

EINSATZ OPTISCHER  
SENSOREN AN  
BIOTECHNOLOGISCHEN  
PROZESSEN

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Anne Glindkamp

geboren am 29. April 1982 in Thuine

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 24.09.2009

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und die benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsleistung verwendet worden ist.

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Mai 2006 bis Juni 2009 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheper angefertigt. Ihm möchte ich herzlich für die stets freundliche Unterstützung bei einer interessanten Aufgabenstellung und für die gebotenen Möglichkeiten danken.

Professor Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats und für seine Ideen und Hilfe bei mathematischen Fragestellungen.

Bei der Firma PreSens möchte ich mich für eine produktive Zusammenarbeit und die Finanzierung eines Teils dieser Arbeit bedanken.

Dr. Sascha Beutel danke ich für sein offenes Ohr auch für wissenschaftliche Probleme, die nicht in seinem Spezialgebiet liegen, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Martina Weiss, die mir bei sämtlichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand, und Thorleif Hentrop, der mir beim Lösen von Problem half, die ich kaum in Worte fassen konnte. Der Feinmechanik-Werkstatt des Institutes unter der Leitung von Wilhelm Behnsen danke ich für die schnelle Anfertigung unzähliger kleiner oder auch größerer Teile sowie für diverse Hilfestellungen bei allen kleinen und großen Problemen. Bei Friedbert Gellermann möchte ich mich für das Anfertigen der technischen Zeichnungen bedanken.

Bei Kai Mutz und Ismet Bice bedanke ich mich für ihre wissenschaftliche Unterstützung im Rahmen ihrer Diplom- bzw. ihrer Schwerpunktarbeit. Bei Daniel Riechers, der mir auch nach seiner Zeit am TCI mit vielen Hinweisen weiterhalf, möchte ich mich hierfür bedanken. Vielen Dank an Michael Fritzsche für die Beantwortung unzähliger Fragen und das Korrekturlesen der Arbeit.

Allen Mitgliedern des TCI danke ich herzlich sowohl für die tolle Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft als auch für die ein oder andere Feierabendgestaltung. Danke für die vielen Freundschaften, die entstanden sind und über den Uni-Alltag hinausgingen.

Vielen Dank auch an Arne Bluma und Alain Graf, den beiden anderen As des „A-Teams“, die mich während meiner gesamten TCI-Zeit begleitet haben. Ohne euch wäre sie nicht dieselbe gewesen. Tim Höpfner danke ich für die Einführung in die Kunst des „Um-die-Ecke-Denkens.“

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für ihre Unterstützung und auch für die gelegentlich nötige Ablenkung danken. Besonders Sebastian Ruberg danke ich für seinen Rückhalt und das Ertragen diverser Gefühlsschwankungen während des Schreibens dieser Arbeit.

## Zusammenfassung

Optische Sensoren stellen eine einfach anzuwendende, nicht invasive Möglichkeit zur online-Überwachung verschiedener Prozesse dar. Sie ermöglichen die Detektion einer Vielzahl von Analyten. Messungen können durch transparente Wände und damit berührungsfrei durchgeführt werden, daher sind optische Sensoren besonders für biotechnologische Anwendungen geeignet. Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei Arten von Sensoren: Optische Chemosensoren und photometrische Sensoren.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Optimierung eines fluoreszenzbasierten faser-optischen Chemosensors beschrieben. Es handelt sich dabei um ein ratiometrisches Sensorsystem zur Bestimmung von Sauerstoffgehalt und Temperatur. Die Messung eines internen Referenzsignals soll zur Stabilisierung des Messsignals dienen und eine Signaldrift durch Ausbleichen des Sensors verhindern. Als Indikator wird eine Farbstoffmischung aus zwei Octaethylporphyrinen verwendet.

Zunächst wird nach der optimalen Farbstoffzusammensetzung für die beiden Optoden gesucht. Basierend auf der Abhängigkeit der Lumineszenzsignale der Farbstoffmischungen wird eine Kalibrationsmethode erstellt. Im Weiteren werden wichtige Qualitätsmerkmale des Sensorsystems, wie die Reproduzierbarkeit, die Langzeitstabilität des Signals, die Stabilität der Farbstoffe gegenüber Heißdampfsterilisation und die Ansprechzeit untersucht. Es folgt der Einsatz des Systems in verschiedenen Modell-Kultivierungen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines Systems zur online-Messung der optischen Dichte in Schüttelkolben. Das System ermöglicht sowohl die Anwendung von Reflexionsmessungen als auch von Streulichtmessungen. Der Zusammenhang zwischen der mit diesen beiden Methoden gemessenen Lichtintensität und der optischen Dichte wird untersucht. Dies geschieht zunächst an Modellsystemen, an denen außerdem der Einfluss des Schüttlerbetriebes auf das Messsignal untersucht wird. Die Intensität des eingestrahlt Lichts wird variiert, um so den Messbereich zu vergrößern. Schließlich wird das Messsystem zur Aufnahme von Wachstumskurven von Kultivierungen genutzt.

Schlagworte: Chemosensoren, Lumineszenz, interne Referenz, photometrische Sensoren, Turbidimetrie

## Abstract

Optical sensors provide a simple applicable, non invasive possibility for online monitoring of different processes. They enable to measure a multitude of analytes. Since measurements can take place through transparent walls and thus contact-free, optical sensors are especially suited for biotechnological applications. Within this PhD-thesis, two types of sensors are described: optical chemosensors and photometric sensors.

The first part of this thesis deals with the optimization of a fluorescence-based fiber-optic chemosensor. It is a ratiometric sensor system to determine oxygen content and temperature. The detection of an internal reference signal should stabilize the measuring signal and thereby inhibit a signal drift. A mixture of two octaethylporphyrines is used as indicator.

First, it is searched for the most suitable dye composition for the two optodes. Based on the dependency of the luminescence signals of the dye mixtures, a calibration method is developed. Further, important characteristics of the sensor system, like reproducibility, long-term stability, stability against sterilization by superheated steam and response time, are examined. Following, the sensor system is tested during cultivations.

The second part of the thesis is about the development of a system for online-measurements of optical density in shaking flasks. The system enables the possibility to measure scattered as well as reflected light. The correlation between the light intensity measured with the two methods and the optical density is examined. First, model systems are used, at which also the influence of shaking on the measuring signal is tested. The intensity of the irradiated light is varied to enlarge the measurement range. Finally the measuring system is used to detect growth curves during model cultivations.

keywords: chemosensors, luminescence, internal reference, photometric sensors, turbidimetry

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Optische Chemosensoren</b>	<b>3</b>
2.1	Optische Sauerstoffsensoren . . . . .	4
2.2	Optische pH-Sensoren . . . . .	6
2.3	Optische pCO <sub>2</sub> - und pNH <sub>3</sub> -Sensoren . . . . .	6
2.4	Sensoren für Kationen und Anionen . . . . .	7
2.5	Vor- und Nachteile optischer Sensoren . . . . .	8
2.5.1	Vorteile gegenüber etablierten Methoden . . . . .	8
2.5.2	Schwächen optischer Sensoren . . . . .	9
2.5.2.1	Methoden zur Signalstabilisierung . . . . .	9
<b>3</b>	<b>Beurteilung eines neuen optischen Sauerstoffsensors</b>	<b>13</b>
3.1	Sensoren und Messaufbau . . . . .	13
3.2	Ansprechzeit . . . . .	15
3.3	Reproduzierbarkeit . . . . .	19
3.4	Driftverhalten . . . . .	20
3.5	Zusammenfassung . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Ratiometrischen Messung von Sauerstoffgehalt und Temperatur</b>	<b>23</b>
4.1	Lumineszenz des Porphyrin-Indikators . . . . .	23
4.2	Die Sauerstoff- und Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz . . . . .	24
4.2.1	Temperatursensor . . . . .	25
4.2.2	Sauerstoffsensor . . . . .	26

---

4.3	Das optische System . . . . .	26
4.4	Untersuchung verschiedener Farbstoffmischungen . . . . .	29
4.4.1	Sauerstoffmessungen . . . . .	29
4.4.2	Temperaturmessung . . . . .	33
4.4.3	Zusammenfassung . . . . .	35
4.5	Sauerstoffmessung bei unterschiedlichen Temperaturen . . . . .	36
4.5.1	Einfluss der Temperatur auf die Messung des Sauerstoffgehaltes	36
4.5.2	Kalibration der Sensorpatches . . . . .	38
4.5.3	Zusammenfassung . . . . .	40
4.6	Beurteilung des Sensors . . . . .	41
4.6.1	Langzeitstabilität . . . . .	41
4.6.2	Reproduzierbarkeit . . . . .	42
4.6.3	Stabilität gegenüber Heißdampfsterilisation . . . . .	43
4.6.4	Adaption an die flüssige Phase . . . . .	44
4.6.5	Ansprechzeit . . . . .	45
4.6.6	Zusammenfassung . . . . .	47
4.7	Einsatz des Sensorsystems . . . . .	48
4.7.1	Kultivierung von MG-63 . . . . .	48
4.7.2	Kultivierung von <i>Kluyveromyces marxianus</i> . . . . .	50
4.7.3	Zusammenfassung . . . . .	52
4.8	Diskussion und Ausblick . . . . .	52
<b>5</b>	<b>Die Messung der optischen Dichte</b>	<b>54</b>
5.1	Turbidimetrie . . . . .	54
5.2	Trübungsmessung zur Bestimmung der Biomasse . . . . .	56
<b>6</b>	<b>Online-Messung der optischen Dichte in Schüttelkolben</b>	<b>58</b>
6.1	Aufbau des Messsystems . . . . .	58
6.2	Konstruktion einer LED-Halterung . . . . .	59
6.3	Anorganische Partikel als Modellsystem . . . . .	60
6.3.1	Diskontinuierliche Messungen . . . . .	60

---

6.3.2	Zusammenfassung . . . . .	61
6.4	Messungen mit Backhefe als Modellsystem . . . . .	62
6.4.1	Diskontinuierliche Messungen . . . . .	62
6.4.2	Kontinuierliche Messungen . . . . .	63
6.4.3	Messungen auf dem Tischschüttler . . . . .	65
6.4.3.1	Messungen mit Set-up A . . . . .	65
6.4.3.2	Messungen mit Set-up C . . . . .	67
6.4.3.3	Variation der LED-Intensität . . . . .	69
6.4.3.4	Digitale Filter . . . . .	70
6.4.4	Zusammenfassung . . . . .	74
6.5	Messungen während der Kultivierung von <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	76
6.5.1	Messungen mit Set-up A . . . . .	77
6.5.2	Messungen mit Set-up C . . . . .	78
6.5.3	Zusammenfassung . . . . .	80
6.6	Diskussion und Ausblick . . . . .	81
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>93</b>
<b>A</b>	<b>Sensorsystem zur Sauerstoff- und Temperaturmessung</b>	<b>95</b>
A.1	Immobilisierung des Porphyrin-Indikators in Epoxidharz . . . . .	95
A.2	Herstellung der sauerstoffsensitiven Membran . . . . .	95
A.3	Durchführung der Sauerstoffmessungen . . . . .	96
A.4	Abbildungen zur Entwicklung des Sensorsystems . . . . .	96
A.4.1	Foto des Sensorsystems . . . . .	96
A.4.2	Foto der optischen Komponenten . . . . .	97
A.4.3	Schematische Darstellung der elektronischen Schaltung . . . . .	97

<b>B Online-Messung der optischen Dichte</b>	<b>94</b>
B.1 Konstruktionsskizzen und Fotos der LED-Halterung . . . . .	94
B.2 Optische Dichte in den Schüttelkolben . . . . .	95
B.3 Kalibration des SFR . . . . .	96
B.4 Kalibrationsgeraden . . . . .	96
<b>C Materialien</b>	<b>99</b>
C.1 Verwendete Geräte . . . . .	99
C.2 Verwendete Materialien . . . . .	100
C.3 Verwendete Chemikalien . . . . .	100
C.4 Verwendete Medien . . . . .	101
C.4.1 Wickerham-Medium . . . . .	101
C.4.2 Kulturmedium . . . . .	101
<b>Lebenslauf</b>	<b>102</b>

# Kapitel 1

## Einleitung und Zielsetzung

Zur Analyse und Regelung von Fermentationsprozessen ist die Kontrolle von verschiedenen Variablen unerlässlich. Um schnell auf sich ändernde Bedingungen reagieren zu können, sind online-Analysesysteme wünschenswert. Eine einfach anzuwendende, nicht-invasive Methode zur online-Überwachung stellen optische Sensoren dar. Diese Arbeit beschäftigt sich mit zwei unterschiedlichen Typen von optischen Sensoren: optischen Chemosensoren und photometrischen Sensoren.

Optische Chemosensoren messen nicht die spektroskopischen Eigenschaften des Analyten selbst, bei ihnen wird ein Indikator verwendet, dessen spektroskopische Eigenschaften sich in Abhängigkeit vom Analyten ändern. Photometrische Sensoren dienen zur Messung der Veränderung eines Lichtstrahls (Intensität, spektrale Zusammensetzung, etc.) durch Interaktion mit einer Probe.

Beiden Typen ist gemein, dass sie keinen direkten Kontakt zum Medium benötigen, die Messungen können berührungslos durch eine transparente Wand erfolgen. Dies ist insbesondere für biotechnologische Anwendungen von Vorteil, da so das Infektionsrisiko minimiert wird.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, einen optischen Chemosensor zur Messung von Sauerstoffpartialdruck und Temperatur zu optimieren. Das Messprinzip des Sensors basiert auf dynamischer Lumineszenzlöschung. Die Nachteile lumineszenzbasierter Sensoren sollen durch die Messung eines internen Referenzsignals umgangen werden. Sauerstoff ist bei vielen Kultivierungen der limitierende Faktor des Zellwachstums oder auch der Produktbildung, daher stellt der Sauerstoffgehalt eine wichtige Messgröße dar. Lumineszenzbasierte Messungen sind generell temperaturabhängig. Die Möglichkeit, neben dem Sauerstoffgehalt die Temperatur optisch messen zu können, erlaubt die Sauerstoffmessung bei variierender Temperatur, ohne dass die Vorteile der nicht-invasiven, berührungslosen Messung verloren gehen.

Die Optimierung des Sensorsystems erfordert zunächst die Auswahl einer geeigneten Farbstoffmischung sowohl für die Sauerstoff- als auch für die Temperaturoptoden. Um die Messung von Sauerstoff bei variierender Temperatur zu ermöglichen, wird der Temperatureinfluss auf die Signale des Sauerstoffsensors untersucht und mathematisch beschrieben. Außerdem erfolgt die Charakterisierung des Sensors bezüglich Ansprechzeit, Reproduzierbarkeit, Langzeitstabilität und Stabilität gegenüber Heißdampfsterilisation. Abschließend erfolgt die Applikation an die flüssige Phase und die Anwendung des Sensors bei Modell-Kultivierungen.

Eine weitere wichtige Messgröße zur Analyse von Fermentationsprozessen ist die optische Dichte. Da diese mit der Biomasse korreliert, aber mit weniger aufwändigen Methoden gemessen werden kann, ist sie eine beliebte Messgröße zur Beobachtung des Zellwachstums. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgt in den meisten Fällen offline, da kein allgemein anwendbares System zur online-Messung existiert. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein photometrisches Messsystem zur online-Bestimmung der optischen Dichte von Schüttelkolbenkulturen etabliert werden.

Die Detektion der optischen Dichte erfolgt hierbei direkt auf dem Tischschüttler durch Streulicht- bzw. Reflexionsmessungen. Zunächst wird mit verschiedenen Modellsystemen die generelle Eignung des Messsystems überprüft und die Abhängigkeit der gemessenen Lichtintensität von der optischen Dichte untersucht. Dies geschieht anfangs durch Vermessen einzelner Proben, später durch online-Messung bei kontinuierlicher Erhöhung der optischen Dichte. Im Weiteren wird ermittelt, ob Messungen auch während des Schüttlerbetriebes möglich sind. Abschließend soll der Verlauf der optischen Dichte bei realen Kultivierungen mit Hilfe des Messsystems verfolgt werden.

# Kapitel 2

## Optische Chemosensoren

Als optische Chemosensoren werden optische Sensoren bezeichnet, die nicht die spektroskopischen Eigenschaften des Analyten selbst messen, sondern mit Hilfe eines Indikators arbeiten. Gemessen werden optische Eigenschaften des Indikators (z.B. Photolumineszenz, Absorption, Reflexion...) die von dem Analyten beeinflusst werden. Eine Vielzahl von Analyten kann auf diese Weise bestimmt werden, eine Auswahl mit Angabe des Indikators und der Immobilisierungsmatrix ist in Tabelle 2.1 gegeben, detailliertere Beschreibungen folgen in den Abschnitten 2.1-2.4.

Tabelle 2.1: Eine Auswahl von Analyten, die mit Hilfe von optischen Chemosensoren bestimmt werden können [1]

Analyt	Indikator/Matrix	Messgröße
pH (stark sauer)	Kongorot	Absorption
pH (schwach sauer - neutral)	Fluoresceinamin/Glas	Fluoreszenz
Al <sup>3+</sup>	Morin/Zellulose	Absorption
K <sup>+</sup>	Valinomycin + MEDPIN/PVC	Absorption
Cl <sup>-</sup>	Fluorescein/ kolloidales Silber	Fluoreszenz
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Ba-chloranilat/ Glas	Fluoreszenz
O <sub>2</sub>	Ru-trisbipyridin/Silikon	Phosphoreszenz

## 2.1 Optische Sauerstoffsensoren

Das Messprinzip von optischen Sauerstoffsensoren basiert auf Phosphoreszenz- oder Fluoreszenzlöschung durch molekularen Sauerstoff. Da die Funktionsweise optischer Sauerstoffsensoren prinzipiell unabhängig davon ist, ob es sich bei der Messgröße um Fluoreszenz oder Phosphoreszenz handelt, werden beide Phänomene im Folgenden als Lumineszenz zusammengefasst.

Bei der Lumineszenzlöschung durch Sauerstoff handelt es sich um eine dynamische Lumineszenzlöschung. Die Sauerstoffmoleküle wechselwirken mit dem angeregten Farbstoffmolekül und bewirken dessen strahlungslose Desaktivierung. Die Anregungsenergie geht dabei auf den Sauerstoff über, der dabei aus dem Grundzustand (Singulett-Zustand) in den energiereicheren Triplett-Zustand übergeht. Dadurch werden sowohl die Lebensdauer  $\tau$  als auch die Intensität  $I$  der Lumineszenz verringert. Mathematisch lässt sich dies durch die Stern-Vollmer-Gleichung beschreiben:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} \cdot [O_2] \quad (2.1)$$

$I_0$  und  $\tau_0$  bezeichnen die Lumineszenzintensität bzw. -lebensdauer in Abwesenheit von Sauerstoff,  $[O_2]$  die Sauerstoffkonzentration.  $K_{SV}$  steht für die Stern-Vollmer-Konstante, sie gibt Auskunft über die Effizienz des Löschungsvorgangs.

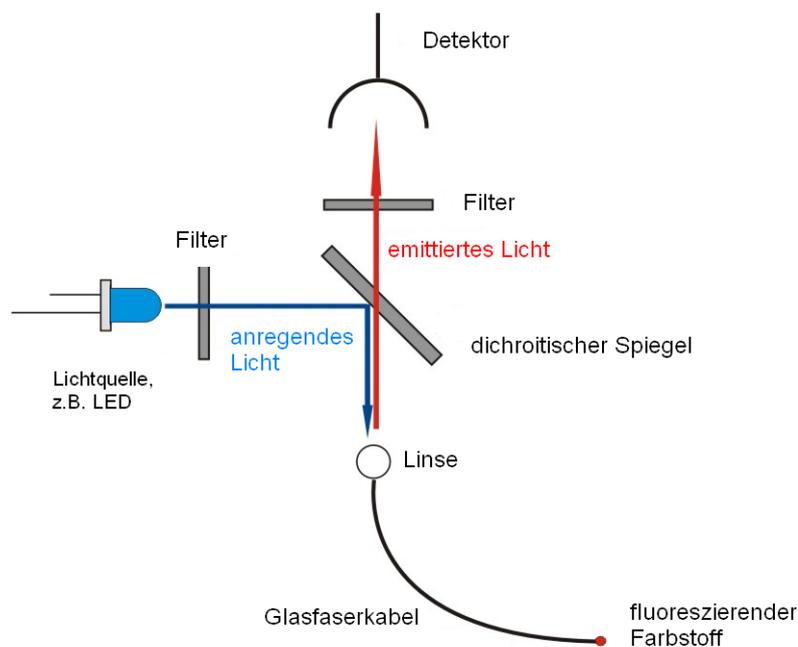


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzsensors

Abbildung 2.1 zeigt schematisch einen möglichen Aufbau eines faseroptischen Fluoreszenzensors, wie er auch für Sauerstoffmessungen eingesetzt werden kann. Eine Lichtquelle (z.B. eine LED) sendet Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches, welches über ein Glasfaserkabel zu dem Fluoreszenzfarbstoff gelangt, der in einer Polymermatrix immobilisiert wurde. Das vom Farbstoff emittierte Licht gelangt durch die optische Faser zurück, wird durch einen dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht getrennt und von einem Photomultiplier oder einer Photodiode detektiert.

1968 stellte Bergmann einen der ersten lumineszenzbasierten Sauerstoffsensoren vor, bei dem Fluoranthren als Indikator und Glas und Polyethylen als Immobilisierungsmatrix verwendet wurden [2]. Seitdem wurden eine Vielzahl von möglichen Indikatoren und Immobilisierungsmethoden gefunden [3]. Hauptsächlich werden in Polymeren immobilisierte Metallkomplexe verwendet, wie z.B. Tris-4,7-diphenyl-1,10-phenantrolin-Ruthenium(II) ( $\text{Ru(dpp)}_3$ ) in Silikon [4, 5, 6].

Neben der Wahl des Lumineszenzfarbstoffes hat die Immobilisierungsmatrix einen großen Einfluss auf die Eigenschaften des Sensors. Beispielsweise lässt sich die Empfindlichkeit durch gezielte chemische Veränderung der Matrix vergrößern. So wird die Sauerstoffempfindlichkeit von Platin-Octaethylporphyrin in einer Polystyrol-Matrix vervierfacht, wenn diese Matrix fluoriert wird [7]. Immobilisiert man Platin-Octaethylporphyrin in dem extrem sauerstoffdurchlässigen Poly(1-trimethylsilyl-1-Propin), wird dessen Fluoreszenz etwa 50-mal effektiver gelöscht als in Polystyrol, wodurch der Einsatz des Sensors in der Sauerstoffspurenanalytik ermöglicht wird [8]. Auch die Ansprechzeiten der Sensoren lassen sich durch geeignete Immobilisierungsmethoden verkürzen. Chu et al. erreichten Ansprechzeiten von 4-7 s, indem sie Platin-Octaethylporphyrin bzw. Platin-5,10,15,20-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorphenyl)-porphyrin in einem Xerogel aus n-Propyltrimethoxysilan und 3,3,3-trifluorpropyltrimethoxysilan immobilisierten [9].

Neue Anwendungsmöglichkeiten erschließen sich durch geeignete Modulation des Anregungslichtes. Vinogradov et al. entwickelten ein Messsystem, bei dem die Lichtquelle mit mehreren Frequenzen moduliert wird [10]. So lässt sich in heterogenen Systemen die Verteilung der Lumineszenzlebensdauer und damit auch der Quencherkonzentration bestimmen. Auf diese Weise wurde die Verteilung der Sauerstoffkonzentration z.B. in Tumoren von Mäusen [11] oder in der Hirnrinde von Ferkeln während einer Bypass-Operation gemessen [12].

## 2.2 Optische pH-Sensoren

Generell lassen sich zwei Arten von faseroptischen pH-Sensoren unterscheiden, fluoreszenz- und absorptionsbasierte Sensoren. Typische Indikatoren für fluoreszenzbasierte Sensoren sind z.B. Fluoresceinderivate und 8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure (HPTS) [13, 14], für absorptionsbasierte Sensoren werden z.B. Phenol- und Cresolrot verwendet [15]. Beiden Varianten ist gemein, dass sich die optischen Eigenschaften der Indikatoren in Abhängigkeit vom Protonierungsgrad - und damit vom pH-Wert - ändern.

Der Nachteil der auf Absorption basierten Methode ist, dass sie nicht sehr empfindlich ist, so dass eine hohe Indikatorkonzentration oder eine dicke Sensorschicht benötigt werden [16]. Wird die Absorption durch Transmissionsmessungen bestimmt, muss die sensitive Schicht zwischen zwei gegenüberliegenden Glasfaserkabeln platziert werden, wodurch die Möglichkeit der Miniaturisierung limitiert wird [17]. Um dieses Problem zu lösen, wird die Absorption oft durch Reflexionsmessungen bestimmt [18] oder ATR-(*attenuated total reflectance*)-Messungen angewandt [19, 20]. Fluoreszenzbasierte pH-Sensoren sind dagegen empfindlicher, lassen sich leichter miniaturisieren und benötigen nur geringe Mengen Indikator [21, 22, 23].

Der analytische Messbereich optischer pH-Sensoren ist sehr eingeschränkt und erstreckt sich typischerweise über zwei bis drei pH-Einheiten. Li et al. berichteten 2006 von einem neuartigen Sensorsystem, das einen breiten pH-Bereich (1-11) abdeckt. Als Indikator werden modifizierte fluoreszierende Aminophenylcorrole eingesetzt, die in einer Sol-Gel  $\text{SiO}_2$ -Matrix immobilisiert werden [24]. Der erweiterte pH-Bereich resultiert daraus, dass diese Corrole mehrere Protonierungsstufen eingehen können. Dong et al. erreichten einen ähnlich breiten pH-Bereich (4,5-13), indem sie eine Mischung aus drei Indikatoren benutzen [25].

Ein weiteres Problem optischer pH-Sensoren ist die Ionenstärke-Abhängigkeit der pH-Indikatoren [26]. Ein Ansatz, diese Abhängigkeit zu verringern, ist die Verwendung von veresterten Fluorescein-Derivaten. Durch die Veresterung der Carboxyl-Gruppe verbleibt nur noch eine Möglichkeit der Deprotonierung, was zu einer erheblichen Verminderung der Kreuz-Selektivität gegenüber der Ionenstärke führt [27].

## 2.3 Optische $\text{pCO}_2$ - und $\text{pNH}_3$ -Sensoren

Die meisten faseroptischen  $\text{pCO}_2$ -Sensoren basieren auf Prinzip der Severinghaus-Elektrode [28]. Diese Elektrode besteht aus einer pH-Elektrode, die in Kontakt mit einer Carbonatpufferlösung steht, und einer Referenzelektrode. Die Pufferlösung ist

in einer  $\text{CO}_2$ -permeablen Membran eingeschlossen. Der Sensor misst den pH-Wert des Carbonatpuffers, der mit dem  $\text{CO}_2$  außerhalb der Membran im Gleichgewicht steht. Erhöht sich die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Medium, so diffundiert Kohlendioxid durch die Membran und verändert über das Hydrogencarbonatgleichgewicht entsprechend der Henderson-Hasselbach-Gleichung den pH-Wert der Pufferlösung. Bei der Severinghaus-Elektrode wird diese pH-Wert-Änderung elektrochemisch über die Einstabmesskette erfasst, bei optischen  $\text{pCO}_2$ -Sensoren mit optischen pH-Sensoren. Da die Gleichgewichtseinstellung zwischen Carbonatpuffer und Medium durch die Membran nur langsam abläuft, liegen die Ansprechzeiten dieser Sensoren im Bereich von Minuten. Auch muss aufgrund der Ionenstärkeabhängigkeit der optischen pH-Messung der Carbonatpuffer häufig ausgetauscht und der Sensor oft recalibriert werden [29]. Eine Alternative bilden die so genannten "trockenen Sensoren", bei denen die Carbonatpufferlösung durch quartäre Ammoniumhydroxide ersetzt wird. Die Sensormembran enthält Ionenpaare aus anionischem pH-Indikator und dem quartären Ammoniumkation plus zusätzlichem quartärem Ammoniumhydroxid. Dadurch werden kürzere Ansprechzeiten erreicht und die Empfindlichkeit gegenüber der Ionenstärke vermindert [30, 31, 32, 33].

Optische Sensoren zur Bestimmung des Ammoniak-Partialdruckes basieren auf dem selben Prinzip wie die  $\text{pCO}_2$ -Sensoren. Wolfbeis und Posch beschreiben ein System, in dem eine gepufferte Indikatorlösung in einem  $\text{NH}_3$ -permeablem Polymer emulgiert ist. Als Puffer kann auch der Indikator selbst dienen, wenn er in hohen Konzentrationen vorliegt [34].

## 2.4 Sensoren für Kationen und Anionen

Die ersten reversiblen Methoden zur Bestimmung von Kalium-Ionen wurden von Charlton et al. entdeckt. Bei der so genannten Co-Extraktion werden Kalium-Ionen in weiches Polyvinylchlorid extrahiert, als Ionen-Carrier dient dabei Valinomycin. Neben den Kalium-Ionen wird die gleiche Menge des anionischen roten Farbstoffs Erythrosin co-extrahiert, welches durch Absorption detektiert werden kann [35]. Auch das Ionen-Austausch-Prinzip zur Detektion von Kalium-Ionen wurde von Charlton entdeckt [36]. Wieder wird weiches Polyvinylchlorid mit Valinomycin verwendet, außerdem ein deprotonierbarer Farbstoff (MEDPIN; ein lipophiles 2,6-Dichlorphenol-Indophenol). Werden Kalium-Ionen aus der Probe in die Sensormatrix extrahiert, wird ein Proton des MEDPINs aus der Sensormatrix gelöst. Dadurch ändert sich dessen Farbe von rot nach blau. Dieses Prinzip wird bis heute bei den kommerziell erhältlichen  $\text{K}^+$ -Sensoren [37, 38] und auch bei  $\text{Na}^+$ -Sensoren eingesetzt [39].

Zur Detektion von schwereren Kationen kann deren Neigung zur Bildung von Komplexen ausgenutzt werden. So lässt sich Al(III) über den fluoreszierenden Aluminium-Morin-Komplex nachweisen. Morin wird hierbei in einer Zellulose-Matrix immobilisiert [40].

Weniger verbreitet als Optoden für die Bestimmung von Kationen sind solche für Anionen. Bei Chlorid-Optoden dient das nicht fluoreszierende Silber-Fluoreszeinat als Agens. In Anwesenheit von Chlorid-Ionen bildet sich Silberchlorid und Fluoreszein, über dessen Fluoreszenz der Nachweis erfolgt. Das zugrunde liegende Fällungsgleichgewicht ist sehr langsam, so dass die Optode nicht reversibel ist [41]. Ein ähnliches Prinzip kommt bei der Detektion von Sulfat zum Einsatz. Als nicht fluoreszierendes Agens wird Bariumchloranilat verwendet, in Anwesenheit von Sulfat-Ionen entsteht Bariumsulfat und Chloranilsäure [42].

## 2.5 Vor- und Nachteile optischer Sensoren

Optische Sensoren weisen eine Reihe von Vorteilen gegenüber den etablierten elektrochemischen Messmethoden auf, andererseits können die optischen Signale auch einigen störenden Einflüssen unterliegen. Im Folgenden werden die Stärken und Schwächen von optischen Chemosensoren erläutert.

### 2.5.1 Vorteile gegenüber etablierten Methoden

Ein wichtiger Vorteil optischer Chemosensoren ist die Möglichkeit der Miniaturisierung. Das sensitive Element eines optischen Sensors ist die Matrix aus Polymer und Indikatorfarbstoff, die in den meistens Fällen nur wenige Mikrometer bis einen Millimeter stark ist. Die benötigte Fläche hängt von der Intensität der Lumineszenz bzw. der Stärke der Absorption, der Detektorempfindlichkeit und von eventuell vorhandenem Fremdlicht ab. Sie ist aber in der Regel klein im Vergleich zu dem Ausmaß elektrochemischer Messsonden. Dadurch lassen sich Messungen mit hoher Ortsauflösung und kleinen Probenvolumina durchführen [43]. Es wurden pH-Sensoren mit einem Durchmesser von weniger als einem Mikrometer entwickelt [22]. Optoden dieser Größe zeigen Ansprechzeiten im Millisekunden-Bereich und ermöglichen sogar intrazelluläre Messungen [44].

Der Einsatz von elektrochemischen Sonden ist in kleinen Volumina nicht nur auf Grund deren Größe schwierig, sondern auch weil der Analyt bei der Messung verbraucht wird. Während dies bei Messungen in großen Volumina oft irrelevant ist, wird in kleinen Volumina die Konzentration des Analyten durch den Verbrauch oft

signifikant reduziert. Die meisten optischen Sensoren arbeiten dagegen nicht-invasiv, haben also keinen Einfluss auf die Konzentration der Analyten. Auch für Messungen in nicht gerührten Systemen ist dies von Vorteil, da der Verbrauch des Analyten dort zu lokalen Konzentrationsänderungen führen kann.

Des Weiteren wird für Messungen mit optischen Sensoren kein elektrischer Kontakt zu der sensitiven Schicht benötigt, die Messung kann durch eine transparente Wand erfolgen. Dies ist insbesondere für biotechnologische Anwendungen von Vorteil, da das Kontaminationsrisiko minimiert wird. Auch für Messungen in explosionsgefährdeten Bereichen stellt das Fehlen von elektrischen Kontakten einen entscheidenden Vorteil dar. Da optische Signale unempfindlich gegenüber elektromagnetischen Feldern sind, können sie auch bei hohen Feldstärken, z.B. in NMR-Bioreaktoren eingesetzt werden [45]. Weitere Vorteile sind, dass kein Bezugselement benötigt wird [3] und dass alte oder defekte Optoden verhältnismäßig preiswert ersetzt werden können.

## 2.5.2 Schwächen optischer Sensoren

Das optische Signal hängt nicht allein von der Konzentration des Analyten ab. Mechanische Einwirkungen, wie z.B. das Biegen oder Bewegen des Lichtwellenleiters von faseroptischen Sensoren, verändern das Signal. Auch Ausbleichen oder Auswaschen des Indikators wirkt sich auf das Signal aus. Das Auswaschen des Indikators lässt sich bei Sauerstoffoptoden durch die Verwendung hydrophober Immobilisierungsmatrizes verhindern, wodurch gleichzeitig vermieden wird, dass das Lumineszenzsignal durch Wechselwirkungen des Indikators mit Ionen gequench wird [3]. Bei pH-Optoden ist es nicht möglich, hydrophobe Immobilisierungsmatrizes zu verwenden, da sie durchlässig für Protonen sein müssen. Um dennoch eine hohe Stabilität gegenüber Auswaschen zu erreichen, werden die Indikatorfarbstoffe kovalent an die polymeren Matrizes gebunden [46].

Die durch Ausbleichen des Farbstoffes verursachte Sensordrift ist ein generelles Problem von optischen Sensoren, so dass einige Strategien zur Minimierung dieser Drift entwickelt wurden, die im folgendem Abschnitt erläutert werden.

### 2.5.2.1 Methoden zur Signalstabilisierung

Das Ausbleichen des Farbstoffes lässt sich dadurch verlangsamen, dass die Beleuchtung nicht dauerhaft, sondern nur während der Aufnahme von Messwerten erfolgt. Auch die Verwendung eines möglichst photostabilen Indikators verringert die durch

Ausbleichen verursachte Drift des Signals. Durch gezielte Derivatisierung der Indikatoren lässt sich die Photostabilität von Sensoren steigern. So wurde bei mehrfach fluorierten Platin-Porphyrinen ein 10 bis 20-mal langsames Ausbleichen als bei den nicht-fluorierten Porphyrinen beobachtet. Dieses Phänomen lässt sich darauf zurückführen, dass durch die elektronenziehenden Fluoridgruppen die Oxidationsempfindlichkeit gegenüber dem reaktiven Singulett-Sauerstoff verringert wird [47, 48].

Ein anderer Ansatz, um die Sensordrift weitgehend zu verhindern ist es, unabhängig von der Intensität der Lumineszenz zu messen. Dies lässt sich zum Einen durch die Messung der Lebensdauer der Lumineszenz und zum Anderen durch die Messung eines internen Referenzsignals erreichen.

#### **2.5.2.1.1 Messung der Lumineszenzlebensdauer**

Bei der dynamischen Lumineszenzlöschung wird neben der Intensität auch die Lebensdauer der Lumineszenz verringert, so dass auch diese als Messgröße verwendet werden kann. Sie wird entweder aus dem Abklingen der Lumineszenzintensität nach dem Ausschalten der Lichtquelle bestimmt oder bei Modulation des Anregungslichtes aus der Phasenverschiebung der Lumineszenz errechnet [49]. Der Vorteil bei dieser Methode ist, dass die Lebensdauer unabhängig von der Zahl der angeregten Moleküle und der detektierten Lichtintensität ist. Verglichen mit der einfachen Intensitätsmessung lässt sich die Sensordrift beim Ausbleichen des Farbstoffes durch die Messung der Lebenszeit deutlich reduzieren [50]. Die Lebensdauerermessung ist geeignet für Indikatoren mit relativ langen Abklingzeiten, wie viele Sauerstoffindikatoren sie aufweisen. So beträgt die Lebenszeit der Fluoreszenz von Ruthenium-Diaminkomplexen 1-5  $\mu\text{s}$ , im Gegensatz zu einer Fluoreszenzlebenszeit von 0,1-100 ns bei vielen anderen Fluorophoren [51].

Die Messung der Lumineszenzlebensdauer kann nur bei dynamischer Lumineszenzlöschung angewendet werden, da statisches Quenching die Lebensdauer der Lumineszenz nicht beeinflusst. Daher wird diese Methode vor allem bei optischen Sauerstoffsensoren genutzt.

#### **2.5.2.1.1 Verwendung interner Referenzsignale**

Eine andere Möglichkeit, optische Messungen unabhängig von der absoluten Intensität zu machen, ist die Aufnahme eines Referenzsignals, welches im einfachsten Fall unabhängig von der Konzentration des Analyten ist. Die Wellenlängen von Mess-

und Referenzsignal müssen sich ausreichend unterscheiden, so dass sie optisch voneinander getrennt und einzeln detektiert werden können. Der Quotient der beiden Signale ist unabhängig von der absoluten Intensität. Das Referenzsignal kann entweder vom Indikator selbst stammen oder von einem zweiten Farbstoff, der zugesetzt wird. Verwendet man zwei Farbstoffe, werden zwar z.B. Schwankungen der Intensität der Lichtquelle ausgeglichen, die Sensordrift durch Ausbleichen aber nur dann vermieden, wenn beide Farbstoffe dieselbe Photostabilität besitzen, also im gleichen Maße ausbleichen. Dieses Problem tritt nicht auf, wenn Mess- und Referenzsignal von demselben Indikator verursacht werden. Dazu muss das Lumineszenzspektrum des Indikators in verschiedenen Wellenlängenbereichen unterschiedliche Abhängigkeiten gegenüber der Analytkonzentration aufweisen. Die Spektren der meisten Lumineszenzfarbstoffe enthalten keine entsprechenden Referenzsignale, so dass die Identifikation bzw. die Synthese geeigneter Indikatoren eine große Herausforderung darstellt [52].

