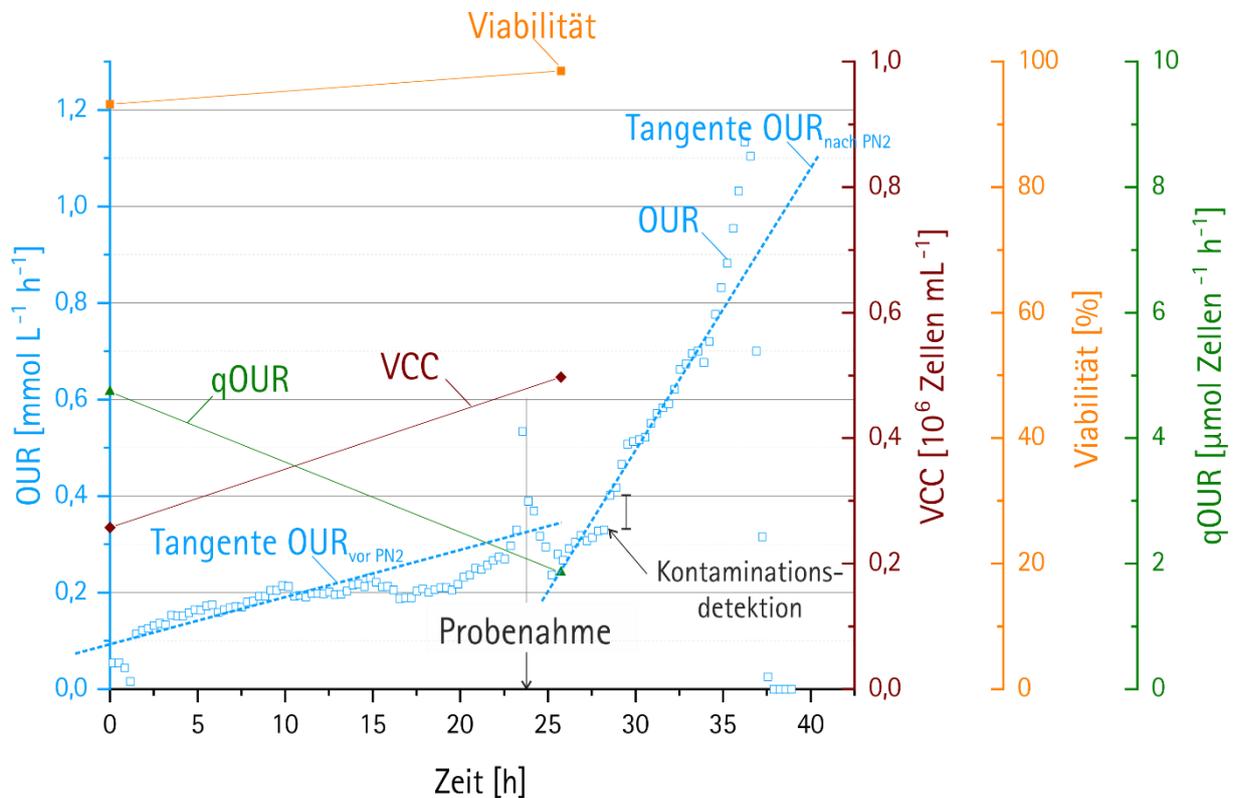


Abbildung 41 - Sauerstoffaufnahme, viablen Zellzahl und Viabilität in Schüttelkolben 2 bei einer CHO-Kultivierung mit Tangenten der OUR zum Veranschaulichen der Kontamination

rate aus beiden Schüttelkolbenversuchen nebeneinander gezeigt. Diese sind komplett unterschiedlich, sowohl von der Wertgröße als auch vom Verlauf der Versuchsdaten sind wenig bis keine Ähnlichkeiten zu erkennen. Die beiden Kulturen starten mit einer ähnlichen Startzellzahl, wobei die OUR in Schüttelkolben 1 zu Beginn viel höher als die in Schüttelkolben 2 ist. Nach etwa 15 h kreuzen sich die Verläufe und die zunächst höhere OUR von Schüttelkolben 1 ist nun niedriger als Schüttelkolben 2.

Wiederzuerkennen in beiden Datensätzen ist die Reaktion der OUR auf die Probenahme. Durch das Öffnen der Inkubatortür für die Probenahme wird neuer Sauerstoff in das System gelassen und die Temperatur sinkt und muss über den Inkubator wieder auf den Sollwert geregelt werden. Beides beeinflusst die Zellen und die Messung der OUR. Die Sauerstoffmessung zur OUR-Bestimmung ist temperaturabhängig und in dieser Versuchsreihe nicht kompensiert worden. Gleichzeitig wird das Inkubatorinnere durch das Öffnen der Tür neu belüftet und frischer Sauerstoff kann nach kurzer Zeit über die Gasphase in die Flüssigkeitsphase diffundieren.

Abschließend kann zu den Schüttelkolbenversuchen festgehalten werden, dass sich die Vermutung aufstellen lässt, dass diese Versuche wenig reproduzierbar zu sein scheinen, was die metabolische Aktivität der Zellen angeht. Prozesssysteme wie Bioreaktoren eignen sich besser, um die Zellsysteme zu überwachen und eine Regelung der wichtigen Prozessparameter vorzunehmen.

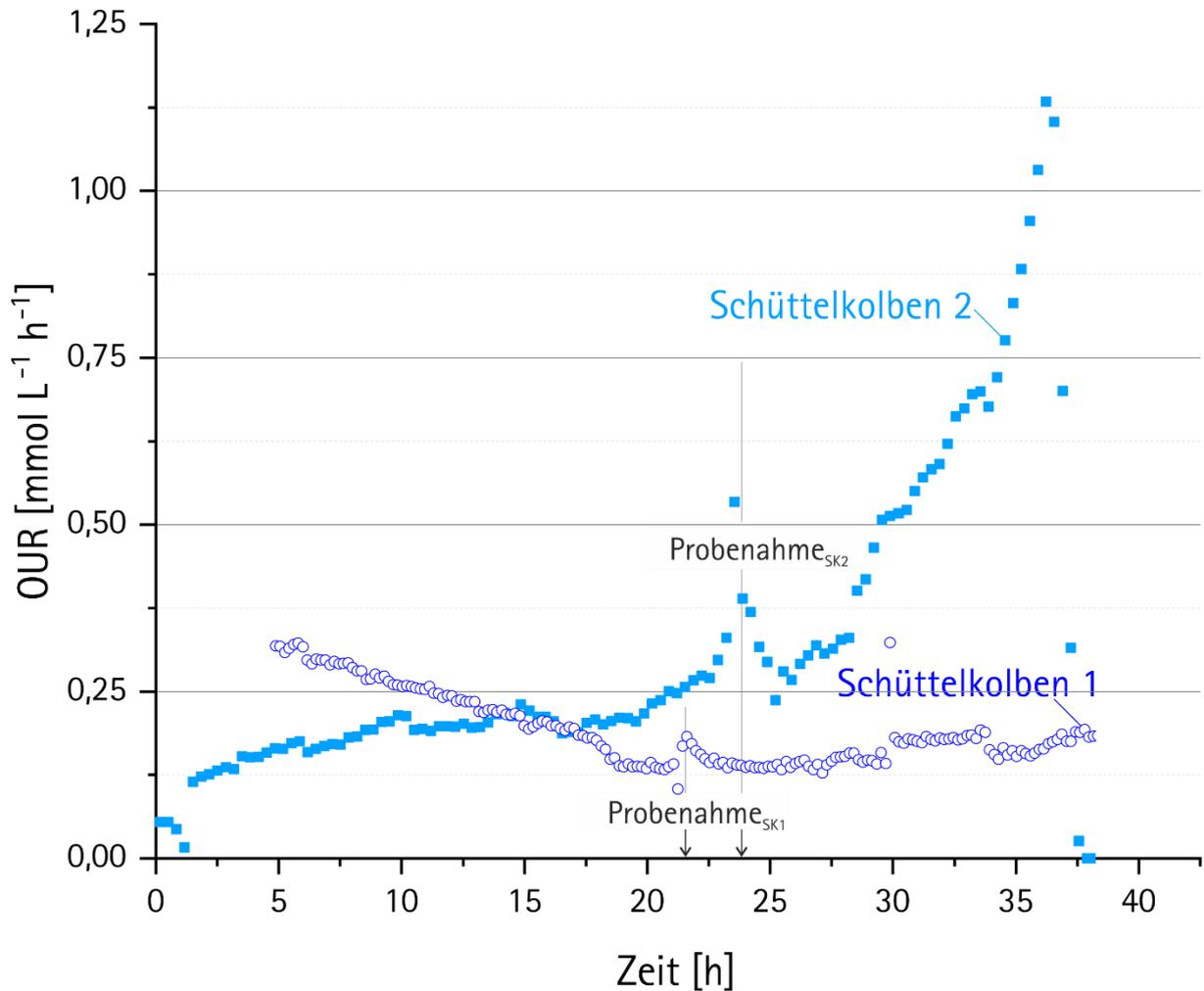


Abbildung 42 – OUR von CHO-Schüttelkolbenkultivierung 1 gegenüber Schüttelkolbenkultivierung 2

5.2.2 Mikrobioreaktor – Ambr250®

Mikrobioreaktoren sind bedeutende Spieler für Prozessentwicklung, indem sie im Bereich der Stammauswahl oder der Optimierung von z.B. Fütterungsmedien eingesetzt werden (Gagliardi et al. 2019; Sandner et al. 2019; Sokolov et al. 2018). In kleinen Volumina können Stämme getestet und damit für einen kostspieligen Scale-up-Prozess eliminiert werden. In Reaktoren wie dem Ambr250® von Sartorius, Göttingen können Prozesse im Maßstab von 250 mL parallel gefahren werden. Die Dimension der Reaktoren sind gleich bis ähnlich wie bei großen Reaktoren aus der Pilot- oder Produktionsreihe. In diesem Kapitel wird gezeigt, welches Prozesswissen schon in diesem kleinen Maßstab durch das miniCOM zur Verfügung gestellt werden kann.

Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse der Kultivierung der CHO DG55 im Ambr250® mit *Online*-Überwachung von OUR und CER mit dem miniCOM. Das oberste Diagramm zeigt die Ergebnisse der *Offline*-Messungen zur Konzentrationsbestimmung von Glukose (rot), Laktat (blau – gefüllt), Glutamat (blau – nicht gefüllt), Glutamin (cyan) und IgG-Antikörpern (grün). Die Proben der ersten 70 h wurden ausschließlich zur Bestimmung der Zellkonzentration genutzt. Vergangene Prozesse wurden dazu genutzt, den Verlauf der Prozessgrößen über gestrichelte Linien anzudeuten (Schellenberg 2023; Nagraik 2021). Die Glukosekonzentration wird nach der ersten Probennahme mit etwa 3.350 mg L⁻¹ bestimmt. Über den Prozessverlauf steigt sie auf das Maximum von 8.428 mg L⁻¹, welches nach 146 h erreicht wird. Anschließend sinkt die Glukosekonzentration bis zum Ende der Kultivierung nach 213 h auf 1.629 mg L⁻¹. Laktat sinkt über den gesamten Prozess von 1.577 mg L⁻¹ auf 244 mg L⁻¹. Glutamat hat einen ähnlichen Verlauf wie Glukose. Die Konzentration wird bei der ersten Messung mit einem Wert von 388 mg L⁻¹ bestimmt. Das Maximum wird nach 146 h bestimmt mit 872 mg L⁻¹. Bis zu diesem Wendepunkt steigt der Wert annähernd linear an und sinkt dann linear auf 380 mg L⁻¹ am Prozessende. Innerhalb des Analysezeitraums steigt die Glutamin- und die IgG-Antikörperkonzentration. Es ist bekannt, dass die Glutaminkonzentration zuvor zwischen 700 und 900 mg L⁻¹ auf unter 100 mg L⁻¹ innerhalb der erste 3 Tage sinkt (Nagraik 2021; Schellenberg 2023). Im weiteren Prozessverlauf steigt die IgG-Antikörperkonzentration schneller als die von Glutamin. Die IgG-Antikörperkonzentration steigt von 135 mg L⁻¹ auf 1796 mg L⁻¹. Die Glutaminkonzentration steigt von 45 mg L⁻¹ auf 438 mg L⁻¹.

Das zweite Diagramm von oben zeigt die Ergebnisse der *Offline*-Messungen zu den Konzentrationen der Zellparameter: Gesamtzellzahl (TCC – gefüllt), Anzahl lebensfähiger Zellen (VCC – nicht gefüllt) und Viabilität (grau). Die Gesamtzellzahl und die Lebendzellzahl steigen beide exponentiell bis 144 h an. Sie starten bei 3 x 10⁻⁶ Zellen mL⁻¹ und steigen auf ein Maximum von 187 x 10⁻⁶ Zellen mL⁻¹ nach 188 h. Anschließend sinkt die Zellzahl und erreicht am Ende der Kultivierung folgende Werte: Gesamtzellzahl 151 x 10⁻⁶ Zellen mL⁻¹ und Lebendzellzahl 147 x 10⁻⁶ Zellen mL⁻¹. Die Viabilität bleibt über den gesamten Prozess > 99 %. Am Ende der Kultivierung beträgt sie 97,4 %.