Ratiometrische Messungen werden oft bei optischen pH-Sensoren verwendet [3], da die Spektren von pH-Sensoren oft so genannte isosbestische Punkte enthalten. In diesen Punkten schneiden sich die bei verschiedenen pH-Werten aufgenommenen Kurven der Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektren. Das Auftreten solcher Punkte hängt damit zusammen, dass pH-Indikatoren aus zwei verschiedenen Spezies bestehen - dem protonierten und dem deprotonierten Indikator - zwischen deren Konzentrationsänderungen ein linearer Zusammenhang besteht [53]. Da die Absorption bzw. Fluoreszenz am isosbestischen Punkt nicht vom pH-Wert abhängt, kann das Signal bei dieser Wellenlänge als interne Referenz verwendet werden.

Für ratiometrische Temperaturmessungen lässt sich ein Lanthanoid-Fluorophor verwenden. Dabei werden die Emissionsbanden unterschiedlich angeregter Zustände detektiert, die sich in ihrer Temperaturabhängigkeit unterscheiden [49].

Da optische Sauerstoffsensoren auf dynamischer Lumineszenzlöschung basieren, treten in den Spektren keine isosbestischen Punkte auf. Interne Referenzmessungen waren daher lange Zeit nur mit einem zweiten Farbstoff möglich [3, 54]. Erste Indikatoren, die sich für ratiometrische Sauerstoffmessungen eignen, wurden 2000 von Kostov et al. gefunden [55]. Sie verwendeten ein Platin-1,2-Endithiolat, welches neben der sauerstoffabhängigen Phosphoreszenz ein Fluoreszenzsignal aufweist, das unabhängig von der Sauerstoffkonzentration ist. Beide Signale werden im gleichen Spektralbereich angeregt, die Emission erfolgt bei 570 nm bzw. 680 nm, so dass eine optische Trennung und damit eine separate Detektion der beiden Signale möglich ist. Da sich die Wellenlängenbereiche der Fluoreszenz und der Phosphoreszenz überschneiden, enthält das Referenzsignal Anteile des sauerstoffabhängigen Messsignals und umgekehrt. Eine bessere Trennung der Signale wird erreicht, indem sie anhand

ihrer unterschiedlichen Abklingzeiten (0,5 ns respektive 15  $\mu$ s) voneinander getrennt werden [56]. Bei diesem Verfahren wird das Anregungslicht mit unterschiedlichen Frequenzen moduliert. Während nach Anregung bei hohen Frequenzen die langlebige Phosphoreszenz im Gegensatz zur Fluoreszenz vollständig demoduliert ist, bleibt die Modulation beider Signale bei niedrigen Anregungsfrequenzen erhalten. Die Messung der Modulationen der Lumineszenzsignale bei einer hohen und einer niedrigen Anregungsfrequenz ermöglicht die Berechnung des Verhältnisses von Phosphoreszenz und Fluoreszenz. Diese Methode ist auch bei starker Überlappung der Wellenlängenbereiche von Phosphoreszenz und Fluoreszenz anwendbar. Neben der besseren Trennung der Signale ist ein weiterer Vorteil dieser Methode, dass beide Signale mit nur einem Detektor gemessen werden können.

Interne Referenzierung lässt sich auch für die Temperaturkorrektur bei Sauerstoffmessungen einsetzen. Jorge et al. beschrieben 2005 eine Sauerstoffoptode, in deren Messkopf ein Langpassfilter integriert ist [57]. Dieser Filter absorbiert einen Teil des reflektierten Anregungslichts. Die Intensität dieses Anregungslichts wird bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert, das Verhältnis dieser Intensitäten wird von der Lage der Absorptionskante des Filters bestimmt, die wiederum von der Temperatur abhängt. Die auf diese Weise bestimmte Temperatur kann zur Korrektur des Sensorsignals verwendet werden und man erhält ein temperaturunabhängiges Messsignal.

# Kapitel 3

## Beurteilung eines neuen optischen Sauerstoffsensors

Sensoren müssen bestimmte Anforderungen erfüllen. Die wichtigsten Eigenschaften sind Ansprechzeit, Signalstabilität und Reproduzierbarkeit. Um die Qualität eines neu entwickelten Sensors beurteilen zu können, ist es notwendig, diese Eigenschaften zu untersuchen und mit denen anderer, etablierter Sensoren zu vergleichen. Im Folgenden wird die Evaluierung eines sich in der Entwicklung befindlichen optischen Sensors, der den Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase misst, beschrieben; als Referenzsensor dient ebenfalls ein optischer Sensor (Messgerät: HQ30d; Sauerstoff-Sonde: LDO-Standard, Hach-Lange, Loveland, CO, USA).

### 3.1 Sensoren und Messaufbau

Sowohl bei dem zu beurteilenden Sensor als auch bei dem Referenzsensor handelt es sich um portable Messgeräte für den Einsatz im Labor und bei Feldmessungen. Abbildung 3.1 zeigt den Aufbau und die Funktionsweise der Sauerstoffsonde des Referenzsensors. Die Optik befindet sich im Sensorkörper, während die Farbstoffmembran sich in einer auswechselbaren Kappe befindet. Das Messprinzip beruht auf der Messung der Abklingzeit, die Anregung erfolgt über eine blaue LED, die Detektion über eine Photodiode. Als Referenz dient eine rote LED. Der Aufbau des zu evaluierenden Sensors ist ähnlich dem gezeigten; er wird hier aus patentrechtlichen Gründen nicht gezeigt.

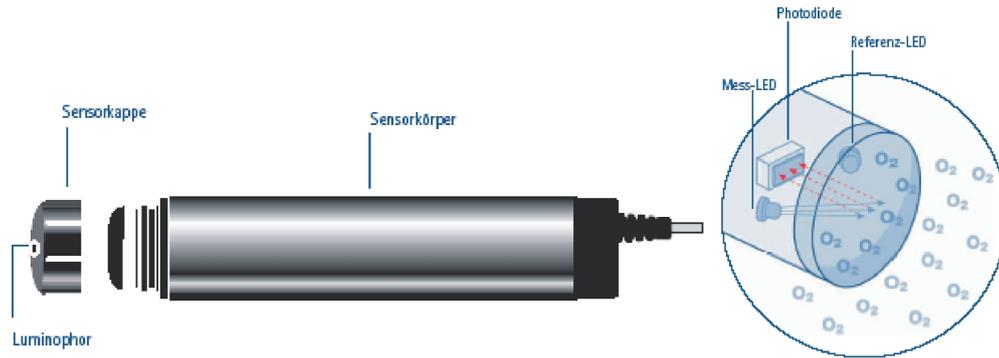


Abbildung 3.1: Aufbau (links) und Funktionsprinzip (rechts) der Sauerstoffsonde LDO-Standard (Quelle: www.hach-lange.de)

Die Messungen erfolgen in deionisiertem Wasser, das mit Gasen mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt begast wird, der Volumenstrom beträgt 500 mL/min. Die Begasung erfolgt über einen perforierten Metallring, der sich innerhalb eines Drahtnetzes befindet. Dieses dient dazu, die Sensoren frei von Gasblasen zu halten, da diese die Signale beeinflussen, wenn sie sich an der Membran ablagern. Der Aufbau ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

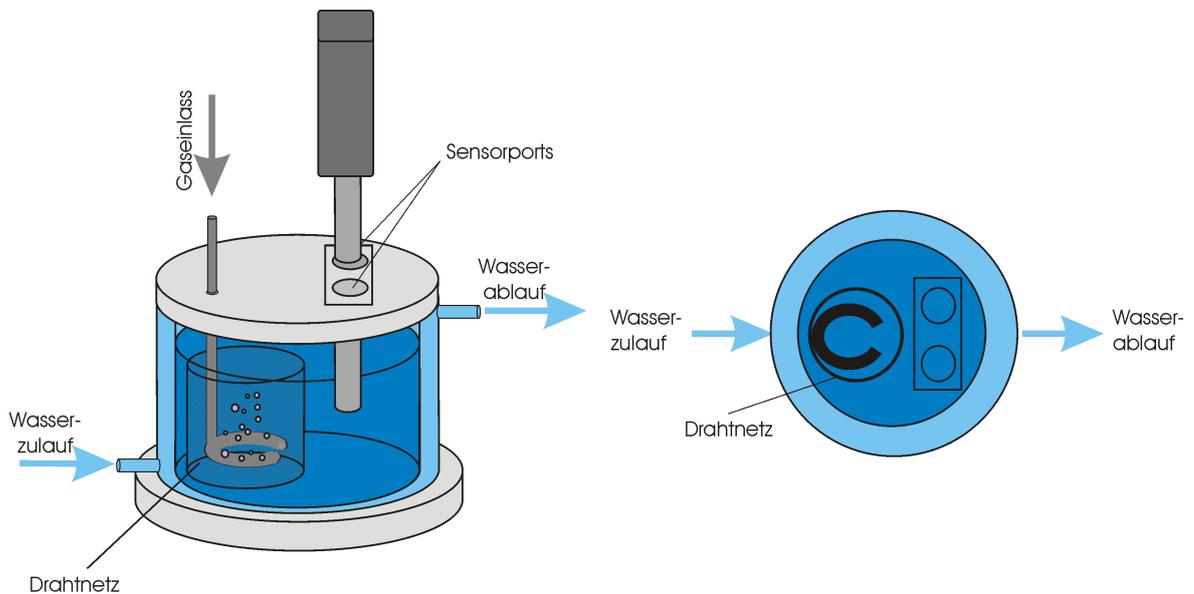


Abbildung 3.2: Messaufbau, links: Seitenansicht; rechts: Aufsicht

Die Steuerung der Begasung erfolgt mit Hilfe des Programmes DasyLab 10 (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA). Es kann zwischen sieben verschiedenen Gasen gewechselt werden. Die Schaltung ist in Abbildung dargestellt. Die Begasungsdauer und die Reihenfolge der Gase kann frei gewählt werden. So ist es möglich, Stufenprofile, einen kontinuierlichen Wechsel zwischen zwei Gasen oder andere Begasungsvariationen automatisiert durchzuführen.

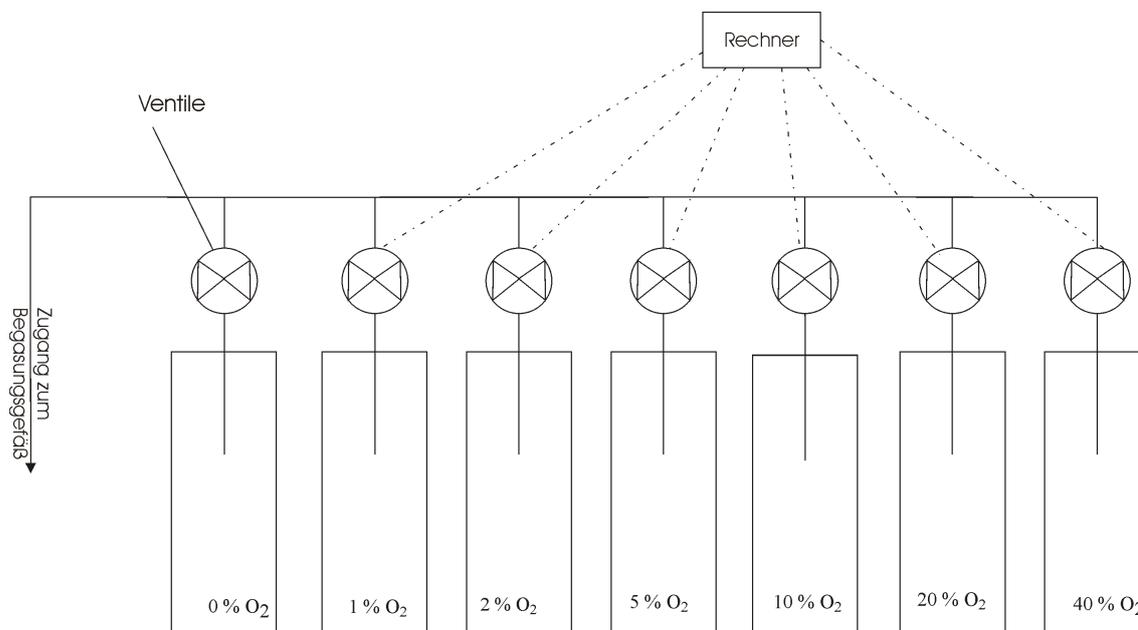


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Gasschaltung

## 3.2 Ansprechzeit

Will man eine effektive Prozesskontrolle ermöglichen, ist es notwendig, sich ändernde Bedingungen zeitnah zu erkennen, um auf sie reagieren zu können. Hierfür müssen Sensoren kurze Ansprechzeiten aufweisen. Der hier zu untersuchende Sensor soll eine  $t_{90}$ -Zeit, also die Zeit bis 90 % des Endwertes erreicht sind, von einer Minute aufweisen.

Für die Messungen wurde je 45 min mit Stickstoff und 40 % Sauerstoff begast, als Messgröße dient der Gelöstsauerstoff (*dissolved oxygen*, DO). Zur Berechnung der Ansprechzeiten wird die Zeitkonstante  $\tau$  bestimmt, mit der sich  $t_{90}$  nach

$$t_{90} = -\tau \cdot \ln 0,1 \quad (3.1)$$

berechnen lässt. Die zeitliche Änderung des Sauerstoffgehaltes in der Messlösung lässt sich beschreiben mit:

$$\frac{dcO_2}{dt} = k_{La} \cdot (cO_2^* - cO_2) \quad (3.2)$$

Hierbei ist  $cO_2$  die Gelöstsauerstoffkonzentration,  $cO_2^*$  die Gelöstsauerstoffkonzentration an der Grenzfläche, die der Sättigungskonzentration entspricht und  $k_{La}$  eine Systemkonstante, die ein Maß für den Sauerstoffübergang darstellt. Die Zeitverzögerung der Sensorsignale  $s$  lassen sich durch ein System 1. Ordnung beschreiben

$$\frac{ds}{dt} = \frac{cO_2 - s}{\tau} \quad (3.3)$$

Eine analytische Lösung dieser Gleichung führt zu

$$cO_2(t) = cO_{2,ein} - e^{-k_{La} \cdot t} \cdot cO_{2,ein} + e^{-k_{La} \cdot t} \cdot cO_{2,Start} \quad (3.4)$$

und

$$s(t) = \frac{cO_{2,ein} \cdot k_{La} - e^{-\frac{1}{\tau} \cdot k_{La} \cdot \tau} \cdot cO_{2,ein} + e^{-\frac{1}{\tau} \cdot k_{La} \cdot \tau} \cdot cO_{2,Start} - e^{-k_{La} \cdot t} \cdot cO_{2,Start} + e^{-k_{La} \cdot t} \cdot cO_{2,ein} - cO_{2,ein}}{-e^{-k_{La} \cdot t} \cdot cO_{2,Start} + e^{-k_{La} \cdot t} \cdot cO_{2,ein} - cO_{2,ein}} \cdot \frac{1}{k_{La} \cdot \tau - 1} \quad (3.5)$$

wobei  $cO_{2,Start}$  die Sauerstoffkonzentration vor dem Sprung und  $cO_{2,ein}$  die dem eingeleiteten Gas entsprechende Sättigungskonzentration darstellt. Gleichung 3.5 wird durch Variation der Parameter  $\tau$  und  $k_{La}$  an die gemessenen Werte angeglichen. Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen die mit dem zu testenden Sensor bzw. dem HQ30d aufgezeichneten Messkurven im Vergleich zum theoretischen Modell.

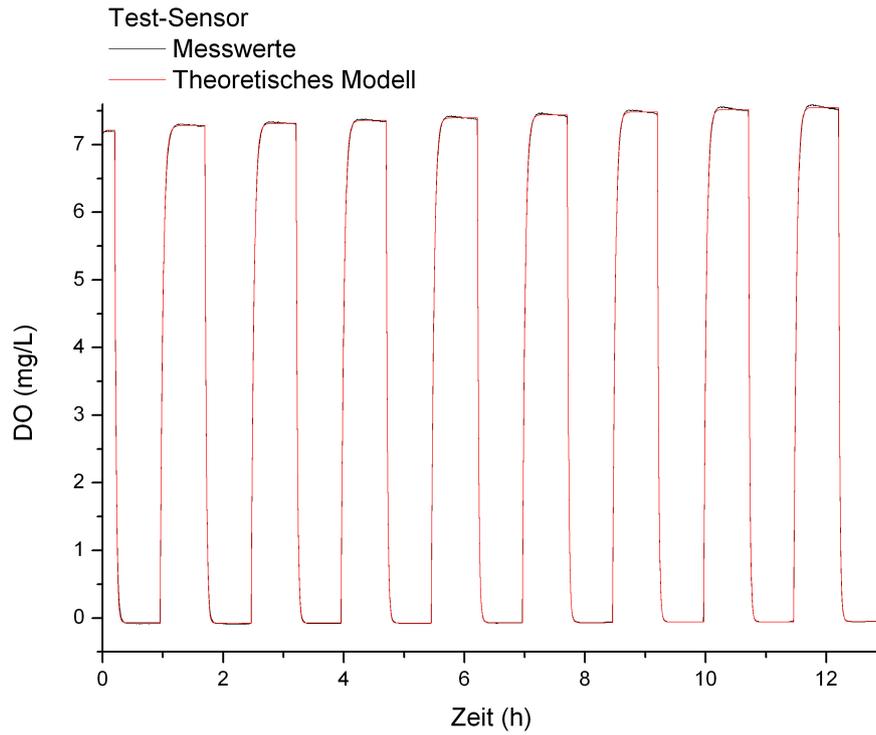


Abbildung 3.4: Messwerte des Test-Sensors im Vergleich zum theoretischen Modell

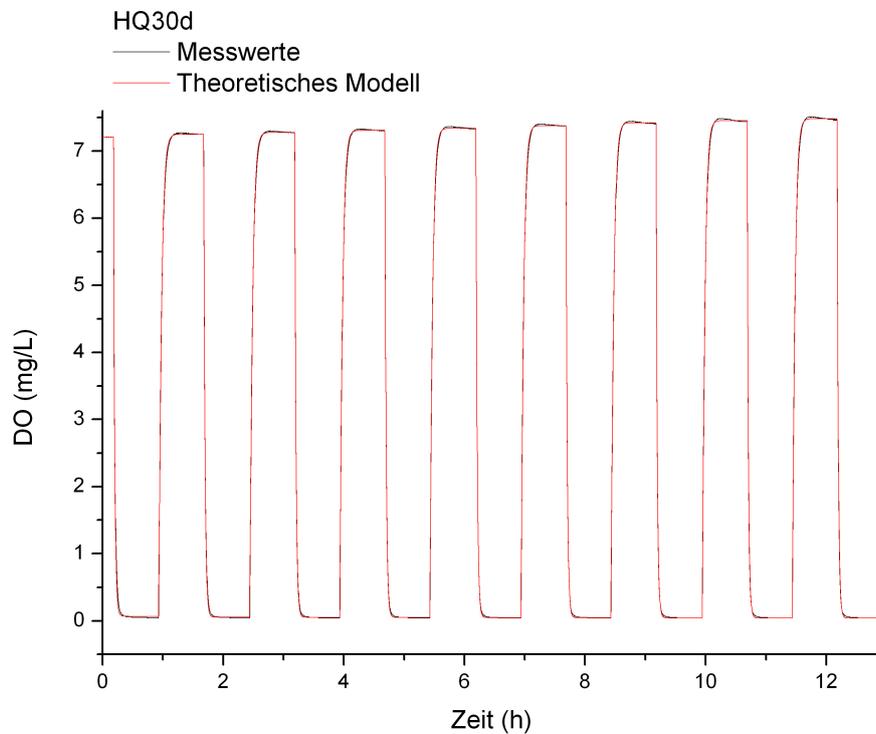


Abbildung 3.5: Messwerte des HQ30d im Vergleich zum theoretischen Modell

Das theoretische Modell gibt die Messwerte gut wider, die durchschnittliche Abweichung zu den Messwerten beträgt 0,03 mg/L. Es ergeben sich  $t_{90}$ -Zeiten von 85 s für den Test-Sensor und 45 s für den Referenz-Sensor bei ansteigendem Sauerstoffgehalt, bei abfallendem Sauerstoffgehalt liegen sie bei 65 s für den Test-Sensor und 63 s für den Referenz-Sensor. Die Ansprechzeiten des Test-Sensors sind damit bei steigendem Sauerstoffgehalt etwa doppelt so hoch wie die des HQ30d, bei fallendem Sauerstoffgehalt weisen beide Sensoren ähnliche Ansprechzeiten auf.

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebene Methode richtige Werte für die Ansprechzeiten liefert, werden diese zusätzlich durch manuelles Wechseln der Sensoren zwischen zwei Lösungen bestimmt. Für diese Messungen wird ein Gefäß (siehe Abbildung 3.2) mit Stickstoff begast, ein anderes mit Druckluft. Die Sensoren (ein Test-sensor und ein HQ30d) werden zwischen den beiden Gefäßen manuell umgesetzt. Um ein möglichst zeitgleiches Umsetzen zu ermöglichen, werden beide Sensoren an einem Einsatz befestigt. Das Messintervall des Test-Sensors beträgt 1 s, das des HQ30d 10 s, da dies das bei diesem Sensor kürzeste einstellbare Intervall ist. Abbildung 3.6 zeigt die bei der Messung erhaltenen Messkurven, die daraus erhaltenen  $t_{90}$ -Zeiten sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

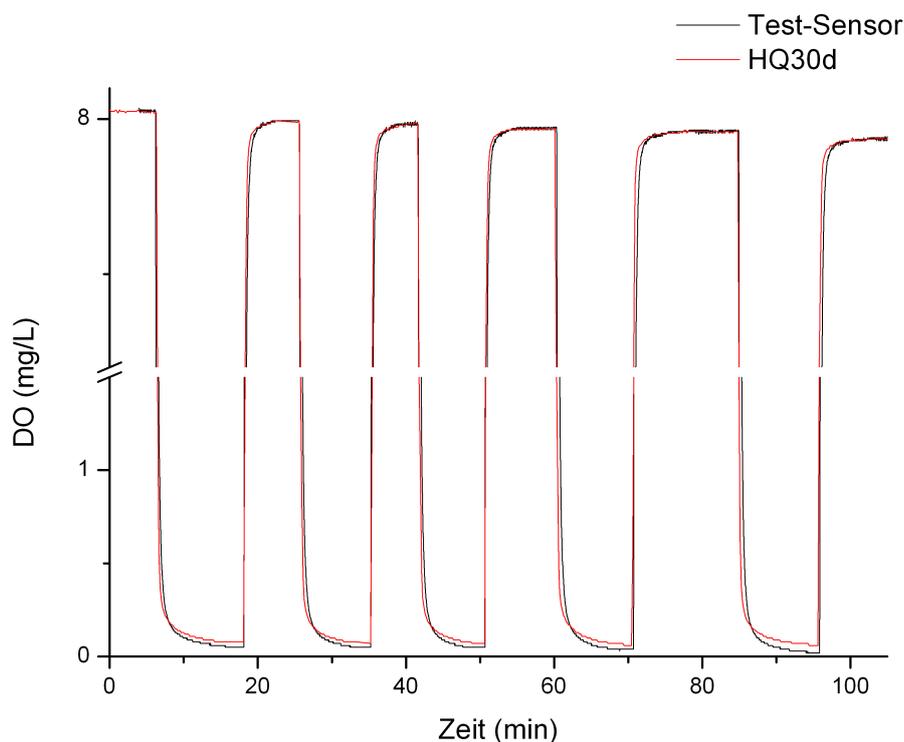


Abbildung 3.6: Messkurven des Test- und des Referenzsensors, erhalten bei manuellem Umsetzen der Sensoren zwischen mit Stickstoff und Druckluft begastem Wasser

Tabelle 3.1:  $t_{90}$ -Zeiten der beiden Sensoren, gemessen bei manuellem Umsetzen der Sensoren zwischen mit Stickstoff und Druckluft begasten Lösungen

ansteigender Sauerstoffgehalt		abfallender Sauerstoffgehalt	
Test-Sensor	HQ30d	Test-Sensor	HQ30d
[s]	[s]	[s]	[s]
37	20	31	30
36	20	30	20
36	30	28	20
36	30	29	30
36	20	28	30

Bei ansteigendem Sauerstoffgehalt liegen die  $t_{90}$ -Zeiten des Test-Sensors mit 36-37 s deutlich über denen des HQ30d (20-30 s). Allerdings liegen sie dennoch innerhalb der geforderten Spezifikation von einer  $t_{90}$ -Zeit kleiner als 60 s. Auch bei abfallendem Sauerstoffgehalt liegen die gemessenen  $t_{90}$ -Zeiten mit 28-31 s innerhalb der Spezifikation. Die  $t_{90}$ -Zeiten des Test-Sensors bei abfallendem Sauerstoffgehalt sind ähnlich denen des HQ30d, die bei 20 bis 30 s liegen.

Verglichen mit den bei der zuerst beschriebenen Methode erhaltenen Ansprechzeiten, liegen die durch manuelles Umsetzen der Sensoren erhaltenen Ansprechzeiten um ca. die Hälfte niedriger. Das Berechnung liefert also keine korrekten Werte, allerdings stimmt das Verhältnis der so erhaltenen Ansprechzeiten zueinander. Es lassen sich also mit der Methode keine Absolutwerte bestimmen, zum Vergleichen verschiedener Sensoren ist diese Methode aber geeignet. Der Vorteil der Methode ist, dass sie automatisierbar ist und somit ein sehr viel geringerer Arbeitsaufwand notwendig ist.

### 3.3 Reproduzierbarkeit

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Reproduzierbarkeit der Messwerte. Um diese zu überprüfen wird in dem in Abbildung 3.2 dargestellten Messaufbau abwechselnd jeweils 45 min mit Stickstoff und 20 % Sauerstoff begast und mit zwei Test-Sensoren und einem Referenzsensor gemessen. Das Messintervall beträgt 10 s. In Abbildung 3.7 sind die Messkurven der drei Sensoren dargestellt.

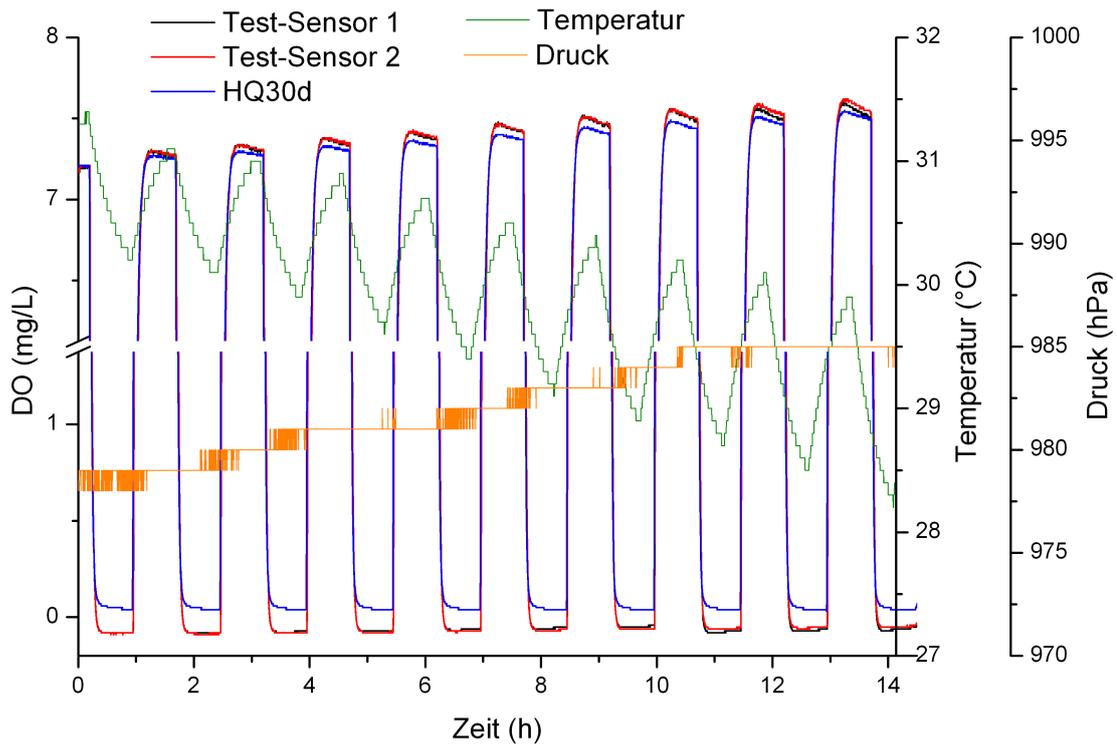


Abbildung 3.7: Reproduzierbarkeit der Sauerstoffmessung in Wasser

Die Messkurven der beiden Test-Sensoren sind nahezu identisch. Bei Begasung mit Stickstoff werden von ihnen negative Werte ausgegeben (-0,08 mg/L bis -0,05 mg/L), während die Messwerte des HQ30d im Bereich von 0,04 mg/L bis 0,05 mg/L liegen. Bei Begasung mit 20 % Sauerstoff weisen alle Messkurven eine Hypertonie auf. Die Messwerte steigen von einem Begasungszyklus zum nächsten leicht an, beim HQ30d von 7,21 mg/L auf 7,49 mg/L, bei den Test-Sensoren von 7,20 mg/L auf 7,55 mg/L. Dies ist auf Änderung von Temperatur und Luftdruck zurückzuführen, die zu einer Veränderung der Sättigungskonzentration von Sauerstoff führen. Eine gute Reproduzierbarkeit ist also bei beiden Sensoren gegeben.

### 3.4 Driftverhalten

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Stabilität des Messsignals. Um diese beurteilen zu können, wird das Driftverhalten der Sensoren überprüft. Hierzu wird deionisiertes Wasser über einen längeren Zeitraum mit Druckluft begast und es werden Messkurven von zwei Testsensoren und einem Referenzsensor aufgenommen. Diese Messkurven sind zusammen mit dem Temperatur- und Druckverlauf in Abbildung 3.8 dargestellt.

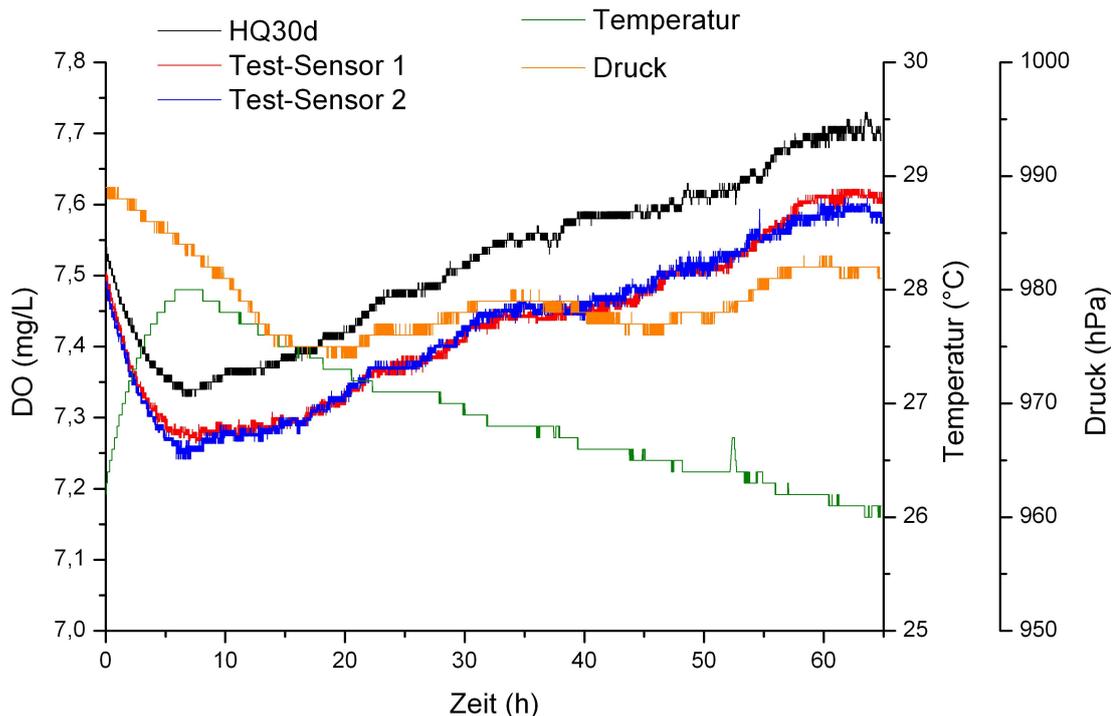


Abbildung 3.8: Verlauf von Sauerstoffkonzentration bei Messung in mit Druckluft begastem Wasser, gemessen mit zwei Testsensoren und einem Referenzsensor, und Temperatur- und Druckverlauf

Es wird keine konstante Sauerstoffkonzentration gemessen. Dies liegt aber nicht an dem Driftverhalten der Sensoren, sondern wird durch Änderungen von Druck und Temperatur hervorgerufen, die sich auf die Löslichkeit von Sauerstoff auswirken. Die Messkurven der beiden Testsensoren sind nahezu identisch. Auch der Verlauf der Messkurve des Referenzsensors ähnelt den Kurven der Testsensoren, allerdings liegt diese Messkurve etwas über denen der Testsensoren. Zu Beginn der Messung ist dieser Unterschied minimal ( $0,02 \text{ mg/L}$ ), während der ersten 7 h der Messung steigt er bis auf  $0,1 \text{ mg/L}$  an, im weiteren Verlauf der Messung bleibt er konstant bei diesem Wert. Die unterschiedlichen Messwerte lassen sich auf das Kalibrationsverfahren des Sensors zurückführen. Die Kalibration des Test-Sensors wird zunächst in der Gasphase durchgeführt, anschließend erfolgt eine Justierung in Wasser. Die Messung begann direkt nachdem der Testsensor von der Gas- in die wässrige Phase gewechselt wurde. Während der ersten 5 h der Messung kam es in der vorher trockenen Sensormembran zu Quelleffekten, die zu einer Drift des Sensors führten. Nach diesen 5 h war der Sensor vollständig an die wässrige Phase adaptiert, so dass keine weitere Drift beobachtet wurde. Bei der Verwendung sollte man dieses beachten, und die Messspitze des Sensors mindestens 5 h vor Benutzung in Wasser lagern.

### 3.5 Zusammenfassung

Ein in der Entwicklung befindlicher optischer Sensor wurde im Vergleich zu einem etablierten optischen Sensor getestet. Es wurden die Ansprechzeit, die Reproduzierbarkeit und das Driftverhalten untersucht.

Die Ansprechzeiten wurden mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt, zum Einen durch automatisiertes Wechseln des Gases, das in die Lösung eingeleitet wird, zum Anderen durch manuelles Umsetzen der Sensoren zwischen zwei Lösungen mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt. Die Methoden ergaben unterschiedliche Ansprechzeiten, das Verhältnis der Ansprechzeiten zueinander war bei beiden Methoden identisch. Um die Absolutwerte der Ansprechzeiten bestimmen zu können, muss man also auf die Methode des manuellen Wechselns zurückgreifen, will man die Ansprechzeiten zweier Sensoren vergleichen, ist dies mit der automatisierten Methode möglich.

Die Ansprechzeiten des zu testenden Sensors lagen über denen des Referenzsensors. Sie lagen dennoch innerhalb der geforderten Spezifikation von 60 s. Die Reproduzierbarkeit der Messwerte war bei beiden Sensoren gegeben. Zwar stiegen die Messwerte von Messzyklus zu Messzyklus, dies lässt sich aber auf Änderungen der Sauerstofflöslichkeit durch Temperatur- und Druckänderung zurückführen. Die Untersuchung des Driftverhaltens ergab, dass sich der Test-Sensor nach einem Wechsel von Gas in Wasser zunächst an die wässrige Phase adaptieren muss, während dieser Adaptionsphase tritt eine Drift des Messsignals auf. Nach etwa 5 h hat sich der Sensor vollständig an die wässrige Phase adaptiert, es wird im Vergleich zu dem Referenzsensor keine weitere Signaldrift beobachtet.

# Kapitel 4

## Ratiometrischen Messung von Sauerstoffgehalt und Temperatur

Fritzsche entwickelte 2006 ein ratiometrisches Sensorsystem zur Messung von Temperatur und Sauerstoffgehalt [47]. Messungen mit diesem System sind sowohl in der Gas- als auch in der Flüssigphase möglich. Als Indikator wurde hierbei Platinoc-taethylporphyrin (PtOEP) in Kombination mit Zinkoctaethylporphyrin (ZnOEP) verwendet.

Da eine reproduzierbare Herstellung dieser Farbstoffkombination nicht möglich war, wird in dieser Arbeit mit definierten Farbstoffmischungen aus den beiden Einzelkomponenten gearbeitet. Es wird untersucht, ob sich diese Farbstoffmischungen für ratiometrische Messungen eignen und ob sich die Messsignale durch Variation der Mischungsverhältnisse optimieren lassen.

Im Folgenden werden zunächst die spektroskopischen Eigenschaften der in der vorhergehenden Dissertation verwendeten Farbstoffkombination beschrieben (Abschnitt 4.2 - 4.2), außerdem wird der entwickelte Sensoraufbau vorgestellt (Abschnitt 4.3). Im Weiteren werden die Ergebnisse der Untersuchungen mit den definierten Farbstoffmischungen dargestellt (Abschnitt 4.4 - 4.7).

### 4.1 Lumineszenz des Porphyrin-Indikators

Abbildung 4.1 zeigt das Spektrum des von Fritzsche 2006 verwendeten Porphyrin-Indikators in Chloroform. Vor der Aufnahme des Spektrums wurde die Lösung mit Stickstoff begast und die Küvette anschließend verschlossen, um so durch Sauerstoff verursachte Löschungseffekte zu vermeiden. Links ist Lumineszenzintensität in Abhängigkeit von Exzitations- und Emissionswellenlänge als dreidimensionale Fläche

und als Projektion dieser Fläche auf die xy-Ebene dargestellt (a), rechts zwei Schnitte durch dieses 3D-Spektrum, oben bei einer Emissionswellenlänge von 645 nm (b), unten bei einer Exzitationswellenlänge von 410 nm (c).