Das zweite Diagramm von unten zeigt den Verlauf der *Online* gemessenen Kultivierungsparameter pH (rot), pO_2 (blau) und den k_a -Wert (braun-rot) im Ambr250®. Der pH-Wert wird über den gesamten Prozess auf 7,1 geregelt. Durch die Fütterung kommt es täglich zu Schwankungen des pH-Wertes, da das zugegebene Feedmedium basisch ist. Nach jeder Fütterung fällt der pH-Wert auf einen Wert zwischen 6,7 und 7,02. Der Sauerstoffgehalt im Prozess wird nach der Batch-Phase der Kultivierung auf 60 % geregelt. Nach der Inokulation sinkt der Sauerstoffgehalt von 80 % exponentiell auf 60 %, steigt nochmal schlagartig bei 20 h auf 76 % und fällt anschließend annähernd linear auf den Sollwert. Über den Prozessraum von 58-

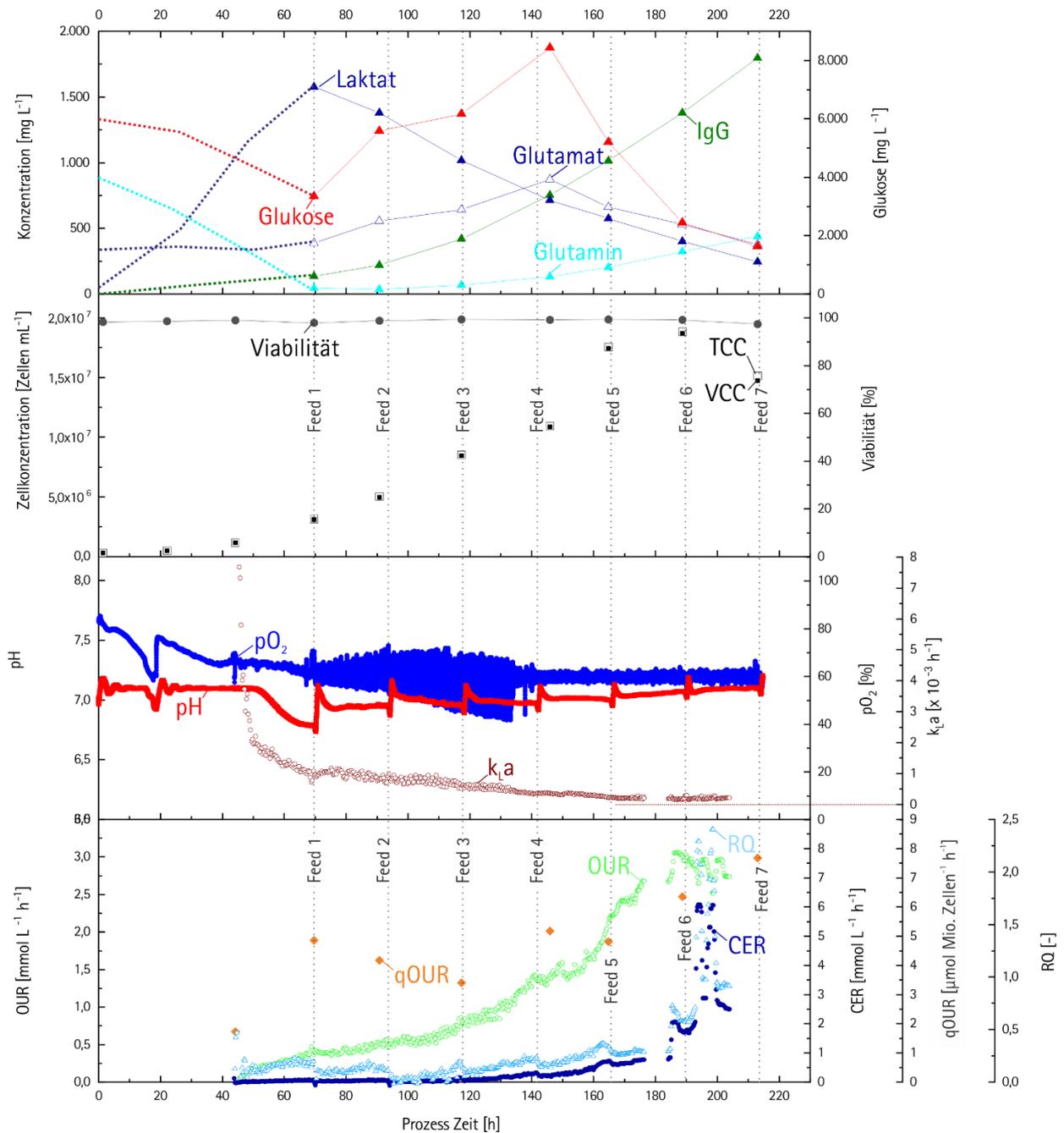


Abbildung 43 - Kultivierungsverlauf der Fed Batch Kultivierung CHO DG44 im Ambr250® mit online Monitoring der Sauerstoffaufnahme durch das miniCOM beginnend 42 h nach Kultivierungsbeginn

135 h schwankt der pO_2 -Wert zwischen 71 % und 42 %, in diesen Zeitraum ist es vermehrt zu Schaumbildung gekommen. Den restlichen Prozess bleibt er stabiler um den Sollwert zwischen 62 % und 56 %. Der Sauerstofftransportkoeffizient k_{ia} nimmt ab dem Beginn der Messaufzeichnung ab. Der Wert startet bei $7,6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, fällt auf $1 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ an Tag 3 und sinkt weiter auf $0,2 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ über die fast 204 Prozessstunden. Da sich in diesem Zeitraum keine physikalischen Prozesseigenschaften (Rührerdrehzahl, Be-gasungsrate, Temperatur, ...) verändern, wird vermutet, dass die Viskosität des Mediums über den Prozess immer weiter steigt und damit den Sauerstofftransfer erschwert (Pappenreiter et al. 2019).

Im letzten Diagramm sind die Verläufe des OUR (hellgrün), der CER (dunkelblau), RQ (hellblau) und q_{OUR} (orange), die über das miniCOM gemessen wurden, dargestellt. Das miniCOM wurde erst nach 42 h in das System eingebaut. Außerdem gab es einen Systemausfall am Prozessrechner des miniCOM, der eine Datenlücke von 7 h im Prozesszeitintervall (178 h-185 h) verursacht hat. Die Sauerstoffaufnahme beginnt bei einem Wert von $6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Der OUR-Wert steigt zunächst schneller an, ab Prozessstunde 70 h nimmt die Steigung ab, es ist ein exponentieller Anstieg auf einen Wert von $3,05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zu verzeichnen. Ob der zunächst steilere Anstieg in den ersten 70 h ein Indiz dafür ist, dass die Zellen sich nach dem Warburg-Effekt (Ahn and Antoniewicz 2012) verhalten, in dem sie Laktat aus Glukose produzieren, gilt es in weiteren Versuchen zu untersuchen. Nach dem Hochpunkt sinkt die OUR schwankend wieder ab und erreicht am Ende der Kultivierung einen Wert von $2,73 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Die OUR und die viable Zellzahl zeigen einen ähnlichen Verlauf. Dies ist auch in anderen CHO-Prozessen dokumentiert worden (Pappenreiter et al. 2019). Innerhalb dieses Anstiegs sind lokale Plateaus oder Einbrüche der Prozessgröße um die Fütterungspunkte zu erkennen. Ein ähnlicher Verlauf ist bei der CER zu erkennen. Die CER beginnt bei $0,01 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, überschreitet dann lange den Wert von $0,07 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nicht. Nach der Fütterung nach 117 h steigt die CER schneller und erreicht zum Prozesszeitpunkt von 200 h das Maximum von $3,17 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit Schwankungen. Anschließend sinkt die CER wieder auf einen Wert von $2,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Aus der OUR und der CER konnte zusätzlich der Respiratorische Quotient RQ bestimmt werden. Zu Beginn steigt der RQ-Wert verhältnismäßig schnell auf einen Wert nah 0,2 bis zur ersten Fütterung, die nach 70 h erfolgt. Zum Zeitpunkt der ersten Fütterung sinkt der RQ-Wert auf 0,03 und steigt danach wieder auf 0,17, bis er bei der zweiten Fütterung erneut auf Werte nah null sinkt. Bis zur dritten Fütterung erholt sich der RQ Wert nur schwer, sinkt aber zum Zeitpunkt der Fütterung nicht mehr auf null, sondern steigt ab dem Fütterungszeitpunkt von einem Wert von 0,09. Zum Zeitpunkt der vierten Fütterung hat der RQ einen Wert von 0,23. Durch die Fütterung sinkt er auf 0,14 und steigt bis zur fünften Fütterung auf 0,36. Zwischen Fütterungspunkt fünf und sechs erreicht der RQ einen Wert von 0,72. Bei Fütterungspunkt sechs beginnt der RQ-Wert von 0,56 erneut zu steigen. Kurz vor Ende der Kultivierung überschreitet der RQ-Wert einen Wertebereich >1 und erreicht den Maximalwert von 2,4 (Goudar, Piret, and Konstantinov 2011).

Da die Zelldichte nicht kontinuierlich bestimmt wurde, stehen Daten der zellspezifischen Sauerstoffaufnahme nur punktuell zur Verfügung. Der erste verzeichnete q_{OUR} -Messwert liegt bei $1,73 \mu\text{mol Mio. Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei Prozessstunde 44. Anschließend steigt er dann auf $2,54 \mu\text{mol Mio. Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei 72 h. Über die nächsten 50 h sinkt die q_{OUR} auf einen Wert von $3,4 \mu\text{mol Mio. Zellen}^{-1} \text{ h}^{-1}$, steigt nach einem

kurzen Plateau wieder an, auf den Maximalwert von $7,7 \mu\text{mol Mio. Zellen}^{-1} \text{h}^{-1}$, der am Ende der Kultivierung gemessen wurde. Das erwähnte Plateau liegt zwischen Fütterungspunkt 4 und 5, bei dem aus den *Offline*-Daten zu erkennen ist, dass die Glukose- und Glutamatkonzentrationen in diesem Zeitfenster sinken. Es scheint, dass die Glukose nun in einem niedrigeren Maße zugegeben wird, als die Zellen benötigen. Gleichzeitig lässt sich aus dem Anstieg auf das Plateau der $q\text{OUR}$ vermuten, dass die Zellen nun nach und nach in die stationäre Phase übergehen, vermehrt das Zellvolumen vergrößern und sich weniger reproduzieren. Es ist bekannt, dass für diesen Prozess mehr metabolische Aktivität gebraucht wird, als für die Zellteilung (Pappenreiter et al. 2019; Wagner, Venkataraman, and Buettner 2011). Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten in Zukunft Impedanzmessungen und Zellgrößenmessungen in der *Offline*-Messung gemacht werden. Mit der Umstellung des Stoffwechsels der Zellen steigt die zellspezifische Sauerstoffaufnahme, die Zellen sind ab diesem Zeitpunkt deutlich leistungsfähiger.

In Abbildung 44 ist die zellspezifische Sauerstoffaufnahme ($q\text{OUR}$) neben der zellspezifischen Produktbildungsrate ($y_{P/X}$) dargestellt. Die Produktbildungsrate beginnt bei $44 \mu\text{g Mio. Zellen}^{-1}$ und steigt auf $69 \mu\text{g Mio. Zellen}^{-1}$ bei Prozessstunde 145. Bei Prozessstunde 165 ist sie auf $58 \mu\text{g Mio. Zellen}^{-1}$ gesunken, um dann zum Ende der Kultivierung das Maximum von $122 \mu\text{g Mio. Zellen}^{-1}$ zu erreichen. Die beiden Größen verlaufen zwischen Prozessstunde 120 und 190 nahezu parallel. Zu Beginn der Kultivierung steigt die $q\text{OUR}$ stärker an als $y_{P/X}$. Am Ende der Kultivierung steigt $y_{P/X}$ deutlich stärker an, im Vergleich zur $q\text{OUR}$. Der

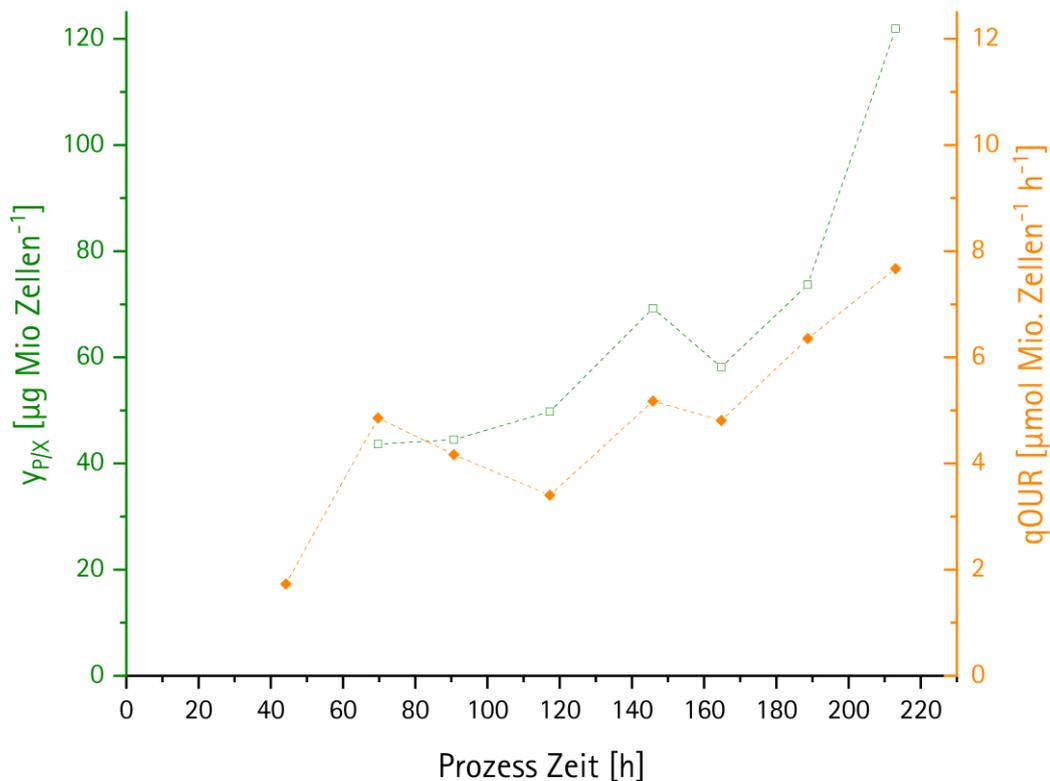


Abbildung 44 - Zellspezifische Sauerstoffaufnahme gegen die Zellspezifische Produktbildungsrate während der CHO Kultivierung im Ambr®

letzte Messwert der $y_{p/x}$ ist wahrscheinlich so hoch, da zu diesem Zeitpunkt mehr lysierte Zellen vorliegen (Viabilität sinkt von 99,2 % auf 97,4 %) und mehr Produkt freigesetzt wird.

Der letzte Messwert der $y_{p/x}$ ist wahrscheinlich so hoch, da zu diesem Zeitpunkt mehr lysierte Zellen vorliegen (Viabilität sinkt von 99,2 % auf 97,4 %) und mehr Produkt freigesetzt wird.

Im Verlauf der OUR ist ein exponentieller Anstieg ab dem Startpunkt der Messung zu beobachten (42 h nach Kultivierungsbeginn). Im Verlauf der Messung sind kleine, aber kurze Plateaus sichtbar, die sich im Verlauf der CER wiederfinden lassen. Diese Messplateaus befinden sich in unmittelbarer Nähe der Fütterungszeitpunkte, sodass diese Messergebnisse auf eine lokale Substratinhibierung, einen Temperatureinfluss durch die Zugabe des gekühlten Mediums oder den schwankenden pH-Wert zurückgeführt werden können. Hier müsste eine genauere Ursachenforschung betrieben werden. Eine Veränderung der Steigung der OUR und CER ist bei nach der Prozesszeit von ca. 141 h zu erkennen. Aus vergangenen Kultivierungen ist dieser Verlauf bekannt, es ist der Punkt, an dem Glukose und Glutamat nicht mehr im Überschuss hinzugegeben werden.

In Abbildung 45 ist der Fütterungspunkt vier genauer dargestellt. Die Tangenten, Mittelungslinien und Flächenbänder um die Messpunkte sollen helfen, den Verlauf genauer einschätzen zu können. Zu den Größen RQ, CER und OUR gibt es jeweils eine Tangente 1, die den Zeitpunkt vor der Fütterung darstellt, eine Tangente 2 kurz nach dem Fütterungszeitpunkt und eine Tangente 3, weiter nach dem Fütterungszeitpunkt. Alle drei Kurven zeigen vor der Fütterung einen Anstieg, direkt danach einen Abfall und dann wieder einen erneuten Anstieg. Dies scheint in direktem Zusammenhang mit der Fütterung zu stehen.

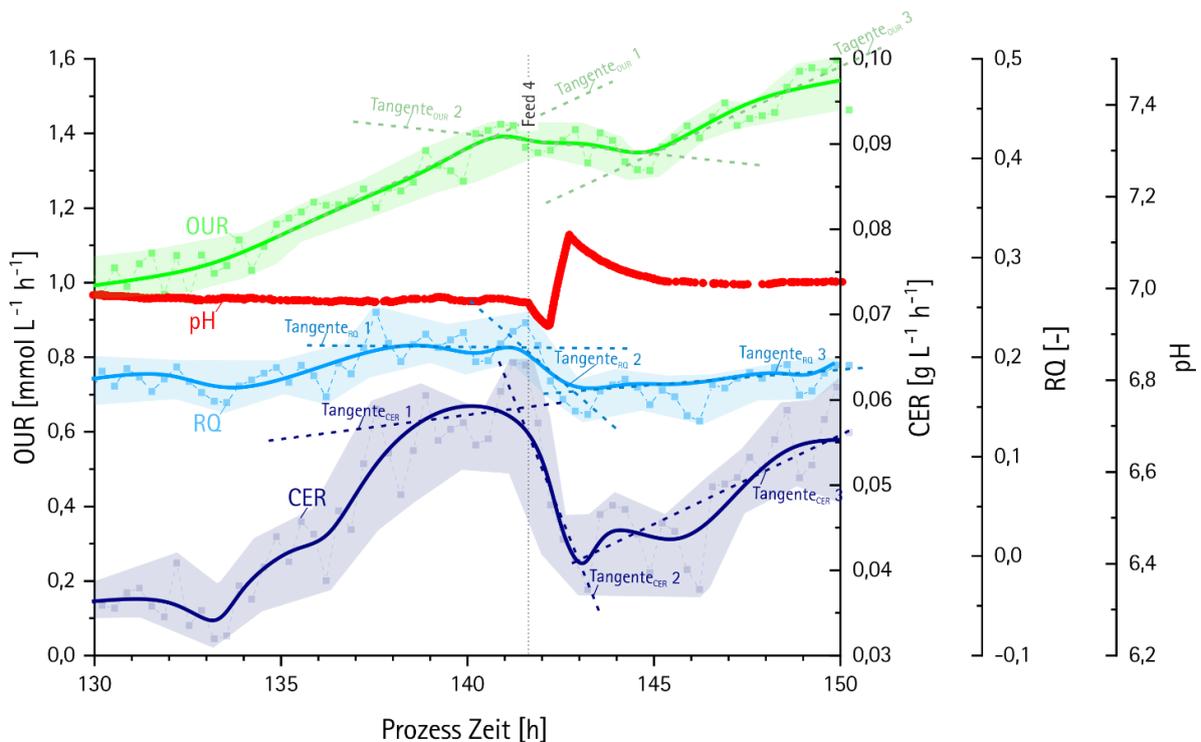


Abbildung 45 – Detailsicht der Größen CER, OUR und RQ bei Fütterungspunkt vier in der CHO-Kultivierung im Ambr250®

Da der pH-Wert sich in diesem Zeitraum verhältnismäßig stark ändert und direkt die CO₂-Messung beeinflussen kann, wurde noch einmal der pH-Wert und die CER zur Beurteilung einer Korrelation dieser beiden Größen in Abbildung 46 aufgetragen. Wie anhand der Tangente zu erkennen ist, korrelieren diese beiden Größen miteinander. Der CO₂-Spot misst also hier die Querempfindlichkeit des pH-Wertes, die für diese Art von CO₂-Messungen bekannt ist (Busse et al. 2017; Biechele et al. 2015).

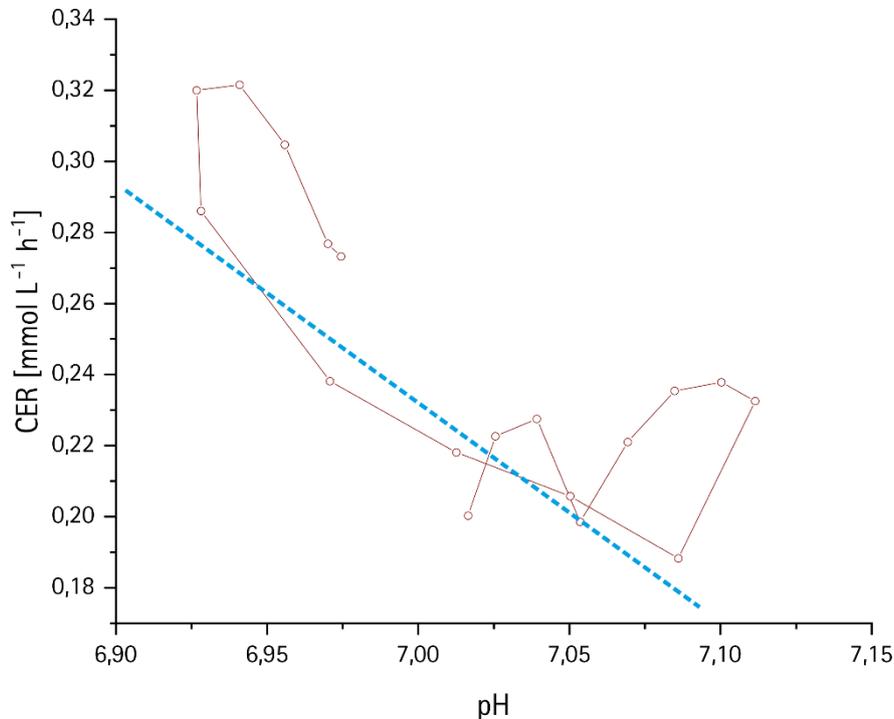


Abbildung 46 – pH aufgetragen gegen die CER in Fütterung vier im Zeitraum 140 h bis 145 h zur Analyse eines Zusammenhangs

Somit sind die Werte der CER und RQ nur bedingt zuverlässig. Die Messungen von Sauerstoff und damit der OUR sind nicht vom pH-Wert abhängig. Daher kann ihnen mehr Gewicht zugeschrieben werden. Da auch in diesen Werten der Einfluss der Fütterung zu erkennen ist, kann die Aussage, dass der Feed die metabolische Aktivität der Zellen beeinflusst, beibehalten werden.

Es ist bekannt, dass sich die metabolische Aktivität von CHO-Zellen über den Prozess verändert. Die Zellen haben an unterschiedlichen Prozesspunkten unterschiedliche Anforderungen und Bedürfnisse und es ist die Aufgabe bzw. die Herausforderung der Regelungsstrategien diesen Bedürfnissen entgegenzukommen (Martínez-Monge et al. 2018; Zagari et al. 2013). Mit den *Online*-Messungen durch das miniCOM ist es möglich, eine Veränderung der Zellaktivität über die Größen RQ, CER und OUR direkt zu erkennen. Des Weiteren können Informationen über den *Online*-k_La zur Verfügung gestellt werden. Es ist es möglich, die Änderung der Bedürfnisse zu erkennen und auf Basis der miniCOM-Messungen eine neue Regelungsstrategie zu entwickeln. Der Einblick in die metabolische Aktivität in einem so frühen Stadium der Prozessentwicklung ist von besonderer Bedeutung (Martínez-Monge et al. 2022).

In unterschiedlichen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das miniCOM in Kultivierungssysteme wie Mikrobioreaktoren und Schüttelkolben integriert werden kann. Auf diese Weise kann eine Vergleichbarkeit

verschiedener Systeme mit demselben Zelltyp hergestellt werden und ihre Skalierbarkeit verglichen werden, was bisher nicht möglich war. Das Design und die Handhabung des miniCOM ermöglichen eine einfache Integration in unterschiedliche Systeme wie dem Ambr250®, Schüttelkolben oder andere Bioreaktoren. Die Möglichkeit, zusätzliche Sensoren in das miniCOM zu integrieren, um das weitere Potenzial der Sensorplattform zu erweitern, kann in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

In einem parallelen Versuch wurde das miniCOM in den gleichen Prozess wie oben beschrieben integriert, dieser Prozess kontaminierte über den Verlauf des Prozesses. Abbildung 47 zeigt die OUR (schwarz gefüllt) und CER (rot nicht gefüllt) dieser Kultivierung. Die OUR beginnt mit einem Offset und fällt dann nach fast 2 h vollständig auf null ab, um dann fast linear auf $0,05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ anzusteigen. Danach folgt ein deutlicher Sprung auf $0,13 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei etwa 3,5 h und bleibt bei diesem Wert konstant. Nach etwa 9 h steigt der Wert exponentiell an und erreicht einen Spitzenwert von $2,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ um anschließend auf null zu fallen.