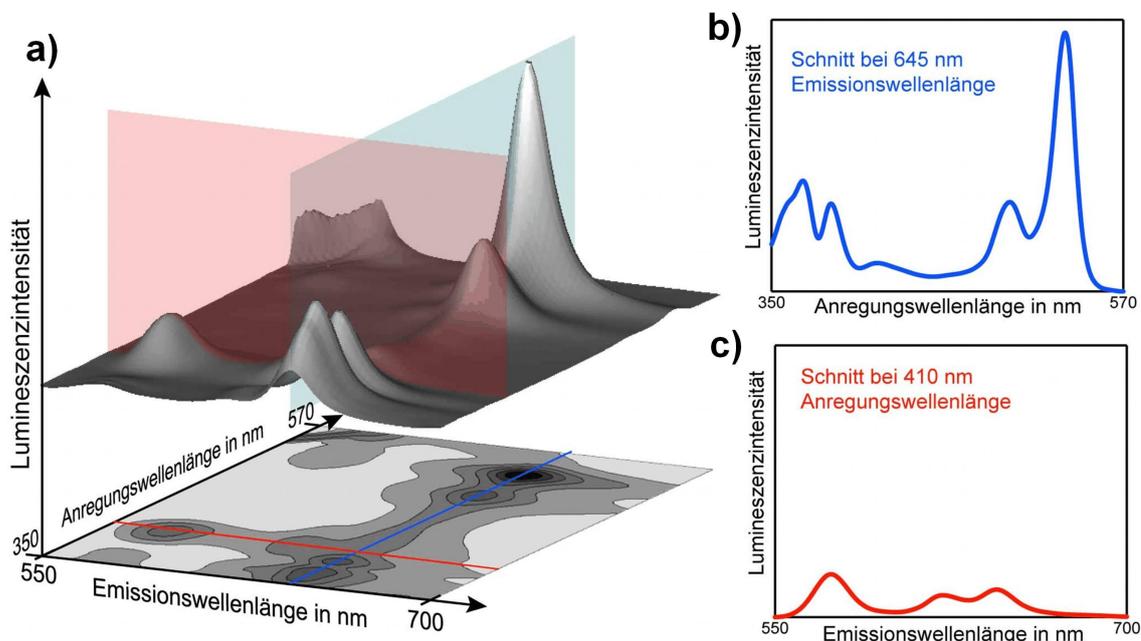


Abbildung 4.1: a) 3D-Lumineszenzspektrum von Platin/Zink-Octaethylporphyrin in Chloroform unter Stickstoff-Atmosphäre,  $c = 10 \text{ mg/L}$ , b) Schnitt bei 645 nm Emissionswellenlänge, c) Schnitt bei 410 nm Anregungswellenlänge [47]

Bei  $\lambda_{em} = 645 \text{ nm}$  treten einige intensive Signale auf. Sie sind der Phosphoreszenz des Platin-octaethylporphyrins zuzuordnen und werden bei Anwesenheit von Sauerstoff stark gequenchet. Bei vielen Sensoren wird diese Phosphoreszenz als Messgröße zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes genutzt [3]. Von Vorteil ist hierbei der große Unterschied zwischen Exzitations- und Emissionswellenlänge (Stokes-Shift), der die optische Trennung von Emissionslicht und gestreutem Anregungslicht vereinfacht.

Bei  $\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$  und  $\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$  ist ein weiteres Lumineszenzsignal zu sehen. Dieses ist der Fluoreszenz des Zink-octaethylporphyrins zuzuordnen [58].

## 4.2 Die Sauerstoff- und Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz

Im Folgenden wird die Abhängigkeit der Lumineszenzsignale des Indikators von den Messparametern dargestellt. Da die Lumineszenz eines Farbstoffes durch seine Umgebung beeinflusst wird, werden diese Eigenschaften für den Indikator in der jeweili-

gen Immobilisierungsmatrix beschrieben. Diese Matrizes müssen je nach Messparameter verschiedene Anforderungen erfüllen. So erfordert die Temperaturmessung eine sauerstoffundurchlässige Matrix, damit die Messung nicht durch Veränderung der Sauerstoffkonzentration gestört werden kann. Für die Sauerstoffmessung hingegen ist eine Matrix mit guter Sauerstoffdurchlässigkeit zu wählen, um möglichst kurze Ansprechzeiten zu erreichen. Beide Matrizes müssen transparent für die Anregungs- und Emissionswellenlängen sein, außerdem ist es von Vorteil hydrophobe Materialien zu verwenden, da so ein Auswaschen des Farbstoffs weitgehend vermieden werden können.

### 4.2.1 Temperatursensor

Zur Herstellung der Temperaturoptoden wird der Indikator in einem Zweikomponenten-Epoxidharz immobilisiert. Dieses Polymer ist mechanisch robust, glasklar und besitzt eine derart geringe Sauerstoffdurchlässigkeit, dass die Lumineszenz des eingeschlossenen Farbstoffes unabhängig von der Sauerstoffkonzentration in der Umgebung ist. Die Durchführung der Immobilisierung wird im Anhang (A.1) beschrieben. Die Phosphoreszenz und Fluoreszenz zeigen eine entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit. Während die Phosphoreszenz wie bei den meisten Luminophoren mit steigender Temperatur abnimmt (Abbildung 4.2 b), nimmt die Intensität des Fluoreszenzsignals zu (Abbildung 4.2 a). Bei einer Exzitationswellenlänge von 410 nm wird neben der Fluoreszenz auch die Phosphoreszenz angeregt. Die beiden Signale überschneiden sich, so dass sich die Temperatureffekte nahezu kompensieren.

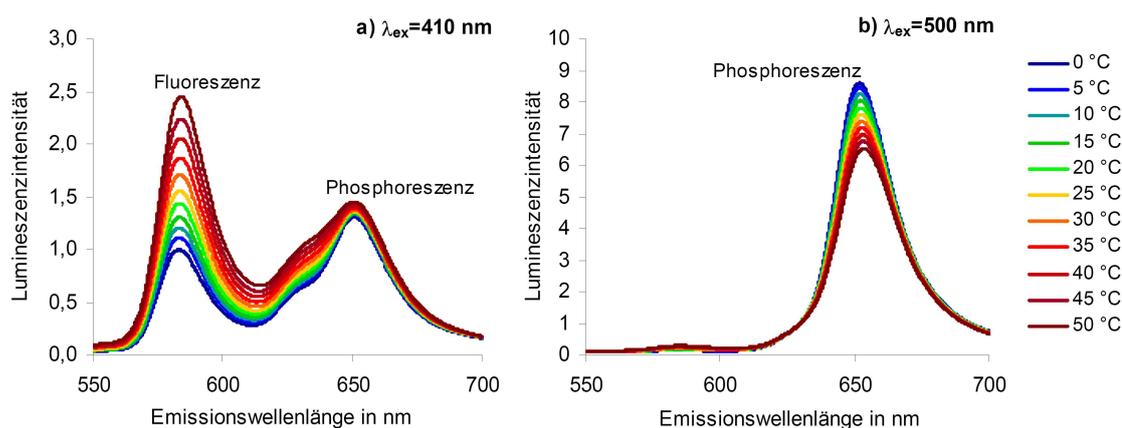


Abbildung 4.2: Die Lumineszenz des Porphyrin-Indikators in Epoxidharz bei verschiedenen Temperaturen bei einer Anregungswellenlänge von a) 410 nm, b) 500 nm [47]

### 4.2.2 Sauerstoffsensor

Zur Herstellung von Sauerstoffoptoden werden oft Silikone zur Immobilisierung verwendet, da sie eine hohe Sauerstoffdurchlässigkeit vorweisen und in großer Vielzahl kommerziell erhältlich sind. Da aber Porphyrine in Silikon unlöslich sind, ist eine Immobilisierung in dieser Matrix nicht möglich. Stattdessen wird Polysulfon (PSU) als Matrix für die Sauerstoffoptoden eingesetzt. Dieses Polymer ist für die Heißdampfsterilisation geeignet, was insbesondere für biotechnologische Anwendungen von Interesse ist.

Um kurze Ansprechzeiten zu erreichen ist es vorteilhaft, poröse Schichten herzustellen. Hierzu wird der Indikator mit dem Polymer in Chloroform gelöst, die Lösung wird mit Ethanol versetzt und auf ein Polypropylen/Polyethylen-Vlies gegeben. Das leichter flüchtige Chloroform verdampft und das Polysulfon bildet eine poröse Schicht, da das Polymer und der Indikator in dem langsamer verdampfenden Ethanol unlöslich sind. Eine genaue Versuchsbeschreibung ist im Anhang (A.2) zu finden.

Abbildung 4.3 zeigt den Einfluss von Sauerstoff auf die Lumineszenz des Indikators bei Exzitationswellenlängen von 410 nm und 500 nm. Die Phosphoreszenz wird gemäß der Stern-Vollmer-Gleichung durch Sauerstoff gequencht. Die Fluoreszenzintensität dagegen ist nur bei niedriger Sauerstoffkonzentrationen von dieser abhängig. Steigt die Sauerstoffkonzentration auf über 1 % bleibt die Fluoreszenzintensität nahezu konstant.

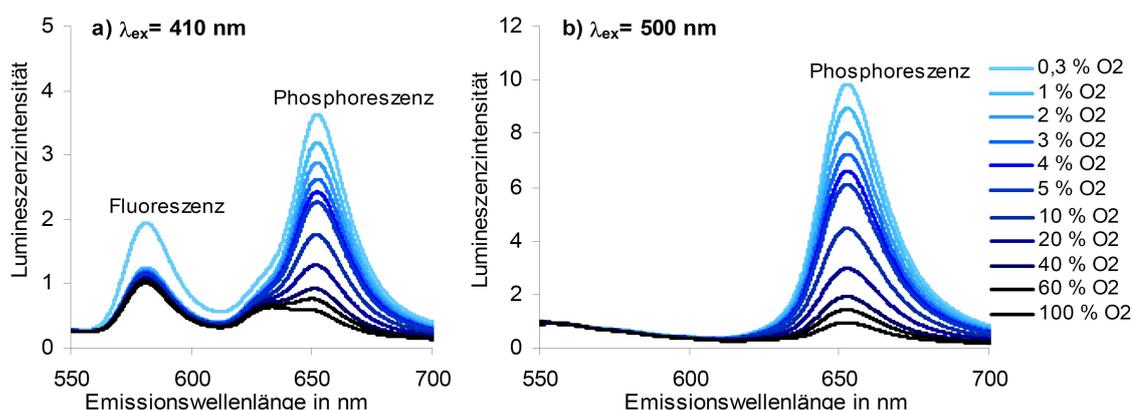


Abbildung 4.3: Lumineszenz des Porphyrin-Indikators in PSU bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen bei 20 °C und einer Anregungswellenlänge von a) 410 nm, b) 500 nm [47]

## 4.3 Das optische System

Ratiometrische Messverfahren erfordern Detektion der Lumineszenz in zwei unterschiedlichen Wellenlängenbereichen. Um die ratiometrische Messung mit nur einem

Detektor durchführen zu können, wird ausgenutzt, dass sich die Anregungsmaxima der beiden Lumineszenzsignale bei unterschiedlichen Wellenlängen befinden. Bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm wird überwiegend Fluoreszenz emittiert, während im Spektralbereich von 500 nm bis 540 nm fast ausschließlich Phosphoreszenz angeregt wird. Durch abwechselnde Anregung bei diesen Wellenlängen können die beiden Signale zeitlich getrennt werden. Die Detektion erfolgt in einem breiten Wellenlängenbereich, der die Emissionsmaxima von Fluoreszenz und Phosphoreszenz einschließt und lediglich das Anregungslicht abtrennt. Als Detektor dient ein Photomultiplier (PMT, Hamamatsu, Herrsching).

Als Lichtquellen werden Leuchtdioden (LEDs) verwendet. Um schmale Exzitationsbereiche zu erhalten, wird das Licht der LEDs mit Interferenzfilter von 10 nm Halbwertsbreite gefiltert. Die Anregung der Phosphoreszenz erfolgt bei 500 nm, also im Bereich des Nebenmaximums und nicht im Hauptmaximum bei 535 nm (zum Vergleich s. Spektrum des Indikators, Kapitel 4.2). Dies ermöglicht die Verwendung einer handelsüblichen blauen LED ( $\lambda_{max} = 470$  nm) als Lichtquelle, da diese auch bei 500 nm noch mit ausreichender Intensität emittiert. Des Weiteren wird durch den größeren Abstand zum Lumineszenzsignal die Trennung von Anregungs- und Emissionslicht vereinfacht. Der optische Aufbau des Sensors ist in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt.

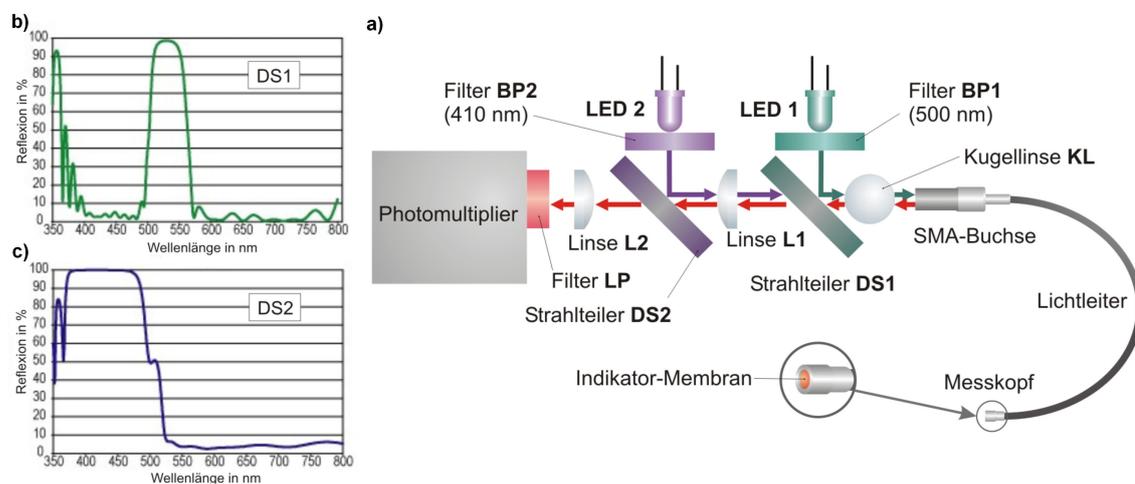


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des optischen Aufbaus des Sensors und Reflexionsspektren der verwendeten dichroitischen Spiegel (Quelle: Edmund Optics GmbH, Barrington, NJ, USA, [www.edmundoptics.com](http://www.edmundoptics.com))

Um die beiden Signale zeitlich zu trennen, werden die LEDs abwechselnd für jeweils 4 ms eingeschaltet. Zwischen jedem Wechsel liegen weitere 4 ms, in denen keine Beleuchtung erfolgt. Die auf diese Weise gehoppten Messsignale können mit einem Lock-in-Verstärker von möglichen Störungen getrennt werden, so dass ein besseres Signal:Rausch-Verhältnis erreicht werden kann. Das Anregungslicht der LEDs wird an den dichroitischen Strahlteilern DS1 und DS2 reflektiert und mit Hilfe der Linsen L1 und KL in den Lichtleiter fokussiert. DS2 ist für langwelliges Licht ab etwa 500 nm durchlässig, während das kurzwellige Anregungslicht in den Lichtleiter reflektiert wird. DS1 reflektiert dagegen nur im Bereich zwischen etwa 500 nm und 570 nm, in welchem die Anregung durch LED 1 erfolgt, und lässt das Anregungslicht von LED 2 durch. Beide Strahlteiler sind durchlässig für die Lumineszenzsignale, so dass diese ungehindert vom Lichtleiter zum Detektor gelangen können (vergleiche Abbildung 4.4 b). Um zu verhindern, dass gestreutes oder reflektiertes Anregungslicht zum PMT gelangt, befindet sich vor dessen aktiver Fläche ein zusätzlicher Langpassfilter mit einer Grenzwellenlänge von 550 nm. Durch die Linsen L1, L2 und KL werden die Signalverluste innerhalb der Optik reduziert.

Da die Empfindlichkeit des Detektors in einem weiten Bereich verändert werden kann, hängt die absolute Höhe des Messsignals von der jeweiligen Einstellung ab. Im Folgenden werden daher alle mit diesem Gerät gemessenen Signalintensitäten in relativen Einheiten (RU) angegeben. Zur Fixierung der einzelnen Komponenten wurde in der Mechanik-Werkstatt des Institutes ein Gehäuse aus schwarz eloxiertem Aluminium gefertigt, das zum Schutz vor Umgebungslicht dient und mit einem Deckel verschlossen werden kann. Um ein möglichst intensives Lumineszenzsignal zu erreichen, sind zuvor die optimalen Positionen der optischen Komponenten ermittelt worden. Ein Foto dieses Aufbaus befindet sich im Anhang in Abschnitt A.4. Als Lichtleiter werden Kunststofffasern von 2 mm Durchmesser (Edmund Optics GmbH, Barrington, NJ, USA) verwendet.

Die Steuerung des Sensorsystems erfolgt durch zwei Mikrocontroller (Reichelt Elektronik GmbH & Co. KG, Sande). Die Ansteuerung des Gerätes und das Auslesen der Messwerte erfolgt über einen PC mit Hilfe des Programmes DasyLab 10 (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA). Die entsprechende Elektronik wurde in der Elektronikwerkstatt des Institutes entwickelt und zusammen mit den optischen Komponenten in ein portables Gehäuse integriert. Im Anhang befinden sich ein Schema der elektronischen Schaltung und ein Foto des kompletten Gerätes (Abschnitt A.4).

## 4.4 Untersuchung verschiedener Farbstoffmischungen

In dieser Arbeit wird untersucht, ob sich definierte Farbstoffmischungen aus PtOEP und ZnOEP zur ratiometrischen Messung von Sauerstoff und Temperatur eignen. Hierzu werden Farbstoffmischungen aus PtOEP und ZnOEP in unterschiedlichen Verhältnissen in Epoxidharz zur Herstellung von Temperaturoptoden bzw. in Polysulfon auf einem Polyethylen/Polypropylen-Vlies zur Herstellung von Sauerstoffoptoden immobilisiert. Detaillierte Beschreibungen der Immobilisierungsmethoden sind im Anhang (A.1 und A.2) zu finden. Abbildung 4.5 zeigt ein Foto und eine schematische Darstellung der Querschnitte der so hergestellten Farbstoffpatches, oben ein Patch für die Temperaturmessung, unten einer für die Sauerstoffmessung. Zum Größenvergleich ist zusätzlich ein 1-Cent-Stück abgebildet.

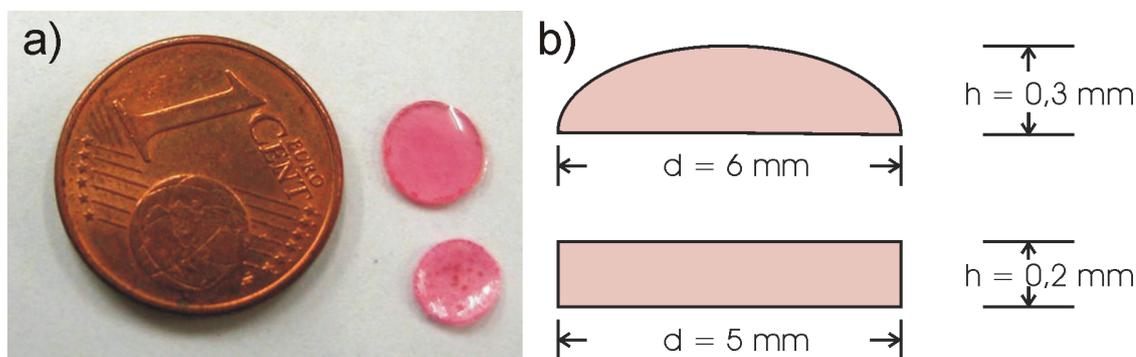


Abbildung 4.5: a) Foto der Sensorpatches im Größenvergleich zu einem 1-Cent-Stück, b) Skizze der Patches im Querschnitt; jeweils oben ein Patch für die Temperaturmessung und unten ein Patch für die Sauerstoffmessung

Die beiden Lumineszenzsignale dieser Patches werden während des Durchfahrens von Temperatur- bzw. Sauerstoffstufenprofilen gemessen, um die Abhängigkeit dieser Signale und des Signalquotienten von der Temperatur bzw. dem Sauerstoffpartialdruck zu bestimmen. Hierdurch soll zum Einen ermittelt werden, ob sich die Farbstoffmischungen für ratiometrische Messungen eignen, zum Anderen, welche Mischung am sensitivsten ist und damit am geeignetesten für den Einsatz zur Sauerstoff- bzw. Temperaturmessung. Zur Vereinfachung wird das Signal, das bei 410 nm angeregt wird, im Folgenden Referenzsignal und das Signal, das bei 500 nm angeregt wird, Messsignal genannt.

### 4.4.1 Sauerstoffmessungen

Es werden Patches mit einem molaren Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 19:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 und 1:9 hergestellt. Mit diesen Patches werden Mes-

sungen in der Gasphase durchgeführt. Sie werden in einer Messkammer angebracht, die mit einem Gasstrom bestehend aus Stickstoff und Sauerstoff durchströmt wird. Die Messkammer ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Es besteht die Möglichkeit zwei Optoden einzuspannen, z.B. zur zeitgleichen Messung von Temperatur und Sauerstoffgehalt oder um Referenzmessungen mit einem zweiten Sensor durchzuführen.

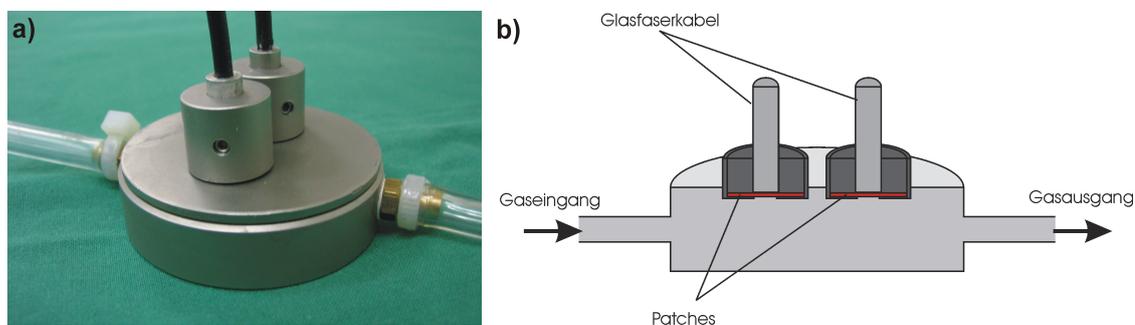


Abbildung 4.6: a) Foto der Gasdurchflusskammer, b) Schematische Darstellung des Querschnitts durch die Gasdurchflusskammer

Der Sauerstoffanteil des Gasstroms wird stufenweise erhöht (detaillierte Beschreibung im Anhang A.3). Um eine konstante Temperatur von 30 °C während der Messung zu erreichen, befindet sich die Messkammer in einem Wasserbad. In Abbildung 4.7 sind exemplarisch die erhaltenen Messwerte bei Verwendung eines Patches mit einer Farbstoffzusammensetzung von PtOEP zu ZnOEP von 7:3 in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt des Gasstroms dargestellt.

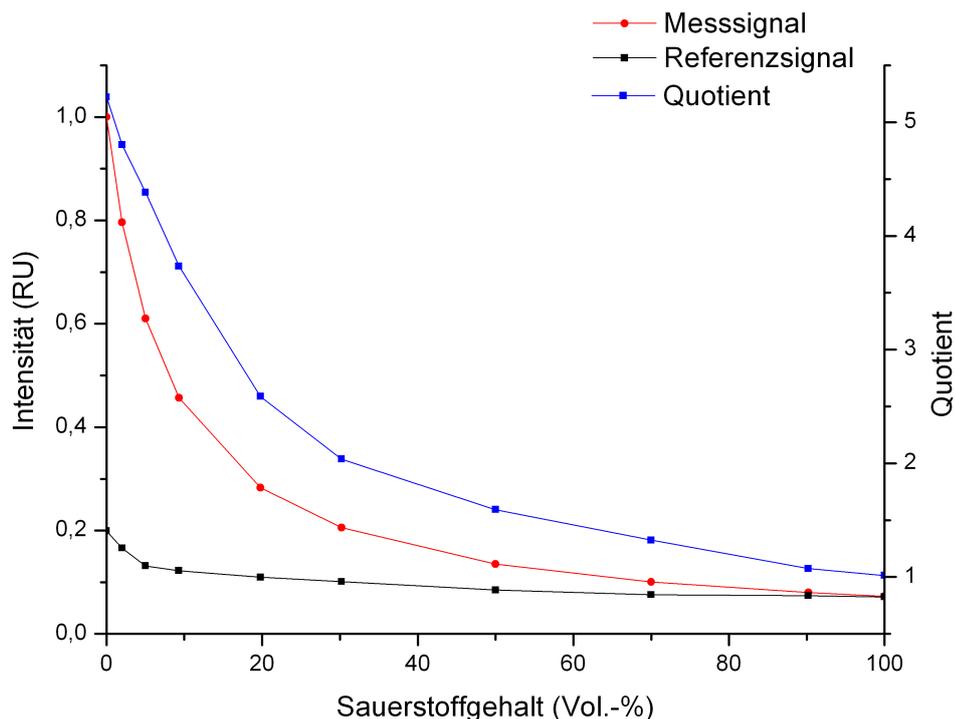


Abbildung 4.7: Signale und Signalquotient in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt, Farbstoffzusammensetzung des Patches PtOEP:ZnOEP = 7:3

Die Signale verhalten sich ähnlich wie die des in der vorhergehenden Arbeit verwendeten Farbstoffs. Das Messsignal zeigt eine starke Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt, während das Referenzsignal nur bei geringem Sauerstoffgehalt von diesem beeinflusst wird. Bei einem Sauerstoffgehalt über 5 % bleibt das Referenzsignal nahezu konstant. Der Quotient der beiden Signale nimmt stetig ab. Somit lässt sich jedem Messwert eindeutig ein Sauerstoffgehalt zuordnen, die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes durch Messen der beiden Fluoreszenzsignale ist also möglich.

Um die Messwerte in Werte für den Sauerstoffgehalt umrechnen zu können, ist es notwendig die Abhängigkeit des Quotienten vom Sauerstoffgehalt mathematisch zu beschreiben. Um später eine möglichst wenig aufwändige Kalibration zu ermöglichen, wird versucht, Gleichungen mit möglichst wenigen Parametern zu finden. Als am geeignetsten erwiesen sich Gleichungen der Form

$$Q = \frac{a}{1 + b[O_2]} \quad (4.1)$$

$Q$  steht hierbei für den Signalquotienten,  $[O_2]$  den Sauerstoffgehalt in %,  $a$  und  $b$  sind Parameter, die an die jeweiligen Messwerte angepasst wurden. Dies ist dieselbe Gleichung mit der sich auch die Sauerstoffabhängigkeit der Arbeit von Fritzsche verwendeten Farbstoffkombination beschreiben lässt [47]. Bei der oben gezeigten Mes-

sung ist  $a = 5,687$  und  $b = 0,003$ . Das Bestimmtheitsmaß beträgt  $0,996$ . Bei späteren Messungen können  $a$  und  $b$  durch eine Zweipunktkalibration bestimmt werden.

Die Messungen unter Verwendung von Patches mit anderen PtOEP : ZnOEP-Verhältnissen liefern qualitativ ähnliche Ergebnisse. Um zu entscheiden, welche Farbstoffmischung am besten für die Sauerstoffmessung geeignet ist, wird die Empfindlichkeit der Quotienten der verschiedenen Patches gegenüber dem Sauerstoffgehalt verglichen. Hierzu wird die für den jeweiligen Quotienten gefundene Gleichung nach dem Sauerstoffgehalt abgeleitet. So erhält man einen Ausdruck für die Änderungen des Messwertes bei Änderung des Sauerstoffgehalts. Da die Steigung der aus den Messungen erhaltenen Gleichungen negativ ist, gilt, je niedriger der Wert der Ableitung, desto größer die Empfindlichkeit der Messung. Abbildung 4.8 zeigt die berechneten Ableitungen exemplarisch für Patches mit drei verschiedenen Zusammensetzungen.

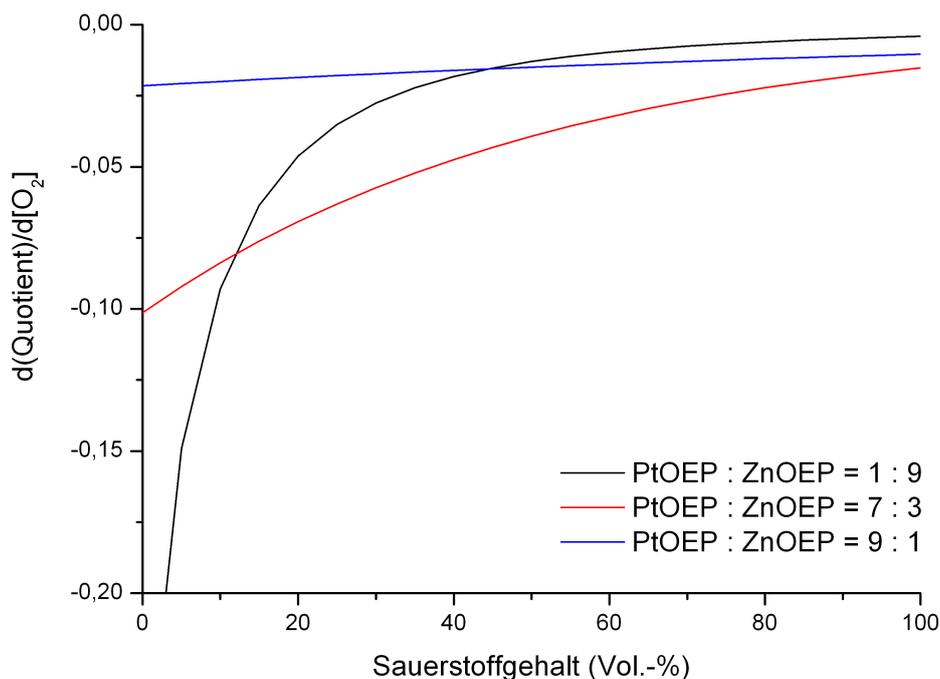


Abbildung 4.8: Empfindlichkeit des Signalquotienten gegenüber dem Sauerstoffgehalt für Patches mit dem Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 1:9, 7:3 und 9:1

Werden Patches mit einem hohen ZnOEP-Anteil (Beispiel: PtOEP : ZnOEP = 1:9) verwendet, weist der Quotient eine große Empfindlichkeit bei geringem Sauerstoffgehalt auf. Die Empfindlichkeit sinkt aber mit steigendem Sauerstoffgehalt stark ab. Werden Patches mit einem hohen PtOEP-Anteil (Beispiel: PtOEP : ZnOEP = 9:1) verwendet, weist der Quotient bei geringem Sauerstoffgehalt eine deutlich niedrigere Empfindlichkeit auf. Der Abfall der Empfindlichkeit bei steigendem Sauerstoffgehalt

ist allerdings sehr viel weniger ausgeprägt, so dass bei einem hohen Sauerstoffgehalt die Empfindlichkeit größer ist als bei Messungen mit Patches mit hohem ZnOEP-Anteil. Die Patches mit einem Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 7:3 zeigt eine gute Empfindlichkeit über den gesamten Bereich. Diese Farbstoffzusammensetzung wird daher für die weiteren Messungen verwendet.

#### 4.4.2 Temperaturmessung

Für die Temperaturmessungen werden Farbstoffmischungen mit einem Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 19:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 und 1:9 in Epoxidharz immobilisiert. Die Messungen werden in einem temperierbaren Wasserbad durchgeführt. In Abbildung 4.9 sind exemplarisch die Messkurven dargestellt, die bei Verwendung eines Patches mit einem Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 6:4 erhalten wurden.

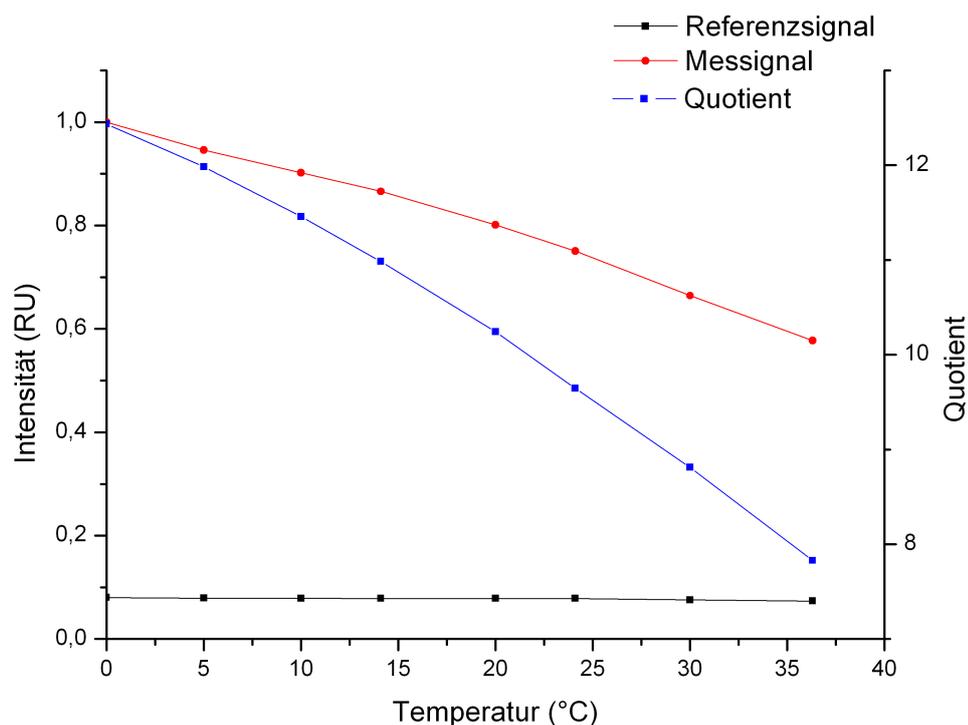


Abbildung 4.9: Signale und Signalquotient in Abhängigkeit von der Temperatur, Farbstoffzusammensetzung des Patches PtOEP : ZnOEP = 6:4

Das Messsignal sinkt mit steigender Temperatur, während das Referenzsignal konstant bleibt. Dies stellt einen Unterschied zu dem in der vorhergehenden Arbeit verwendeten Farbstoff dar, bei Messungen mit diesem stieg das Referenzsignal mit steigender Temperatur. Eine ratiometrische Temperaturmessung ist mit den Farb-

stoffmischungen dennoch möglich, da der Quotient eine stetig fallende Funktion darstellt.

Auch die Messkurven der Temperaturmessungen werden mathematisch angeglichen. Es wird wiederum nach Funktionen mit einer möglichst geringen Anzahl von Parametern gesucht. Da die Messkurve mit einer Funktion mit zwei Parametern nicht ausreichend genau wiedergegeben werden kann, muss auf eine Polynomfunktion mit drei Parametern zurückgegriffen werden. Die genaueste Wiedergabe gelang mit einer quadratischen Funktion der Form

$$Q = a \cdot T^2 + b \cdot T + c \quad (4.2)$$

Hierbei ist  $Q$  wiederum der Signalquotient,  $T$  ist die Temperatur in  $^{\circ}\text{C}$  und  $a$ ,  $b$  und  $c$  sind Parameter, die an die gegebenen Messwerte angeglichen werden. Für die in Abbildung 4.9 gezeigte Messung gilt:  $a = -0,001$ ,  $b = -0,0901$  und  $c = 12,449$ . Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,9999.

Analog zu den Sauerstoffmessungen wird auch bei den Temperaturmessungen die Empfindlichkeit der Signalquotienten von Patches verschiedener Farbstoffzusammensetzung verglichen. In Abbildung 4.10 sind diese für Patches mit einem Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 1:9, 6:4 und 9:1 exemplarisch dargestellt.

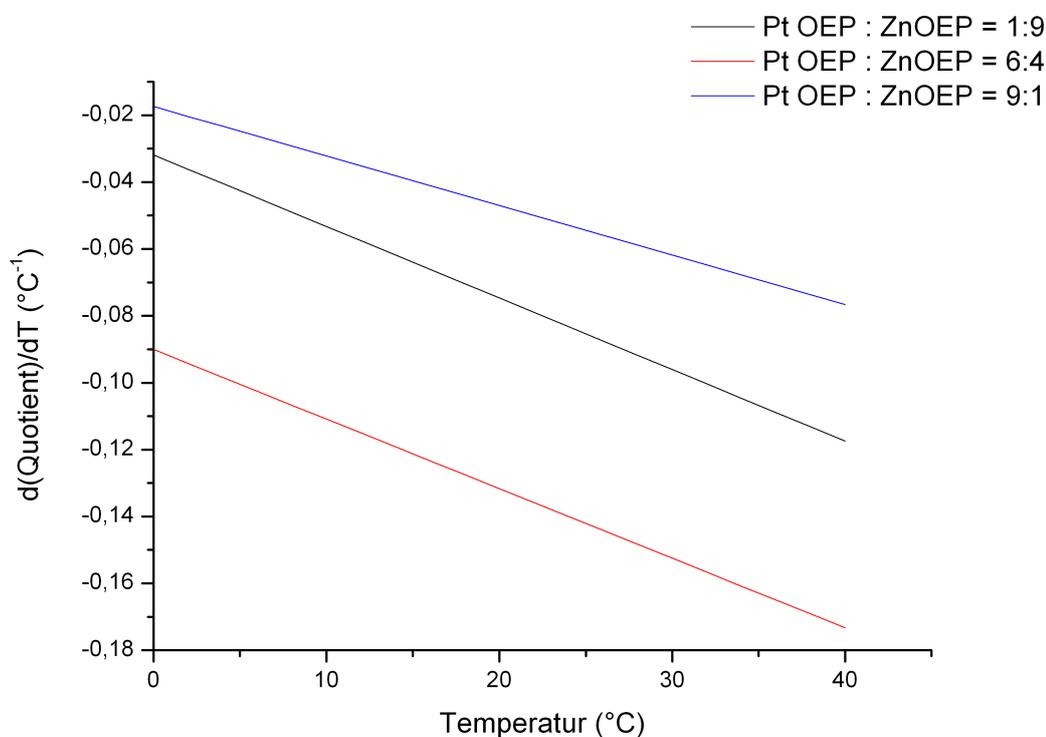


Abbildung 4.10: Empfindlichkeit des Signalquotienten gegenüber der Temperatur für Patches mit dem Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 1:9, 6:4 und 9:1

Für alle Farbstoffzusammensetzungen gilt, dass die Temperaturempfindlichkeit des Signalquotienten mit steigender Temperatur zunimmt. Vergleicht man die Empfindlichkeit der Signalquotienten der verschiedenen Patches, lässt sich feststellen, dass die Empfindlichkeit mit steigendem Anteil von PtOEP zunächst zunimmt, bei einer Zusammensetzung von PtOEP : ZnOEP von 6:4 ein Maximum durchläuft und dann mit steigendem Anteil von PtOEP wieder abnimmt. Für die weiteren Messungen werden daher Patches mit einer Zusammensetzung von PtOEP zu ZnOEP von 6:4 verwendet.