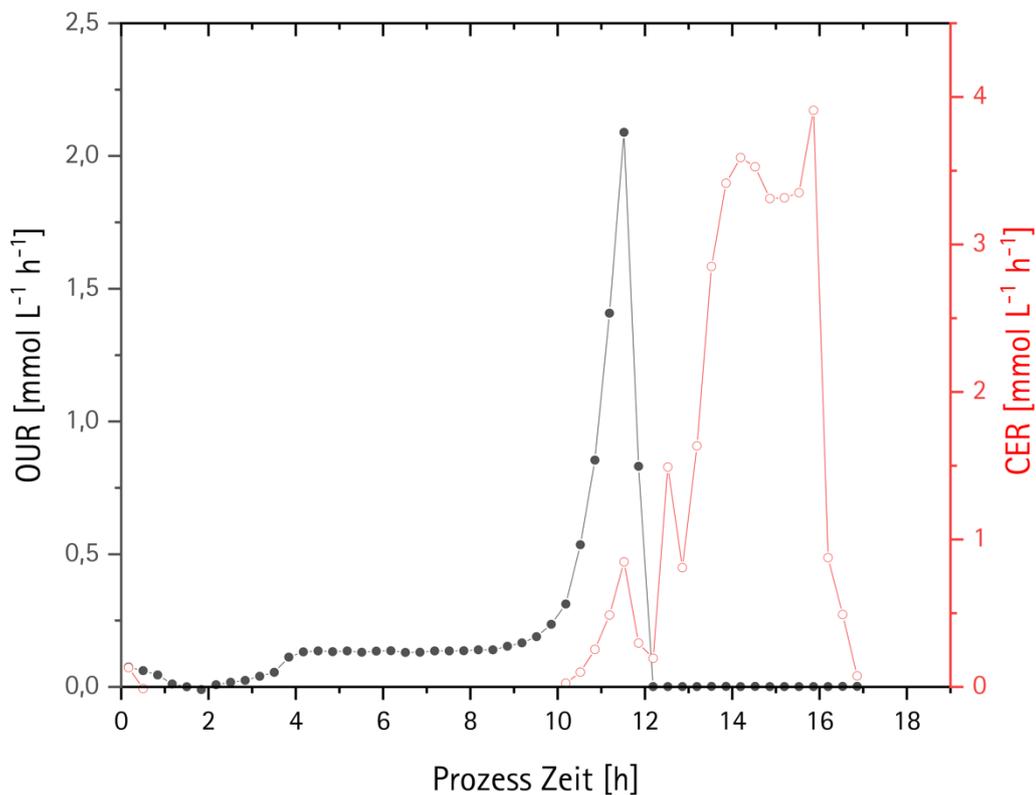


Abbildung 47 - Kontaminiertes Reaktor einer CHO Kultivierung im Ambr250

Die Daten lassen folgende Interpretation zu: Die Zellen benötigen die ersten zwei Stunden der Kultivierung, um sich von dem Stress der Inokulation zu erholen und sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. In den folgenden zwei Stunden beginnen die Zellen mit ihrem Stoffwechsel, dies lässt sich aus den linear ansteigenden Messpunkten erkennen. Für den nachfolgenden Sprung werden weitere Daten hinzugezogen und der Prozessbereich vergrößert. Diese Daten sind in Abbildung 48 dargestellt. Abbildung 48 zeigt die gleichen OUR-Daten wie Abbildung 47 (Reaktor B2), zusätzlich zu diesen OUR-Daten sind Messergebnisse der

Kultivierung aus Abbildung 43 (Reaktor B1) dargestellt. Der direkte Vergleich dieser OUR-Datensätze zeigt, dass ein Wert von $0,05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ unter normalen und sterilen Prozessbedingungen erst nach 48 Stunden Kultivierung erreicht wird. Aus diesem Grund ist der in Abbildung 47 gezeigte steile Anstieg des OUR-Wertes auf eine Kontamination der Kultivierung zurückzuführen. In den vom miniCOM aufgezeichneten Daten ist diese Verunreinigung nach 4 h sichtbar. Ohne die Daten des miniCOM wäre die Verunreinigung aufgrund weiterer Prozessparameter ($pO_2 = 0 \%$) erst nach 8 -12 h aufgefallen. Diese Daten zeigen, dass zusammen mit Referenzdaten (z.B. historische Prozessdaten) eine Bestimmung der Kontamination mit dem miniCOM möglich ist.

Das miniCOM bietet die Möglichkeit, in einem sehr frühen Prozessstadium Indizien für eine mögliche Kontamination zu geben.

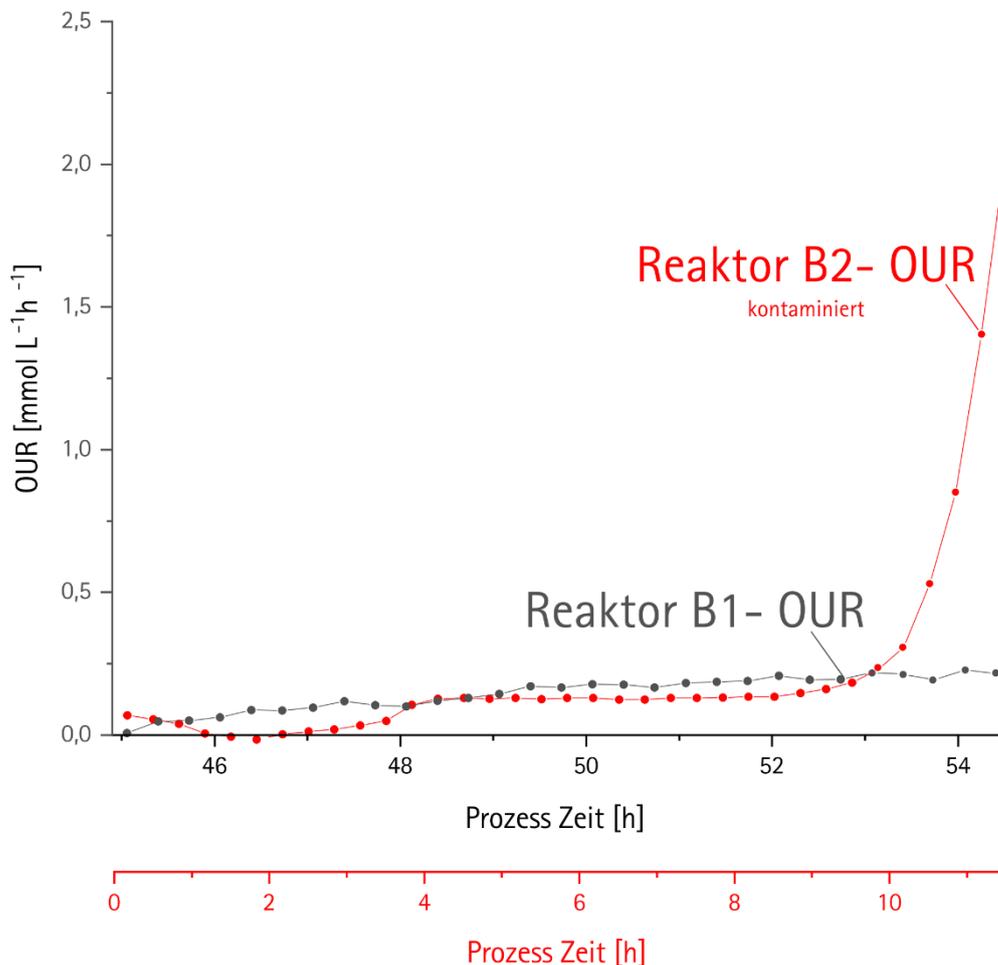


Abbildung 48 - Vergleich kontaminierter Reaktor und nicht kontaminierter Reaktor

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ISICOM-Sensor zusätzlich zu vorangegangenen Arbeiten charakterisiert, erneut im Bioprozess zur Bestimmung der metabolischen Aktivität eingesetzt und um ein graphisches Userinterface schnittstellenseitig erweitert. Zusätzlich wurde das bestehende Messprinzip auf einen mikrofluidischen Chip – das miniCOM – übertragen. Die Miniaturisierung des Messprinzips macht es möglich, die metabolische Aktivität auch im Single-use-Bereich *Online* und damit in Echtzeit zu bestimmen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit den bestehenden Methoden ein steriler und zuverlässiger Einsatz der beiden Sensoren realisiert werden kann und sie für die Überwachung der metabolischen Prozesse in unterschiedlichen Bioprozessen mit Hefe und Tierzellen und Reaktorskalen zwischen 250 mL und 50 L geeignet sind. In diesen Prozessen standen erstmals Informationen zur Sauerstoffaufnahme, Sauerstofftransportkoeffizient, zellspezifische Sauerstoffaufnahme, Kohlendioxidemissionsrate und respiratorischer Quotient zur Verfügung um die metabolische Aktivität der Zellen zu verfolgen.

Die Integration des miniCOMs in das Datenbanksystem des ISICOMs und die Hardwareanbindung an das ISICOM-Prozesssystem wäre ein naheliegender nächster Schritt, der kurzfristig umgesetzt werden kann. Im Anschluss stehen für das miniCOM auch Informationen zur Datenqualität zur Verfügung und der Verlauf der Messungen kann auf dem Interface jederzeit angeschaut werden.

Die Sauerstoffaufnahme ist eine aussagekräftige Prozessgröße, sollte aber immer in Bezug auf die Zelldichte bzw. Zellzahl gesetzt und damit als zellspezifische Sauerstoffaufnahme betrachtet werden. Gerade im Bereich der Tierzellkultivierung sehen die Ergebnisse vielversprechend aus. Ein Bezug zur Zellzahl ergibt nur Sinn, wenn die viable Zelldichte vorhanden ist. Für die zukünftige Weiterentwicklung würde sich daher die Integration einer Impedanzspektroskopiesonde anbieten. Durch diese Sonde wären zusätzlich Informationen zur Zellgrößenverteilung vorhanden, die mehr Informationen zum Prozessverlauf geben und zeigen, wie sich die Zellen über den Prozess verändern. Da diese Informationen auch für Hefezellen von Interesse sein können, wäre die Integration einer Impedanzspektroskopiesonde auch im ISICOM denkbar. Mit diesen Informationen können neue bzw. erweiterte Prozessregelungsstrategien entwickelt werden.

Wie sich in den Versuchen gezeigt hat, würden beide Sensoren von einer Temperatur- bzw. Druckkompensation bei der Sauerstoff- und der CO₂-Sensorik profitieren, um in Zukunft zuverlässige Aussagen über den Verlauf der Konzentrationen sowie die OUR und die CER treffen zu können. Bei der CO₂-Sensorik wäre eine erneute Untersuchung zur pH-Abhängigkeit sinnvoll.

Der Aufwand der sterilen Integration des miniCOMs in Single-use-Systeme wie das Ambr250® hat sich als äußerst umfangreich herausgestellt. Als eine der nächsten Schritte ist die Integration des miniCOMs in den Reaktor vor dem Sterilisationsprozess anzudenken, um im Anschluss beide Systeme gleichzeitig zu sterilisieren.

Um genauer beobachten zu können, wann Effekte wie der Warburg-Effekt oder der Crabtree-Effekt in Bioprozessen auftreten, wäre ein *Online*-Monitoring der Glukose erforderlich. In Kombination mit den Größen wie der CER und der OUR kann in Echtzeit beobachtet werden, ob diese Effekte auftreten oder nicht und in folgenden Schritten der Prozessentwicklung eine Optimierung der Regelstrategie etabliert werden.

Des Weiteren ist die Integration einer optischen CO₂-Messung im ISICOM schnell und einfach zu realisieren und würde damit einen Echtzeitwert der CER liefern, die weiteren Aufschluss zum Verlauf des Zellmetabolismus liefert.

Online-Daten beim Einsatz in Tierzellprozessen zu Laktat, Glutamin und Glutamat würden weitere wertvolle Informationen über den Prozessverlauf enthalten. Eine Integration in die Sensorplattform des miniCOMs wäre hier denkbar, da es bereits mikrofluidische Biosensorsysteme zur Bestimmung von Laktat und Glukose auf dem Markt gibt (Trace Analytics, Braunschweig).

Beim Trend zum vermehrten Einsatz von *Online*-Sensoren muss berücksichtigt werden, dass die Art und Anzahl der für die Prozessüberwachung benötigten Sensoren stark von der jeweiligen Anwendung abhängen. Die Sensorplattform des miniCOMs bietet eine Modularität, die in Zukunft eine kostengünstigere Anpassung der Analytik an den jeweiligen Prozess ermöglicht.

7 Literatur

- Ahn, Woo Suk, and Maciek R Antoniewicz. 2012. "Towards Dynamic Metabolic Flux Analysis in CHO Cell Cultures." *Biotechnology Journal* 7 (1): 61–74.
- Amann, Thomas, Valerie Schmieder, Helene Fastrup Kildegaard, Nicole Borth, and Mikael Rørdam Andersen. 2019. "Genetic Engineering Approaches to Improve Posttranslational Modification of Biopharmaceuticals in Different Production Platforms." *Biotechnology and Bioengineering* 116 (10): 2778–96.
- Behr, Larissa, Klaus Joeris, Mark Burnett, and Thomas Scheper. 2012. "A Novel In Situ Probe for Oxygen Uptake Rate Measurement in Mammalian Cell Cultures." *Biotechnology Progress* 28 (2): 581–86.
- Beutel, Sascha, and Steffen Henkel. 2011. "In Situ Sensor Techniques in Modern Bioprocess Monitoring." *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (6): 1493.
- Biechele, Philipp, Christoph Busse, Dörte Solle, Thomas Scheper, and Kenneth Reardon. 2015. "Sensor Systems for Bioprocess Monitoring." *Engineering in Life Sciences* 15 (5): 469–88.
- BioPhorum Operations Group. 2020. "Biophorum Report 2020." London. <https://www.biophorum.com/download/biophorum-report-2020/>.
- Busse, Christoph. 2017. "Entwicklung Eines In Situ Sensors Zur Messung Der Metabolischen Aktivität in Bioprozessen." Hannover: Leibniz Universität Hannover.
- Busse, Christoph, Philipp Biechele, Ingo Vries, Kenneth F Reardon, Dörte Solle, and Thomas Scheper. 2017. "Sensors for Disposable Bioreactors." *Engineering in Life Sciences*.
- Carvell, John, Stuart Tindal, Aditya Bhat, Jochen Scholz, Pieter van Santen, and Ruud Das. 2016. "Monitoring Live Biomass in Disposable Bioreactors." *BioProcess International*. <https://bioprocessintl.com/upstream-processing/upstream-single-use-technologies/monitoring-live-biomass-in-disposable-bioreactors/>.
- Chmiel, Horst. 2006. *Bioprozesstechnik*. 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Chmiel, Horst, Ralf Takors, and Dirk Weuster-Botz. 2018. *Bioprozesstechnik*. 4th ed. Berlin: Springer Spektrum.
- Claßen, Jens, Florian Aupert, Kenneth F Reardon, Dörte Solle, and Thomas Scheper. 2017. "Spectroscopic Sensors for In-Line Bioprocess Monitoring in Research and Pharmaceutical Industrial Application." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1–16.
- Coppella, Steven J, and Prasad Dhurjati. 1987. "Low-cost Computer-coupled Fermentor Off-gas Analysis via Quadrupole Mass Spectrometer." *Biotechnology and Bioengineering* 29 (6): 679–89.
- Cussler, Edward Lansing. 2009. *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems*. 3rd ed. New York: Cambridge university press.
- Dahlmann, Katharina. 2017. "Online-Überwachung Der Sauerstoffaufnahme-Rate (OUR) in CHO Kultivierungssystemen." Hochschule für Angewandte Wissenschaften.
- Dahlmann, Katharina, Christoph Busse, Florian Aupert, Ingo de Vries, Daniel Marquard, Dörte Solle, Frank Lammers, and Thomas Scheper. 2020. "Online Monitoring of the Cell Specific Oxygen Uptake Rate with an In-Situ Combi-Sensor." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Deken, R H De. 1966. "The Crabtree Effect and Its Relation to the Petite Mutation." *Microbiology* 44 (2): 157–65.
- Dries, Jan. 2016. "Dynamic Control of Nutrient-Removal from Industrial Wastewater in a Sequencing Batch