### 4.4.3 Zusammenfassung

Es wurden verschiedene Farbstoffmischungen in PSU und Epoxidharz immobilisiert und die Abhängigkeit der Lumineszenzsignale von Sauerstoffgehalt und Temperatur untersucht. Das Messsignal zeigt bei allen Mischungen eine hohe Abhängigkeit sowohl vom Sauerstoffgehalt als auch von der Temperatur, während das Referenzsignal kaum von der Temperatur und nur bei geringem Sauerstoffgehalt von diesem beeinflusst wird. Der Quotient aus Messsignal und Referenzsignal ist bei allen Mischungen mit steigender Temperatur bzw. steigendem Sauerstoffgehalt monoton fallend, so dass jedem Quotienten eindeutig eine Temperatur bzw. ein Sauerstoffgehalt zugeordnet werden kann. Ratiometrische Messungen mit den Farbstoffmischungen sind also möglich.

Die Abhängigkeit des Quotienten von der Temperatur und dem Sauerstoffgehalt konnte mathematisch beschrieben werden. Für die Beschreibung der Sauerstoffabhängigkeit ist die Bestimmung von zwei Parametern notwendig, für die Beschreibung der Temperaturabhängigkeit müssen drei Parameter bestimmt werden. Um die Empfindlichkeit der Signalquotienten der verschiedenen Farbstoffmischungen miteinander vergleichen zu können, wurden die Ableitungen des Quotienten nach der Temperatur bzw. nach dem Sauerstoffgehalt gebildet. Die größte Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff wies der Signalquotient der Farbstoffmischung mit einem Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 7:3 auf, gegenüber der Temperatur zeigte der Signalquotient der Farbstoffmischung mit einem Verhältnis von PtOEP zu ZnOEP von 6:4 die größte Empfindlichkeit. Die weiteren Messungen werden daher mit Farbstoffmischungen mit diesen Verhältnissen durchgeführt.

## 4.5 Sauerstoffmessung bei unterschiedlichen Temperaturen

Die Sauerstoffmessung mit optischen Sensoren ist temperaturabhängig. Dies liegt zum Einen daran, dass sich die Löslichkeit des Sauerstoffs mit der Temperatur ändert, zum Anderen an der Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz. Sofern der Einfluss der Temperatur auf das Messsignal und auch die Temperatur selbst bekannt sind, lässt sich der Sauerstoffgehalt auch bei nicht konstanter Temperatur messen. Da mit dem hier beschriebenen Sensorsystem neben dem Sauerstoffgehalt auch die Temperatur optisch gemessen werden kann, eignet es sich besonders zur temperaturunabhängigen Sauerstoffmessung bei biotechnologischen Prozessen. Im Folgenden wird der Temperatureinfluss auf die Messsignale der Sauerstoffmessung untersucht. Außerdem werden die Berechnungen zur Messung des Sauerstoffgehaltes bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt.

### 4.5.1 Einfluss der Temperatur auf die Messung des Sauerstoffgehaltes

Um den Einfluss der Temperatur auf die Messung des Sauerstoffgehaltes zu bestimmen, werden die Fluoreszenzsignale der in PSU immobilisierten Farbstoffmischung in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Sauerstoffgehalt gemessen. Hierzu wird zunächst bei konstanter Temperatur ein Sauerstoff-Stufenprofil durchlaufen. Dies wird für verschiedene Temperaturen wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Messwerte sind hierbei durch die Punkte wiedergegeben, während die Linien berechnet wurden. Die Berechnungen werden im Folgenden erläutert.

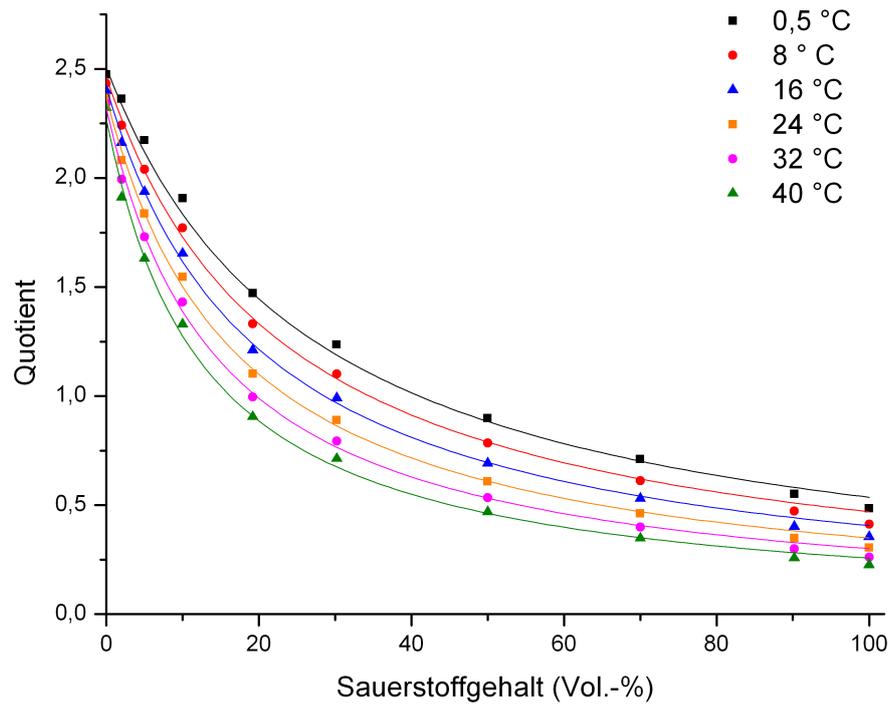


Abbildung 4.11: Abhängigkeit des Signalquotienten vom Sauerstoffgehalt bei verschiedenen Temperaturen

Wie in Abschnitt 4.4 erwähnt, lässt sich die Sauerstoffabhängigkeit des Quotienten mit Funktionen gemäß 4.1 beschreiben. Die Parameter  $a$  und  $b$  wurden für die einzelnen Temperaturen bestimmt, in Abbildung 4.12 sind sie in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Die Temperaturabhängigkeit der Parameter lässt sich beschreiben durch

$$a = c + d \cdot T \quad (4.3)$$

und

$$b = c' \cdot e^{d' \cdot T} \quad (4.4)$$

Die in Abbildung 4.12 dargestellten Linien wurden mit Hilfe dieser Gleichungen berechnet, während die Punkte den Werten entsprechen, die durch das Anpassen von Gleichung 4.1 an die Messwerte für die verschiedenen Temperaturen erhalten wurden.

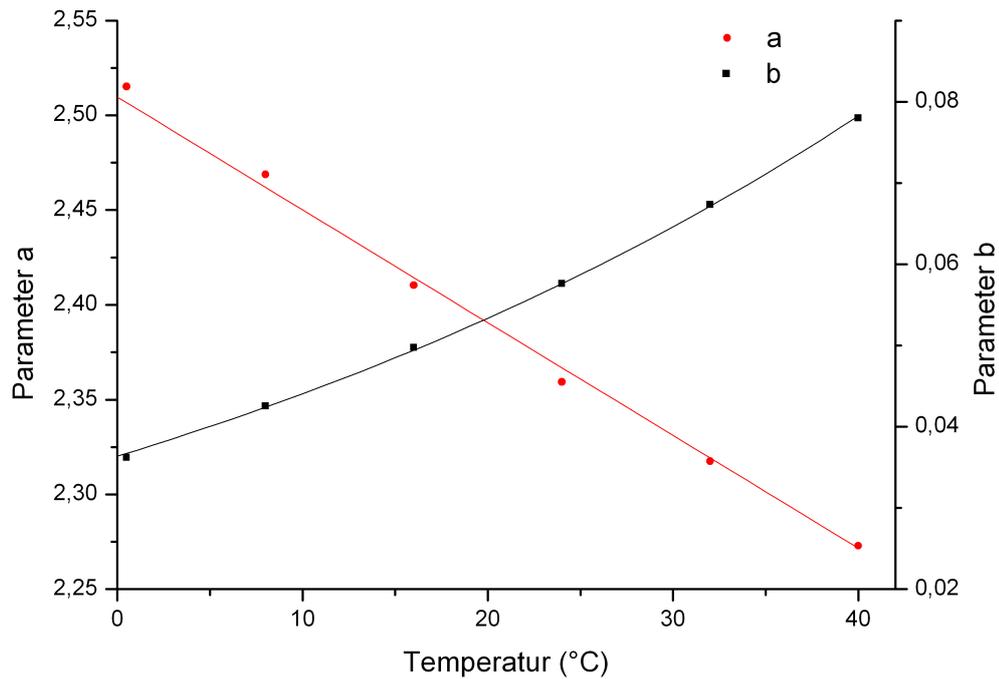


Abbildung 4.12: Temperaturabhängigkeit der Parameter a und b

Fasst man die Gleichungen 4.1, 4.3 und 4.4 zusammen, erhält man einen Ausdruck für den Signalquotienten in Abhängigkeit von Sauerstoffgehalt und Temperatur:

$$Q = \frac{c + d \cdot T}{1 + c' \cdot e^{d' \cdot T} \cdot [O_2]} \quad (4.5)$$

Mit dieser Gleichung wurden die Kurven in Abbildung 4.11 berechnet. Man erkennt eine gute Übereinstimmung mit den Messwerten. Die Abweichung zwischen berechnetem und gemessenem Wert nimmt mit steigendem Sauerstoffgehalt zu, der Temperatureinfluss auf die Abweichung ist zu vernachlässigen. Bei einem Sauerstoffgehalt von bis zu 50 % ist die Abweichung für alle Temperaturen kleiner als 0,5 % des Messwertes, bei einem Sauerstoffgehalt von 70 % steigt sie leicht an auf bis zu 1,3 %. Bei weiter steigendem Sauerstoffgehalt nimmt sie rapide zu. So liegt sie bei einem Sauerstoffgehalt von 90 % bei 6-10 % und in reinem Sauerstoff bei 13-18 %.

### 4.5.2 Kalibration der Sensorpatches

In Abschnitt 4.5.1 wurden die Parameter unter Einbeziehung aller Messwerte erhalten. Bei späterem Gebrauch der Patches ist es aber nicht praktikabel so viele Messwerte bestimmen zu müssen, um die Parameter berechnen zu können. Statt-

dessen wird eine Kalibration vorgenommen, die mit möglichst wenigen Kalibrationspunkten auskommen soll. Da Gleichung 4.5 vier zu bestimmende Parameter enthält, müssen mindestens vier Kalibrationspunkte aufgenommen werden, wobei sowohl die Temperatur als auch der Sauerstoffgehalt variieren müssen. Am einfachsten in der Durchführung ist hierbei die Kalibration mit Stickstoff und Luft bei zwei unterschiedlichen Temperaturen. Um die optimalen Kalibrationstemperaturen zu ermitteln, wurde die Fisher-Informationsmatrix auf die Gleichungen 4.3 und 4.4 angewendet. Die Kalibrationsbedingungen sind demnach optimal, wenn die beiden Temperaturen möglichst weit auseinander liegen.

Tabelle 4.1 zeigt die aus den Kalibrationswerten berechneten Parameter für den Signalquotienten des Patches, der auch für die in Abschnitt 4.5.1 dargestellten Messungen verwendet wurde, im Vergleich zu den durch Anpassung der Gleichungen an die Messwerte berechneten Parametern (vgl. Abschnitt 4.5.1). Zur Berechnung der Parameter wurden die Messwerte bei 0 % und 19,8 % Sauerstoff und 0,5°C und 40°C verwendet. Die Werte für die Parameter  $c$  und  $c'$  stimmen sehr gut überein, die Abweichung beträgt lediglich 1,4 % bzw. 4,3 %, während die Werte für die Parameter  $d$  und  $d'$  um 35 % bzw. 10 % abweichen.

Tabelle 4.1: Parameter  $c$ ,  $d$ ,  $c'$  und  $d'$ , links aus Kalibrationswerten berechnet, rechts durch Anpassung von Gleichungen an die Messwerte, wie in Abschnitt 4.5 beschrieben

	berechnet mit Kalibrationswerten	berechnet durch Anpassen der Gleichungen	Abweichung (%)
$c$	2,4747	2,50962	1,39
$d$	-0,00383	-0,00592	35,30
$c'$	0,03507	0,03628	3,34
$d'$	0,02108	0,01915	10,08

Um die Güte der Kalibration beurteilen zu können, ist ein Vergleich dieser Werte nicht ausreichend. Stattdessen müssen die Messwerte mit den Kurven verglichen werden, die sich mit Hilfe der durch die Kalibration bestimmten Parameter berechnen lassen (Abbildung 4.13).

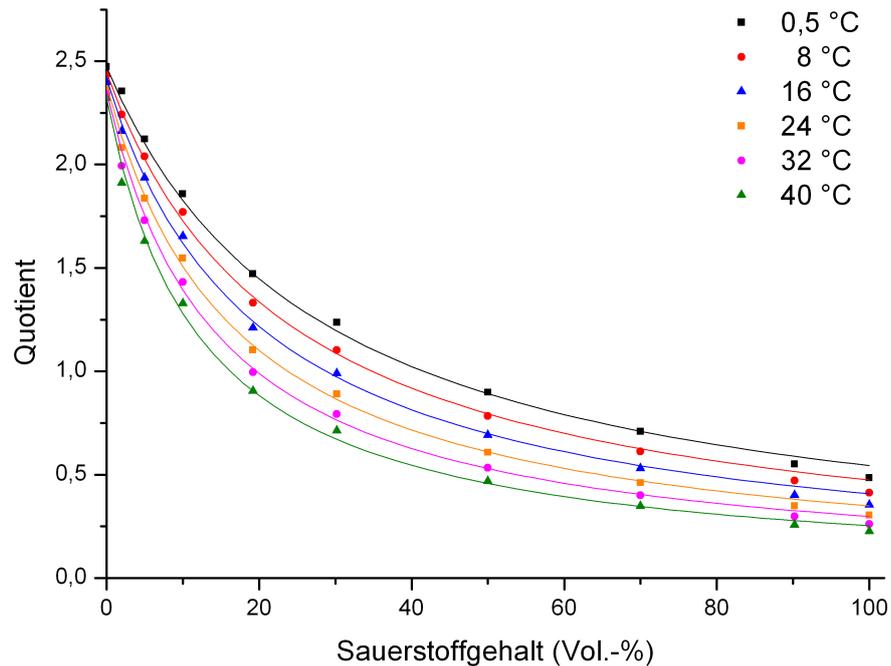


Abbildung 4.13: Sauerstoffabhängigkeit des Signalquotienten vom Sauerstoffgehalt bei verschiedenen Temperaturen; Punkte: Messwerte; Linien: berechnet mit Hilfe der durch Kalibration erhaltenen Parameter

Die berechneten Kurven geben den Verlauf der Messwerte gut wieder. Der Sauerstoffgehalt, den man ausgehend von diesen Messwerten mit Hilfe der Kalibrationsparameter erhalten würde, weicht in den meisten Fällen weniger als 5 % vom eingestellten Wert ab. Eine Ausnahme bilden die Messwerte bei sehr hohem Sauerstoffgehalt. Der Fehler der Messwerte bei 90 % und 100 % Sauerstoffgehalt liegt zwischen 8 % und 20 %.

### 4.5.3 Zusammenfassung

Es wurden Messungen mit variierendem Sauerstoffgehalt bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Gleichung 4.1 wurde an die Messwerte der einzelnen Messungen angepasst. Die so erhaltenen Parameter  $a$  und  $b$  wurden für die einzelnen Temperaturen bestimmt und die Temperaturabhängigkeit dieser Parameter wurde untersucht. Während Parameter  $a$  linear von der Temperatur abhängt, lässt sich die Temperaturabhängigkeit von Parameter  $b$  über eine Exponentialfunktion ausdrücken. Zur Beschreibung des Temperatureinfluss auf die Parameter  $a$  und  $b$  sind jeweils zwei Parameter notwendig, so dass man zur Beschreibung der Abhängigkeit des Signalquotienten von Temperatur und Sauerstoffgehalt einen Ausdruck mit vier

Unbekannten erhält.

Vor der Verwendung eines neuen Sensorpatches müssen diese vier Unbekannten bestimmt werden. Hierzu werden Kalibrationsmessungen bei je zwei unterschiedlichen Temperaturen und Sauerstoffgehalten gemacht. Die so erhaltenen Kalibrationskurven geben die Messwerte bis auf 5 % des Absolutwertes genau wieder, größere Abweichungen treten auf, wenn der Sauerstoffgehalt über 70 % beträgt. Da in der Praxis normalerweise aber mit Luft und nicht mit reinem Sauerstoff begast wird, ist die Genauigkeit äußerst zufriedenstellend.

## 4.6 Beurteilung des Sensors

Die in Abschnitt 4.4 beschriebenen Messungen zeigen, dass eine eindeutige Zuordnung des Signalquotienten zu den Messparametern (Sauerstoff bzw. Temperatur) möglich ist. Um diese Abhängigkeit für einen Sensor nutzen zu können, müssen aber noch weitere Kriterien zutreffen. So müssen Langzeitstabilität und die Reproduzierbarkeit des Signals überprüft werden, auch die Ansprechzeit muss innerhalb eines für die Anwendung sinnvollen Bereiches liegen. Da der Sensor für Messungen im Bereich Kultivierung eingesetzt werden soll, ist es außerdem notwendig, dass die Patches autoklavierbar sind und dass Messungen in flüssiger Phase durchgeführt werden können.

### 4.6.1 Langzeitstabilität

Ein Nachteil vieler fluoreszenzbasierter Sensoren ist das Ausbleichen des Farbstoffs und damit eine Drift des Signals. Durch die ratiometrische Messung soll diese verhindert werden. Um zu überprüfen, ob der Signalquotient trotz Ausbleichens des Farbstoffs konstant bleibt, werden die Fluoreszenzsignale eines Patches während des Durchfahrens eines Stufenprofils gemessen. Diese Messung wird dreimal wiederholt. Zwischen den Messungen werden mit einer Frequenz von 10 Hz Messwerte aufgenommen, um so eine Langzeitnutzung zu simulieren (im Folgenden Beleuchtung genannt), nach der ersten Messung für 30 min, nach der zweiten Messung für weitere 60 min. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 dargestellt.

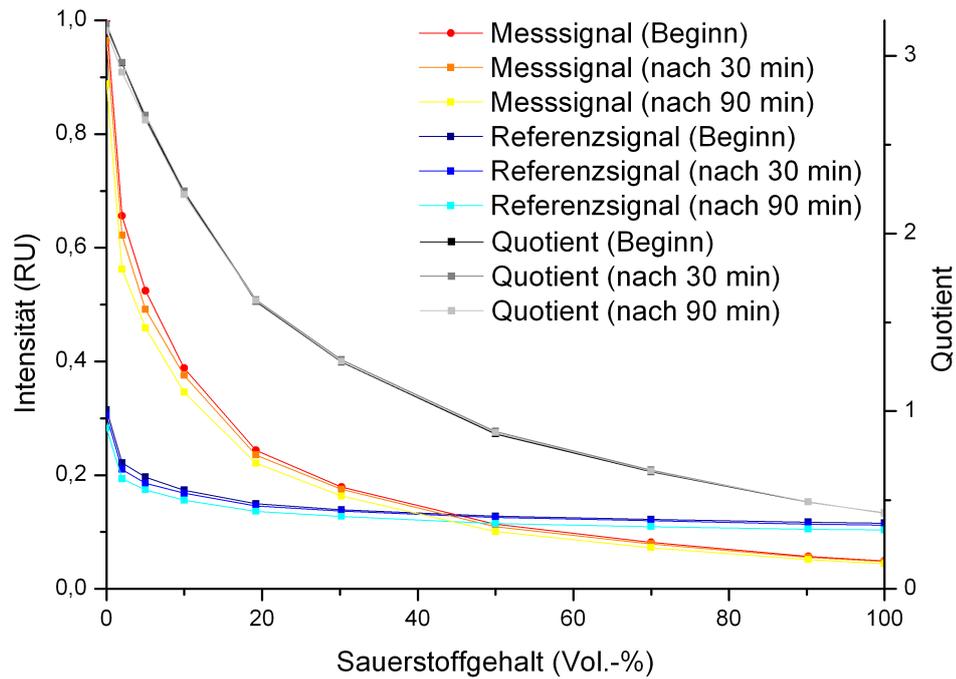


Abbildung 4.14: Signale und Signalquotient vor Simulation einer Langzeitnutzung, nach 30 min Beleuchtung und nach 90 min Beleuchtung

Die Intensität der beiden Signale nimmt nach jeder Beleuchtungsphase merklich ab, der Signalquotient wird dadurch aber nicht beeinflusst. Die drei Kurven der drei Messungen sind nahezu identisch. Damit ist bewiesen, dass durch die interne Referenzierung ein von der absoluten Intensität der Fluoreszenzsignale unabhängiges Messsignal erreicht wird.

#### 4.6.2 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Messwerte zu testen, wird die Messzelle abwechselnd mit Stickstoff und Druckluft für jeweils 15 min durchspült. Als Referenzsensor dient der ebenfalls faseroptische Sensor Fibox 3 (PreSens, Regensburg). In Abbildung 4.15 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt.

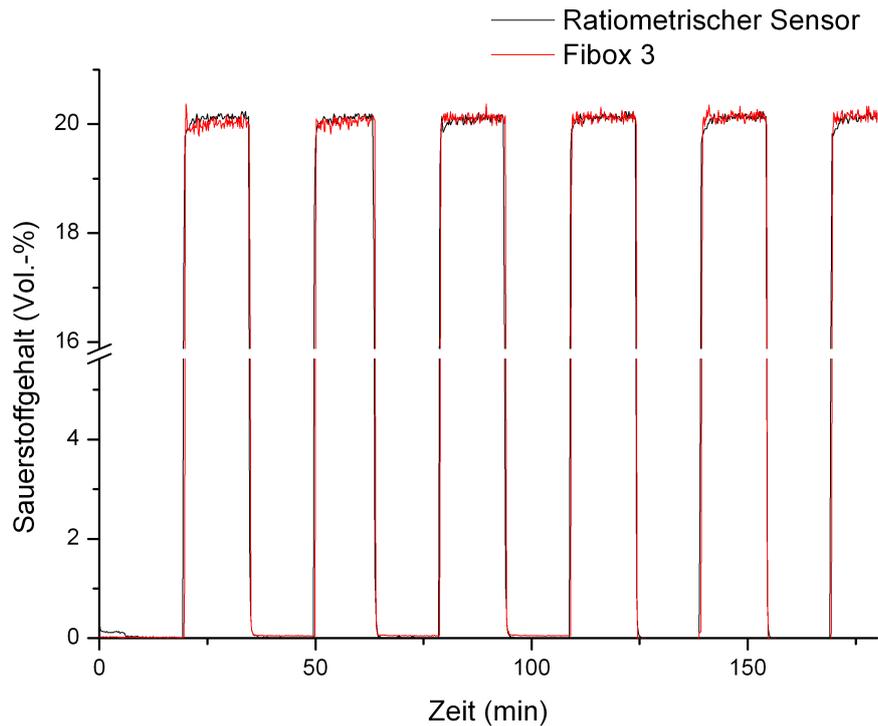


Abbildung 4.15: Sauerstoffgehalt bei Messung abwechselnd in Stickstoff und Luft, gemessen mit dem ratiometrischen Sensor und Fibox 3 (PreSens, Regensburg)

Der Verlauf beider Messkurven ist nahezu identisch. Bei Messungen in Stickstoff geben beide Sensoren Werte zwischen 0,01 Vol.-% und 0,05 Vol.-% Sauerstoff an. Bei Messung in 20 Vol.-% Sauerstoff ist die Streuung der Messwerte größer, was an der geringeren Empfindlichkeit bei höherem Sauerstoffgehalt liegt. Die Messwerte beider Sensoren schwanken zwischen 19,8 Vol.-% und 20,2 Vol.-%, zwischen den einzelnen Begasungszyklen ist kein nennenswerter Unterschied zu erkennen. Eine sehr gute Reproduzierbarkeit ist also gegeben.

### 4.6.3 Stabilität gegenüber Heißdampfsterilisation

Für den Einsatz bei Kultivierungen ist es notwendig, dass die Sensorpatches sterilisierbar sind. Als Standardmethode wird hierfür die Heißdampfsterilisation genutzt. Eine Variante der Heißdampfsterilisation ist das Autoklavieren. Dabei werden die zu sterilisierenden Geräte für 20 min auf 121 °C bei einem Druck von 2 bar in Wasserdampf Atmosphäre erhitzt. Um zu überprüfen, ob die Sensorpatches dies unbeschadet überstehen, werden wiederum die beiden Lumineszenzsignale bei Durchfahren eines Stufenprofils gemessen. Nach der Messung werden die Patches autoklaviert und die Messung wird wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

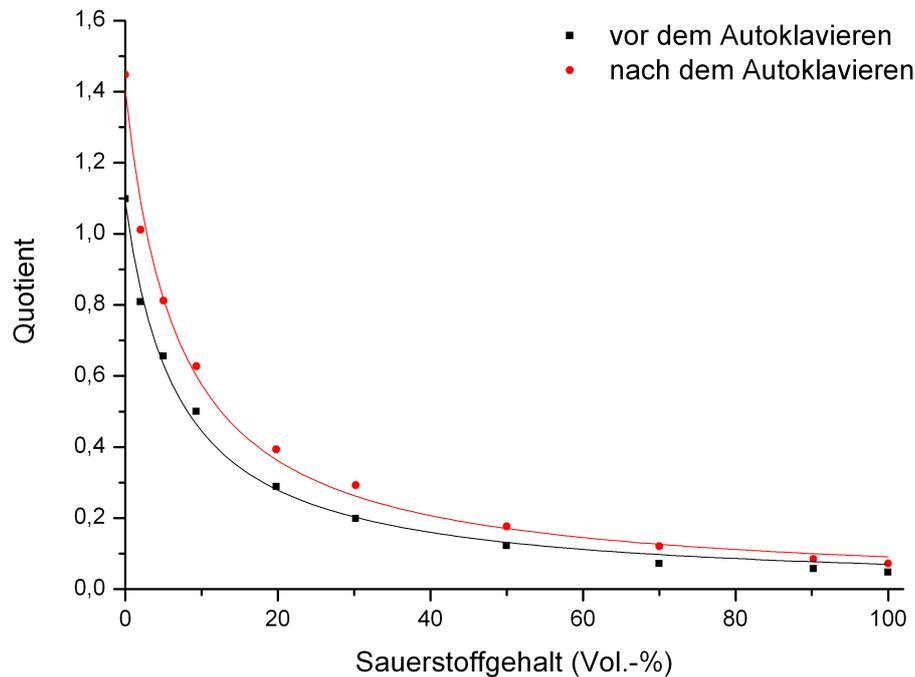


Abbildung 4.16: Signalquotient in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt vor und nach Autoklavieren

Die Messkurve lässt sich auch nach dem Autoklavieren mit Gleichung 4.1 beschreiben, wie in Abbildung 4.16 zu sehen. Die Kurve wurde mit Hilfe von Kalibrationswerten berechnet, während die Punkte die Messwerte darstellen. Zwar weichen die beiden Messkurven deutlich voneinander ab, dies ist aber auch der Fall, wenn die Glasfaser aus der Messzelle entfernt und neu eingesetzt wird, ohne dass der Sensorpatch autoklaviert wird. Auch weitere Autoklavievorgänge hatten keinen negativen Einfluss auf die Messkurven.

#### 4.6.4 Adaption an die flüssige Phase

Der Einsatzbereich des Sensors soll in der Kultivierung liegen, daher müssen Messungen in der Kulturbrühe, also in der flüssigen Phase, durchgeführt werden. Um zu überprüfen, ob die Abhängigkeit des Signals von Temperatur und Sauerstoff auch hier gegeben ist, werden Messungen in deionisiertem Wasser durchgeführt, welches mit Gasmischungen mit unterschiedlichem Sauerstoffanteil begast wird. Abbildung 4.17 zeigt die gemessenen Signalquotienten in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt (angegeben in % Sauerstoffsättigung) bei verschiedenen Temperaturen. Die Kalibration wird wie in Abschnitt 4.5.2 beschrieben durchgeführt, mit den berechneten Parametern werden die in der Abbildung 4.17 dargestellten Kurven berechnet.

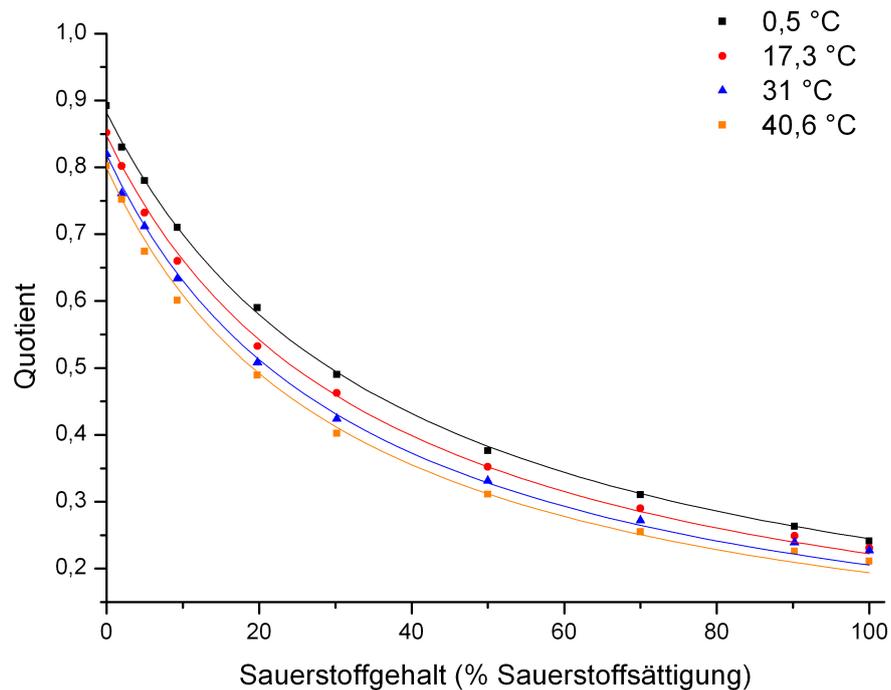


Abbildung 4.17: Signalquotienten in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt bei verschiedenen Temperaturen in deionisiertem Wasser

Die Kurven geben den Verlauf der Messwerte gut wieder. Die Abweichung zwischen tatsächlichem und aus den Messwerten berechnetem Sauerstoffgehalt ist ähnlich wie bei Messungen in der Gasphase (vgl. Kapitel 4.5.2). Sie liegt bei sehr niedrigem Sauerstoffgehalt (2 % Sauerstoffsättigung) zwischen 8 % und 20 %, bei einer Sauerstoffsättigung zwischen 5 % und 90 % liegt sie unter 7 %. Einzig bei einem sehr hohen Sauerstoffgehalt (Sauerstoffsättigung > 90 %) sind die Fehler deutlich größer als bei Messungen in der Gasphase, sie liegen bei bis zu 35 %. Die Messwerte lassen sich also mit derselben Funktion wie die Messungen in der Gasphase beschreiben. Allerdings verlaufen die Kurven deutlich flacher, als die in der Gasphase aufgenommenen Messkurven, wodurch eine geringere Empfindlichkeit gegeben ist.

#### 4.6.5 Ansprechzeit

Die Messung der Ansprechzeit des Sensors erfolgt wiederum durch manuelles Umschalten zwischen einer mit Druckluft begasten Lösung und einer mit Stickstoff begasten Lösung (vgl. Abschnitt 3.2). Als Referenzsensor dient der faseroptische Sensor Fi-box 3 (PreSens, Regensburg). Die erhaltenen Messkurven sind in Abbildung 4.18 dargestellt, die daraus ermittelten  $t_{90}$ -Zeiten sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

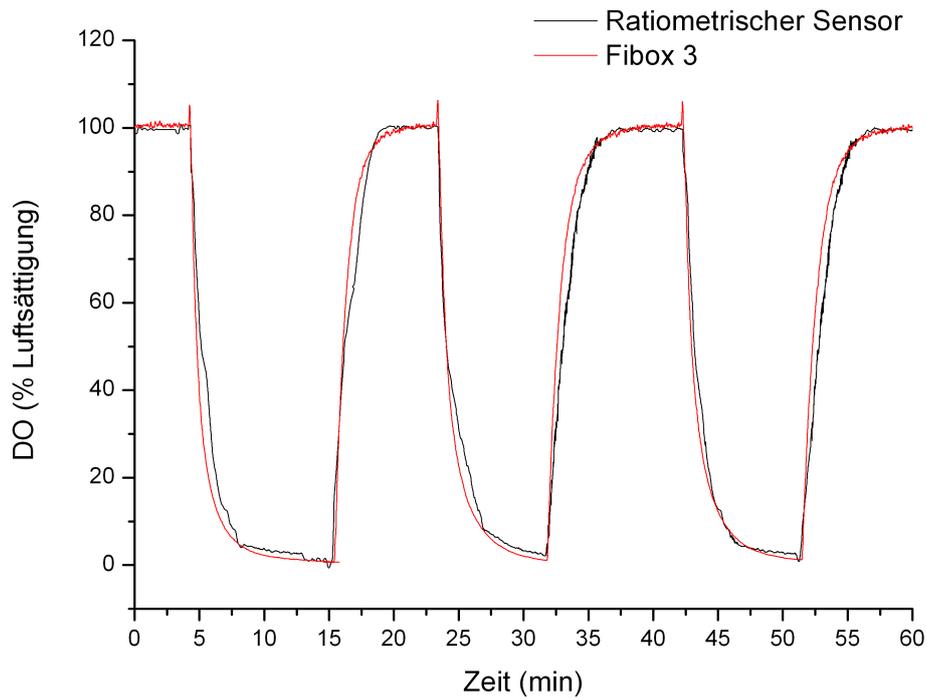


Abbildung 4.18: Messkurven des ratiometrischen Sensors und der Fibox 3, erhalten bei manuellem Umsetzen der Sensoren zwischen mit Stickstoff und Druckluft begastem Wasser

Tabelle 4.2:  $t_{90}$ -Zeiten der eingesetzten Sensoren, gemessen bei manuellem Umsetzen der Sensoren zwischen mit Stickstoff und Druckluft begastem Lösungen

ansteigender Sauerstoffgehalt		abfallender Sauerstoffgehalt	
ratiometrischer Sensor	Fibox	ratiometrischer Sensor	Fibox 3
[min]	[min]	[min]	[min]
2,57	2,17	2,95	2,42
3,08	2,53	3,42	3,07
3,17	2,72	3,12	3,15

Es fällt auf, dass die Messkurven des Fibox 3 gleichmäßiger verlaufen als die des ratiometrischen Sensors. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Sensorpatches des ratiometrischen Sensors bedingt durch die manuelle Fertigung Inhomogenitäten aufweisen. Dies führt zu unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten von Sauerstoff innerhalb des Patches und dadurch zu einer inhomogenen Sauerstoffverteilung.

Die ermittelten  $t_{90}$ -Zeiten des ratiometrischen Sensors liegen zwischen 2,5 min und 3,2 min bei ansteigendem Sauerstoffgehalt und zwischen 2,9 min und 3,5 min bei abfallendem Sauerstoffgehalt. Die  $t_{90}$ -Zeiten des Fibox 3 liegen etwa 0,4-0,5 min bzw.

10 - 15 % unter denen des ratiometrischen Sensors. Messungen mit anderen Sensorpatches zeigen eine starke Varianz der Ansprechzeiten des ratiometrischen Sensors, während die Abweichungen der Ansprechzeiten, die mit verschiedenen Sensorpatches der Firma PreSens gemessen wurden, etwa so groß sind wie die Abweichungen verschiedener Messungen mit demselben Patch. Bei einigen Sensorpatches werden mit dem ratiometrischen Sensor Ansprechzeiten ähnlich denen des Fibox 3 gemessen, bei anderen liegen sie bis zu 50 % über diesen. Der Grund hierfür ist wiederum in der manuellen Fertigung zu finden. Die Schichtdicke der Sensorpatches variiert von Patch zu Patch ein wenig. Eine größere Schichtdicke führt zu einer längeren Ansprechzeit, da der Sauerstoff zunächst in den Patch hinein diffundieren muss, damit die durch ihn verursachten Löschungseffekte detektierbar werden.

### 4.6.6 Zusammenfassung

Der ratiometrische Sensor wurde bezüglich Langzeitstabilität, Reproduzierbarkeit, Stabilität gegenüber Heißdampfsterilisation und Ansprechzeit charakterisiert. Außerdem wurde überprüft, ob Messungen mit dem System auch in wässriger Phase möglich sind und ob die mathematische Beschreibung der Signale, die für die Gasphase gefunden wurde, auch hier gültig ist.

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität des Signals wurden Messungen während Durchfahrens eines Sauerstoffstufenprofils durchgeführt, zwischen den Messungen wurden die Sensorpatches für einige Zeit beleuchtet. Durch diese Beleuchtung wurden zwar die beiden Lumineszenzsignale gebleicht, auf den Signalquotienten hatte dies aber keinen Einfluss. Er zeigte bei allen Messungen einen nahezu identischen Verlauf.

Um die Reproduzierbarkeit der Messwerte beurteilen zu können, wurde die Gasdurchflusskammer abwechselnd mit Stickstoff und Luft gespült. Während der verschiedenen Zyklen wurden nahezu identische Werte erhalten. Auch im Vergleich zu dem Referenzsensor konnte keine Abweichung beobachtet werden. Eine gute Reproduzierbarkeit ist also gegeben.

Die Stabilität gegenüber Heißdampfsterilisation wurde untersucht, indem zunächst die Abhängigkeit des Signalquotienten vom Sauerstoffgehalt für einen bestimmten Patch gemessen wurde. Dieser Patch wurde dann autoklaviert, danach wurde die Messung wiederholt. Es zeigte sich zwar ein Unterschied zwischen der Messung vor und der Messung nach der Heißdampfsterilisation, aber die Messkurve ließ sich weiterhin unter Verwendung derselben Gleichung beschreiben. Es ist also nach der Heißdampfsterilisation eine neue Kalibration nötig.

Vor der Bestimmung der Ansprechzeit erfolgte zunächst die Adaption an die flüssige Phase. Die Messungen erfolgten in deionisiertem Wasser, das mit Gasen mit variierender Sauerstoffkonzentration begast wurde. Analog zu den Untersuchungen in der Gasphase wurden die Messungen bei verschiedenen Temperaturen wiederholt. Die Abweichungen der Messwerte von den tatsächlichen Werten lag unwesentlich höher als in der Gasphase. Messungen sind mit dem Sensorsystem in der flüssigen Phase also unter Verwendung derselben Berechnungen wie in der Gasphase möglich.

Die Analyse der Ansprechzeiten des ratiometrischen Sensors zeigte eine große Varianz der Ansprechzeiten verschiedener Patches. Der Grund liegt in der Herstellung. Sie erfolgt manuell, wodurch es zu Abweichungen in der Schichtdicke kommen kann, die sich auf die Ansprechzeiten auswirken. Eine maschinelle Herstellung der Patches würde zu einheitlicheren Ergebnissen führen, dann könnte auch eine Optimierung der Schichtdicke erfolgen.

## 4.7 Einsatz des Sensorsystems

Das Sensorsystem wurde bei zwei unterschiedlichen Modell-Kultivierungen angewendet, bei der Kultivierung der Knochenvorläuferzelllinie MG-63 und bei der Kultivierung des Hefestammes *Kluyveromyces marxianus*. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

### 4.7.1 Kultivierung von MG-63

Die Kultivierung der Knochenvorläuferzelllinie MG-63 erfolgt in flexiblen Silikon-schalen. Diese werden in Stimulationsmaschinen (Abbildung 4.19, [59]) eingespannt und um 5 % mit einer Frequenz von 1 Hz zyklisch gedehnt. Die Knochenvorläuferzelle wurde als Modellzelllinie gewählt, da die Kultivierung zum Einen in kleinen Volumina (4 mL) erfolgt, so dass die Sauerstoffmessung mit konventionellen Methoden hier nicht möglich ist. Zum Anderen erschwert auch die Dehnung der Silikonschale die Anwendung beispielsweise einer Clark-Elektrode.

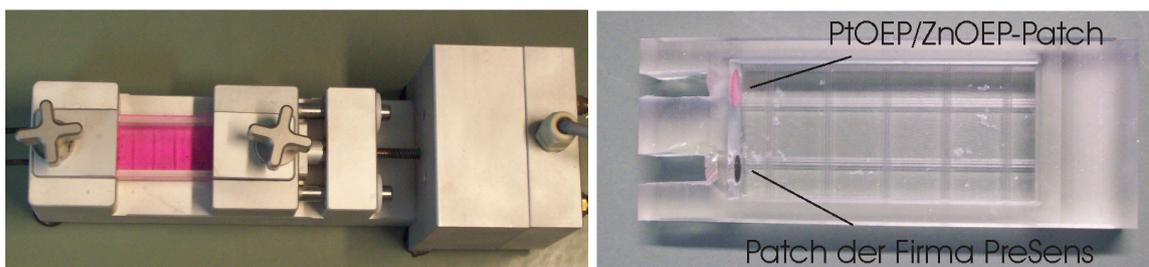


Abbildung 4.19: links: Stimulationsmaschine mit eingespannter Silikon-schale, rechts: Silikon-schale mit Sensorpatches

Während der Kultivierung werden die Zellen dreimal für 4 h mechanisch stimuliert, wobei zwischen jeder Stimulation eine Pause von acht Stunden liegt. Durch die mechanische Reizung der Zellen soll die osteogene Differenzierung gefördert werden [60]. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C und 5 Vol.-% CO<sub>2</sub> in der umgebenden Atmosphäre. Die Messung des Sauerstoffgehaltes erfolgte mit dem ratiometrischen Sensor und der Fibox 3 (PreSens). Die beiden Patches wurden mit Silikonkleber (Elastosil® RT 601, Wacker Chemie AG, München) in der Schale befestigt. Abbildung 4.20 zeigt die bei der Kultivierung erhaltenen Messkurven im Vergleich.

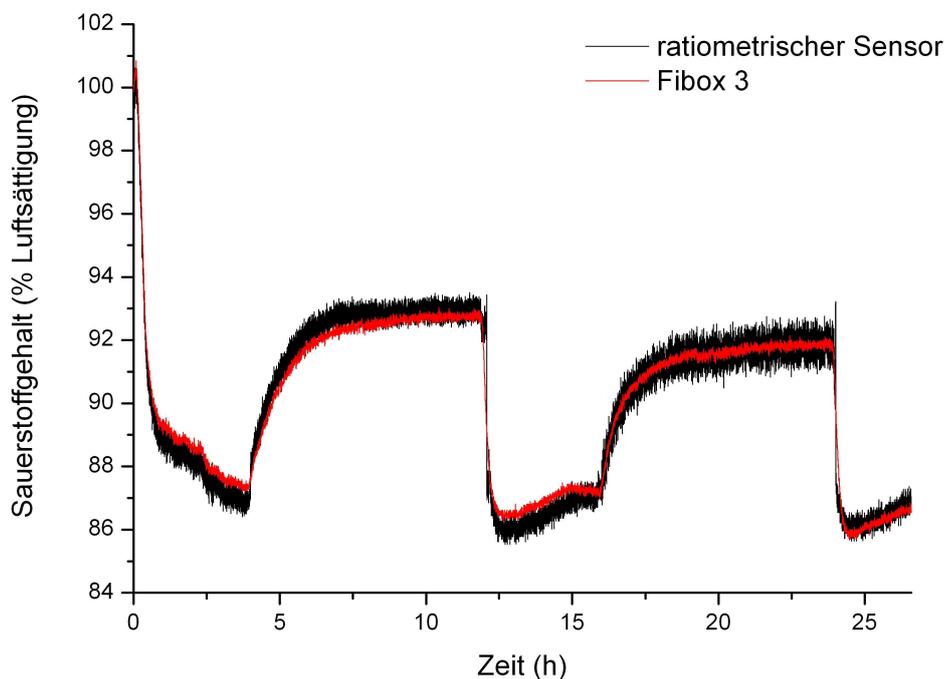


Abbildung 4.20: Verlauf des Sauerstoffgehaltes bei der Kultivierung von MG-63, gemessen mit dem ratiometrischen Sensor und der Fibox 3 (PreSens)

Der Verlauf beider Messkurven ist sehr ähnlich. Während der Stimulationsphasen lässt sich ein Absinken des Sauerstoffgehaltes beobachten, während der Pausen ein Anstieg. Dies lässt auf einen erhöhten Sauerstoffverbrauch der Zellen während der Stimulationsphasen schließen. Das Rauschen des Signals des ratiometrischen Sensors ist stärker als das des Referenzsensors. Durch Verwendung eines geeigneten mathematischen Filters kann dieses Rauschen verringert werden. Es wurden ein Median- und ein Mittelwertfilter auf die Messkurven angewandt. In Abschnitt 6.4.3.4 werden die verwendeten Filter näher beschrieben. Die gefilterten Kurven sind in Abbildung 4.21 im Vergleich zur Originalkurve dargestellt.

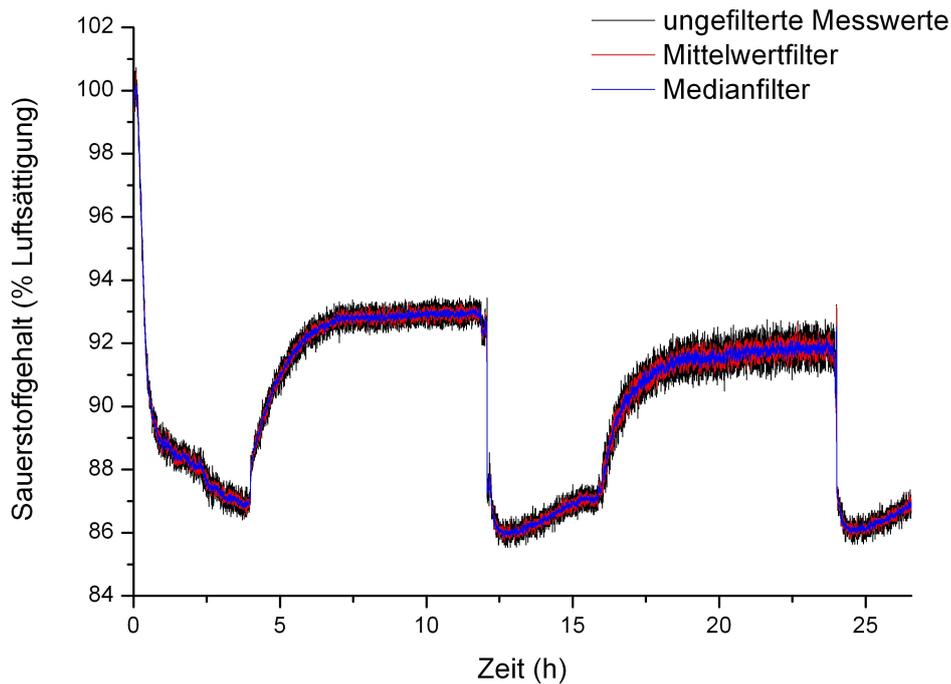


Abbildung 4.21: Verlauf des Sauerstoffgehaltes bei der Kultivierung von MG-63, Originalmesskurve des ratiometrischen Sensors im Vergleich zu zwei gefilterten Messkurven, verwendet wurden ein Median- und ein Mittelwertfilter, Fensterbreite jeweils fünf Messwerte

Beide Filter vermindern das Rauschen erheblich, ohne dass Informationen verloren werden. Die unter Verwendung des Mittelwertfilters erhaltene Kurve weist ein geringeres Rauschen auf, als die unter Verwendung des Medianfilters erhaltene Messkurve. Erhöht man die Fensterbreite der Filter, erhält man Kurven mit ähnlich starkem Rauschen, eine weitere Verminderung des Rauschen ließen sich nur mit einer sehr viel größeren Fensterbreite erreichen, was zu einem Verlust von Information führt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Messung des Sauerstoffgehaltes während der Kultivierung der Knochenvorläuferzelllinie MG-63 mit dem ratiometrischen Sensor ist also unter Verwendung eines geeigneten Filters möglich. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen, die mit dem faseroptischen Sensor der Firma PreSens, Regensburg, erhalten wurden.

#### 4.7.2 Kultivierung von *Kluyveromyces marxianus*

Um ein breites Spektrum abzudecken wurde für die zweite Modell-Kultivierung ein Hefestamm verwendet. Der Hefestamm *Kluyveromyces marxianus* DSM5422 (Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig) wird in einem Biostat A+ kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in teilentzu-

ckertem Molkekonzentrat bei 30 °C, der Sauerstoffgehalt wird vor Beginn auf 50 % Luftsättigung eingestellt. Er wird mit dem ratiometrischen Sensor und einer Clark-Elektrode gemessen, die Temperatur mit dem ratiometrischen Sensor und einem Pt100-Widerstandsthermometer. Abbildung zeigt die bei der Kultivierung erhaltenen Messkurven bis zum Übergang in die anaerobe Kultivierungsphase.

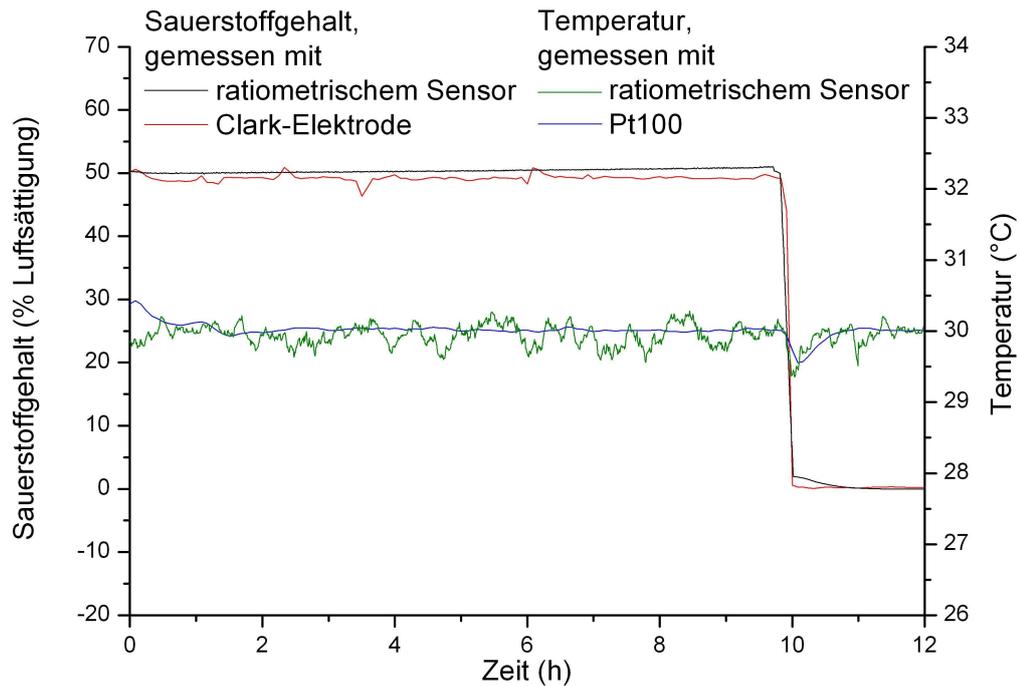


Abbildung 4.22: Verlauf von Sauerstoffgehalt und Temperatur bei Kultivierung von *K. marxianus*, gemessen jeweils mit dem ratiometrischen Sensor und einem Referenzsensor

Die Messwerte der Clark-Elektrode liegen um etwa 0,8 % Luftsättigung unter denen des ratiometrischen Sauerstoffsensors, dies entspricht einer Abweichung von 0,6 % des Absolutwertes. Verglichen mit der in Abschnitt 4.7.1 beschriebenen Messung ist das Signalrauschen des ratiometrischen Sensors erheblich geringer. Dies ist darauf zurückzuführen, dass hier bei geringerem Sauerstoffgehalt gemessen wird und in diesem Bereich die Änderung des Signalquotienten bei Änderung des Sauerstoffgehaltes größer ist (vgl. Abschnitt 4.4). Auf eine Filterung der Messwerte wird daher verzichtet. Das Signal der Clark-Elektrode weist einige Schwankungen auf, während das Signal des ratiometrischen Sensors bis zum Abfall des Sauerstoffgehaltes konstant bleibt. Da nach Beginn der Kultivierung nicht mehr begast wurde, sind Schwankungen des Sauerstoffgehaltes, wie sie von der Clark-Elektrode aufgezeichnet wurden, unwahrscheinlich.

Die Messwerte der Temperaturoptode des ratiometrischen Sensors zeigen ein starkes Rauschen, die gezeigten Werte werden mit einem Mittelwertfilter mit einer Fensterbreite von fünf Werten gefiltert. Dennoch schwanken sie um ca.  $0,5^{\circ}\text{C}$  um den Messwert des Widerstandsthermometers. Leichte Schwankungen der Temperatur, wie sie von dem Widerstandsthermometer bei einer Kultivierungsdauer von 10 h gemessen wurden, lassen sich daher mit dem ratiometrischen Sensor nicht beobachten. Für die Temperaturkorrektur der Sauerstoffmessung ist eine Genauigkeit von  $0,5^{\circ}\text{C}$  aber ausreichend.

### 4.7.3 Zusammenfassung

Der ratiometrische Sensor wurde für Messungen in Kultivierungen eingesetzt. Bei der Kultivierung der Knochenvorläuferzelllinie wurde nur die Sauerstoffoptode eingesetzt, als Referenzsensor dient der Fibox 3 der Firma PreSens. Beide Sensoren liefern einen ähnlichen Kurvenverlauf, allerdings wies das Signal des ratiometrischen Sensors ein starkes Rauschen auf. Dieses Rauschen konnte mit Hilfe von mathematischen Filtern deutlich reduziert werden.

Bei der Kultivierung des Hefestammes wurde dagegen kein starkes Rauschen der Messwerte der Sauerstoffoptode beobachtet. Dies liegt daran, dass hier mit einem geringeren Sauerstoffgehalt gearbeitet wurde. In diesem Bereich ist die Empfindlichkeit des Sensors größer. Die Messwerte der Temperaturoptode zeigen Schwankungen von  $0,5^{\circ}\text{C}$  um den mit einem Widerstandsthermometer gemessenen Wert. Leichte Schwankungen in der Temperatur können mit dem Sensor daher nicht beobachtet werden. Für die Temperaturkorrektur der Sauerstoffmessung ist die Genauigkeit der Temperaturoptode aber ausreichend.

## 4.8 Diskussion und Ausblick

Ein von Fritzsche entwickeltes ratiometrisches Sensorsystem [47] wurde in dieser Arbeit optimiert. Dazu wurden zunächst die Farbstoffzusammensetzungen mit der größten Empfindlichkeit gegenüber der Änderung des Sauerstoffgehaltes bzw. der Temperatur gefunden. Die Abhängigkeit des Messsignals von den Analyten wurde untersucht und mit Hilfe von mathematischen Gleichungen beschrieben. Mit einer Vier-Punkt-Kalibration erreicht man so eine Messgenauigkeit für den Sauerstoffgehalt bei variierender Temperatur von ca. 5 % des Absolutwertes.

Es wurde eine gute Reproduzierbarkeit sowie die Langzeitstabilität des Messsignals und die Stabilität der Patches gegenüber Heißdampfsterilisation nachgewiesen. Die

Untersuchung der Ansprechzeit zeigte große Abweichungen zwischen Messungen mit unterschiedlichen Patches, was auf die manuelle Fertigung zurückzuführen ist. Um eine Optimierung der Ansprechzeit durchführen zu können, muss eine reproduzierbare Herstellung eingeführt werden.

Das Sensorsystem wurde erfolgreich bei ersten Kultivierungen eingesetzt. Bei Messungen bei hohem Sauerstoffgehalt ist es nötig, das Signal digital zu filtern, um so das starke Messrauschen zu reduzieren. Eventuell würde auch der Einsatz anderer Farbstoffmischungen, die eine größere Empfindlichkeit bei hohem Sauerstoffgehalt vorweisen, zu einem weniger stark verrauschtem Messsignal führen. Auch für Messungen bei niedrigem Sauerstoffgehalt könnte man mit einer anderen Farbstoffmischung arbeiten, um eine höhere Messgenauigkeit zu erreichen.

Das Signal der Temperaturoptode weist eine Genauigkeit von  $0,5^{\circ}\text{C}$  auf. Diese ist ausreichend für die Temperaturkorrektur der Sauerstoffmessungen.

# Kapitel 5

## Die Messung der optischen Dichte

Ein weiterer Typ optischer Sensoren sind die photometrischen Sensoren. Sie dienen zur Messung der Veränderung eines Lichtstrahls durch Interaktion mit einer Probe [61]. Dabei sind viele unterschiedliche Einsatzgebiete und Messanordnungen denkbar. So können z.B. Farbreaktionen verschiedenster Analyten gemessen werden. Dies wird z.B. in der Mess- und Regeltechnik in Abwasserbehandlungsanlagen [61] und in der Biotechnologie, beispielsweise zur Bestimmung von Enzymaktivitäten [62], angewendet. Auch die Reinheit von DNA und RNA in Lösung kann auf diese Weise bestimmt werden.

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet optischer Sensoren ist die Trübungsmessung oder Turbidimetrie [63]. Mit diesem Verfahren lässt sich die optische Dichte einer Probe bestimmen, welche mit der Biomasse korreliert. So lassen sich zwar keine genauen Werte für die Biomasse bestimmen, doch kann man durch die Messung der optischen Dichte mit wenig Aufwand den Verlauf einer Kultivierung verfolgen [64]. In den folgenden Abschnitten wird genauer auf die unterschiedlichen Möglichkeiten der Turbidimetrie und auf die Messung der optischen Dichte eingegangen.

### 5.1 Turbidimetrie

Unter Trübung versteht man die durch ungelöste Substanzen verursachte Verringerung der Durchsichtigkeit einer Probe [99]. Das eingestrahlte Licht trifft auf einen Partikel und wird abhängig vom Partikel und vom Winkel des Auftreffens gestreut oder reflektiert [100].

Die Extinktion (oder optische Dichte) ist ein Maß für die Abschwächung der Intensität von Licht in einem Medium. Sie ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus des Transmissionsgrades, der dem Anteil des durchgelassenen Lichts entspricht [65]. Die Abschwächung des Lichtes wird neben Streuung und Reflexion auch

durch Absorption des Lichtes durch Feststoffpartikel verursacht und ist abhängig von der Wellenlänge des Lichtes. Die Abnahme der Lichtintensität bei Durchgang eines Lichtstrahls durch eine Probe lässt sich mit dem Lambert-Beerschen Gesetz beschreiben:

$$E_\lambda = -\lg \frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (5.1)$$

Hierbei ist  $E_\lambda$  die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$ ,  $I$  die Intensität des austretenden und  $I_0$  die Intensität des eintretenden Lichtstrahls [93]. Die Extinktion ist proportional zur Weglänge des Lichts (Schichtdicke  $d$ ) und zur Konzentration  $c$  der Partikel, Proportionalitätsfaktor ist der ebenfalls wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_\lambda$ . Aus dem möglichen Verhalten von Licht bei Auftreffen auf einen Feststoffpartikel ergeben sich unterschiedliche Methoden zur Messung der Trübung. Es kann entweder das gestreute bzw. reflektierte Licht gemessen werden (nephelometrische Messung) oder die Intensität des transmittierten Lichts [99]. Abbildung 5.1 zeigt den Verlauf der Sensorsignale in Abhängigkeit von der Partikelkonzentration.

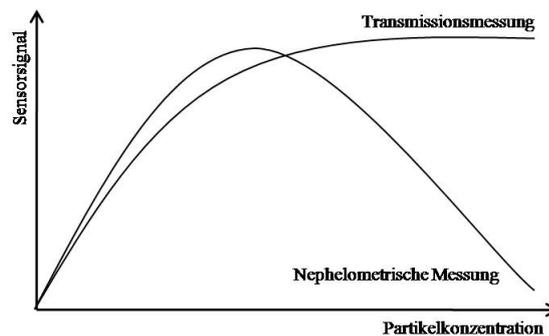


Abbildung 5.1: Verlauf der Messsignale bei Transmissionsmessung und nephelometrischer Messung ( $90^\circ$ ) in Abhängigkeit von der Partikelkonzentration

Streulichtmessungen können prinzipiell mit verschiedenen Winkeln gemessen werden, meist werden sie bei einem Winkel von  $90^\circ$  gemessen [63]. Schwache Trübungen, wie sie z.B. im Bereich der Medizin- oder Nahrungsmittelforschung vorkommen, lassen sich generell durch Transmissionsmessung am besten detektieren [63], stärkere Trübungen (Abwasserreinigung, Bioprozesstechnik) besser durch nephelometrische Messungen [66]. Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Messaufbauten erhalten werden, können nicht direkt miteinander verglichen werden, jede Methode bedarf einer eigenen Kalibration. Die in der Biotechnologie wichtige Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ist mit keiner Methode möglich [63].

## 5.2 Trübungsmessung zur Bestimmung der Biomasse

In der Biotechnologie werden für die Optimierung der Prozessführung online-Informationen über das Prozessverhalten benötigt [67, 68]. Die Biomassekonzentration ist dabei eine relevante Messgröße [69]. Dies gilt nicht nur, wenn die Biomasse selbst das Produkt ist, sondern auch bei der Produktion von hochwertigen Stoffwechselprodukten mit entsprechenden Zellen [70]. Die Biomasse erfolgt in der Regel immer noch als offline-Messung. Direkte Methoden zur Messung des Feststoffgehaltes, wie die Gravimetrie oder die Verwendung von Coulter-Countern, sind sehr zeitaufwändig [71, 70, 72]. Da die Biomasse mit der optischen Dichte korreliert, ist die Turbidimetrie eine verbreitete Alternative zur Biomassemessung. Meist geschieht dies offline, was personalintensiv und zeitaufwändig ist [70]. Kleine Änderungen der Biomassekonzentration erfolgen durchaus schnell. Um sie zu detektieren sind klassische Methoden kaum geeignet [73, 69].

Online-Messungen der Biomasse direkt im Kultivierungsgefäß sind mit deutlich weniger Aufwand und Personal verbunden [74]. Außerdem ist keine Probenahme notwendig, die immer das Risiko einer Infektion birgt. Optische Sensoren zur photometrischen online-Messung sind vielfach kommerziell erhältlich [75], sie werden allerdings mehr im Bereich der Ab- und Frischwassertechnik als für in-situ-Messungen in der Biotechnologie eingesetzt [76], da dort insbesondere zu beachten ist, dass die Sensoren sterilisierbar sein müssen [70]. Bei Kultivierungsexperimenten besteht zudem das Problem, dass es sich bei den Partikeln um lebende Zellen handelt. Während der Messungen können sie sich stark verändern [70]. Außerdem ist - im Gegensatz zur Transmissionsmessung am Laborphotometer - für jede Art von biologischen Proben eine eigene Kalibration nötig [77]. Für eine kontinuierliche online-Messung kann z.B. eine externe Schleife mit vorgeschaltetem Blasenabscheider eingesetzt werden. Dieser Aufbau benötigt eine vorhergehende Kalibration für die jeweilige Zellart [78]. Als Probenahmesystem kann z.B. ein Fließ-Injektions-Analyse System (FIA) dienen [79, 80]. Da der Zusammenhang zwischen Biomassekonzentration und optischer Dichte nur bis zu einem bestimmten Wert linear ist, wird bei höherer Biomasse mit Verdünnungen der Proben gearbeitet. Für eine Verdünnung und die damit verbundene Probenahme sind hauptsächlich offline-Messungen geeignet [70, 81].

Seit Ende der 1970er Jahre gibt es Ideen für Methoden zur online-Messung. Eine automatisierte Verdünnung der Proben ist mit einer aufwändigen Konstruktion des Messgeräts verbunden. Eine andere Möglichkeit zur Vergrößerung des linearen Messbereichs ist die Anpassung der Schichtdicke der Messung an die Zellkonzentration. Eine variable Schichtdicke [82] oder eine keilförmige, bewegliche Küvette [83] sind

Umsetzungen dieser Idee. Sie zeigen aber beide eine ungenügende Genauigkeit, vor allem bei geringer optischer Dichte. Es besteht auch die Möglichkeit, andere Wellenlängen und damit andere Extinktionskoeffizienten zu verwenden oder über eine geeignete Signalauswertung den linearen Messbereich scheinbar zu vergrößern [66].

Eine andere Variante der online-Messung ist der Einbau der Messschleife direkt an den Bioreaktor. Hierfür gibt es einige Beispiele, die allerdings alle mit dem Problem des Bewuchses auf den Einbauten zu kämpfen haben [84, 85, 86]. Auch ist der lineare Bereich bei allen Methoden für viele Kultivierungen nicht ausreichend. Nephelometrische Messungen, vor allem Messungen des Reflexionslichtes, zeigen einen deutlich breiteren linearen Bereich [70]. Sie eignen sich daher besser zur online-Messung der optischen Dichte ohne Probenahme. Die Messung des Reflexionslichtes toleriert zwar höhere optische Dichten als Streulicht- und Transmissionsmessungen [87], zeigt aber keine gute Genauigkeit für geringe optische Dichten [88, 69].

Aufgrund der Weiterentwicklung der Glasfasertechnik werden in jüngerer Zeit hauptsächlich kommerziell erhältliche Faseroptik-Systeme, wie sie z.B. von Avantes (Eerbeek, Niederlande) angeboten werden, direkt im Bioreaktor eingesetzt. Dafür werden die Lichtquelle sowie der Detektor so im Bioreaktor platziert, dass die Lichtreflexion durch die Reaktorwand, weitere Einbauten oder das Rührwerk möglichst gering ausfällt [89]. Es existieren viele weitere Beispiele für solche Konstruktionen [69, 90, 91, 92, 93, 94, 95], allen ist gemeinsam, dass sie jeweils für den entsprechenden Prozess konstruiert wurden und keinen universell einsetzbaren Messaufbau darstellen.

Ein neuer Ansatz, der in dieser Arbeit getestet und optimiert werden soll, ist die Entwicklung einer online-Messmethode für Schüttelkolben. Da sie einfach durchzuführen und außerdem kostengünstig sind, werden Schüttelkolbenexperimente in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie eingesetzt [72, 96]. Sie werden z.B. für Vorkulturen oder für Screening-Versuche eingesetzt. Von Vorteil gegenüber dem Bioreaktor ist hierbei die Anzahl der zeitgleich durchführbaren Parallelexperimente [97]. Die hier zu untersuchende online-Messung in Schüttelkolben erfolgt von außen durch die transparente Wand, wodurch die Probleme des Infektionsrisikos und des Bewuchses umgangen werden. Die Messung der optischen Dichte soll direkt auf dem Tischschüttler durchgeführt werden, wodurch der Arbeits- und Zeitaufwand minimiert wird [66].

# Kapitel 6

## Online-Messung der optischen Dichte in Schüttelkolben

In Zusammenarbeit mit der Firma PreSens GmbH (Regensburg) soll ein System entwickelt werden, welches die online-Messung der optischen Dichte in Schüttelkolben ermöglicht. Die Messmethode soll zunächst mit trüben Modelllösungen, dann mit Backhefe und später während realer Kultivierungen evaluiert und optimiert werden. Ziel ist es einzuschätzen, ob das Messsystem präzise und reproduzierbare Werte liefern kann und ob eine Weiterentwicklung bis zur Marktreife lohnenswert ist. Ein Teil der hier beschriebenen Arbeiten wurden von Kai-Oliver Mutz im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

### 6.1 Aufbau des Messsystems

Das System baut auf dem kommerziell erhältlichen *Shaking Flask Reader* (SFR) der Firma PreSens GmbH (Regensburg) auf. Dabei handelt es sich um einen Aufsatz für Tischschüttler, der mit neun Optiken zur online-Sauerstoff- und pH-Wertmessung im Schüttelkolben ausgestattet ist. Mit Hilfe eines Akkus lässt sich das Messgerät kabellos unter einer Inkubationshaube betreiben. Die Kommunikation zwischen SFR und Steuerungsrechner erfolgt ebenfalls kabellos über einen *Wireless Transmission Converter* (WTC), der sowohl für den *stand-alone*-Betrieb direkt an einen PC angeschlossen werden oder für den LAN-Betrieb in ein Netzwerk eingebunden werden kann [102].

Zur Messung der optischen Dichte wurde die Optik aus zwei Kanälen entfernt, stattdessen wurde jeweils eine Photodiode als Detektor fest und eine LED ( $\lambda = 650 \text{ nm}$ ) als Emitter an einem 145 mm langen Kabel frei beweglich installiert. Dadurch lässt sie sich in verschiedenen Positionen anbringen, so dass sowohl Streulicht- als auch

Reflexionsmessungen ermöglicht werden. Die Photodiode ist so angebracht, dass sie Licht aus einem Bereich nah der Eintrittsstelle ins Medium detektiert, also je nach Größe des Schüttelkolbens nah an seinem äußeren Rand, wodurch einer langer Weg des Lichtes durch das Medium verhindert wird.

Zur Datenaufzeichnung wird die Software des ursprünglichen SFR verwendet. Als Messgröße dient die Amplitude, sie wird über den ehemaligen O<sub>2</sub>-Kanal ausgegeben. Eine hohe Amplitude bedeutet hohe Lichtintensität, also starke Streuung oder Reflexion, verursacht durch eine hohe optische Dichte im Schüttelkolben. Das kürzeste Messintervall beträgt 10 s.

### 6.2 Konstruktion einer LED-Halterung

Um reproduzierbare Messungen durchführen zu können, ist es wichtig, einen stabilen Messaufbau zu gewährleisten. Daher muss die LED, die bisher an einem flexiblen Kabel befestigt ist, mit Hilfe einer Halterung fixiert werden. Da Messungen mit unterschiedlichen Stellungen der LED durchgeführt werden sollen, muss diese Halterung justierbar sein. Sie soll für Messungen in Standard-Schüttelkolben mit einem Gesamtvolumen von 250 mL ausgelegt werden. Die Konstruktion und Fertigstellung wurden an der Mechanikwerkstatt des Instituts durchgeführt, Konstruktionsskizzen und Fotos sind im Anhang B.1 zu finden.

Die LED lässt sich zum Einem direkt neben die Photodiode positionieren, wodurch Reflexionsmessungen ermöglicht werden. Zum Anderen kann man die LED im 90°-Winkel zur Photodiode anbringen, um Streulichtmessungen durchzuführen. In dieser Position lässt sich der Abstand zwischen LED und Schüttelkolben variieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit drei verschiedenen Messaufbauten gearbeitet, sie sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Im Folgenden werden sie mit Set-up A, B und C bezeichnet. Set-up A und B sind für Streulichtmessungen ausgelegt, der Winkel zwischen LED und Photodiode beträgt 90°. Sie unterscheiden sich durch den Abstand der LED vom Schüttelkolben. Bei Set-up A beträgt er weniger als 1 mm, bei Set-up B beträgt er 6 mm. Set-up C dient für Reflexionsmessungen, die LED ist 4 mm neben der Photodiode auf gleicher Höhe wie diese angebracht.

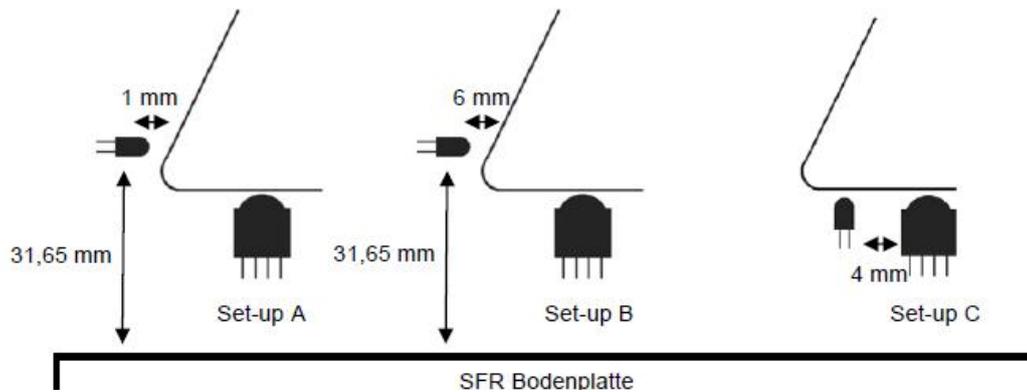


Abbildung 6.1: Die drei unterschiedlichen in dieser Arbeit verwendeten Messaufbauten

## 6.3 Anorganische Partikel als Modellsystem

Zunächst soll untersucht werden, ob das Messsystem sich grundsätzlich zur online-Messung der optischen Dichte eignet. Statt Zellen dienen in der ersten Versuchsphase anorganische  $\text{TiO}_2$ -Partikel (PC10, Millenium Inorganic Chemicals, Baltimore, USA,  $\text{Ø}$  152  $\mu\text{m}$ ) als Trübungsmittel. Die Partikel haben eine deutlich einfachere Form als Zellen und sind auch uniformer als diese. So ergibt sich eine einheitlichere Lichtstreuung und -reflexion, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit garantiert werden soll.

### 6.3.1 Diskontinuierliche Messungen

Bei den ersten Messungen wird die Konzentration einer Suspension von  $\text{TiO}_2$ -Partikeln in einem 250 mL Schüttelkolben (Duranglas, Wandstärke 2 mm), der mit 100 mL Lösung gefüllt ist, schrittweise erhöht. Nach jeder Konzentrationsänderung wird die optische Dichte der Suspension mit einem Laborphotometer (SCHOTT Instruments GmbH, Mainz) bei 650 nm bestimmt, außerdem wird auf beiden umgebauten Kanälen des SFR die Lichtintensität gemessen, die auf die Photodiode trifft. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wird die Flüssigkeitsmenge im Schüttelkolben konstant gehalten. Die Messungen werden jeweils in Zweifachbestimmung mit den drei verschiedenen Set-ups durchgeführt.

Bei ersten Messungen konnte kein Zusammenhang zwischen OD und Amplitude beobachtet werden. Die Amplitude lag bei allen Proben nah an der maximal messbaren Amplitude von 270.000 RU. Auch bei Messungen, in denen reines Wasser im Schüttelkolben vorlag, wurden solch hohe Amplituden gemessen. Der Grund hierfür war, dass Licht direkt von der LED auf die Photodiode gelangen konnte, ohne durch den Schüttelkolben zu strahlen. Um dies zu verhindern wurden Abschirmblenden aus schwarzem Fotokarton zwischen LED und Photodiode befestigt, so dass nun nur noch gestreutes bzw. reflektiertes Licht die Photodiode erreicht.

Nach Anbringen der Abschirmblenden wurde bei Messungen mit reinem Wasser im Schüttelkolben Amplituden von 10.000 RU gemessen, im Gegensatz zu einem Wert von 220.000 RU ohne Abschirmblenden. Die Messungen wurden wiederholt, die Ergebnisse sind in Abbildung 6.2 dargestellt.

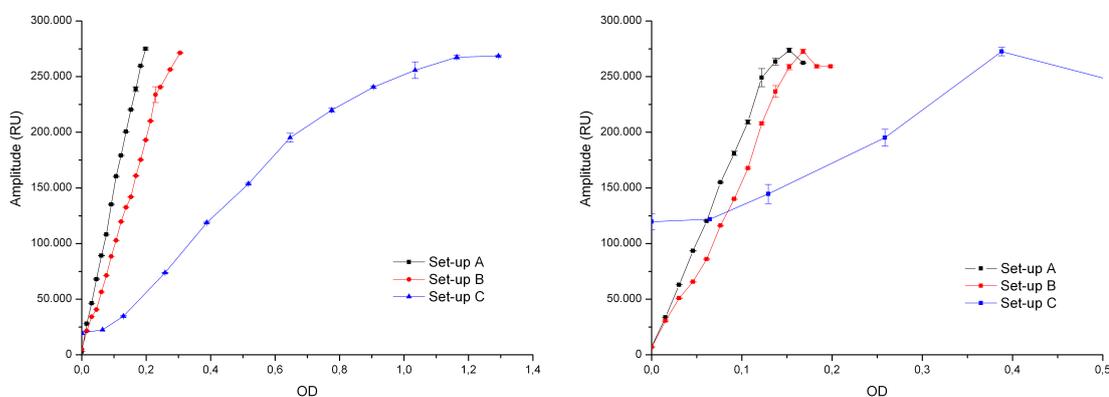


Abbildung 6.2: Amplitude in Abhängigkeit von der optischen Dichte bei schrittweiser Erhöhung der optischen Dichte, links: Kanal 1, rechts: Kanal 2

Das Messsystem liefert reproduzierbare Ergebnisse. Die bei einer bestimmten optischen Dichte gemessenen Amplitudenwerte weichen - bis auf wenige Ausnahmen - nicht mehr als 2% voneinander ab. Mit Set-up A lässt sich die optische Dichte je nach Kanal bis zu einem Wert von OD 0,15-0,2 verfolgen, mit dem Set-up B von OD 0,17-0,3. Mit Set-up C lässt sich auf Kanal 1 die Zunahme der optischen Dichte in einem Bereich von OD 0,2-0,8 verfolgen, auf Kanal 2 ist dies nur von OD 0,2-0,4 möglich. Der limitierende Faktor ist bei diesen Messungen aber nicht der Bereich, in dem der Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Amplitude linear ist, sondern die maximale Amplitude, die mit der Photodiode gemessen werden kann.