- Reactor, Using Common and Low-Cost Online Sensors." *Water Science and Technology* 73 (4): 740–45.
- Eibl, Dieter, and Regine Eibl. 2019. "Single-use Equipment in Biopharmaceutical Manufacture: A Brief Introduction." *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 1–11.
- Evens, Ronald P. 2016. "Pharma Success in Product Development—Does Biotechnology Change the Paradigm in Product Development and Attrition." *The AAPS Journal* 18: 281–85. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9833-6>.
- Fahrmeir, Ludwig, Christian Heumann, Rita Künstler, Iris Pigeot, and Gerhard Tutz. 2016. *Statistik: Der Weg Zur Datenanalyse*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Food and Drug Administration. 2004. "PAT—A Framework for Innovative Pharmaceutical Manufacturing and Quality Assurance. Washington, DC: Food and Drug Administration." *Guidance for Industry*, 19.
- Gagliardi, Thomas M, Rahul Chelikani, Yang Yang, Gioia Tuozzolo, and Hang Yuan. 2019. "Development of a Novel, High-throughput Screening Tool for Efficient Perfusion-based Cell Culture Process Development." *Biotechnology Progress* 35 (4): e2811.
- Garcia-Ochoa, Felix, Emilio Gomez, Victoria E Santos, and Jose C Merchuk. 2010. "Oxygen Uptake Rate in Microbial Processes: An Overview." *Biochemical Engineering Journal* 49 (3): 289–307.
- Goudar, Chetan T, James M Piret, and Konstantinov B Konstantinov. 2011. "Estimating Cell Specific Oxygen Uptake and Carbon Dioxide Production Rates for Mammalian Cells in Perfusion Culture." *Biotechnology Progress* 27 (5): 1347–57.
- Gruener, Donald. 2008. "Guide to Irradiation and Sterilization Validation of Single-Use Bioprocess Systems." *BioProcess International*. <https://bioprocessintl.com/upstream-processing/upstream-single-use-technologies/guide-to-irradiation-and-sterilization-validation-of-single-use-bioprocess-systems-183975/>.
- Gupta, Priyanka A, Xudong Ge, Yordan Kostov, and Govind Rao. 2014. "A Completely Noninvasive Method of Dissolved Oxygen Monitoring in Disposable Small-scale Cell Culture Vessels Based on Diffusion through Permeable Vessel Walls." *Biotechnology Progress* 30 (1): 172–77.
- Hamilton Bonaduz. 2021. "Incyte Arc Sensors." Bonaduz. https://assets-sensors.hamiltoncompany.com/File-Uploads/10072078-02_Manual_IncyteArc-Sensors_LR.pdf?v=1625551224.
- Hamilton Bonaduz AG. 2021. "Solid-State Optical CO2 Sensors." https://craft-sensors.s3.amazonaws.com/File-Uploads/HPA0070_CO2-Sensor-Brochure_R3_FNL-LR1.pdf?v=1618925081.
- Hass, Volker C, and Ralf Pörtner. 2011. *Praxis Der Bioprozesstechnik: Mit Virtuellem Praktikum*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verlag.
- Hoek, P I M Van, Johannes P Van Dijken, and Jack T Pronk. 1998. "Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker's Yeast." *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11): 4226–33.
- Hu, Wei-Shou. 2020. *Cell Culture Bioprocess Engineering*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Kessler, Rudolf W. 2012. *Prozessanalytik: Strategien Und Fallbeispiele Aus Der Industriellen Praxis*. Weinheim: John Wiley & Sons.
- Martínez-Monge, I, P Comas, J Triquell, M Lecina, A Casablanca, and J J Cairó. 2018. "A New Strategy for Fed-Batch Process Control of HEK293 Cell Cultures Based on Alkali Buffer Addition Monitoring: Comparison with OUR Dynamic Method." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 10469–83.

- Martínez-Monge, Iván, Carlos Martínez, Marianne Decker, Isuru A Udugama, Igor Marín de Mas, Krist V Gernaey, and Lars K Nielsen. 2022. "Soft- sensors Application for Automated Feeding Control in High-throughput Mammalian Cell Cultures." *Biotechnology and Bioengineering* 119 (4): 1077–90.
- Martínez, Verónica S, Stefanie Dietmair, Lake- Ee Quek, Mark P Hodson, Peter Gray, and Lars K Nielsen. 2013. "Flux Balance Analysis of CHO Cells before and after a Metabolic Switch from Lactate Production to Consumption." *Biotechnology and Bioengineering* 110 (2): 660–66.
- Meyer, C, and W Beyeler. 1984. "Control Strategies of Continuous Bioprocesses Based on Biological Activities." *Biotechnology and Bioengineering* 26 (8): 916–25.
- Mikrosoft Office. n.d. "BESTIMMTHEITSMASS (Funktion)." Accessed August 11, 2023a. <https://support.microsoft.com/de-de/office/bestimmtheitsmass-funktion-d7161715-250d-4a01-b80d-a8364f2be08f>.
- Mikrosoft Office n.d. "Pearson-Funktion." Accessed August 11, 2023b. <https://support.microsoft.com/de-de/office/pearson-funktion-0c3e30fc-e5af-49c4-808a-3ef66e034c18>.
- Nagraik, Tamanna. 2021. "Process Transfer and Optimization of Chinese Hamster Ovary Cell Cultivation for Monoclonal Antibody Production." Hannover: Institutionelles Repositorium der Leibniz Universität Hannover.
- Nico Ulber. 2019. "Entwicklung Und Modifikation Eines Photometers Zur Untersuchung Des Sedimentationsverhaltens Unterschiedlicher Zellsysteme." Leibniz Universität Hannover.
- Office, Microfot. 2023. "RGP-Funktion." 2023. <https://support.microsoft.com/de-de/office/rgp-funktion-84d7d0d9-6e50-4101-977a-fa7abf772b6d>.
- Otto, Warburg. 1956. "On the Origin of Cancer Cells." *Science* 123 (3191): 309–14.
- Pappenreiter, Magdalena, Bernhard Sissolak, Wolfgang Sommeregger, and Gerald Striedner. 2019. "Oxygen Uptake Rate Soft-Sensing via Dynamic KLa Computation: Cell Volume and Metabolic Transition Prediction in Mammalian Bioprocesses." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7: 195.
- Pfeiffer, Thomas, and Annabel Morley. 2014. "An Evolutionary Perspective on the Crabtree Effect." *Frontiers in Molecular Biosciences* 1: 17.
- Postma, Erik, Cornelis Verduyn, W Alexander Scheffers, and Johannes P Van Dijken. 1989. "Enzymic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology* 55 (2): 468–77.
- PreSens. n.d. "O2 Sensorspot SP-PSt3-YAUe." Accessed July 22, 2019. <https://www.presens.de/de/produkte/detail/o2-sensorspot-sp-pst3-yau.html>.
- Rogge, Peter, Dethardt Müller, and Stefan R Schmidt. 2015. "The Single-Use or Stainless Steel Decision Process." *BioProcess International* 13 (11).
- Ruffieux, Pierre-Alain, Urs von Stockar, and Ian William Marison. 1998. "Measurement of Volumetric (OUR) and Determination of Specific (QO₂) Oxygen Uptake Rates in Animal Cell Cultures." *Journal of Biotechnology* 63 (2): 85–95.
- Sandner, Viktor, Leon P Pybus, Graham McCreath, and Jarka Glassey. 2019. "Scale-down Model Development in Ambr Systems: An Industrial Perspective." *Biotechnology Journal* 14 (4): 1700766.
- Sartorius. n.d. "Fermentation Bioreactors." Accessed January 16, 2021. <https://www.sartorius.com/en/products/fermentation-bioreactors>.
- Scheffler, Ulrich, and Olaf Elsholz. 2021. "Smartphone-Photometer." 2021. <https://www.haw-hamburg.de/hochschule/life-sciences/forschung/forschungsgruppen-projekte->

schullabor/schullabor-mobile-analytik/smartphone-photometer/.

- Schellenberg, Jana. 2023. "Implementierung Einer Kontinuierlichen Prozessführung Zur Produktivitätssteigerung Bei Der Kultivierung Tierischer Zellen."
- Schügerl, Karl. 2001. "Progress in Monitoring, Modeling and Control of Bioprocesses during the Last 20 Years." *Journal of Biotechnology* 85 (2): 149–73.
- Siller, Ina G, Anton Enders, Tobias Steinwedel, Niklas-Maximilian Epping, Marline Kirsch, Antonina Lavrentieva, Thomas Scheper, and Janina Bahnemann. 2019. "Real-Time Live-Cell Imaging Technology Enables High-Throughput Screening to Verify in Vitro Biocompatibility of 3D Printed Materials." *Materials* 12 (13): 2125.
- Sokolov, Michael, Massimo Morbidelli, Alessandro Butté, Jonathan Souquet, and Hervé Broly. 2018. "Sequential Multivariate Cell Culture Modeling at Multiple Scales Supports Systematic Shaping of a Monoclonal Antibody toward a Quality Target." *Biotechnology Journal* 13 (4): 1700461.
- Steinwedel, Tobias, Katharina Dahlmann, Dörte Solle, Thomas Scheper, Kenneth F Reardon, and Frank Lammers. 2019. "Sensors for Disposable Bioreactor Systems." *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 69–82.
- Super, Alexandre, Nicolas Jaccard, Marco Paulo Cardoso Marques, Rhys Jarred Macown, Lewis Donald Griffin, Farlan Singh Veraitch, and Nicolas Szita. 2016. "Real-time Monitoring of Specific Oxygen Uptake Rates of Embryonic Stem Cells in a Microfluidic Cell Culture Device." *Biotechnology Journal* 11 (9): 1179–89.
- Swann, Patrick, Lorraine Brophy, David Strachan, Eli Lilly, and Paul Jeffers. 2017. "Biomanufacturing Technology Roadmap – In-Line Monitoring and Real-Time Release." <https://www.biophorum.com/in-line-monitoring-and-real-time-release/>.
- Swarbrick, Brad, Martin Gadsby, and Faithe Wempen. 2018. *QbD & PAT For Dummies, Optimal Special Edition*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd., The Atrium, Souothern Gate.
- Urk, Hendrik Van, W S Leopold Voll, W Alexander Scheffers, and Johannes P Van Dijken. 1990. "Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts." *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1): 281–87.
- Urlaub, Gail, Emmanuel Käs, Adelaide M Carothers, and Lawrence A Chasin. 1983. "Deletion of the Diploid Dihydrofolate Reductase Locus from Cultured Mammalian Cells." *Cell* 33 (2): 405–12.
- Valero, F, and J López-Santín. 2017. "Online Analysis for Industrial Bioprocesses: Gas Analysis." In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 649–78. Elsevier.
- Wagner, Brett A., Sujatha Venkataraman, and Garry R. Buettner. 2011. "The Rate of Oxygen Utilization by Cells." *Free Radical Biology and Medicine* 51 (3): 700–712.
- Wang, Li, Matthew E. Pepper, Ajay Padmakumar, Timothy C. Burg, Sarah W. Harcum, and Richard E. Groff. 2014. "A Real-Time Adaptive Oxygen Transfer Rate Estimator for Metabolism Tracking in Escherichia Coli Cultures." In *2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 6191–94. IEEE.
- Wang, Xu-dong, and Otto S Wolfbeis. 2015. "Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors (2013–2015)." *Analytical Chemistry* 88 (1): 203–27.
- WTW. n.d. "Bestimmung Der Trübung." Accessed August 11, 2023. http://old.omnilab.de/hpb/export/1/TURB_D.PDF.
- Wurm, Florian M. 2004. "Production of Recombinant Protein Therapeutics in Cultivated Mammalian Cells."

Nature Biotechnology 22 (11): 1393.

Wurm, Florian M, and David Hacker. 2011. "First CHO Genome." *Nature Biotechnology* 29 (8): 718–20.

Yoon, Sung-jin, and Konstantin B Konstantinov. 1994. "Continuous, Real-time Monitoring of the Oxygen Uptake Rate (OUR) in Animal Cell Bioreactors." *Biotechnology and Bioengineering* 44 (8): 983–90.