### 6.3.2 Zusammenfassung

Es wurden Messungen in Schüttelkolben durchgeführt, als Modellsystem dienten  $\text{TiO}_2$ -Partikel. Zunächst konnte kein Zusammenhang zwischen Amplitude und optischer Dichte festgestellt werden, was darauf zurückzuführen war, dass Licht direkt

von der LED zu der Photodiode gelangen konnte, ohne den Schüttelkolben zu passieren. Dieses Problem konnte behoben werden, indem eine Abschirmblende zwischen Photodiode und LED angebracht wurde.

Nach Anbringen der Messblenden lieferten Messungen mit suspendierten  $\text{TiO}_2$ -Partikeln reproduzierbare Ergebnisse. Es konnte in gewissen Bereichen ein linearer Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Amplitude nachgewiesen werden. Der limitierende Faktor bei den Messungen ist die von der Photodiode maximal detektierbare Amplitude.

## 6.4 Messungen mit Backhefe als Modellsystem

In der nächsten Versuchsphase dienen abgetötete Backhefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) als Modellsystem. Die Messungen werden mit Suspensionen aus Backhefe in 0,9 %iger Kochsalzlösung durchgeführt, zur Verhinderung von Zellwachstum wurden 50 mM Natriumsulfit hinzugegeben.

### 6.4.1 Diskontinuierliche Messungen

Die Messungen, die in Abschnitt 6.3.1 mit  $\text{TiO}_2$ -Partikeln beschrieben wurden, werden mit Backhefe wiederholt. Auch mit diesem Modellsystem lässt sich ein Anstieg der optischen Dichte mit dem SFR beobachten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.3 dargestellt.

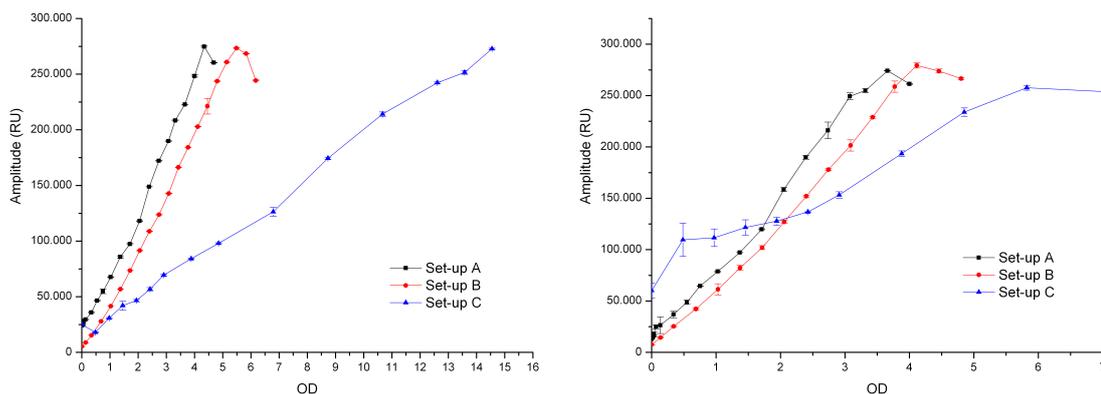


Abbildung 6.3: Amplitude in Abhängigkeit von der optischen Dichte bei diskontinuierlichen Messungen mit Backhefe

Der Bereich, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Amplitude besteht, ist bei den Messungen mit Backhefe größer als bei denen mit  $\text{TiO}_2$ -Partikeln. Mit Set-up A lässt sich die Veränderung der optischen Dichte bis

zu einem Wert von ca. OD 4 auf Kanal 1 und ca. OD 3 auf Kanal 2 verfolgen. Wie schon bei den in Abschnitt 6.3.1 beschriebenen Experimenten vergrößert auch hier der größere Abstand zwischen LED und Schüttelkolben den Bereich möglicher Messungen. Mit Set-up B ließ sich die optische Dichte auf Kanal 1 bis OD 5,5 und auf Kanal 2 bis OD 4 messen. Set-up C ermöglicht Messungen in einem deutlich größeren Bereich. Auf Kanal 1 lässt sich die optische Dichte im Bereich von OD 1-14 beobachten, auf Kanal 2 ist der Bereich mit einer optischen Dichte von OD 2-6 wiederum deutlich eingeschränkt. Auch diese Ergebnisse entsprechen den in Abschnitt 6.3.1 beschriebenen. Auch die dort beobachtete gute Vergleichbarkeit zweier Messungen mit dem selbem Set-up auf dem selbem Kanal wird bei den Messungen mit Backhefe bestätigt, die Abweichung liegt wiederum unter 2 %.

### 6.4.2 Kontinuierliche Messungen

Als nächster Schritt werden Messungen durchgeführt, bei denen sich die optische Dichte kontinuierlich ändert. Hierzu wird auf jedem Kanal des SFR je ein Schüttelkolben mit 0,9 %iger-Kochsalzlösung vorgelegt. In einem Vorratsbehälter befindet sich eine Backhefe-Suspension mit einer Konzentration von 10 g/L. Diese Suspension wird mit einem Volumenstrom von 75 mL/h in die Schüttelkolben auf dem SFR gepumpt. Gleichzeitig wird mit derselben Geschwindigkeit, die Lösung aus den Schüttelkolben in einen Abfallbehälter gepumpt, so dass der Flüssigkeitspegel in den Schüttelkolben konstant bleibt. So erreicht man einen linearen Anstieg der optischen Dichte in den Schüttelkolben. Als Pumpe dient eine 4-Kanal-Peristaltikpumpe (Eppendorf AG, Hamburg), die Lösungen in den Schüttelkolben werden jeweils mit KPG-Rührwerken (Janke & Kunkel, Staufen, 400 rpm) durchmischt, zur Durchmischung des Vorratsbehälters wurde ein Magnetrührer verwendet (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen, 500 rpm). Der Messaufbau ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Die Messungen werden mit allen Set-ups dreifach durchgeführt.

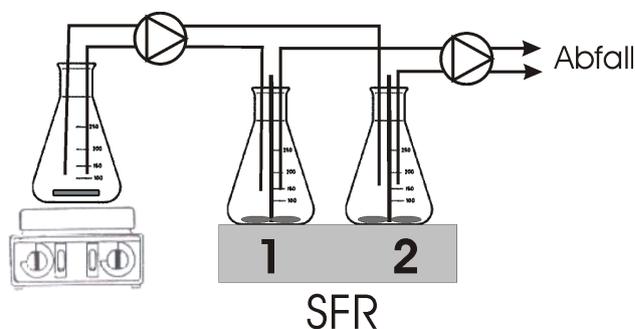


Abbildung 6.4: Messaufbau für die kontinuierlichen Messungen

Die Messung der optischen Dichte bei kontinuierlicher Zugabe von Backhefesuspension durch das Pumpsystem spiegelt die Ergebnisse der diskontinuierlichen Messung wider (vgl. 6.5). Bei den Messungen mit den Set-ups A und B lässt sich ein linearer Anstieg der Amplitude beobachten. Der Anstieg erfolgt bis zur maximal detektierbaren Amplitude (250.000 RU), danach lässt sich nur ein starkes Rauschen messen. Die Messungen, die mit den Set-ups A und B durchgeführt wurden, sind wiederum ähnlich, sie unterscheiden sich durch den größeren Messbereich bei Set-up B. Der Grund für die Durchführung von Streulichtmessungen mit zwei verschiedenen Set-ups war es, herauszufinden, ob Streulichtmessungen auch mit einem Abstand zwischen Schüttelkolben und LED möglich sind. Dies wäre von Vorteil, um später dieselbe Halterung für verschiedene Kolbengrößen benutzen zu können. Die bisherigen Messungen zeigen, dass es möglich ist, Streulichtmessungen durchzuführen, bei denen ein kleiner Abstand zwischen LED und Schüttelkolben besteht. Für eine abschließende Beurteilung müssen Tests mit größeren Abständen durchgeführt werden. Dies ist mit der vorhandenen Halterung nicht möglich.

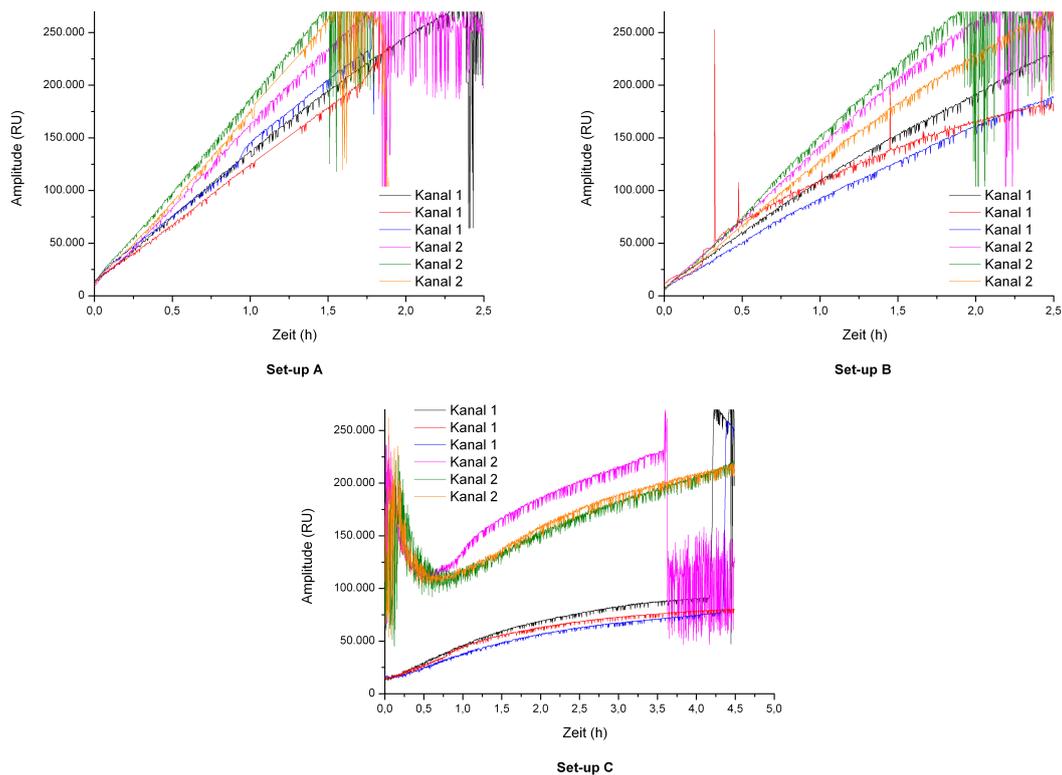


Abbildung 6.5: Amplitude in Abhängigkeit von der Zeit bei kontinuierlicher Erhöhung der Backhefekonzentration bei Verwendung der verschiedenen Set-ups

Bei Messungen mit Set-up C ist der Anstieg der Amplitude ab etwa 1 h linear. Bei einer Messung (pinke Kurve) wurden Störungen beobachtet, nach ca. 3,5 h sinkt die Amplitude sprunghaft ab.

Es fällt auf, dass zwei Messungen unter gleichen Bedingungen weniger gut übereinstimmen als dies bei den diskontinuierlichen Messungen der Fall war. Der Grund hierfür ist, dass die Zunahme der optischen Dichte nicht bei jedem Versuch identisch verläuft. Das Pumpsystem befördert nicht jedes Mal die identische Menge Zellen in die Schüttelkolben hinein bzw. aus ihnen hinaus. Belegt wird dieses durch den Vergleich der optischen Dichte in den Schüttelkolben nach Ende der Messungen, sie weichen um bis zu 30 % voneinander ab (Messwerte siehe Anhang B.2).

### 6.4.3 Messungen auf dem Tischschüttler

Der nächste Schritt ist die Durchführung von online-Messungen im Schüttlerbetrieb. Hierzu wird der SFR auf einem Tischschüttler (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) montiert. Die Durchmischung der Suspensionen in den Schüttelkolben erfolgt auf dem Tischschüttler bei 150 rpm. Durch die hohe Schüttelgeschwindigkeit soll die Grenzschicht zwischen Flüssigkeit und Luft rotationssymmetrischer werden, was zu einer geringeren Fluktuation der Amplitude führen soll.

Es werden ausschließlich kontinuierliche Messungen durchgeführt. Die Durchführung entspricht den in Abschnitt 6.4.2 beschriebenen Messungen. Eingesetzt werden Backhefe-Suspensionen mit einer Konzentrationen zwischen 10 g/L und 40 g/L. Die Messungen werden mit Set-up A und Set-up C durchgeführt. Der Messaufbau wird durch eine Inkubationshaube (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) gegen Störlicht abgedunkelt.

#### 6.4.3.1 Messungen mit Set-up A

Bei den Messungen mit Set-up A und 100 mL Suspension im Schüttelkolben lässt sich auf Kanal 1 trotz eines extremen Messrauschens ein linearer Zusammenhang von Amplitude und optischer Dichte bis zu einem OD-Wert von ca. OD 4,5 erkennen (Ergebnisse nicht gezeigt). Um die Messung einordnen zu können, wird sie mit den kontinuierlichen Messungen ohne Schüttlerbetrieb verglichen. Für den Vergleich werden durch lineare Regression erhaltenen Hilfsgeraden herangezogen (Abbildung 6.6). Die Messungen im Schüttlerbetrieb lassen sich mit denen ohne Schüttlerbetrieb vergleichen. Die Unterschiede lassen sich wie schon in Abschnitt 6.4.2 dadurch erklären, dass die Zunahme der optischen Dichte während der einzelnen Messungen nicht exakt identisch ist. Bei den Messungen auf Kanal 2 ist das Signalrauschen so stark, dass die Messungen nicht auswertbar sind.

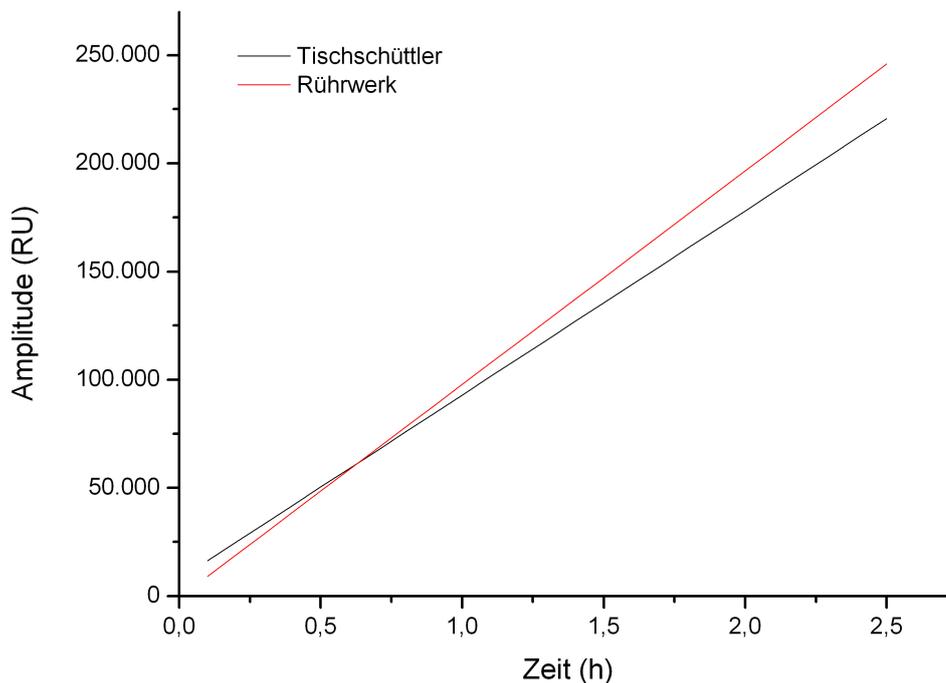


Abbildung 6.6: Amplitude in Abhängigkeit von der Zeit, lineare Bereiche der Messungen von Backhefesuspensionen mit Set-up A

Um das starke Messrauschen zu umgehen, wird das Volumen der Suspension im Schüttelkolben auf 200 mL erhöht. Ein hoher Flüssigkeitspegel vergrößert den Abstand zwischen einfallendem Licht und der Luft, wodurch störende Lichtreflexionen an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Gasphase minimiert werden sollen. Allerdings spiegelt ein hoher Flüssigkeitspegel im Schüttelkolben nicht die Realität echter Kultivierungen wider und verhindert außerdem eine homogene Durchmischung. Um die optische Dichte in Zusammenhang mit der Amplitude zu bringen, wurden Kalibrationsgeraden für den jeweiligen linearen Bereich der Messungen erstellt. Für die Kalibration wurden zusätzlich zu den online-Messungen offline-Proben am Laborphotometer vermessen. Die detaillierte Durchführung und die Kalibrationsgeraden sind im Anhang (B.3 und B.4) zu finden. Die Messungen wurden dreimal durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 6.7 dargestellt.

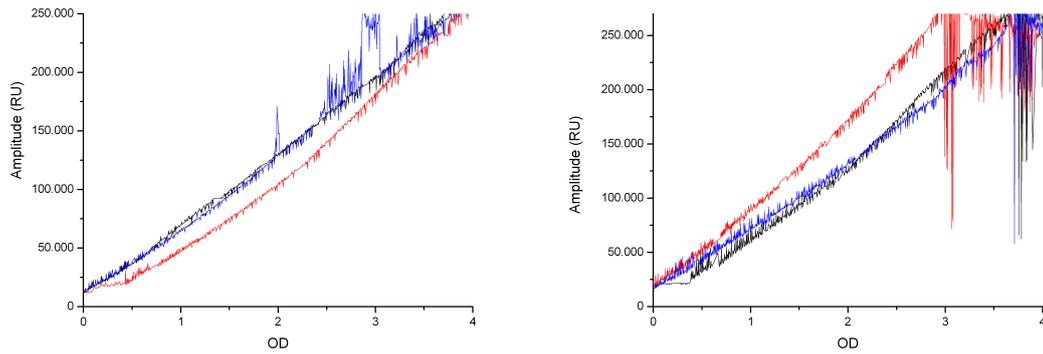


Abbildung 6.7: Amplitude in Abhängigkeit von der optischen Dichte, kontinuierliche Messung im Schüttlerbetrieb, Set-up A, Füllvolumen 200 mL, links: Messungen auf Kanal 1, rechts: Messungen auf Kanal 2

Durch die Verdopplung des Volumens der Suspension im Schüttelkolben wird das Messrauschen deutlich schwächer. Man erhält Ergebnisse mit guter Reproduzierbarkeit. Bei Messungen auf Kanal 1 besteht ein linearer Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Amplitude bis zu einem OD-Wert von etwa OD 4. Wie schon bei früheren Messungen ist dieser Bereich bei Messungen auf Kanal 2 kleiner, er besteht bis zu einem OD-Wert von etwa OD 3,5.

#### 6.4.3.2 Messungen mit Set-up C

Bei Messungen mit Set-up C werden auf Kanal 1 und einem Füllvolumen des Schüttelkolbens von 100 mL Ergebnisse erhalten, die trotz Messrauschens mit guter Reproduzierbarkeit einen linearen Zusammenhang zwischen Amplitude und optischer Dichte zeigen. Dieser besteht im Bereich von OD-Werten von ca. OD 2-12. Die Ergebnisse von zwei dieser Messungen sind in Abbildung 6.8 dargestellt.

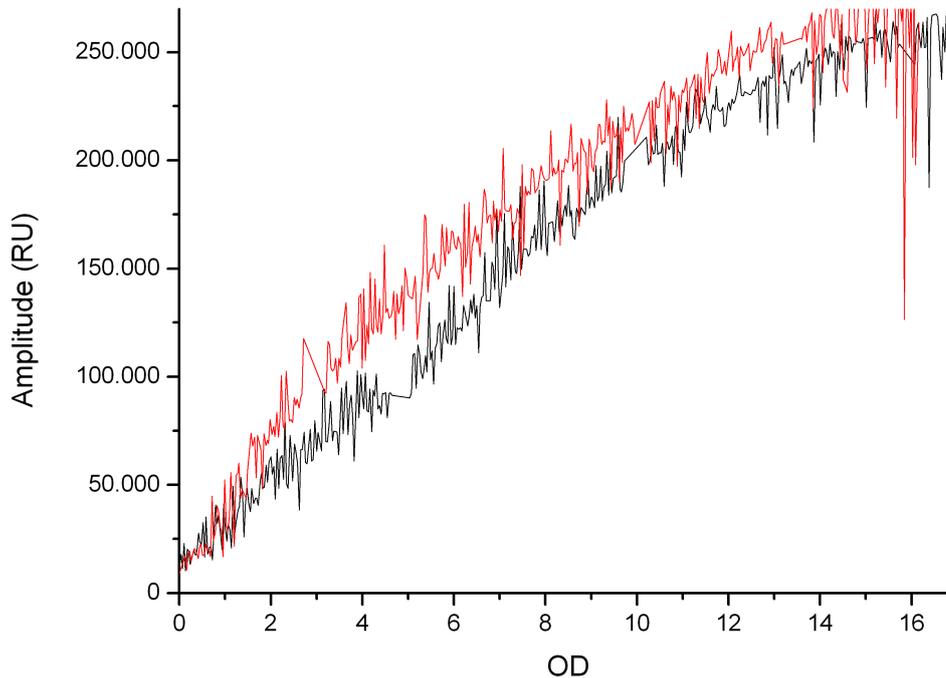


Abbildung 6.8: Amplitude in Abhängigkeit von der optischen Dichte, kontinuierliche Messung, Set-up-C, Füllvolumen 100 mL

Bei Messungen auf Kanal 2 konnten keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden, da das Messrauschen zu groß war. Es wurde ein optischer Filter (CALFLEX, LINOS Photonics GmbH, Göttingen) vor der Photodiode platziert. Hierbei handelt es sich um einen Langpassfilter mit einer Grenzwellenlänge von 700 nm. Falls das Messrauschen durch das Umgebungslicht verursacht wird, sollte es durch den Filter verringert werden. Die Messungen wurden wiederholt, das Rauschen blieb unverändert stark. Abbildung 6.9 zeigt die erhaltenen Ergebnisse bei Durchführung der Messung auf Kanal 1 mit Set-up C. Sie unterscheiden sich kaum von den entsprechenden Messungen ohne CALFLEX-Filter (Abbildung 6.8). Dass der CALFLEX-Filter wirksam gegen Störlicht ist, zeigen Messungen mit geöffneter Inkubationshaube. Trotz Tageslicht nimmt das Messrauschen auf Kanal 1 kaum zu (Ergebnisse nicht gezeigt). Dass der Filter zu keiner Verbesserung führt, liegt eher daran, dass der Messaufbau ausreichend gegen Störlicht abgedunkelt ist, so dass dieses auch vor dem Einbau des Filters keine Rolle spielte.

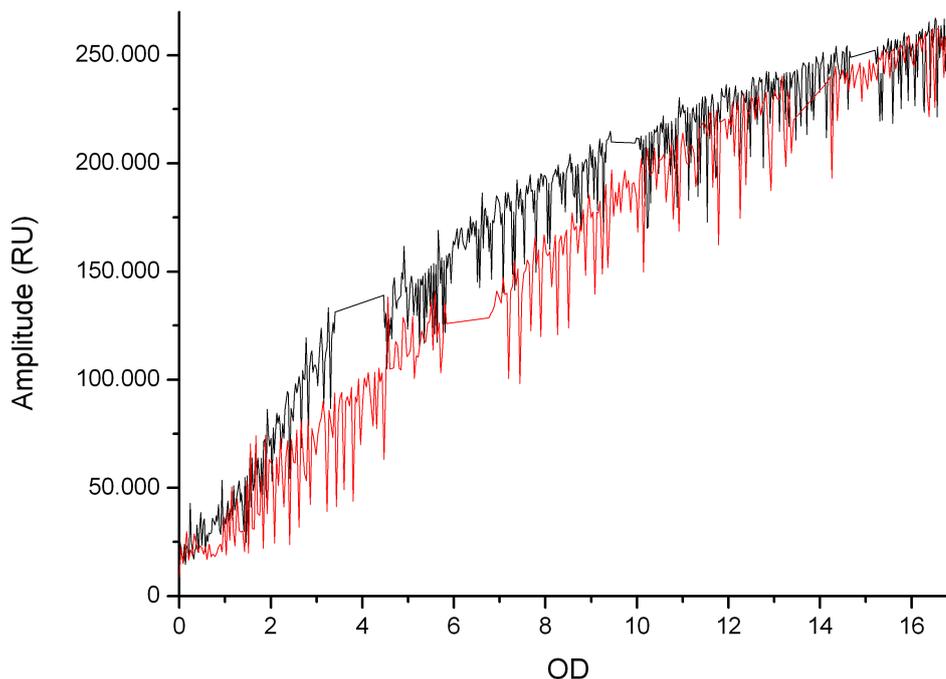


Abbildung 6.9: Amplitude in Abhängigkeit von der optischen Dichte nach Einbau des CALFLEX-Filters, kontinuierliche Messung, Set-up-C, Füllvolumen 100 mL

### 6.4.3.3 Variation der LED-Intensität

Für die abweichenden Messergebnisse von Kanal 1 und Kanal 2 bezüglich Amplitude bei gleicher optischer Dichte und Stärke des Messrauschens, wurde eine Erklärung gefunden. Produktionsbedingt verhalten sich sowohl Mess-LEDs als auch Photodioden nicht vollkommen identisch bezüglich Lichtemission und Detektion. Bei Kanal 2 scheint zufälligerweise eine besonders ungünstige Kombination aus einer starken Mess-LED und einem besonders empfindlichen Detektor verwendet worden sein. Daher werden bei Messungen auf diesem Kanal schnell Amplituden erreicht, die über die maximal detektierbare Amplitude von 270.000 RU hinausgehen, so dass keine sinnvollen Messwerte ausgegeben werden. Bei einer kommerziellen Version des SFR würden die einzelnen Kanäle vom Hersteller abgestimmt werden. Ein Angleichen der beiden Messkanäle aneinander ist über Variation der Intensität der Mess-LED möglich. Die Messungen bei unterschiedlicher Mess-LED-Intensitäten werden mit Einweg-Plastikkolben (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) statt Glaskolben durchgeführt, da bei kommerzieller Anwendung des SFR diese Plastikkolben genutzt werden sollen.

Es werden drei kontinuierliche Messungen mit Set-up C während des Schüttlerbetriebs durchgeführt, die LED-Intensität beträgt 1 %, 50 % und 99 %. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 6.10 dargestellt. Die Auftragung erfolgt als optische Dichte gegen die Zeit, wie das bei Kultivierungsexperimenten zur Veranschaulichung der Wachstumskurve üblich ist. Die Werte für die optische Dichte wurden mit Hilfe der entsprechenden Kalibrationsgerade berechnet (siehe Anhang, Abschnitt B.4).

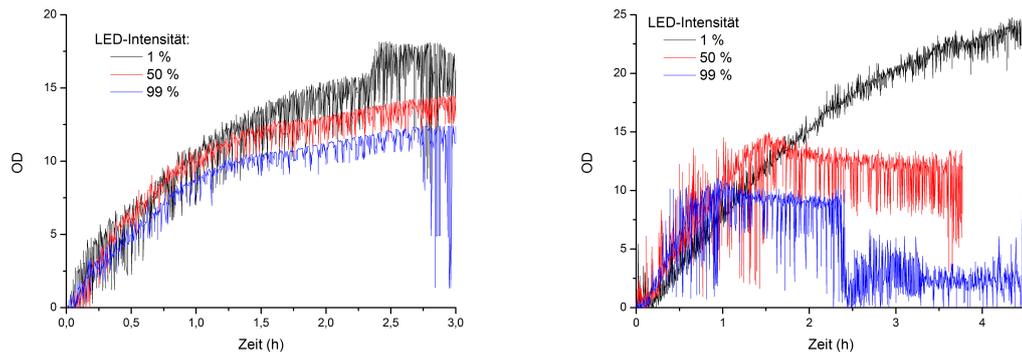


Abbildung 6.10: Optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit bei kontinuierlicher Messung von Backhefesuspensionen auf dem Tischschüttler mit Set-up C mit drei unterschiedlichen LED-Intensitäten, links: Kanal 1, rechts: Kanal 2

Bei Messungen auf Kanal 1 ist mit LED-Intensitäten von 1 % bzw. 50 % ein linearer Zusammenhang bis zu einem OD-Wert von ca. OD 10-12 erkennen. Bei einer Mess-LED-Intensität von 99 % besteht der lineare Zusammenhang nur bis zu einem OD-Wert von ca. OD 8,0.

Durch die Regulierung der LED werden auch Messungen auf Kanal 2 möglich. Bei einer LED-Intensität von 1 % besteht ein linearer Zusammenhang bis zu einem OD-Wert von ca. OD 20,0. Der lineare Bereich ist damit sogar größer als auf Kanal 1. Bei LED-Intensitäten von 50 % bzw. 99 % besteht der lineare Zusammenhang bis zu einem OD-Wert von OD 15,0 bzw. OD 10,0.

#### 6.4.3.4 Digitale Filter

Bevor die optische Dichte realer Kultivierungen mit dem SFR verfolgt wird, müssen zunächst die optimalen LED-Intensitäten für die verschiedenen Kanäle und Set-ups bestimmt werden. Um dies zu vereinfachen, wäre es von Vorteil, mit einem weniger verrauschten Signal arbeiten zu können. Hierfür werden mathematische Filter auf die Messwerte angewendet. Der Vorteil dieser digitalen Filter ist, dass sie leicht an die Problemstellung anzupassen und zu verändern sind.

Für die Reduzierung des Messrauschens der Tischschüttler-Messungen werden drei verschiedene digitale Filter und Kombinationen aus ihnen getestet. Der Mittelwertfilter ist der einfachste Filter. Er arbeitet nach dem Prinzip gleitender Mittelwerte, bei denen innerhalb eines definierten Fensters mit einer bestimmten Filterbreite der Mittelwert über die Messwerte gebildet wird:

$$y_k^* = \frac{1}{2m+1} \cdot \sum_{j=-m}^m y_{k+j} \quad (6.1)$$

Dabei sind  $y_k^*$  der gefilterte Messwert und  $2m+1$  die Größe des Fensters (Filterbreite), die durch  $m$  festgelegt ist. Dieses Fenster wird sukzessive vorgeschoben, dadurch wird das Messrauschen verringert. Die Filterbreite darf nicht zu groß gewählt werden, da sonst Strukturen in Spektren oder Peaks eingeebnet werden können. Der Mittelwertfilter reduziert immer die Höhe eines Peaks und verbreitert ihn.

Der Medianfilter funktioniert ähnlich wie der Mittelwertfilter. Messwerte innerhalb eines definierten Fensters werden der Größe nach sortiert. Der Median ist als Punkt in der Mitte definiert, 50 % der Werte liegen darüber und 50 % der Werte darunter.

Ein weiterer bekannter digitaler Filter ist die Polynomglättung nach Savitzky und Golay [75]. Durch Verwendung von Filterkoeffizienten werden die Messwerte gewichtet. Es wird ein quadratisches Polynom angenommen. Statt mit gleitenden Mittelwerten oder Medianen wird mit einem Normalisierungsfaktor, der sich aus der Summe der Koeffizienten ergibt, gearbeitet. Die Koeffizienten sind je nach Filterbreite einer Savitzky-Golay-Filter-Koeffizienten-Tabelle zu entnehmen [75]. In dieser Arbeit wird mit einem Savitzky-Golay-Filter mit  $m=4$ , also einer Filterbreite von neun gearbeitet. Damit ergibt sich der Filter formal als:

$$y_k^* = \frac{1}{231} (-21y_{k-4} + 14y_{k-3} + 39y_{k-2} + 54y_{k-1} + 59y_k + 54y_{k+1} + 39y_{k+2} + 14y_{k+3} - 21y_{k+4}) \quad (6.2)$$

Die bei den Messungen auf dem Tischschüttler erhaltenen Messdaten wurden mit dem Mittelwert-, dem Median und dem Savitzky-Golay-Filter, sowie mit Kombinationen der Filter geglättet. Dabei wurden auch verschiedene Filterbreiten untersucht. Die Verwendung des Medianfilters mit einer Filterbreite von 45 ( $m=22$ ) mit anschließender Savitzky-Golay-Filterung mit einer Filterbreite von 9 ( $m=4$ ) zeigt die stärkste Verringerung des Messrauschens aller getesteten Filterungen, ohne dabei den Informationsgehalt der Messung zu sehr zu verkleinern (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei dem verwendeten Messintervall von 10 s ergibt sich daraus eine Fensterbreite von ca. 8 min.

Es werden mit Set-up A und Set-up C auf jedem Kanal jeweils drei Messungen in 250 mL Plastikkolben durchgeführt. Da bei den ersten Messungen bereits festgestellt wurde, dass der mögliche Messbereich bei LED-Intensitäten über 50 % eingeschränkt ist, wird die Intensität der Mess-LED dabei auf 1 %, 25 %, und 50 % eingestellt. Während des Verlaufs der Experimente werden zur Beurteilung der Präzision und Genauigkeit der online-Messung Proben aus den Kolben gezogen und Referenzmessungen mit dem Laborphotometer durchgeführt.

In Abbildung 6.11 ist die optische Dichte gegen die Zeit bei Messungen auf Kanal 1 mit Set-up A aufgetragen. Da beide Kanäle ähnliche Ergebnisse lieferten, wird auf die Darstellung der auf Kanal 2 erhaltenen Messkurven verzichtet. Die Kurven verlaufen trotz unterschiedlicher starker LED-Intensität ähnlich, die Abweichung der bei einer LED-Intensität von 25 % bzw. 50 % erhaltenen Messkurven liegt bis zu einer Messdauer von 2 h unter OD 0,5. Die kontinuierliche Zugabe und der damit verbundene lineare Anstieg der optischen Dichte lassen sich bis zu einer optischen Dichte von ca. OD 7,0 bis OD 8,0 verfolgen. Danach ist die maximale Amplitude erreicht und es werden keine korrekten Ergebnisse mehr gemessen. Die Kurve flacht ab. Die Werte für die mit dem Laborphotometer gemessenen Proben liegen nah den berechneten Verläufen, was für eine hohe Genauigkeit der Kalibration spricht. Die späteren Messungen mit Set-up A werden mit einer LED-Intensität von 1 % durchgeführt.

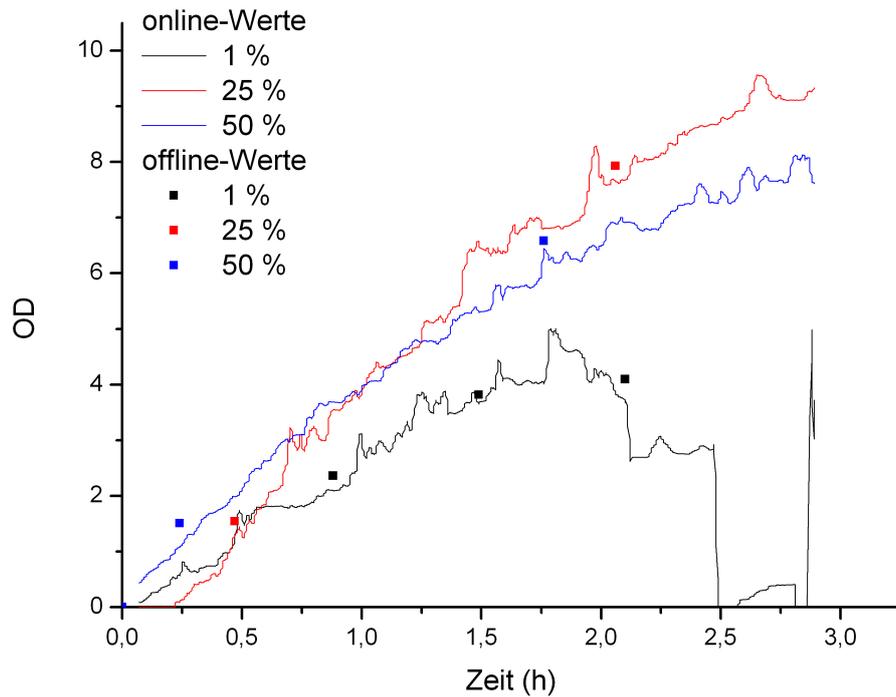


Abbildung 6.11: Optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit, gefilterte Werte der kontinuierlichen Messungen mit Backhefe auf dem Tischschüttler, verwendet wurde Set-up A bei drei unterschiedlichen LED-Intensitäten, Kanal 1

Mit Set-up C werden weit weniger stark verrauschte Ergebnisse als mit Set-up A erhalten (ungefilterte Ergebnisse nicht gezeigt). In Abbildung 6.12 sind die Ergebnisse, die auf Kanal 2 erhalten werden, dargestellt. Es besteht wie bei Set-up A eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die kontinuierliche Zugabe und der damit verbundene lineare Anstieg der optischen Dichte lässt sich bis zu einer optischen Dichte von ca. 23,0 bis 25,0 verfolgen. Die Messung mit einer LED-Intensität von 50 % verläuft aufgrund zu geringer Menge an vorgelegter Backhefe-Suspension nur bis zu einer optischen Dichte von 15,0. Auch hier zeugen die mit dem Laborphotometer gemessenen Proben von einer hohen Genauigkeit der Kalibration. Für spätere Messungen wird die LED-Intensität von Kanal 1 auf 50 % und von Kanal 2 auf 25 % eingestellt.

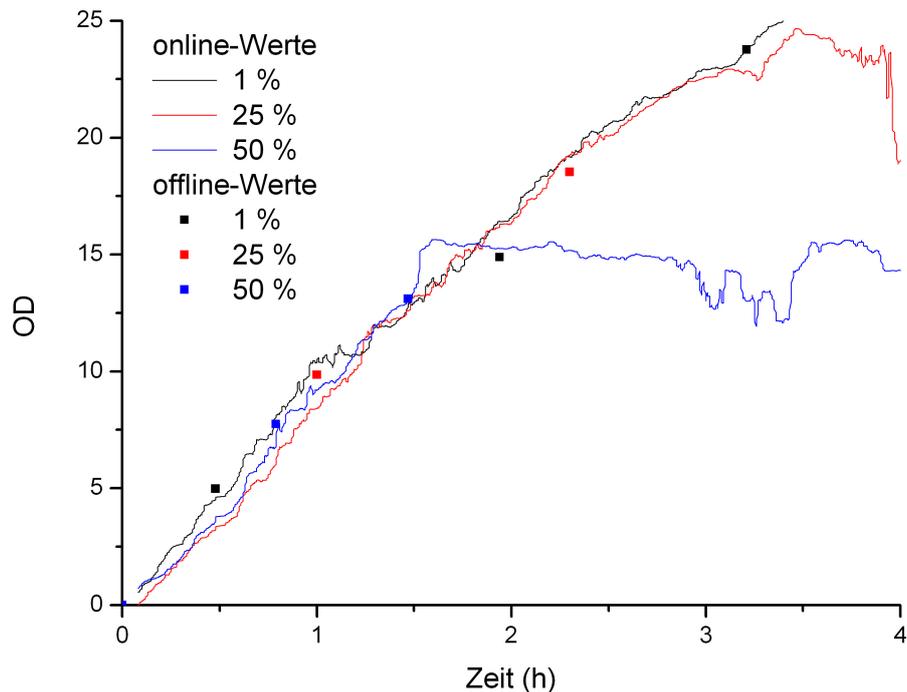


Abbildung 6.12: Optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit, gefilterte Werte der kontinuierlichen Messungen mit Backhefe auf dem Tischschüttler, verwendet wurde Set-up C bei drei unterschiedlichen LED-Intensitäten, Kanal 2

#### 6.4.4 Zusammenfassung

Es wurden Messungen mit Backhefe als Modellsystem durchgeführt. Diskontinuierliche Messungen liefern wie schon bei den Messungen mit  $\text{TiO}_2$ -Partikeln Ergebnisse mit guter Reproduzierbarkeit, die Abweichungen der bei einer bestimmten optischen Dichte gemessenen Amplitudenwerte voneinander liegen unter 2%. Im Gegensatz zu Transmissionsmessungen mit einem Laborphotometer hat die Art der suspendierten Partikel einen sehr großen Einfluss auf den linearen Bereich, in dem Messungen möglich sind.

Messungen, bei denen die Konzentration der Backhefe kontinuierlich erhöht wurde, wurden durchgeführt. Auch hier ließ sich die optische Dichte der Suspension in einem bestimmten Bereich mit Hilfe der gemessenen Amplitude verfolgen. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessenen Amplituden weichen teilweise stark voneinander (bis zu 15%), was aber nicht an der Streulicht- bzw. Reflexionsmessung selbst liegt, sondern daran, dass bei den einzelnen Experimenten, die Zellmenge, die zu- bzw. abgepumpt wird, nicht völlig identisch ist.

Die Ergebnisse von Set-up A und Set-up B unterscheiden sich kaum, was zeigt, dass zumindest Messungen mit einem kleinen Abstand zwischen Mess-LED und Schüttelkolben möglich sind. Für weitere Messungen wird Set-up B nicht mehr verwendet.

Es wurden Messungen im Schüttelkolben während des Schüttlerbetriebes durchgeführt. Das durch das Schütteln verursachte Schwanken des Flüssigkeitsstandes führt zu einem starken Messrauschen bei Messungen mit Set-up A. Dennoch lässt sich der Verlauf der optischen Dichte verfolgen. Durch einen höheren Flüssigkeitspegel lässt sich das Messrauschen stark verringern. Jedoch sind Versuche mit einem größeren Füllvolumen weniger gut mit realen Kultivierungsexperimenten zu vergleichen. Die Messsignale, die auf Kanal 2 erhalten werden, sind aufgrund des zu starken Messrauschens nicht auswertbar.

Auch mit Set-up C sind nur Messungen auf Kanal 1 möglich. Wieder sind die Messsignale, die auf Kanal 2 erhalten werden, zu stark verrauscht für eine sinnvolle Auswertung. Die Messungen auf Kanal 1 liefern im Vergleich zu den Messungen mit Set-up A auf diesem Kanal ein weitaus weniger verrauschtes Signal.

Der Einbau der CALFLEX-Filter gegen Störlicht führte zu keiner Verbesserung der Messungen. Die beiden Messungen mit eingebautem Filter lieferten Ergebnisse ähnlich denen ohne Filter. Störlicht scheint keine Rolle zu spielen, die Abdunklung des Messaufbaus ist ausreichend. Trotzdem bleiben die Filter weiterhin eingebaut; sie verschlechtern die Ergebnisse nicht und ermöglichen den Verzicht auf die Abdunklung.

Durch eine Veränderung der Intensität der Mess-LED konnte das Rauschen der Signale vermindert werden. Ein Absenken der Mess-LED-Intensität führt außerdem dazu, dass die maximal messbare Amplitude von 270.000 erst bei höherer OD erreicht wird, so dass der Bereich, in dem Messungen möglich sind, vergrößert wird. Es wurden die optimalen LED-Intensitäten für die späteren Messungen gesucht, sie betragen 1 % auf beiden Kanäle für Set-up A, 25 % für Set-up C auf Kanal 2 und 50 % für Set-up C auf Kanal 1.

Eine Verminderung des Messrauschens wurde mit Hilfe von digitalen Filtern erreicht. Es wurde Mittelwerts-, Median- und Savitzky-Golay-Filter sowie Kombinationen aus diesen getestet. Die stärkste Rauschverminderung wurde unter Verwendung des Medianfilters mit einer Filterbreite von 45 ( $m = 22$ ) und anschließender Savitzky-Golay-Filterung mit einer Filterbreite von 9 ( $m = 4$ ) erreicht, woraus sich eine Filterbreite von etwa 8 min ergibt.

## 6.5 Messungen während der Kultivierung von *Kluyveromyces marxianus*

Nachdem in den vorhergehenden Messungen herausgefunden wurde, dass online-Messungen der optischen Dichte im Schüttlerbetrieb möglich sind, und die LED-Einstellung sowie die digitale Filterung der Messwerte optimiert wurden, soll das Messsystem nun unter realen Bedingungen, also während einer Kultivierung getestet werden. Als Mikroorganismus wird der Hefestamm *Kluyveromyces marxianus* DSM5422 (DSMZ, Braunschweig) verwendet. Dieser Organismus wurde ausgewählt, da es sich hierbei zwar - wie bei dem Organismus, der für die in Abschnitt 6.4.2 beschriebenen Vorversuchen verwendet wurde - um einen Hefestamm handelt, allerdings handelt es sich um eine andere Gattung. So lässt sich herausfinden, ob der Zusammenhang zwischen Amplitude und optischer Dichte für verschiedene Hefegattungen identisch ist.

Die Animpfung der *Kluyveromyces marxianus*-Kulturen erfolgt von einer Plattenkultur in 100 mL Medium (Zusammensetzung siehe Anhang, Abschnitt C.4). Als Kulturgefäß wird ein 250 mL Plastikkolben verwendet, da dieser von der PreSens GmbH (Regensburg) als Standardkolben vorgesehen ist. Auf dem SFR wird auf Kanal 1 und Kanal 2 jeweils ein Plastikkolben mit *Kluyveromyces marxianus*-Kultur platziert. Die Kultivierung wird jeweils ca. 24 h durch Messung der Amplitude verfolgt. Während der Kultivierung wird außerdem ca. alle 1,5 h eine Probe genommen und deren optische Dichte mit dem Laborphotometer gemessen. Bei beiden Kultivierungen mit Set-up A ist die Intensität der Mess-LED für beide Kanäle auf 1 % eingestellt. Für Set-up C ist die Intensität der Mess-LED für Kanal 1 auf 50 % und für Kanal 2 auf 25 % eingestellt. Die Einstellungen ergeben sich aus den Ergebnissen der Kalibrationsgeraden (Anhang, Abschnitt B.4). Die beiden Kanäle sollen bei gleicher optischer Dichte möglichst ähnliche Werte für die Amplitude anzeigen und es soll einen möglichst großen Messbereich abgedeckt werden.

### 6.5.1 Messungen mit Set-up A

Die Wachstumskurven der mit Set-up A durchgeführten Kultivierungen sind in Abbildung 6.13 dargestellt. Die Messungen zeigen den Verlauf typischer Wachstumskurven für Hefekulturen. Die lag-Phase dauert ca. 6 h, danach beginnt die exponentielle Wachstumsphase. Nach ca. 13 h gehen die Kulturen in die stationäre Phase über.

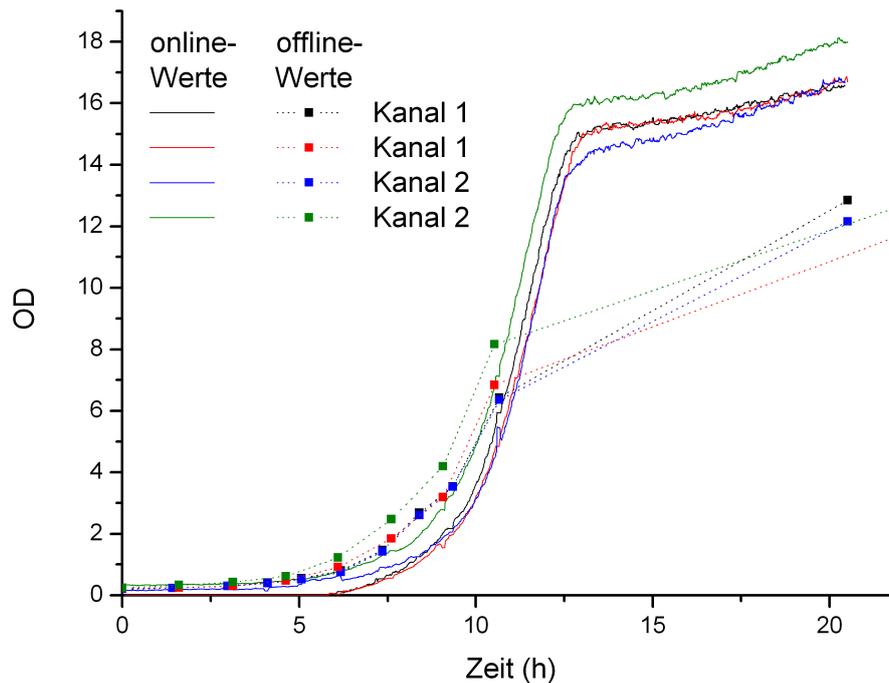


Abbildung 6.13: Optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit, gefilterte Werte bei Kultivierung von *Kluyveromyces marxianus*, Set-up A, Punkte und gestrichelte Linien: mit dem Laborphotometer gemessene OD, durchgezogene Linie aus der Amplitude berechnete OD, Kalibration erfolgte mit Werten aus Messungen mit Backhefe

Die Berechnung der optischen Dichte aus der gemessenen Amplitude erfolgte mit der Kalibrationsgeraden, die mit Backhefe als Modellorganismus in Plastikkolben erstellt wurden (Anhang, Abschnitt B.4). Wie der Vergleich zwischen online- und offline-Werten zeigt, ist die Kalibration für diesen Organismus nicht ideal. Obwohl es sich bei beiden Organismen um Hefen handelt, können die Kalibrationskurven für Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) nicht ohne Weiteres übernommen werden. Stattdessen wurde aus den Werten einer der beiden Messungen eine Kalibration erstellt und mit dieser die gemessenen Amplituden aus der anderen Messung in Werte für die optische Dichte umgerechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.14 dargestellt.

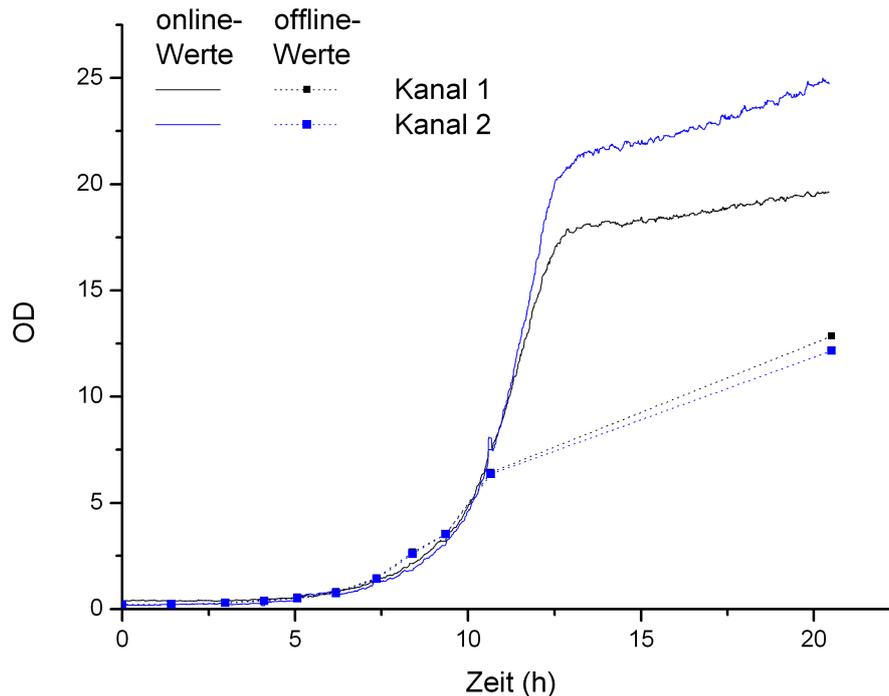


Abbildung 6.14: Optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit, gefilterte Werte bei Kultivierung von *Kluyveromyces marxianus*, Set-up A, Punkte und gestrichelte Linien: mit dem Laborphotometer gemessene OD, durchgezogene Linie aus der Amplitude berechnete OD, Kalibration erfolgte mit Werten aus einer anderen *K. marxianus*-Kultivierung

Zu Beginn der Messung stimmen die offline-Werte sehr gut mit den online-Werten überein. Ab einer optischen Dichte von ca. 8,0 weichen sie stark voneinander ab. Dies lässt sich damit erklären, dass der lineare Zusammenhang zwischen Amplitude und optischer Dichte bei Set-up A nur bis zu diesem Wert gegeben ist. Das verwendete Set-up lässt sich daher nur eingeschränkt für das Bioprozessmonitoring bis ca. OD 8,0 einsetzen.

### 6.5.2 Messungen mit Set-up C

Abbildung 6.15 stellt die Wachstumskurven dar, die bei der Kultivierung von *K. marxianus* mit Set-up C erhalten werden. Wiederum zeigen die Messungen typische Wachstumsverläufe für Hefekulturen. Die lag-Phase dauert ca. 6 h, danach beginnt die exponentielle Wachstumsphase, die nach ca. 13 h in die stationäre Phase übergeht.

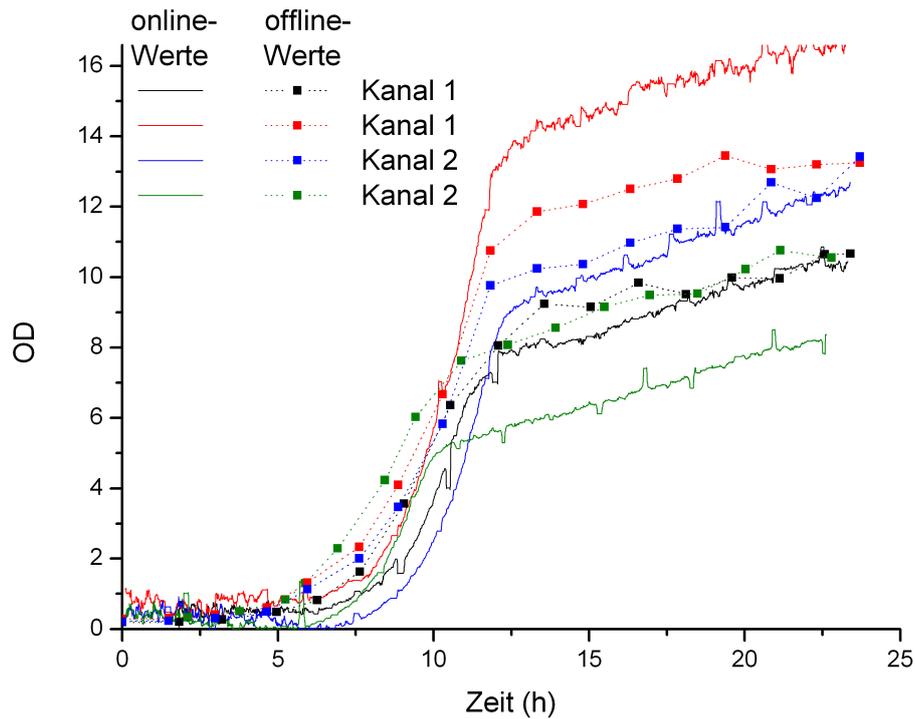


Abbildung 6.15: Optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit, gefilterte Werte bei Kultivierung von *Kluyveromyces marxianus*, Set-up C, Punkte und gestrichelte Linien: mit dem Laborphotometer gemessene OD, durchgezogene Linie aus der Amplitude berechnete OD, Kalibration erfolgte mit Werten aus Messungen mit Backhefe

Die Berechnung der optischen Dichte aus den Amplitudenwerten erfolgte wiederum mit der aus den Messungen mit Backhefe erstellten Kalibrationsgerade (Anhang, Abschnitt B.4), auch hier erkennt man eine Diskrepanz zwischen online- und offline-Werte. Die unterschiedliche Morphologie der beiden Zelltypen hat also sowohl Einfluss auf die Streuung als auch auf die Reflexion von Licht.

Auch bei Messungen mit Set-up C lässt sich eine größere Übereinstimmung von online- und offline-Messwerten erzielen, indem aus den Werten einer Messung eine Kalibrationsgerade erstellt und diese für die Berechnung der optischen Dichte aus den Amplitudenwerten der zweiten Messung verwendet (Abbildung 6.16). Die offline-Messwerte stimmen nun besser mit den online-Werten überein. Eine so gute Übereinstimmung wie mit Set-up A lässt sich nicht allerdings nicht erreichen. Messungen mit Set-up C sind also weniger genau, dafür ist aber die Messung in einem größerem Bereich möglich, da die lineare Abhängigkeit der optischen Dichte von der Amplitude hier über einen wesentlichen weiteren Bereich (OD 1-25) besteht.

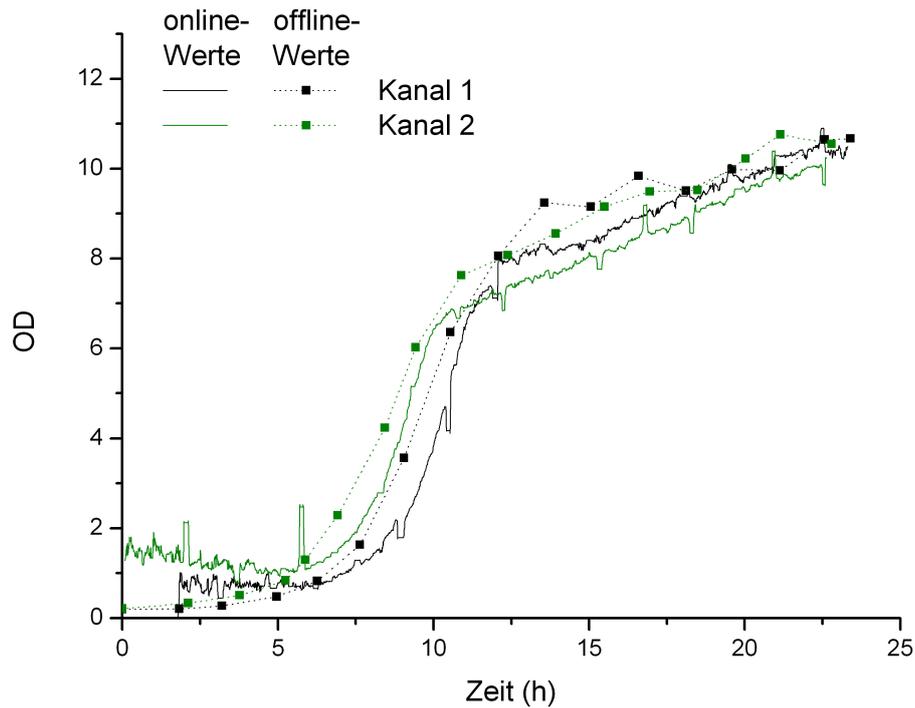


Abbildung 6.16: Optische Dichte in Abhängigkeit von der Zeit, gefilterte Werte bei Kultivierung von *Kluyveromyces marxianus*, Set-up C, Punkte und gestrichelte Linien: mit dem Laborphotometer gemessene OD, durchgezogene Linie aus der Amplitude berechnete OD, Kalibration erfolgte mit Werten aus einer anderen *K. marxianus*-Kultivierung

### 6.5.3 Zusammenfassung

Der zeitliche Verlauf von Kultivierungen lässt sich mit dem SFR online verfolgen. Man erhält sowohl mit Set-up A als auch mit Set-up C die erwarteten Wachstumskurven.

Die Kultivierungen wurden dem Hefestamm *Kluyveromyces marxianus* DSM5422 (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt. Die Auswertung wurde zunächst mit Kalibrationsgeraden durchgeführt, die mit Hilfe von Backhefesuspensionen erhalten wurden. Die so berechneten online-Werte stimmten nicht sehr gut mit den offline-Messwerten überein. Daher wurden Kalibrationsgeraden für den hier verwendeten Stamm ermittelt und die Wachstumskurven neu berechnet, wodurch die Korrelation zwischen online- und offline-Werten verbessert werden konnte. Bei Messungen mit Set-up A ist die Genauigkeit größer, dafür sind Messungen mit Set-up C in einem größerem Bereich möglich.

## 6.6 Diskussion und Ausblick

Das Messsystem eignet sich zur online-Messung der optischen Dichte. Dies wurde zunächst durch Messungen mit Modellsystemen untersucht. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen gemessener Amplitude und optischer Dichte in bestimmten Bereichen sowohl bei Streulichtmessungen als auch bei Reflexionsmessungen. Es zeigte sich, dass dieser Bereich bei Messungen des Reflexionslichtes größer ist als bei Messungen des Streulichtes. Für *K. marxianus*-Kulturen liegt er bei OD 0-8 für Streulichtmessungen und bei OD 1-25 für Reflexionsmessungen. Allerdings sind Streulichtmessungen vor allem bei einer geringen optischen Dichte genauer als Reflexionsmessungen.

Es wurde herausgefunden, dass Streulichtmessungen auch möglich sind, wenn ein gewisser Abstand zwischen LED und Schüttelkolben besteht. Dies ist von Vorteil, da so mit demselben Aufbau in Schüttelkolben unterschiedlicher Größe gemessen werden kann.

Werden Messungen im Schüttlerbetrieb durchgeführt, wird ein starkes Signalrauschen beobachtet. Durch die Verwendung eines geeigneten mathematischen Filters, wie z.B. einer Kombination aus Medianfilter einer Fensterbreite von 45 und Savitzky-Golay-Filter mit einer Fensterbreite von 9, kann dieses reduziert werden.

Bei online-Messungen während der Kultivierung des Hefestammes *Kluyveromyces marxianus* DSM5422 wurden die typische Wachstumsverläufe erhalten. Es zeigte sich jedoch, dass die Kalibrationsgeraden, die bei Messungen mit Backhefe erhalten wurden, für diesen Hefestamm nicht gültig waren. Es sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob für jeden Organismus eine eigene Kalibration notwendig ist oder ob es möglich ist, z.B für Organismen derselben Gattung dieselbe Kalibration zu verwenden.

# Kapitel 7

## Zusammenfassung

Ein in der Entwicklung befindlicher optischer Sensor wurde getestet, als Referenzsensor diente dabei ein etablierter optischer Sensor. Es wurden wichtige Kriterien wie die Ansprechzeit, die Reproduzierbarkeit und das Driftverhalten untersucht und verglichen.

Die Ansprechzeiten des zu testenden Sensors sind größer als die des Referenzsensors. Sie liegen dennoch innerhalb der geforderten Spezifikation von 60 s. Die Reproduzierbarkeit der Messwerte ist bei beiden Sensoren gegeben. Die Untersuchung des Driftverhaltens ergab, dass sich der Test-Sensor nach einem Wechsel von Gas in Wasser zunächst an die wässrige Phase adaptieren muss, während dieser Adaptionsphase tritt eine Drift des Messsignals auf. Nach etwa 5 h hat sich der Sensor vollständig an die wässrige Phase adaptiert, es wird im Vergleich zu dem Referenzsensor keine weitere Signaldrift beobachtet. Bis auf die Ansprechzeit sind also alle überprüften Kriterien des zu testenden Sensors mit denen des Referenzsensors vergleichbar.

Des Weiteren wurden zwei verschiedene optische Sensoren optimiert. Zum Einen ein ratiometrischer optischer Chemosensor zur Bestimmung von Sauerstoffgehalt und Temperatur, zum Anderen ein photometrischer Sensor zur online-Messung der optischen Dichte in Schüttelkolben.

Für das in einer vorhergehenden Dissertation entwickelte ratiometrische Sensorsystem wurde die optimale Farbstoffmischung für den jeweiligen Analyten bestimmt. Als Auswahlkriterium diente dabei die Empfindlichkeit des Signalquotienten der Patches gegenüber Sauerstoffgehalt und Temperatur. Es folgte die mathematische Beschreibung der Abhängigkeit der Signalquotienten von diesen Messgrößen, um darauf basierend ein geeignetes Kalibrationsverfahren zu entwickeln. Der Temperatursensor lässt sich mit Hilfe von drei Messwerten kalibrieren, daraus ergeben sich Messungen mit einer Genauigkeit von  $0,5^{\circ}\text{C}$ . Der Sauerstoffsensor kann bei konstanter Temperatur betrieben werden, dann ist eine Zweipunktkalibration ausreichend.

Soll er bei variierender Temperatur messen, so muss eine Vierpunktkalibration erfolgen, bei der sowohl die Temperatur als auch der Sauerstoffgehalt verändert werden muss.

Es wurden wichtige Qualitätsmerkmale des Sensorsystems überprüft, um es dann in Kultivierungen einsetzen zu können. Hierbei wurde eine gute Reproduzierbarkeit sowie die Langzeitstabilität des Messsignals und die Stabilität der Patches gegenüber Heißdampfsterilisation nachgewiesen. Bei der Untersuchung der Ansprechzeit wurden große Abweichungen zwischen Messungen mit unterschiedlichen Patches festgestellt.

Zunächst wurde eine Modell-Kultivierung durchgeführt, bei der nur die Sauerstoff-optode verwendet wurde, später wurden beide Optoden in Kombination eingesetzt. Dabei wurde ein starkes Signalauschen festgestellt. Mit Hilfe von mathematischen Filtern konnte dieses Rauschen minimiert werden, so dass zufriedenstellende Ergebnisse erhalten wurden.

Das Sensorsystem lässt sich also zur temperaturunabhängigen Sauerstoffmessung nutzen. Um eine einfachere Handhabung zu ermöglichen, sollte die Reproduzierbarkeit der Herstellungsprozesse der Patches verbessert werden. Dadurch wäre es möglicherweise nicht mehr notwendig, jeden Patch einzeln zu kalibrieren, stattdessen könnten die Kalibrationsdaten eines Patches auf seine gesamte Batch zu übertragen. Des Weiteren könnte die Empfindlichkeit der Temperaturmessung erhöht werden, indem man z.B. die Farbstoffkonzentration des Patches variiert.

Der photometrische Sensor zur online-Messung der optischen Dichte wurde zunächst mit  $\text{TiO}_2$ -Partikeln getestet, dann mit Backhefesuspensionen. In einem bestimmten Bereich konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Amplitude und optischer Dichte festgestellt werden. Bei Reflexionsmessungen ist dieser Bereich größer als bei Streulichtmessungen, allerdings ist bei diesen die Genauigkeit größer. Der Betrieb des Tischschüttlers führte zu starkem Rauschen des Messsignals, das durch die Anwendung mathematischer Filter reduziert werden konnte.

Das Verfolgen von Wachstumskurven mit dem photometrischen online-Sensor ist möglich. Allerdings zeigte sich, dass man für die verschiedenen verwendeten Organismen jeweils eine individuelle Kalibration erstellen muss. Es sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob es möglich ist, z.B. für Organismen derselben Gattung dieselbe Kalibration zu verwenden.

Auch sollte die flexible Halterung durch eine starre ersetzt werden, um dadurch Signaländerungen, die durch kleine Änderungen der LED-Stellung hervorgerufen werden, zu vermeiden. So ließe sich wahrscheinlich die Reproduzierbarkeit der Messungen erhöhen.

# Literaturverzeichnis

- [1] P. Gründler, *Chemical sensors - An Introduction for Scientists and Engineers*. Springer-Verlag, Berlin, 2007.
- [2] I. Bergmann, "Rapid-response atmospheric oxygen monitor based on fluorescence quenching," *Nature*, vol. 218, p. 396, 1968.
- [3] O. S. Wolfbeis, "Materials for fluorescence-based optical chemical sensors," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 15, pp. 2657–2669, 2005.
- [4] A. Turner, I. Karube, and G. Wilson, *Biosensors, Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford, 1987.
- [5] F. Scheller and F. Schubert, *Biosensoren*. Birkhäuser-Verlag, Basel, 1989.
- [6] J. Janata and A. Bezegh, "Chemical sensores," *Analytical Chemistry*, vol. 60, pp. 62R–74R, 1988.
- [7] Y. Amao and K. Asai, "Novel optical sensing material: platinum porphyrin-styrene-pentafluorostyrene copolymer film," *Analytical Communication*, vol. 36, pp. 367–369, 1999.
- [8] Y. Amao and K. Asai, "Platinum porphyrin embedded in poly(1-trimethylsilyl-1-propyne) film as an optical sensor for trace analysis of oxygen," *Analyst*, vol. 125, pp. 1911–1914, 2000.
- [9] C. S. Chu and Y. L. Lo, "High-performance fiber-optic oxygen sensors based on fluorinated xerogels doped with Pt(II) complexes," *Sensors and Actuators B*, vol. 124, pp. 376–382, 2007.
- [10] A. Vinogradov, M. Fernandez-Searra, B. Dugan, and D. Wilson, "Frequency domain instruments for measuring phosphorescence lifetimedistributions in heterogeneous samples," *Review of scientific instruments*, vol. 72, pp. 3396–3406, 2001.

- 
- [11] L. Ziemer, W. Lee, S. Vinogradov, C. Sehgal, and D. Wilson, "Oxygen distribution in murine tumors: characterization using oxygen-dependent quenching of phosphorescence," *Journal of Applied Physiology*, vol. 98, pp. 1503–1510, 2005.
- [12] G. Schears, S. Schultz, J. Creed, W. Greeley, D. Wilson, and P. A., "Effect of perfusion flow rate on tissue oxygenation in newborn piglets during cardiopulmonary bypass," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 75, pp. 560–565, 2003.
- [13] M. Fritzsche, C. G. Barreiro, B. Hitzmann, and T. Scheper, "Optical pH sensing using spectral analysis," *Sensors and Actuators B*, vol. 128, pp. 133–137, 2007.
- [14] H. R. Kermis, Y. Kostov, P. Harms, and G. Rao, "Dual excitation ratiometric fluorescent pH sensor for non invasive bioprocess monitoring: development and application," *Biotechnology Progress*, vol. 18, pp. 1047–1053, 2002.
- [15] J. I. Peterson, S. R. Goldstein, R. V. Fitzgerald, and D. K. Buckhold, "Fiber optic pH probe for physiological use," *Analytical Chemistry*, vol. 52, pp. 864–869, 1980.
- [16] J. Lin, "Recent development and applications of optical and fiber-optic pH sensors," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 19, pp. 541–552, 2000.
- [17] T. Hao, X. Xing, and C. C. Liu, "A pH sensor constructed with two types of optical fibers: the configuration and the initial results," *Sensors and Actuators B*, vol. 10, pp. 155–159, 1993.
- [18] S. Motellier, M. H. Michels, B. Duréault, and P. Toulhoat, "Fiber-optic pH sensor for in situ applications," *Sensors and Actuators B*, vol. 11, pp. 467–473, 1993.
- [19] L. Yang and S. S. Saavedra, "Chemical sensing using sol-gel derived planar wave guides and indicator phases," *Analytical Chemistry*, vol. 67, pp. 1307–1314, 1995.
- [20] C. Egami, Y. Suzuki, and O. Sugihara, "Wide range pH fiber sensor with congo-red- and methyl-red-doped poly(methyl methacrylate) cladding," *Japanese Journal of Applied Physics Part 1*, vol. 36, pp. 2902–2905, 1997.
- [21] A. Song, S. Parus, and R. Kopelmann, "High-performance fiber-optic pH microsensors for practical physiological measurements using a dual-emission sensitive dye," *Analytical Chemistry*, vol. 69, pp. 863–867, 1997.
- [22] W. Tan, Z. Y. Shi, and R. Kopelman, "Development of submicron chemical fiber optic sensors," *Analytical Chemistry*, vol. 64, pp. 2985–2990, 1992.

- [23] W. Tan, Z. Y. Shi, S. Smith, D. Birnbaum, and R. R. Kopelman, "Submicrometer intracellular chemical optical fiber sensors," *Science*, vol. 258, pp. 775–778, 1992.
- [24] C. Y. Li, X. B. Zhang, Z. X. Han, B. Akermark, L. Sun, G. L. Shen, and R. Q. Yu, "A wide pH range optical sensing system based on a sol-gel encapsulated amino-functionalised corrole," *Analyst*, vol. 131, pp. 388–393, 2006.
- [25] S. Dong, M. Luo, G. Peng, and W. Cheng, "Broad range pH sensor based on sol/gel entrapped indicators on fibre optic," *Sensors and Actuators B*, vol. 129, pp. 94–98, 2008.
- [26] B. Dremel and R. Schmid, "Optical sensors for bioprocess control," *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 64, pp. 510–517, 1992.
- [27] B. Weidgans, C. Krause, I. Klimant, and O. Wolfbeis, "Fluorescent pH sensors with negligible sensitivity to ionic strength," *Analyst*, vol. 129, pp. 645–650, 2004.
- [28] J. Severinghaus and A. Bradley, "Electrodes for blood pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub> determination," *Journal of Applied Physiology*, vol. 13, pp. 515–520, 1958.
- [29] A. Mills, "Optical sensors for carbon dioxide and their applications," *In: Sensors for Environment, Health and Security: Advanced Materials and Technologies*, pp. 347–370, 2009.
- [30] B. Weigl and O. Wolfbeis, "Sensitivity studies on optical carbon-dioxid sensors based on ion-pairing sensitivity studies on optical carbon-dioxide sensors based on ion-pairing," *Sensors and Actuators B*, vol. 28, pp. 151–156, 1995.
- [31] X. Ge, Y. Kostov, and G. Rao, "Low-cost non-invasive optical CO<sub>2</sub> sensing for fermentation and cell culture," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 89, pp. 329–334, 2004.
- [32] X. Ge, Y. Kostov, and G. Rao, "High-stability non-invasive autoclavable naked optical co<sub>2</sub> sensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, pp. 857–865, 2003.
- [33] A. Mills and Q. Chang, "Fluorescence plastic thin-film sensor for carbon dioxide," *Analyst*, vol. 118, pp. 839–843, 1993.
- [34] O. Wolfbeis and H. Posch, "Fiber-optic fluorescing sensor for ammonia," *Analytica Chimica Acta*, vol. 185, pp. 321–327, 1986.
- [35] S. Charlton, R. Fleming, and A. Zipp, "Solid-phase colirometric determination of potassium," *Clinical Chemistry*, vol. 28, p. 1857, 1982.

- [36] S. Charlton *US Patent 4.645.744*, 1987.
- [37] A. Kumar, E. Chapoteau, P. Czech, C. Gebauer, M. Chimenti, and O. Raimondo, "Chromogenic ionophore-based methods for spectrophotometric assay of sodium and potassium in serum and plasma," *Clinical Chemistry*, vol. 34, pp. 1709–1712, 1988.
- [38] R. Ng, K. Sparks, and B. Statland, "Colorimetric determination of potassium in plasma and serum by reflectance photometry with a dry-chemistry reagent," *Clinical Chemistry*, vol. 38, pp. 1371–1372, 1992.
- [39] Z. Zhujun, J. Mullin, and W. Seitz, "Optical sensor for sodium based on ion-pair extraction and fluorescence," *Analytica Chimica Acta*, vol. 184, pp. 251–258, 1986.
- [40] L. Saari and W. Seitz, "Immobilized morin as fluorescence sensor for determination of aluminum(III)," *Analytical Chemistry*, vol. 55, pp. 667–670, 1983.
- [41] T. Hirschfeld, T. Deaton, F. Milanovich, and S. Klainer, "Feasibility of using fiber optics for monitoring groundwater contaminants," *Optical Engineering*, vol. 22, pp. 527–531, 1983.
- [42] T. Hirschfeld, T. Deaton, F. Milanovich, and S. Klainer, "The feasibility of using fiber optics for monitoring groundwater contaminations," *EPA Report AD-89-F-2A074*, 1983.
- [43] I. Klimant, M. Kuhl, R. Glud, and G. Holst, "Optical measurement of oxygen and temperature in microscale: strategies and biological application," *Sensors and Actuators B*, vol. 38-39, pp. 29–37, 1997.
- [44] J. Lu and Z. Rosenzweig, "Nanoscale fluorescent sensors for intracellular analysis," *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 366, pp. 569–575, 2000.
- [45] R. Koneke, A. Comte, H. Jurgens, O. Kohls, H. Lam, and T. Scheper, "Faseroptische Sauerstoffsensoren für Biotechnologie, Umwelt- und Lebensmitteltechnik," *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 70, pp. 1611–1617, 1998.
- [46] H. R. Kermis and Y. Kostov, "Rapid method for the preparation of a robust optical pH sensor," *Analyst*, vol. 128, pp. 1181–1186, 2003.
- [47] M. Fritzsche, *Entwicklung ratiometrischer optischer Chemosensoren*. PhD thesis, Universität Hannover, 2006.