Zagari, Francesca, Martin Jordan, Matthieu Stettler, Hervé Broly, and Florian M Wurm. 2013. "Lactate Metabolism Shift in CHO Cell Culture: The Role of Mitochondrial Oxidative Activity." *New Biotechnology* 30 (2): 238–45.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 -	Single-use-Bioreaktoren der Firma Sartorius Göttingen in unterschiedlichen Größen (Sartorius Göttingen 2023).....	3
Abbildung 2 -	Beispiel für Multi-use Bioreaktoren als Benchtop und stainless steel Reaktoren der Firma Sartorius Göttingen (Sartorius n.d.).....	4
Abbildung 3 -	Bioreaktor mit unterschiedlichen Sensoren als Beispiele für die unterschiedlichen Kategorien an Sensorüberwachungstypen (nach Dahlmann, 2017).....	5
Abbildung 4 -	Schematischer Aufbau einer Clark Elektrode.....	9
Abbildung 5 -	Schematisches Abbild eines optischen Sauerstoffsensors im Bioreaktors und in einem Mikrofluidischen Chip (single-use).....	10
Abbildung 6 -	Schematisches Messprinzip der Kohlendioxidbestimmung nach Severinghaus, Mittlerem Infrarotlicht und optisch mit Fluoreszenzfarbstoff - angelehnt an (Hamilton Bonaduz AG 2021; Steinwedel et al. 2019).....	11
Abbildung 7 -	Verdeutlichung der unterschiedlichen Messmethoden zur Bestimmung der totalen Zellzahl (in Anlehnung an (WTW n.d.)).....	13
Abbildung 8 -	Messprinzip zur Bestimmung der viablen Zellzahl.....	15
Abbildung 9 -	Übersicht der Prozessgrößen, des Aufbaus und Messstellen zur Bestimmung der OUR über die Gasmassenbilanz (Dahlmann 2017; Yoon and Konstantinov 1994).....	17
Abbildung 10 -	Übersicht der Prozessgrößen, des Aufbaus und Messstellen zur Bestimmung der OUR über die Flüssigphasenbilanz zur online Bestimmung der OUR	19
Abbildung 11 -	Schrittweiser Verlauf der dynamischen Methode in einem Bioreaktor während der Kultivierung	20
Abbildung 12 -	Zweifilm Model mit schematischer Darstellung des Übergangs von Sauerstoff von der Gas- in die Flüssigphase (Chmiel 2006) nach (Dahlmann 2017).....	23
Abbildung 13 -	ISICOM eingebaut in Bioreaktor im Ingoldport (Dahlmann et al. 2020).....	27
Abbildung 14 -	Querschnitt durch den ISICOM Sensor	28
Abbildung 15 -	Querschnitt des miniCOM mit eingebauten Sensorplugs für die Anwendung im Schüttelkolben.....	29
Abbildung 16 -	Schematische Zeichnung des miniCOMs für den Einbau ins Ambr250®	30
Abbildung 17 -	Vorgehen zum sterilen Einsatz des miniCOMs in diverse Reaktorsystem wie das Ambr® 250, Schüttelkolben oder ein Bench-top-Bioreaktor.....	32
Abbildung 18 -	Schematischer Versuchsaufbau – Schüttelkolben mit miniCOM, Pumpe, Signalwandler (PreSens GmbH, Regensburg) und Monitoring und Kontrolleinheit Schüttelkolben, Pumpe und miniCOM befinden sich im temperierten Inkubator.....	34
Abbildung 19 -	miniCOM eingebaut ins Ambr250®	35
Abbildung 20 -	Schematischer Versuchsaufbau – Ambr250® mit miniCOM, Pumpe, Signalwandler (PreSens GmbH– Regensburg) und Monitoring und Kontrolleinheit.....	36
Abbildung 21 -	Kommunikationskonzept ISICOM.....	37
Abbildung 22 -	Übersicht der Datenbank im ISICOM-Rechner.....	38

Abbildung 23 - Veranschaulichung des Idealisierten und tatsächlichen Verlaufes des pO_2 -Wertes innerhalb der ISICOM Messkammer zur Verbildlichung des Modell-Fehlers.....	39
Abbildung 24 - Beispiel der Nutzeroberfläche auf dem ISICOM Rechner inkl. exemplarischer Daten während einer Messung	40
Abbildung 25 - Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Sedimentationsphotometers nach (Nico Ulber 2019). t_0 beschreibt dabei den Anfangszustand der Messung, t_1 beschreibt den Zustand, bei dem die Zellen innerhalb des Photometers sedimentiert sind. Beide Zustände sind beispielhaft mit einem methodischen Signalverlauf der Photodiode über die Zeit dargestellt.....	43
Abbildung 26 - Sedimentationsphotometer (Nico Ulber 2019).....	44
Abbildung 27 - links: Sedimentationsverhalten von Sand über einen Zeitraum von 5 min.....	45
Abbildung 28 - links: Sedimentationsverhalten von 5 g L ⁻¹ Hefe-Zellen über einen Zeitraum von 20 min. 45	45
Abbildung 29 - Sterilversuche des miniCOMs.....	46
Abbildung 30 - Versuchsaufbau mikrofluidischer Chip zur Analyse des Diffusionsverhaltens.....	47
Abbildung 31 - Untersuchung des Rückvermischungs- und Diffusionsverhalten des mikrofluidischen Chips des miniCOMs über einen Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur. Zu Zeitpunkten: Versuchsbeginn t_0 , 25 s nach dem Stoppen der Pumpen, 5 min und 60 min nach dem Stoppen der Pumpe.....	48
Abbildung 32 - Eingebautes ISICOM mit Auswertungsrechner in der 50 L Pilot Anlage bei Chr. Hansen	50
Abbildung 33 - Messung während einer Saccharomyces-Batch-Kultivierung über 22h. Der Sauerstoffgehalt wurde auf einem Sollwert von 30 % über die Rührerdrehzahl und den Druck geregelt.....	52
Abbildung 34 - OTR der Abgasanalytik und OUR der ISICOM-Messung am Anfang (links) und am Ende (rechts) der Fermentation in der Detailaufnahme.....	53
Abbildung 35 - Daten zur Beurteilung der Messqualität während der Saccharomyceskultivierung.....	55
Abbildung 36 - Non Saccharomyces Batch - Kultivierung über 68h. Der Sauerstoffgehalt wurde auf einem Sollwert von 30% über die Rührerdrehzahl geregelt.....	56
Abbildung 37 - OTR, CPR (Abgas Analytik) und OUR (ISICOM) aus Batch-Kultivierung der Non-Saccharomyces	58
Abbildung 38 - Daten zur Beurteilung der Messqualität während der Non-Saccharomyces-Kultivierung 59	59
Abbildung 39 - Sauerstoffaufnahme, Viablen-Zellzahl und Viabilität in Schüttelkolben 1 einer CHO-Kultivierung	62
Abbildung 40 - Sauerstoffaufnahme, viablen Zellzahl und Viabilität in Schüttelkolben 2 bei einer CHO-Kultivierung	63
Abbildung 41 - Sauerstoffaufnahme, viablen Zellzahl und Viabilität in Schüttelkolben 2 bei einer CHO-Kultivierung mit Tangenten der OUR zum Veranschaulichen der Kontamination	64
Abbildung 42 - OUR von CHO-Schüttelkolbenkultivierung 1 gegenüber Schüttelkolbenkultivierung 2	65

Abbildung 43 - Kultivierungsverlauf der Fed Batch Kultivierung CHO DG44 im Ambr250® mit online Monitoring der Sauerstoffaufnahme durch das miniCOM beginnend 42 h nach Kultivierungsbeginn.....	67
Abbildung 44 - Zellspezifische Sauerstoffaufnahme gegen die Zellspezifische Produktbildungsrate während der CHO Kultivierung im Ambr®.....	69
Abbildung 45 - Detailansicht der Größen CER, OUR und RQ bei Fütterungspunkt vier in der CHO-Kultivierung im Ambr250®	70
Abbildung 46 - pH aufgetragen gegen die CER in Fütterung vier im Zeitraum 140 h bis 145 h zur Analyse eines Zusammenhangs.....	71
Abbildung 47 - Kontaminiertes Reaktor einer CHO Kultivierung im Ambr250	72
Abbildung 48 - Vergleich kontaminierter Reaktor und nicht kontaminierter Reaktor	73
Abbildung 49 - Detailansicht der Größen CER, OUR und RQ bei Fütterungspunkt Feed 3 in der CHO Kultivierung im Ambr250.....	IX
Abbildung 50 - Detailansicht der Größen CER, OUR und RQ bei Fütterungspunkt Feed 5 in der CHO Kultivierung im Ambr250.....	IX
Abbildung 51 - Technische Zeichnung miniCOM fürs Ambr® 250.....	X
Abbildung 52 - Technische Zeichnung miniCOM für den Schüttelkolben	XI
Abbildung 53 - Schraubgewinde für miniCOM Reaktor unabhängig.....	XII
Abbildung 54 - Wie diese Arbeit unter anderem entstanden ist. – Thanks for the memories.....	XVI

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Abkürzungsübersicht.....	vii
Tabelle 2 - Übersicht der optischen Messanordnungen im Zusammenhang mit der Zellkonzentration	14
Tabelle 3 - Geräte Liste ISICOM.....	IV
Tabelle 4 - Geräteliste Sedimentations Photometer.....	IV
Tabelle 5 - Geräteliste miniCOM.....	IV
Tabelle 6 - Geräteliste die allgemein verwendet wurden.....	V

8.3 Geräte

Tabelle 3 – Geräte Liste ISICOM

ISICOM

Bezeichnung	Modelnr.	Hersteller
Electro-Optical Module	EOM-O2-FOM-PHB50-T4D-AO-v1	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
Gehäuse	Consolets C16C16	Hoffman nvent / Schroff GmbH, Straubenhardt, Deutschland
Lichtleiter	POF-L2,5-1SMA	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
Oxygen Sensor Spots	SP-PSt3-NAU-D5-OIW30	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
Panel PC	Panelmaster 1081	ICO Innovation Computer GmbH, Diez/Lahn, Deutschland

Siehe auch (Busse 2017)

Tabelle 4 – Geräteliste Sedimentations Photometer

Sedimentations-Photometer

Siehe (Nico Ulber 2019)

Tabelle 5 – Geräteliste miniCOM

miniCOM

Bezeichnung	Modelnr.	Hersteller
3D Drucker	ProJet®MJP 2500 Plus	3D Systems, USA
3D Drucker	EasyClean System	3D Systems, USA
Lichtleiter	POF-L2,5-1SMA	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
pCO ₂ Sensor	CO ₂ SensorPlug	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
Peristaltik Pumpe	Ismatec® Reglo ICC	ISMATEC, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Peristaltik Pumpe	Ismatec IPC	ISMATEC, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland

pH Sensor	pH SensorPlug	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
pO ₂ Sensor	O ₂ SensorPlug	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland
Signalwandler	OXY-1 SMA-BT Oxygen Meter, pH-1 SMA HP5, CO ₂ -1 SMA	PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland

Tabelle 6 – Geräteliste die allgemein verwendet wurden

Allgemein		
Bezeichnung	Modelnr.	Hersteller
Autoklav	VX-150	Systemec GmbH, Deutschland
Bioreaktor	Ambr®250 Modular	Sartorius Stedium Biotech, Deutschland
Feinwaage		Sartorius AG, Deutschland
Inkubator	HERAcell™ 240	Thermo Fischer Scientific, USA
Magnetrührer		IKA Werke GmbH, Deutschland
Metaboliten Analyse	CEDEX HiRes	Roche Diagnostics GmbH, Schweiz
Neubauer Zählkammer		Assistent, Deutschland
Photometer	Photometer Multiscan Go	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
pH-Sonde	OxyFerm FDA VP 225	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
Pipetten	Eppendorf Research®	Eppendorf, Deutschland
Sauerstoff- Sonde	EasyFerm Plus PHI VP 225 Pt100	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
Schüttelkolben	Corning Einweg	VWR International GmbH, Deutschland
Schüttelkolben	Glas	VWR International GmbH, Deutschland
Sicherheitswerkbank	MSC-Advantage™	Thermo Fischer Scientific, USA
Sicherheitswerkbank	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, USA
Spritzenpumpe	Aladdin AL-1000	Waukesha-Pearce Industries, USA
Ultraschallbad	Sonsorex Super RK510H	Bandelin GmbH, Deutschland
Vakuumpumpe	LABORPORT® Mini	KNF Neuberger GmbH, Deutschland

Allgemein

Bezeichnung	Modelnr.	Hersteller
Vortex	Genie 1	Bender & Hobein GmbH, Deutschland
Zellzähler	CEDEX Bio Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Schweiz
Zentrifuge	Centrifuge Hareus Pico 21	Thermo Fisher Scientific, USA

8.4 Kultivierungsmedien

Siehe (Schellenberg 2023)

8.5 Verwendete Software

Name	Hersteller
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Office Word 2016	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Visual Studio Code	Microsoft Corporation, USA
Origin 2016G	OriginLab Corporation
Python 3.8.5	Python Software Foundation, USA
QT-Designer	QT Group, Finland
SolidWorks	Dassault Systems GmbH, Deutschland

8.6 Ergänzenden Formeln und Berechnungen

8.6.1 Bestimmung der Henry Konstante in Abhängigkeit der Temperatur

$$k_{H,CP} = k_{H,CP,\theta} \cdot e^{\left(c \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_\theta}\right)\right)}$$

$$k_{O_2,H,CP}(36^\circ C) = 1,3 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L atm}} \cdot e^{\left(1700 \frac{1}{K} \left(\frac{1}{298+36 K} - \frac{1}{298 K}\right)\right)}$$

$$= 7,0292 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L atm}} = 6,9389 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{L bar}}$$

$$H_{O_2}(36^\circ C) = \frac{1}{k_{O_2,H,CP}(36^\circ C)} = 1441 \frac{\text{L bar}}{\text{mol}} \quad (15)$$

$$k_{CO_2,H,CP}(36^\circ C) = 3,4 \cdot 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{L atm}} \cdot e^{\left(2400 \frac{1}{K} \left(\frac{1}{298+36 K} - \frac{1}{298 K}\right)\right)}$$

$$= 14,27 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L atm}} = 14,08 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L bar}}$$

$$H_{O_2}(36^\circ C) = \frac{1}{k_{CO_2,H,CP}(36^\circ C)} = 70,98 \frac{\text{L bar}}{\text{mol}}$$

8.6.2 Bestimmung Todvolumen miniCOM

Im Schüttelkolben:

Hin- und Rückweg vom Schlauch ($d_i = 0,5 \text{ mm}$) zum Kolben:	$2 \times 50 \text{ cm}$
Umrechnung in Volumen ($V = \left(\frac{d_i}{2}\right)^2 \cdot \pi \cdot l$)	$196,34 \text{ mm}^3 = 196,34 \mu\text{L}$
Pump Schlauch:	40 cm
Umrechnung in Volumen ($V = \left(\frac{d_i}{2}\right)^2 \cdot \pi \cdot l$)	$452,4 \text{ mm}^3 = 452,4 \mu\text{L}$
Summe:	$648,73 \mu\text{L}$
Anteil zum Kolbenvolumen:	$\frac{V_{\text{Schläuche}}}{V_{L_{\text{Kolben}}}} \cdot 100 = 3,25 \%$

8.6.3 Funktionen für die Fehlerfortpflanzung

8.6.3.1.1 Pearson Koeffizient

Dieser Koeffizient dient dazu lineare Abhängigkeit zweiter Datensätze darzustellen. Dieser Koeffizient kann einen Wertebereich zwischen $-1,0 \leq r \leq 1,0$ erlangen. Durch diesen Wertebereich ist es möglich eine Richtung und eine Stärke der Korrelation anzugeben.

$$r_{XY}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x}) \cdot \sum_{i=1}^n (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y - \bar{y})^2}} \quad (16)$$

r	-	Korrelations-Koeffizient, Pearson Koeffizient	[-]
x, y	-	Wert der Variable x bzw. y die gegeneinander korreliert werden	[div.]
\bar{x}	-	Mittelwert der Variable x bzw. y die gegeneinander korreliert werden	[div.]