- [48] S. W. Lai, Y. J. Hou, C. M. Che, H. L. Pang, K. Y. Wong, C. K. Chang, and N. Y. Zhu, "Electronic spectroscopy, photophysical properties, and emission quenching studies of an oxidatively robust perfluorinated platinum porphyrin," *Inorganic Chemistry*, vol. 43, pp. 3724–3732, 2004.
- [49] K. Grattan and Z. Zhang, "Fiber optic fluorescence thermometry," *In: Topics in fluorescence spectroscopy, vol. 4: Probe design and chemical sensing*, vol. a, p. a, 1994.
- [50] H. Lam, *Entwicklung eines faseroptischen Chemo- und eines Biosensors und deren Einsatz in der Biotechnologie*. PhD thesis, Universität Hannover, 2002.
- [51] R. Becker, *Theory and interpretation of fluorescence and phosphorescence*. Wiley, New York, 1969.
- [52] H. Szmajda and J. Lakowicz, "Life-time based sensing," *In: Topics in fluorescence spectroscopy, vol. 4 Probe design and Chemical sensing*, Plenum Press, New York, 1994.
- [53] *Römpp Chemie-Lexikon*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.
- [54] S. Im, G. Khalil, J. Callis, B. Ahn, M. Gouterman, and Y. Xia, "Synthesis of polystyrene beads loaded with dual luminophors for self-referenced oxygen sensing," *Talanta*, vol. 67, pp. 492–497, 2005.
- [55] Y. Kostov, P. Harms, R. Pilato, and G. Rao, "Ratiometric oxygen sensing: detection of dual emission ratio through a single emission filter," *The Analyst*, vol. 125, pp. 1175–1178, 2000.
- [56] Y. Kostov and G. Rao, "Ratio measurements in oxygen determinations: wavelength ratiometry, lifetime discrimination, and polarization detection," *Sensors and Actuators B*, vol. 90, pp. 139–142, 2003.
- [57] P. Jorge, P. Caldas, J. Esteves da Silva, C. Rosa, A. Oliva, J. Santos, and F. Fahren, "Luminescence-based optical fiber chemical sensors," *Fiber and Integrated Optics 24, 201-225*, vol. 24, pp. 201–225, 2005.
- [58] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes*. Academic Press, London, 1992.
- [59] M. van Griensven, J. Zeichen, M. Skutek, T. Barkhausen, C. Krettek, and U. Bosch, "Cyclic mechanical strain induces NO production in human patellar tendon fibroblasts—a possible role for remodelling and pathological transformation," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 54, pp. 335–338, 2003.

- [60] S. Diederichs, *Dynamische Kultivierungsmethoden für das Tissue Engineering von Knochen*. PhD thesis, Leibniz Universität Hannover, 2008.
- [61] K. Cammann, *Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung, 1. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001.
- [62] R. Seevaratnam, B. Patel, and M. Hamadeh, “Comparison of total protein concentration in skeletal muscle as measured by the bradford and lowry assays,” *Journal of biochemistry*, vol. 145, pp. 791–797, 2009.
- [63] T. Scheper, *Bioanalytik: Messung des Zellzustands und der Zellumgebung in Bioreaktoren*. Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1991.
- [64] K. Dochnahl, *Einsatz optischer Methoden bei der online Analytik von Fermentationen*. PhD thesis, Universität Kaiserslautern, 1997.
- [65] D. Skoog and J. Leary, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen*. Springer-Verlag, Berlin, 1996.
- [66] P. Jeffers, S. Raposo, M. Lima-Costa, P. Conolly, B. Glennon, and P. Kieran, “Focussed beam reflectance measurement (FBRM) monitoring of particle size and morphology in suspension cultures of morinda citrifolia and centaurea calcitrapa,” *Biotechnological Letters*, vol. 25, pp. 2023–2028, 2003.
- [67] S. Iijima, S. Yamashita, K. Matsunaga, H. Miura, M. Morikawa, K. Shimizu, and M. Matsubara, “Use of a novel turbidimeter to monitor microbial growth and control glucose concentration,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 40, pp. 203–213, 1987.
- [68] B. Park, W. Lee, Y. Chang, and H. Chang, “Long-term operation of continuous high cell density culture of *saccharomyces cerevisiae* with membrane filtration and online cell concentration monitoring,” *Bioprocess Engineering*, vol. 21, pp. 97–100, 1999.
- [69] E. Poilpre, T. D. G. Goma, and V. Guillou, “Online estimation of biomass concentration during transient growth on yeast chemostat culture using light reflectance,” *Biotechnological Letters*, vol. 24, pp. 2075–2081, 2002.
- [70] T. Scheper, “Neue Messverfahren zur Beobachtung des Zellzustands und der Zellumgebung in Bioreaktoren,” *Habil.*, 1990.
- [71] K. Reardon and T. Scheper, “Determination of cell concentration and characterization of cells,” *Biotechnology (2nd Edition)*, vol. 4, pp. 179–223, 1991.

- [72] K. Schugerl, ed., *Analytische Methoden in der Biotechnologie*. Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1991.
- [73] K. Kolahi and H. Rock, "Kooperative Sensorfusion in der Durchflussmesstechnik," *Technisches Messen*, vol. 71, pp. 154–163, 2004.
- [74] Y. Kostov, P. Harms, L. Randers-Eichhorn, and G. Rao, "Low-cost microbio-reactor for high-throughput bioprocessing," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 72, pp. 346–352, 2001.
- [75] R. Madrid and C. Felice, "Microbial biomass estimation," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 25, pp. 97–112, 2005.
- [76] B. Kowalkowski, G. Nowack, and O. Uberbach, "Kontinuierlich arbeitende Photometer in der Wasseraufbereitung," *Angewandte Prozess-Messtechnik*, vol. 17, pp. 1–26, 1996.
- [77] K. Kolahi, "Online-Messtechnik in der Biotechnologie," *Messtechnisches Symposium AHMT*, pp. 108–117, 2001.
- [78] K. Anders, R. Akhnoukh, T. Scheper, and G. Kretzmer, "Messung von Kulturfluoreszenz zur Überwachung und Charakterisierung von Insektenzellkultivierungen in Bioreaktoren," *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 64, pp. 572–573, 1992.
- [79] L. Meireles, J. Azevedo, J. Cunha, and M. F., "Online determination of biomass in a microalga bioreactor using a novel computerized flow injection analysis system," *Biotechnological Progress*, vol. 18, pp. 1387–1391, 2002.
- [80] K. Schugerl, "Progress in monitoring, modeling and control of bioprocess during the last 20 years," *Journal of Biotechnology*, vol. 85, pp. 149–173, 2001.
- [81] E. Veale, J. Irudayaraj, and A. Demirci, "An online approach to monitor ethanol fermentation using FTIR spectroscopy," *Biotechnological Progress*, vol. 23, pp. 494–500, 2007.
- [82] C. Lee and H. Lim, "New device for continuously monitoring the optical density of concentrated microbial cultures," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 22, pp. 639–642, 1980.
- [83] A. Ortmanis, W. Patterson, and R. Neufeld, "Evaluation of a new turbidimeter design incorporating a microprocessor-controlled variable pathlength cuvette," *Enzyme Microbiological Technology*, vol. 13, pp. 450–455, 1991.

- 
- [84] Y. Lee, "Pulsed light probe for cell density measurement," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 23, pp. 1903–1906, 1981.
- [85] J. Lima-Filho and W. Ledingham, "Continuous measurement of biomass concentration in laboratory-scale fermenters using a led-electrode system," *Biotech. Tech.*, vol. 1, pp. 145–150, 1987.
- [86] M. Ohashi, T. Watanabe, T. Ishikawa, and Y. Watanabe, "Sensors and instrumentation: Steam-sterilizable dissolved oxygen sensor and cell mass sensor for online fermentation system control," *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, vol. 9, pp. 105–116, 1979.
- [87] R. Sparks and C. Dobbs, "The use of laser backscatter instrumentation for the online measurement of the particle size distribution of emulsions," *Particle & Particle Systems Characterization*, vol. 10, pp. 279–289, 1993.
- [88] V. Guillou, I. Queinnec, J. Uribelarrea, and A. Pareilleux, "Online sensitive lightness measurement of cell mass in *saccharomyces cerevisiae* culture," *Biotech. Tech.*, vol. 10, pp. 19–24, 1996.
- [89] N. Reis, C. Goncalves, A. Vicente, and J. Teixeira, "Proof-of-concept of a novel micro-bioreactor for fast development of industrial bioprocess," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 95, pp. 744–753, 2006.
- [90] H. Elias, *Makromoleküle - Band 1: Chemische Struktur und Synthesen*. Wiley-VCH, Weinheim, 1990.
- [91] B. Junker, D. Wang, and T. Hatton, "Fluorescence sensing of fermentation parameters using fiber optics," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 32, pp. 55–63, 1988.
- [92] B. Junker and H. Wang, "Bioprocess monitoring and computer control: Key roots of the current pat initiative," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 95, pp. 226–261, 2006.
- [93] K. Konstantinov, S. Chuppa, E. Sajan, Y. Tsai, S. Yoon, and F. Golini, "Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures," *Trends in Biotechnology*, vol. 12, pp. 324–333, 1994.
- [94] P. Roychoudhury, R. OKennedy, B. McNeil, and L. Harvey, "Multiplexing fibre optic near infrared (NIR) spectroscopy as an emerging technology to monitor industrial bioprocess," *Analytica Chimica Acta*, vol. 590, pp. 110–117, 2007.

- [95] D. Zabriskie and A. Humphrey, “Real-time estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by component balancing,” *American Institute of Chemical Engineers Journal*, vol. 24, pp. 138–146, 1978.
- [96] L. Villain, L. Meyer, S. Kroll, S. Beutel, and T. Scheper, “Development of a novel membrane aerated hollow-fiber microbioreactor,” *Biotechnological Progress*, vol. 24, pp. 367–371, 2008.
- [97] A. Oberthur, *Aerob-thermophile Reinigung mineralölkontaminierter Abwässer*. PhD thesis, Universität Bayreuth, 2004.

## Abkürzungsverzeichnis

[O <sub>2</sub> ]	Sauerstoffkonzentration
ATR	<i>attenuated total reflectance</i>
bzw.	beziehungsweise
CO	Colorado
d	Schichtdicke
DO	Gelöstsauerstoff
DS	dichroitischer Strahlteiler
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
FIA	Fließ-Injektionsanalyse
g	Gramm
h	Stunde
HPTS	8-Hydroxy-1,3,6-pyrentrisulfonsäure
Hz	Hertz
I <sub>0</sub>	Intensität in Abwesenheit von Sauerstoff
I	Intensität in Anwesenheit von Sauerstoff
K <sub>SV</sub>	Stern-Vollmer-Konstante
KL	Kugellinse
$\lambda$	Wellenlänge
L	Liter
LED	lichtemittierende Diode
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{s}$	Mikrosekunde
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
NJ	New Jersey
nm	Nanometer

ns	Nanosekunde
NY	New York
OD	optische Dichte
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PMT	Photomultiplier
pNH <sub>3</sub>	Ammoniakpartialdruck
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PSU	Polysulfon
PtOEP	Platinoctaethylporphyrin
Q	Signalquotient
rpm	<i>rounds per minute</i>
RU	Relative Einheit
s	Sekunde
SFR	<i>Shaking Flask Reader</i>
$\tau_0$	Lumineszenzintensität in Abwesenheit von Sauerstoff
$\tau$	Lumineszenzintensität in Anwesenheit von Sauerstoff
T	Temperatur
TX	Texas
vgl.	vergleiche
Vol.-%	Volumenprozent
WTC	<i>Wireless Transmission Converter</i>
ZnOEP	Zinkoctaethylporphyrin

# Anhang A

## Sensorsystem zur Sauerstoff- und Temperaturmessung

### A.1 Immobilisierung des Porphyrin-Indikators in Epoxidharz

Es werden Lösungen der beiden Indikatorfarbstoffe in Chloroform mit einer Konzentration von jeweils 10 mg/mL hergestellt. Aus diesen Lösungen werden jeweils 100  $\mu$ L Mischlösung in verschiedenen Verhältnissen hergestellt und mit 100 mg des Epoxidharzes (71 mg Epoxidharz L und 29 mg Härter L) vermischt. Um die Bildung poröser Strukturen zu vermeiden, wird die Mischung zur Entfernung des Lösungsmittels auf einem Objektträger verteilt und etwa 15 min im Abzug stehen gelassen. Anschließend kann die benötigte Menge an Epoxidharz auf einen Glaträger oder die Stirnfläche eines Lichtleiters aufgebracht werden. Zur Aushärtung wird der Sensor über Nacht bei 50 °C gelagert.

### A.2 Herstellung der sauerstoffsensitiven Membran

Es werden Lösungen der Indikatorfarbstoffe in Chloroform mit einer Konzentration von jeweils 1 mg/mL hergestellt. Aus diesen Lösungen werden jeweils 0,1 mL Mischlösung in verschiedenen Verhältnissen hergestellt. 10 mg Polysulfon werden in 0,1 mL dieser Lösung und 0,1 mL Chloroform gelöst und anschließend mit 0,04 mL Ethanol versetzt. 5  $\mu$ L dieser Lösung werden auf ein kreisförmiges Stück Polypropylen/Polyethylen-Vlies von 5 mm Durchmesser gegeben. Nach dem Verdampfen der Lösungsmittel ist die Membran einsatzbereit.

## A.3 Durchführung der Sauerstoffmessungen

Die Messungen des Sauerstoffgehaltes erfolgen in der in Abbildung 4.6 dargestellten Gasdurchflusskammer. Der Sauerstoffgehalt des Gases wird variiert, indem Stickstoff und Sauerstoff in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt werden. Dies wird mit Hilfe des Programmes DasyLab 10 (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA) und zweier Massendurchflussregler durchgeführt. Die Genauigkeit dieser Regler beträgt 2%. Die eingestellten Sauerstoffpartialdrücke werden mit Hilfe der Fibox 3 (PreSens GmbH, Regensburg) kontrolliert. Der Volumenstrom des Gasflusses beträgt 100 mL/min.

## A.4 Abbildungen zur Entwicklung des Sensorsystems

### A.4.1 Foto des Sensorsystems

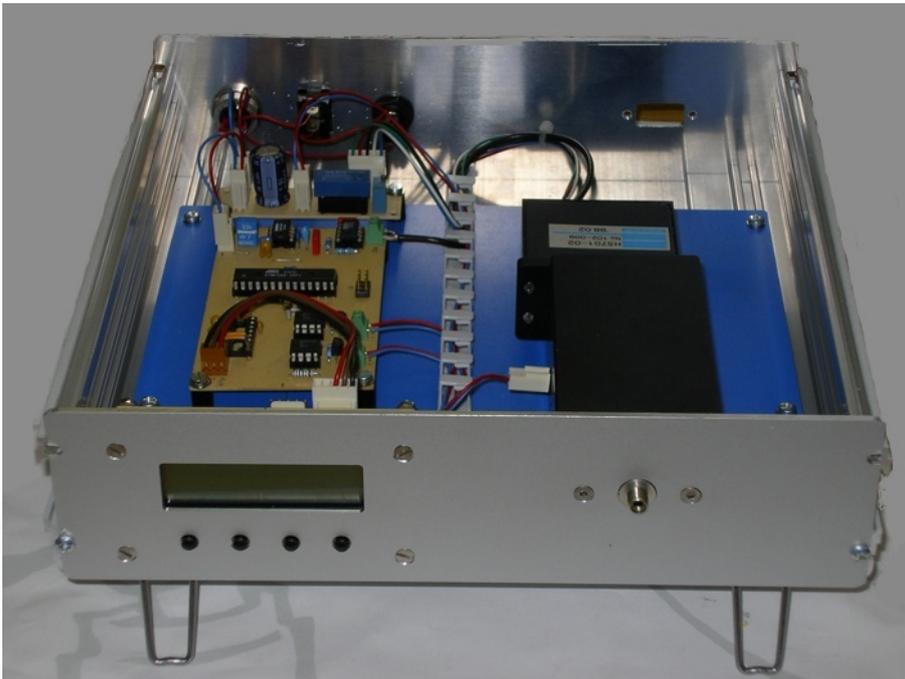


Abbildung A.1: Foto des Sensorsystems zur faseroptischen Temperatur- und Sauerstoffmessung. Um die optischen und elektronischen Komponenten sichtbar zu machen, wurde der Deckel des Gehäuses entfernt.

### A.4.2 Foto der optischen Komponenten

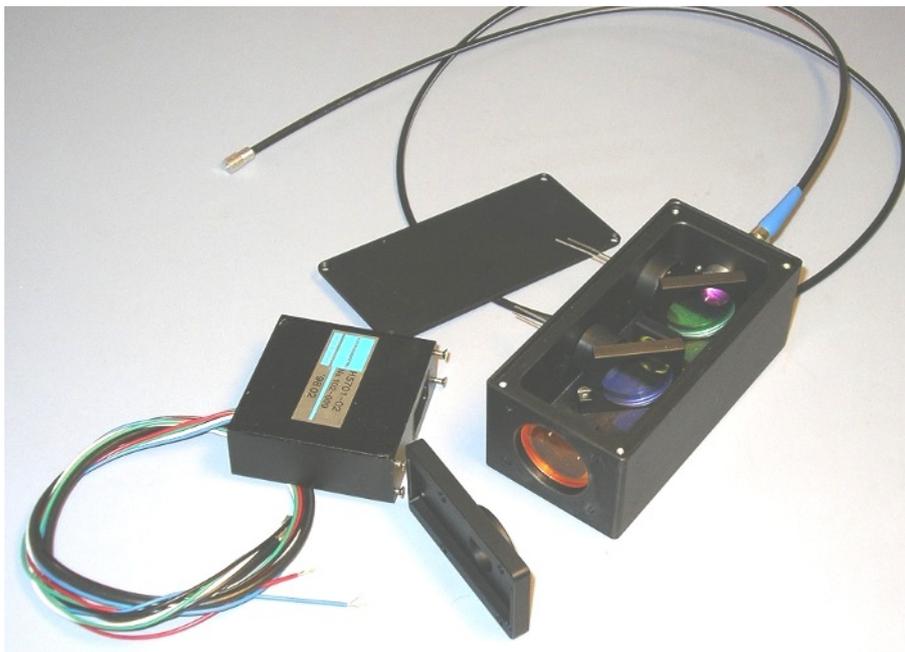


Abbildung A.2: Foto der optischen Komponenten des Sauerstoff- und Temperatursensor-Systems

### A.4.3 Schematische Darstellung der elektronischen Schaltung

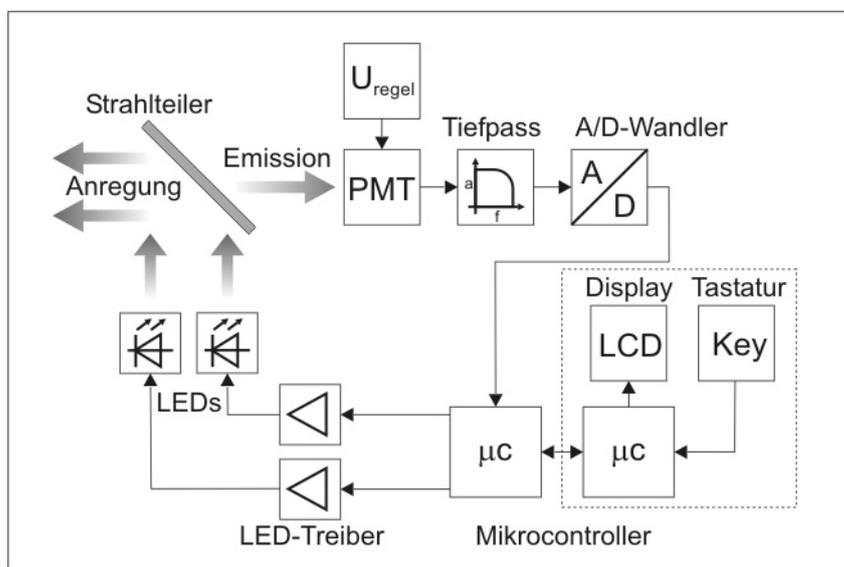


Abbildung A.3: Schematische Darstellung der elektronischen Schaltung des Sauerstoff- und Temperatursensors

# Anhang B

## Online-Messung der optischen Dichte

### B.1 Konstruktionsskizzen und Fotos der LED-Halterung

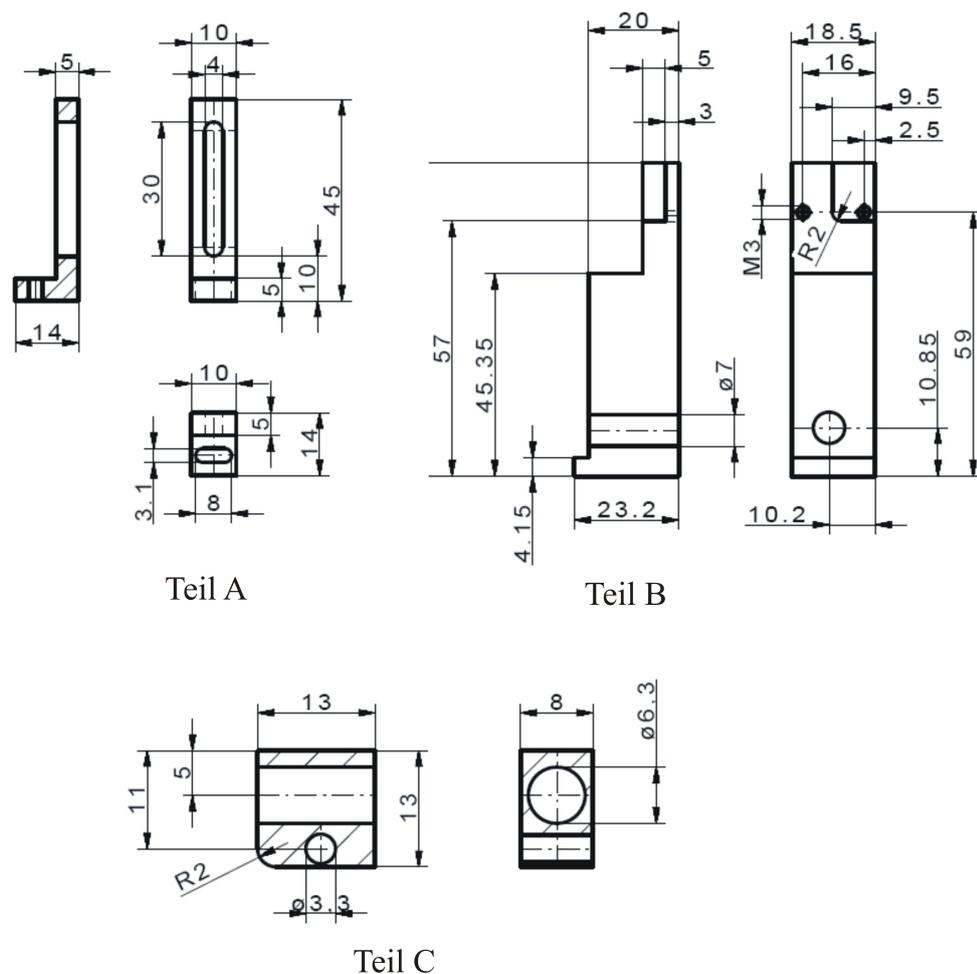


Abbildung B.1: Konstruktionsskizze der LED-Halterung, Maße in mm, Maßstab Teil A und B 1:1, Teil C 1:2

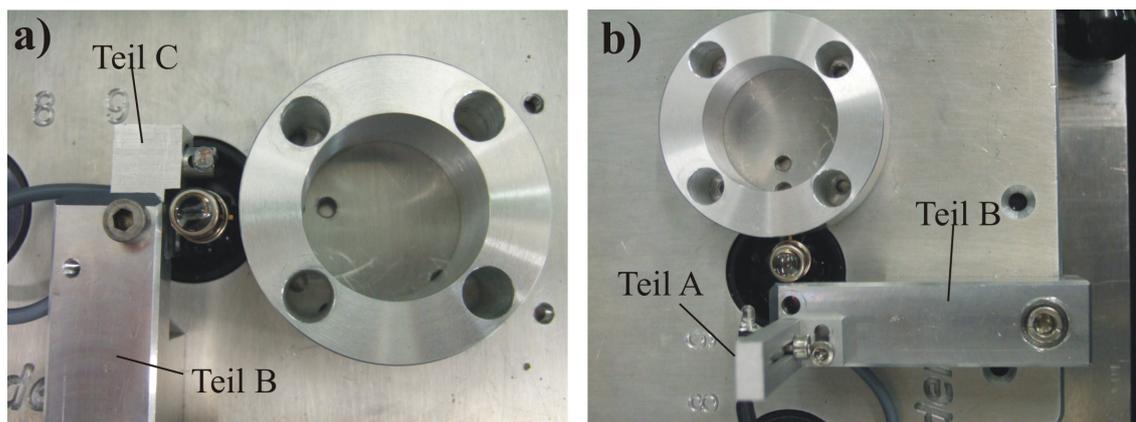


Abbildung B.2: Fotos der LED-Halterung; a) 360°-Stellung, b) 90°-Stellung

## B.2 Optische Dichte in den Schüttelkolben

Tabelle B.1: OD-Werte der Backhefe-Suspensionen in den Schüttelkolben nach Ende der kontinuierlichen Messungen

Set-up	Kanal	OD-Werte nach Ende der verschiedenen Messungen
A	1	4,62
		5,40
		3,68
	2	4,96
		3,62
		4,47
B	1	4,70
		4,20
		4,09
	2	4,85
		4,30
		4,76
C	1	13,29
		11,78
		12,66
	2	8,02
		7,63
		5,81

### B.3 Kalibration des SFR

Für die Kalibration bei Set-up A und Set-up B werden in einem 250 mL Schüttelkolben 100 mL 0,9 %ige Saline-Lösung vorgelegt. Schrittweise wird Backhefe zur Saline-Lösung zugegeben. Nach jeder Zugabe wird die Amplitude des auf die Photodiode treffenden Lichts im Schüttlerbetrieb gemessen. Anschließend wird 1 mL der Backhefe-Suspension als Probe aus dem Schüttelkolben entnommen und ihre optische Dichte mit dem Laborphotometer (SCHOTT Instruments GmbH, Mainz) bei 650 nm gemessen. Die Messung erfolgt in Dreifachbestimmung. Die lineare Regression der linearen Bereiche der Auftragung von mit dem SFR gemessener Amplitude gegen die mit dem Photometer gemessene optische Dichte ergibt die entsprechenden Kalibrationsgeraden.

### B.4 Kalibrationsgeraden

Tabelle B.2: Kalibrationsgeraden für Messungen mit Backhefe in Glaskolben (a = Amplitude)

Kanal	LED-Intensität	Set-up	Kalibrationsgerade	Bestimmtheitsmaß
1	?	A	$a = 59.761 \cdot OD$	0,938
2	?	A	$a = 64.619 \cdot OD$	0,930
1	?	C	$a = 59.761 \cdot OD$	0,940
1	1 %	A	$a = 15.472 \cdot OD + 7537$	0,999
1	25 %	A	$a = 17.451 \cdot OD + 30.197$	0,992
1	50 %	A	$a = 26.577 \cdot OD + 40.912$	0,997
1	75 %	A	$a = 35.066 \cdot OD + 47.891$	0,999
1	99 %	A	$a = 50.078 \cdot OD + 54.602$	1,000
2	1 %	A	$a = 12.609 \cdot OD + 3.473$	0,975
2	25 %	A	$a = 18.097 \cdot OD + 6.512$	1,000
2	50 %	A	$a = 24.991 \cdot OD + 13.503$	1,000
2	75 %	A	$a = 25.392 \cdot OD + 16.523$	1,000
2	99 %	A	$a = 40.651 \cdot OD + 13.503$	1,000
1	1 %	C	$a = 3.599 \cdot OD + 4.966$	0,996
1	25 %	C	$a = 7.237 \cdot OD + 11.548$	0,998

1	50 %	C	$a = 11.260 \cdot OD + 15.505$	0,998
1	75 %	C	$a = 14.524 \cdot OD + 24.316$	0,996
1	99 %	C	$a = 20.735 \cdot OD + 18.112$	1,000
2	1 %	C	$a = 5.493 \cdot OD + 12.231$	0,978
2	25 %	C	$a = 13.299 \cdot OD + 11.702$	0,988
2	50 %	C	$a = 16.767 \cdot OD + 34.498$	1,000
2	75 %	C	$a = 23.222 \cdot OD + 38.665$	1,000
2	99 %	C	$a = 21.785 \cdot OD + 40.791$	1,000

Tabelle B.3: Kalibrationsgeraden für Messungen mit Backhefe in Plastikkolben (a = Amplitude)

Kanal	LED-Intensität	Set-up	Kalibrationsgerade	Bestimmtheitsmaß
1	1 %	A	$a = 13.656 \cdot OD + 10.049$	0,970
1	25 %	A	$a = 15.379 \cdot OD + 29.386$	0,987
1	50 %	A	$a = 24.702 \cdot OD + 41.767$	0,999
1	75 %	A	$a = 33.820 \cdot OD + 53.299$	0,999
1	99 %	A	$a = 47.301 \cdot OD + 63.261$	0,974
2	1 %	A	$a = 11.506 \cdot OD + 2.638$	0,991
2	25 %	A	$a = 17.137 \cdot OD + 7.863$	1,000
2	50 %	A	$a = 22.614 \cdot OD + 13.027$	1,000
2	75 %	A	$a = 28.680 \cdot OD + 21.742$	1,000
2	99 %	A	$a = 39.785 \cdot OD + 18.987$	1,000
1	1 %	C	$a = 3.062 \cdot OD + 6.724$	0,996
1	25 %	C	$a = 6.848 \cdot OD + 8.264$	0,998
1	50 %	C	$a = 10.389 \cdot OD + 10.010$	0,998
1	75 %	C	$a = 13.577 \cdot OD + 23.214$	0,996
1	99 %	C	$a = 20.623 \cdot OD + 19.564$	1,000
2	1 %	C	$a = 4.921 \cdot OD + 6.096$	0,978
2	25 %	C	$a = 10.131 \cdot OD + 14.710$	0,988
2	50 %	C	$a = 15.707 \cdot OD + 10.533$	1,000
2	75 %	C	$a = 17.314 \cdot OD + 38.721$	1,000
2	99 %	C	$a = 17.291 \cdot OD + 58.628$	1,000

Tabelle B.4: Kalibrationsgeraden für Messungen mit *K. marxianus* in Plastikkolben (a = Amplitude)

Set-up	Kalibrationsgerade	Bestimmmaß
A	$a = 11.969 \cdot OD + 1277$	0,996
C	$a = 10.131 \cdot OD + 14.710$	0,978

# Anhang C

## Materialien

### C.1 Verwendete Geräte

4-Kanal-Sauerstoffmessgerät „Oxy-4“	PreSens GmbH, Regensburg
1-Kanal-Sauerstoffmessgerät „Fibox 3“	PreSens GmbH, Regensburg
Analysenwaage „Analytik AC 210S“	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav „Systek V-150“	Systec GmbH, Wetttenberg
Bioreaktor „Biostat A+“	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
CALFLEX-Filter „G380220032“	LINOS Photonics AG, Göttingen
Flowmeter „F150-S-V3/B-250-8-TA“	Porter Instrument Company Inc., Hatfield (USA)
Inkubationshaube „CERTOMAT H“	Sartorius Stedim Systems GmbH, Melsungen
KPG-Rührwerk „IKA-Wertk® RW 20 DZM“	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Laborphotometer „UVIKON Spectrometer 922“	General Tools & Instruments Co., New York (USA)
Magnetrührer „IKAMAG® REC“	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Mass Flow Controller „F210C-FA-11-V“	Bronkhorst High-Tech B.V., Ruurlo (NL)
Peristaltikpumpe „EVA-Pump v2.40“	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter „MP 220“	Mettler Toledo GmbH, Gießen

Photomultiplier „H5701-02“	Hamamatsu Photonics GmbH, Herrsching
Sauerstoffelektrode „OxyFerm FDA225“	Hamilton AG, Bonaduz (CH)
Sicherheitswerkbank „HERAsafe KS 18“	Thermo Fisher SCIENTIFIC Inc., Waltham (USA)
Temperiereinheit „Haake K15“	Thermo Fisher SCIENTIFIC Inc., Waltham (USA)
Tischschüttler „CERTOMAT S“	Sartorius Stedim Systems GmbH, Melsungen
Thermomixer „5437“	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank „BK 5060 E“	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortex Mixer „WhirlMixer“	Fision Scientific Co., Samjeong-Dong (ROK)
Widerstandsthermometer „Pt100“	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Zentrifuge „Multifuge® 3S“	Thermo Fisher SCIENTIFIC Inc., Waltham (USA)

## C.2 Verwendete Materialien

Küvetten „No./REF 67.742“	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Plastikolben „431144“	Corning Inc., Kennebunk (USA)
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Patches „Oxygen Sensor Spot“	PreSens GmbH, Regensburg
Silikonschläuche	Farnell InOne GmbH, Oberhaching

## C.3 Verwendete Chemikalien

Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
Epoxidharz L	Faserverbundwerkstoffe GmbH, Waldenbuch
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)

Lactose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
Malzextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
Nanopartikel „PC10“	Millenium Inorganic Chemicals, Baltimore (USA)
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumsulfit	Riedel-de-Haën GmbH, Seelze
Platinoctaethylporphyrin	Porphyrin Systems GbR, Lübeck
Polypropylen/Polyethylen-Vlies	Freudenberg & Co. Kommanditgesellschaft, Weinheim
Polysulfon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (CH)
Silikonkleber „Elastosil® RT 601“	Wacker Chemie AG, München
Sojapepton	Biotechnica Internacional S.A. de C.V., San Jacinto Amilpas (MEX)
Teilenzuckertes Molkenkonzentrat (TEM 30)	Biolac GmbH & Co. KG
Zinkoctaethylporphyrin	Porphyrin Systems GbR, Lübeck

## C.4 Verwendete Medien

### C.4.1 Wickerham-Medium

In ca. 300 mL ddH<sub>2</sub>O werden 1,5 g Hefeextrakt 1,5 g Malzextrakt, 2,5 g Sojapepton und 5 g Lactose gelöst und mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 mL aufgefüllt. Die Lösung wird autoklaviert.

### C.4.2 Kulturmedium

DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*) Pulver wird mit 37 g Natriumbicarbonat in 10 L deionisiertem Wasser gelöst und mit 1 M HCl ein pH-Wert von 7,2 eingestellt. Das Medium wird mit 10 % FCS (fetales Kälber Serum) und 1 Vol.-% Antibiotika (1000 Units/mL Penicillin G und 0,1 mg/mL Streptomycin) und Vol.-1 % Glutamin versetzt.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Anne Glindkamp  
Anschrift: Fröbelstraße 9, 30451 Hannover  
Telefon: 0511/2629831  
E-Mail: anne.glindkamp@gmx.de  
Geburtsdatum: 29.04.1982  
Geburtsort: Thuine  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## AUSBILDUNG

1988 – 1992 Grundschole Neuenkirchen  
1992 – 2001 Fürstenberg-Gymnasium Recke  
Abschluss: Abitur  
Okt 2001 – Apr 2006 Chemiestudium an der Universität Hannover  
Schwerpunkt: Technische Chemie  
Abschluss: Diplom  
Jul 2004 – Okt 2004 Schwerpunktpraktikum an der Colorado State University,  
Fort Collins, CO, USA  
Thema: Biosensoren  
Okt 2005 – Apr 2006 Diplomarbeit an der Universität Hannover, Institut für  
Technische Chemie, Arbeitskreis Prof. Scheper  
Thema: Chemometrische Sensoren zur  $k_{La}$ -Wert-  
Bestimmung und Optimierung eines blasenfreien Bega-  
sungssystems

**BERUFSERFAHRUNG**

Mai 2006 – Jun 2009      Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz-Universität Hannover, Arbeitskreis Prof. Scheper

**ZUSATZQUALIFIKATIONEN**

Sprachen	Englisch
EDV-Kenntnisse	MS Office, Origin, Chem Office, Corel Draw, Dasy Lab
Zertifikate/ Weiterbildungen	„Theoretische und praktische Aspekte des Marketing für biotechnologische Produkte und Märkte“ „Verfahrenstechnische und betriebswirtschaftliche Grundlagen biotechnologischer Prozesse“ „Qualitätssicherung in der chemischen Produktion“ „Qualitäts- und Öko- und Kostenmanagement in der chemischpharmazeutischen Industrie“ „Praktische Einführung in die Gentechnik“ „Gene Technology, Biosafety and Biosecurity“ „Schutzrechte“

**PUBLIKATIONEN**

- [1] Glindkamp A, Riechers D, Rehbock C, Hitzmann B, Scheper T, Reardon KF. 2009. Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends, In: Eibl R, Eibl D (Hrsg) Disposable Bioreactors (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology)
- [2] Glindkamp A, Fritzsche M, Beutel S, Baumfalk R, Scheper T. 2008. Ratiometric optical sensing of temperature and oxygen based on luminescence quenching. European Bioperspectives, 7. – 9. Oktober, Hannover (Vortrag)
- [3] Glindkamp A, Fritzsche M, Beutel S, Baumfalk R, Scheper T. 2008. Bestimmung von Sauerstoffkonzentration und Temperatur durch ratiometrische Fluoreszenzmessung. Heiligenstädter Kolloquium, 22. – 24. September, Heiligenstadt (Poster)
- [4] Glindkamp A, Fritzsche M, Beutel S, Baumfalk R, Scheper T. 2007. Ratiometric optical sensing of temperature and oxygen based on luminescence quenching. European Bioperspective, 30. Mai - 1. Juni, Köln (Poster)

- [5] Riechers D, Anton F, Glindkamp A, Behr L, Kasper C, Scheper T. 2006. Application of a hollowfiber membrane stirring system for oxygenation in suspension cell cultures. Cell Culture Engineering X (ECI 2006), 23. – 28. April, Whistler, BC, Kanada (Poster)
- [6] Glindkamp A, Bluma A, Behr L. 2006. Optische Bioprozessmesstechnik: In-situ Mikroskopie und 2D-Fluoreszenzspektroskopie, In: Niedersächsisches Ministerium für Wissenschaft und Kultur (Hrsg.) Optische Technologien aus niedersächsischen Hochschulen – Innovation für die Wirtschaft (Informationsbroschüre)
- [7] Riechers D, Anton F, Glindkamp A, Behr L, Kasper C, Scheper T. 2006. Optimierung eines Systems zur blasenfreien Begasung von Säugerzellkulturen. Chemie Ingenieur Technik 78(9): 1422