Es gelten folgende Grenzwerte zur Beurteilung des Zusammenhangs:

|0,1| – schwacher Zusammenhang

|0,3| – mittel starker Zusammenhang

|0,5| – sehr starker Zusammenhang (Fahrmeir et al. 2016; Mikrosoft Office n.d.)

8.6.3.1.2 Bestimmtheitsmaß

Das Bestimmtheitsmaß gibt das Quadrat des Pearson-Koeffizienten wieder. Es gilt $0 \leq R^2 \leq 1$. Es repräsentiert die Anpassungsgüte einer Regression. Über null wird dabei eine sehr schlechte Regression dargestellt, wohin gegen eine perfekte Regression über eins abgebildet wird.

$$R^2 = (r_{XY}^2)^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (17)$$

R^2	-	Bestimmtheitsmaß	[–]
\hat{y}_i	-	Schätzwert	[div.]
\bar{y}	-	Empirischer Mittelwert	[div.]

(Microsoft Office n.d.; Fahrmeir et al. 2016)

8.6.3.1.3 Modell-Fehler

Der Modell-Fehler wird in diesem Fall aus dem Bestimmtheitsmaß und der Prozessgröße berechnet. Über diesen Wert wird ein Bezug vom Bestimmtheitsmaß zur Messgröße selber geschaffen um eine Aussage über die Zuverlässigkeit bzw. den Unsicherheitsbereich zu ermöglichen.

$$e_A = (1 - R^2) \cdot A \quad (18)$$

A	-	Größe zu der, der Fehler bestimmt werden soll	[div.]
e_A	-	Fehler der Größe A	[div.]

8.7 Ergänzende Graphen

8.7.1 CHO Kultivierung mit miniCOM im Ambr250

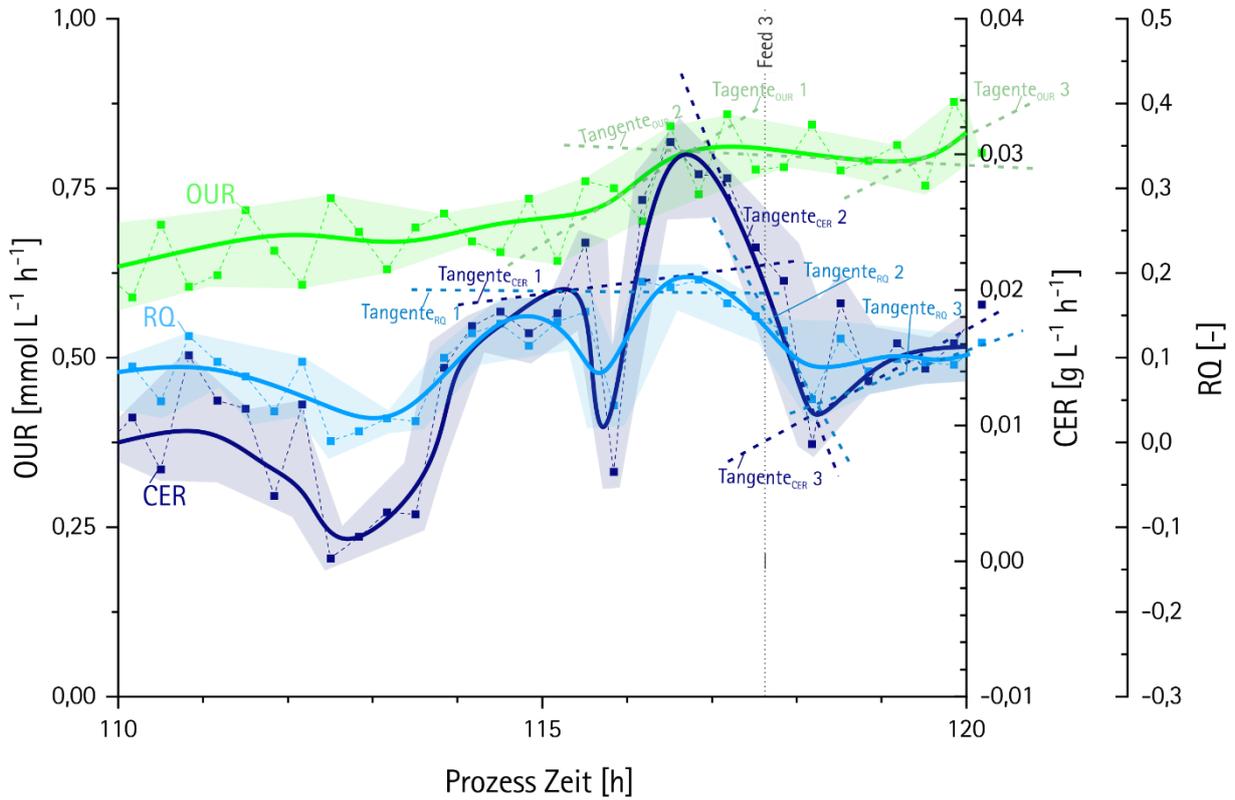


Abbildung 49 – Detailansicht der Größen CER, OUR und RQ bei Fütterungspunkt Feed 3 in der CHO Kultivierung im Ambr250

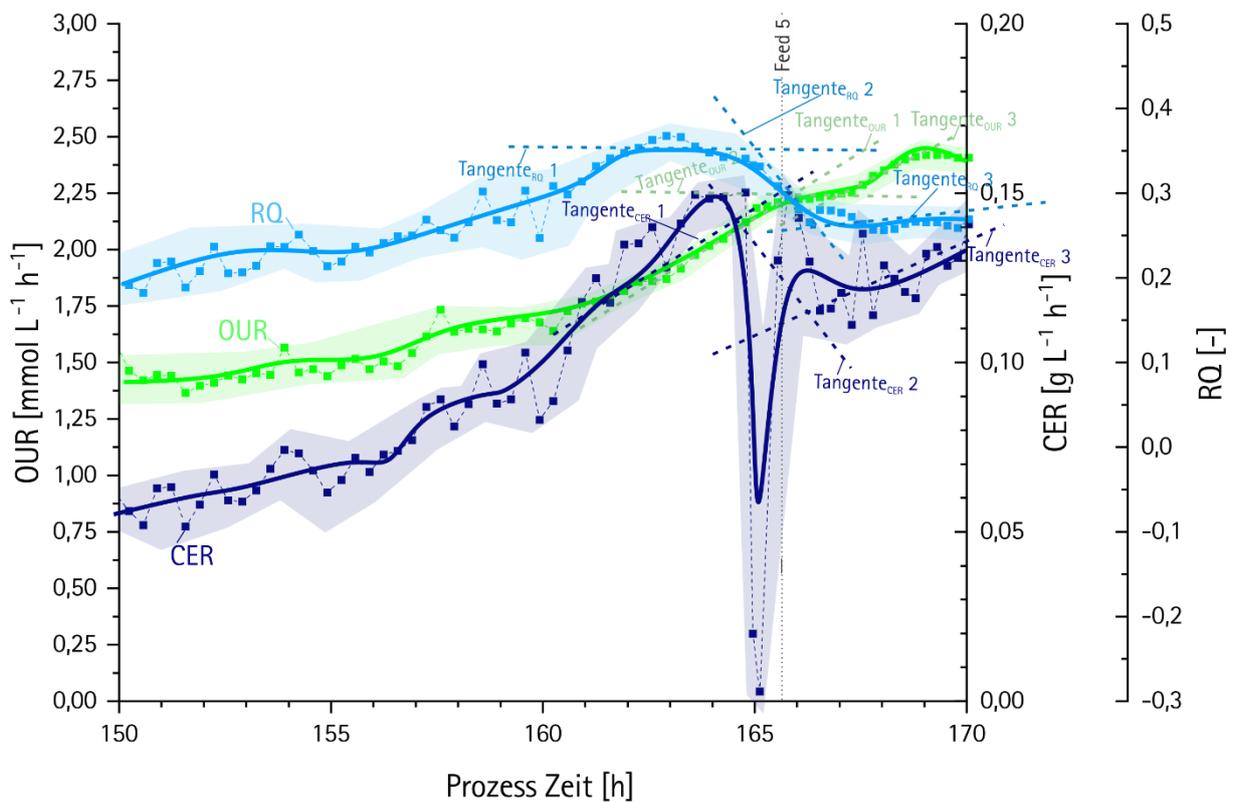


Abbildung 50 – Detailansicht der Größen CER, OUR und RQ bei Fütterungspunkt Feed 5 in der CHO Kultivierung im Ambr250

Schüttelkolben

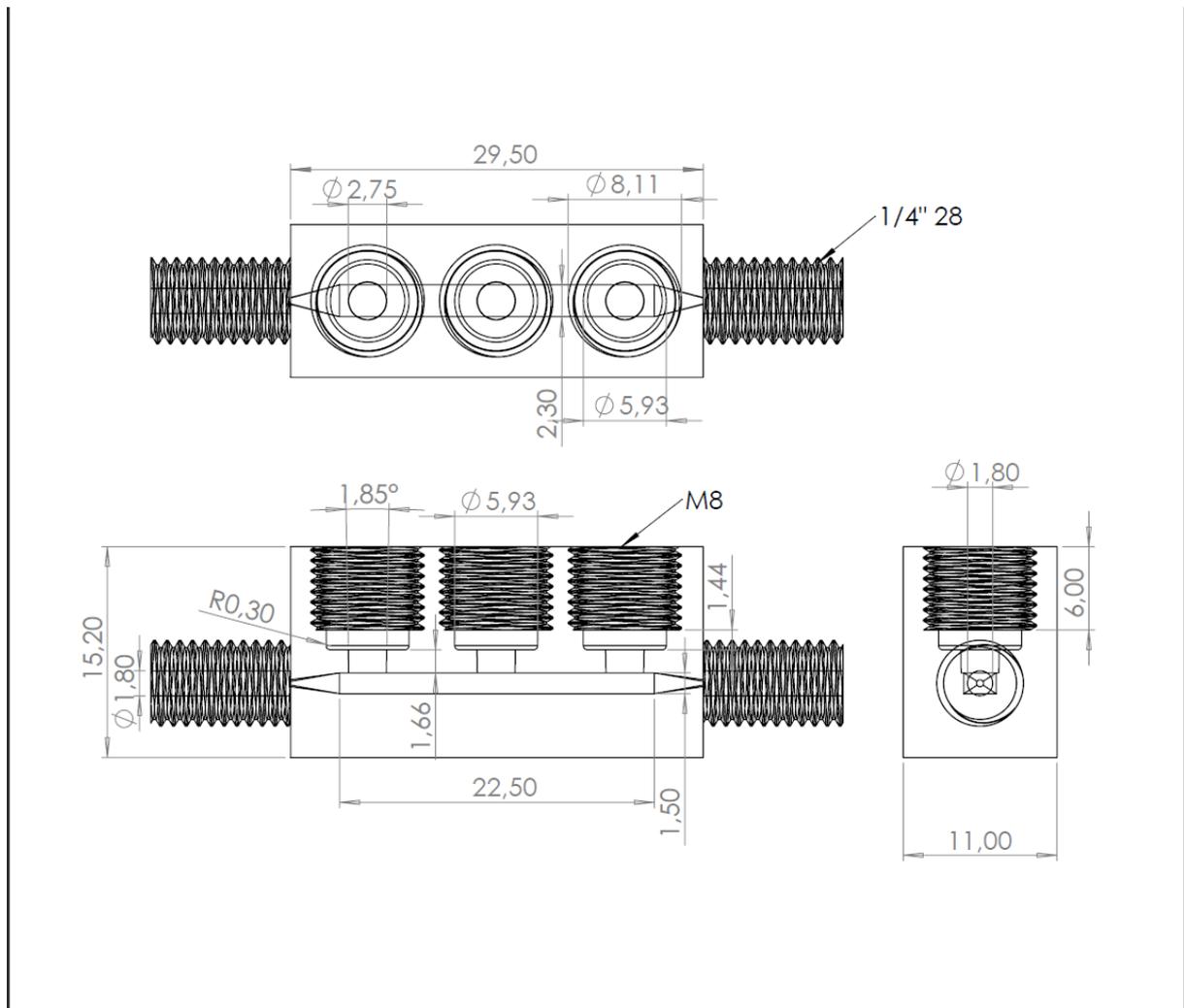


Abbildung 52 – Technische Zeichnung miniCOM für den Schüttelkolben

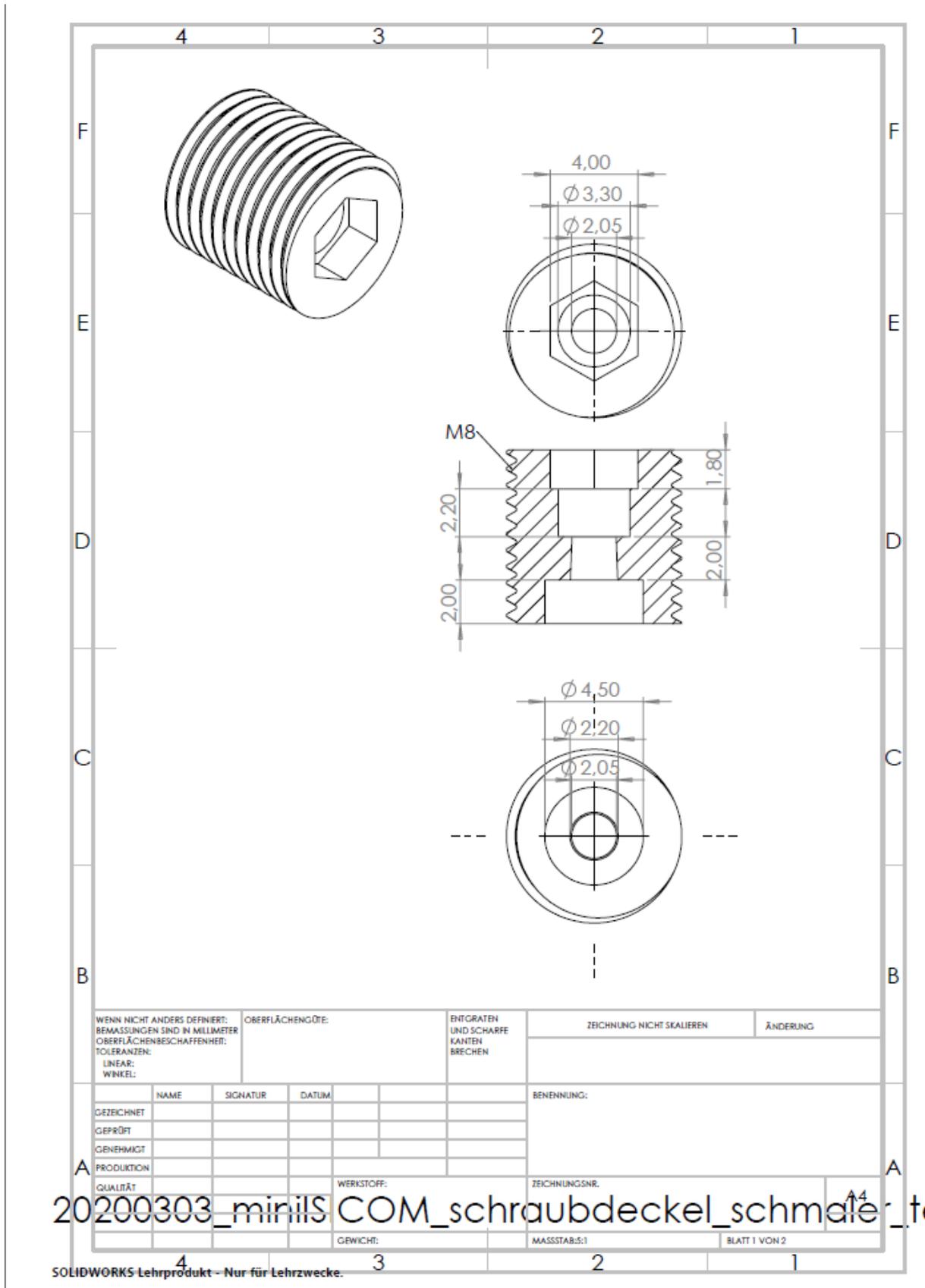


Abbildung 53 – Schraubgewinde für miniCOM Reaktor unabhängig

8.9 Elektrotechnische Schaltpläne

Siehe (Busse 2017)

8.10 Unterstützende Arbeiten

miniCOM	Steffen Winkler, M.Sc.
CHO Kultivierung	Jana Schellenberg, M.Sc. Marek Biermann, M.Sc. Tamanna Nagraik, M.Sc. Ole Böhl, M.Sc.
Hefe Kultivierungen	Dr. Karsten Helmuth Dr. Philipp Grünert Andreas Zimmermann
Weitere Installationen im Labor	Martina Weiß
Elektronische Installation	Thorleif Hentrop, Dip.-Ing. (FH) Kai Patzer
Mechanischer Aufbau	Friedbert Gellermann Torsten Stempel
Software	Jonas Haubold, M.Sc. Thorleif Hentrop, Dip.-Ing. (FH)
Untersuchung des Sedimentationsverhaltens <i>Bachelor Arbeit</i>	Nico Ulber, B.Sc.

8.11 Veranstaltungsbeiträge

Veranstaltungsname	Titel des Beitrags	Art	Datum der Veranstaltung
Jahrestreffen der F.O.M. 2017	Entwicklung eines neuartigen, nicht-invasiven insitu-Kombi Sensors (ISICOM) zur Überwachung des metabolischen Zustands von Kultivierungsprozessen	Poster	November 2017
Processnet Aachen 2018	ISICOM- in situ Kombisensor zum online Monitoring der Sauerstoffaufnahme	Poster	September 2018
Smart Sensors	Online Monitoring of the cell specific oxygen uptake rate in CHO-cell cultivations	Vortrag	September 2018
Jahrestreffen der F.O.M. 2018	ISICOM - in situ Kombisensor zum online Monitoring der Sauerstoffaufnahme	Poster	November 2018

Herbstkolloquium der AK PAT 2019	ISICOM	Vortrag	März 2019
Innovationstag Mittelstand des Bundeswirtschaftsministeriums	ISICOM	Messtand	Mai 2019
Jahrestreffen der F.O.M. 2019	ISICOM- in situ Kombisensor zum online Monitoring der Sauerstoffaufnahme rate	Poster	November 2019
Jahrestreffen der F.O.M. 2020	ISICOM- in situ Kombisensor zum online Monitoring der Sauerstoffaufnahme rate	Poster	November 2020
Herbstkolloquium der AK PAT 2020	ISICOM – Online monitoring of the cell specific oxygen uptake rate (qOUR) with an in-situ combi-sensor	Poster	November 2020

8.12 Danksagung

Alleine kann man viel bewegen, aber man Ende führt man nur die losen Strippen zusammen. Der Umfang und die Komplexität dieser Arbeit wäre niemals denkbar gewesen, wenn ich an den unterschiedlichsten Stellen nicht diverse Unterstützung gehabt hätte. Und dafür möchte ich an diesem Punkt Raum schaffen und Danke zu sagen.

Durch Prof. Dr. Thomas Scheper habe ich die Chance bekommen meine Master Arbeit und auch meine Promotion am Institut für Technische Chemie durchführen zu dürfen. Danke lieber Thomas, dass ich die Ehre hatten in diesem Rahmen so eine wundervolle Erfahrung sammeln durfte. Du hast das TCI zu dem gemacht was es heute ist. Das Netzwerk an Doktoranden welches dahinter steckt ist riesig und wird gestützt durch eine unglaubliche Wissensvielfalt die mit viel Spaß und Freude weitererkundet wird.

Ein herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Sascha Beutel für die Übernahme des Koreferats. Ich bin sehr dankbar dafür zu jeder Zeit mit deiner Unterstützung rechnen zu können.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Krings, danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Eine Begleitung in der Zeit, die nicht wegzudenken ist, wurde durch Dr. Dörte Solle gestellt. Bei ihr möchte ich mich für die lehrreiche Zeit in ihrer Arbeitsgruppe bedanken. Die zahlreichen Stunden gemeinsamer Arbeit und Austausch werden mir noch lange in Erinnerung bleiben. Danke für die Vorfreude auf jedes Weihnachtsfest mit einem gemeinsamen Abenteuer und die immer offenere Bürotür.

Prof. Dr. Janina Bahnemann danke ich für die ermutigenden Worte und die Unterstützung über meine Promotionszeit. Durch sie hat meine Arbeit nochmal eine andere Richtung eingeschlagen und mir die Möglichkeit gegeben, sie in die Richtung zu leiten, wo ich meine Arbeit auch sehe.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Steffen Winkler, da er einen großen Teil zur Umsetzung der Ideen beigetragen hat. Danke für vielen Ideen und die anregenden Gespräche bei denen wir jede Idee vom Funken bis zum Luftschloss denken konnten und sogar in die Tat umsetzen konnten.

Unzählige Male stand ich in der Werkstatt bzw. Büro von Thorleif Hentrop, Kai Patzer, Martina Weiß, Friedbert Gellermann, Thorsten Stempel, Dr. Ivo Havlik, Michael Dors, Frau Alice, Frau Feldt, Christiane Hellwig oder Ulrike Dreschel mit Problemen die unlösbar schienen. Und alle haben mir geholfen eine Lösung zu finden. Danke, dass ihr mit den Rücken freigehalten habt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt. Ohne euch könnte so manch einer einpacken.

Lieber Jonas Haubold, was hätte ich nur ohne dich gemacht. Die Schnelligkeit mit denen du meinen Gedanken folgen konntest und sie sogar weiter gesponnen hast ist nicht messbar gewesen. Danke, dass ich dich egal zu welcher Stunde als Unterstützung an meiner Seite wusste. Es war mir eine unendliche Freude mit dir zusammen an diesem Projekt arbeiten zu dürfen!

Danke meine liebe TCI Familie! Was für eine großartige Zeit mit euch! Ich will keine Minute davon missen und bin dankbar für die vielen Menschen die mich nach wie vor in meinem Leben begleiten. Die tollen Zeiten im Büro mit Lena, Chantal, Alina, Daniel, Jan, Basti und Steffen – ihr habt mich so oft aufgefangen und habt euch meinen Frust angehört, um ihn in direkten Anschluss in Motivation umzuwandeln. Danke

für diese wunderbare Unterstützung, die auch hinter der Bürotür nicht gestoppt hat. Danke an Johanna, Lisa, Caro, Alina, Tammy, Jana, Pia, Ina und so viele mehr.

Danke an Lena, Caro und Keno die sich mit einer Engelsgeduld meiner Arbeit gewidmet haben und sie mit einer Prise Kommas und guter Rechtschreibung gewürzt haben.

Abschließen möchte ich diese Danksagung mit dem Dank an meine Familie und Freunde die immer an mich geglaubt habt auch in Zeiten wo ich kurz davor war die Hoffnung an mich selber zu verlieren. Ihr habt mir Rückhalt gegeben und mich immer unterstützt! Ohne euch würde ich heute nicht an diesem Punkt sein und ich bin so glücklich darüber wo ich gerade bin. Danke!



Abbildung 54 – *Wie diese Arbeit unter anderem entstanden ist. – Thanks for the memories*

9 Lebenslauf

Persönlich Daten

Name: Katharina Dahlmann

Geburtsdatum und – Ort: 02.12.1990 in Hamburg

Leibniz Universität Hannover – Institut für Technische Chemie

Oktober 2017 - **Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotionsstudentin**

heute Thema der Arbeit:

„Entwicklung eines neuartigen, nicht invasiven in-situ Kombi- Sensors (ISICOM) zur Überwachung des metabolischen Zustandes von Kultivierungsprozessen“

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

März 2016 – **Master of Science: Pharmaceutical Biotechnology**

August 2017 Thema der Abschlussarbeit:

„Online-Überwachung der Sauerstoffaufnahme (OUR) in CHO Kultivierungssystemen“

Bearbeitet an der Leibniz Universität Hannover

September 2010 - **Bachelor of Science: Biotechnologie**

Februar 2016 Thema der Abschlussarbeit:

„Entwicklung einer grafischen Oberfläche und Datenbank zur Nutzeranmeldung und Dokumentation von Equipment einer BioProcessDesigner Software“

Gymnasium Oldenfelde

Juni 2001 – Allgemeine Hochschulreife

Juni 2010

10 Publikationen

K. Dahlmann (75 %), C. Busse, F. Aupert, I. de Vries, D. Marquard, D. Solle, F. Lammers, T. Scheper, (2020). Online monitoring of the cell-specific oxygen uptake rate with an in situ combi-sensor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412, Springer Link, 2111-2121, <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02260-9>

Steinwedel, T., Dahlmann, K. (30 %), Solle, D., Scheper, T., Reardon, K.F. and Lammers, F. (2019). Sensors for Disposable Bioreactor Systems. In *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, JohnWiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA; pp. 69-82.

Ole Jacob Wohlenberg, Carlotta Kortmann, Katharina V. Meyer, Jana Schellenberg, Katharina Dahlmann (5 %), Janina Bahnemann, Thomas Scheper, Dörte Solle (2022). Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles, *Engineerin in Life Sciences*, Wiley-VCH GmbH, 484-494, <https://doi.org/10.1002/elsc.202100172>