

**Entwicklung eines
Durchfluss-Multitestersystems zur
Beobachtung von
Kultivierungsprozessen in der Biotechnologie**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
Dipl. - Chem. Christoph Rehbock
geb. 12.03.1979 in Hannover

2010

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Koreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 11. 12. 2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im September 2009

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Juli 2005 bis September 2009 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Für die Übernahme des Koreferats bedanke ich mich bei Prof. Dr. Bernd Hitzmann.

Prof. Dr. Walter Müller möchte ich für seine Bereitschaft danken, meine Prüfung im Nebenfach abzunehmen.

Für die wissenschaftliche Unterstützung und das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Sascha Beutel.

Ein besonderer Dank gilt Guido Rudolph, Arne Bluma und Tim Höpfner für ihre Hilfe bei technischen Fragen rund um das In-situ Mikroskop und bei Tim Höpfner zusätzlich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Elektronik- und Mechanikwerkstatt für ihre fortwährende Unterstützung bei der Gerätesteuerung und der Entwicklung der Messzellen.

Martina Weiß danke ich für Hilfe bei der Durchführung der GC-Messungen

Bei Daniel Riechers bedanke ich mich für die Entwicklung der Steuersoftware sowie für Unterstützung bei der Durchführung der Simulationsrechnungen.

Für seine Einführung in die Kultivierung von *Bacillus megaterium* möchte ich mich bei Ismet Bice bedanken.

Friederike Sander danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich möchte mich zudem bei meinen Schwerpunktpraktikanten Annik Abel und Jörg Schmidt-Hager für ihre Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern des TCI danke ich für die sehr freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Durchfluss-Multitestersystem bestehend aus einem Durchflussmikroskop und einem faseroptischen Sauerstoffsensor entwickelt, optimiert und an Beispielkultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacillus megaterium* getestet. Es wurden dazu über ein automatisiertes Fließinjektionsanalytensystem definierte Proben aus der entsprechenden Kultivierung entnommen, in einen Trägerstrom injiziert und zum Multitester transportiert. Dort wurden Bildzyklen über die Zeit aufgenommen und über einen geeigneten Bildanalysealgorithmus die Anzahl der Zellen auf den Bildern bestimmt. Daraus ließen sich charakteristische Histogramme ableiten, aus denen die Zellzahl der Probe bestimmt werden konnte. Um diesen Histogrammen entsprechende Zelldichten zuzuordnen, wurde eine Kalibration durchgeführt, die für *Saccharomyces cerevisiae* zwischen $1 \cdot 10^6$ und $5 \cdot 10^8$ Zellen/mL und für *Bacillus megaterium* zwischen $4,5 \cdot 10^5$ und $1,7 \cdot 10^7$ Zellen/mL einen linearen Verlauf ergab. Die Sauerstoffsättigung in der Lösung wurde in analoger Weise durch Auswertung von Peaks bestimmt und mit einer Zweipunktkalibration quantifiziert.

Es erfolgte eine Optimierung des Multitestersystems mit *Saccharomyces cerevisiae*, wobei sich als optimale Parameter ein Volumenstrom von $\dot{V} = 6,1$ mL/min, eine Messzonenhöhe des Mikroskops von 125 μm sowie ein Injektionsvolumen von 500 μL ergaben.

Es wurden verschiedene Kultivierungen beider Testorganismen durchgeführt, wobei sich für Zelldichte und Sauerstoffsättigung eine gute Korrelation mit offline-Messwerten bzw. theoretisch berechneten Werten ergab. Zudem konnte die Agglomeratbildung der Zellen während einer Testkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* analysiert werden. Es konnte der Anteil an Einzelzellen, Doppelzellen und Zellclustern erfolgreich mit der entsprechenden Wachstumsphase der Kultivierung in Beziehung gesetzt werden.

Weiterhin wurden das System erfolgreich für die parallele Beobachtung von 2 und 3 Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* sowie die Parallelkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacillus megaterium* eingesetzt.

Abstract

In this thesis a flow-through multitesting system consisting of a flow-through microscope and a fibre-optic oxygen-sensor was developed, optimized and tested with exemplary cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus megaterium*. By an automated flow-injection-analysis system, defined samples were taken from the corresponding culture, injected into a carrier-stream and transported to the multitester. There image-cycles were recorded and by a suitable image-analysis software the cell count in the images was determined. From this, characteristic histograms were deduced, which enabled a determination of the cell count in the sample. To correlate these histograms with cell densities a calibration was done. A good linear correlation was found for *Saccharomyces cerevisiae* between $1 \cdot 10^6$ and $5 \cdot 10^8$ cells/mL and for *Bacillus megaterium* between $4.5 \cdot 10^5$ and $1.7 \cdot 10^7$ cells/mL. The oxygen-saturation in the solution was analogically determined by analysing the peaks and was quantified by a 2-point calibration.

An optimisation of the multitester-system with *Saccharomyces cerevisiae* was done, while an optimal flow rate of $\dot{V} = 6.1$ mL/min, a height of the sampling zone of 125 μm and an injection-volume of 500 μL were found.

Different cultivations with both test organisms were executed, while for cell-density and oxygen saturation a good correlation with offline data or rather theoretically calculated values was found. In addition the formation of agglomerates during a cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* was analysed. The portion of single-cells, double-cells and cell-clusters was successfully correlated to the corresponding growth status of the culture.

Furthermore the system was successfully applied in monitoring 2 and 3 parallel cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and was used in a parallel cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus megaterium*.

Schlagwörter

- Fließinjektionsanalyse
- Durchfluss-Multitestersystem
- Kultivierungsprozesse

Keywords

- flow-injection analysis
- flow-through multitester system
- cultivation processes

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Zielsetzung	2
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1. Online-Messverfahren zur Bestimmung von Zelldichte	4
2.2. In-situ Mikroskopie	5
2.2.1. Digitale Bildverarbeitung in der In-situ Mikroskopie	6
2.2.2. Anwendungen und Grenzen der In-situ Mikroskopie in der Biotechnologie	7
2.3. Fließinjektionsanalyse (FIA)	8
2.3.1. Aufbau von FIA-Systemen	9
2.3.2. Dispersion in FIA-Systemen	10
2.3.3. Anwendungen der FIA in der Biotechnologie	12
2.4. Mikroorganismen	12
2.4.1. Kultivierung und Wachstumsverhalten von Mikroorganismen	13
2.4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.4.3. <i>Bacillus megaterium</i>	15
2.5. Faseroptische Sauerstoffsensoren	16
3. Aufbau und Optimierung des Multitestersystems	18
3.1. Aufbau und Steuerung des Mikroskops	18
3.1.1. Aufbau des verwendeten Mikroskops	18
3.1.2. In-situ control	20
3.1.3. In-situ analysis und Double Yeast Cell Counter (DYCC)	22
3.2. Aufbau und Charakterisierung der Messzellen	23

3.2.1.	Aufbau der verwendeten Messzellen.....	23
3.2.2.	Charakterisierung der Messzellen über Verweilzeitverteilung.....	26
3.2.3.	Simulation der Strömungsverhältnisse in der Messzelle.....	31
3.3.	<i>Aufbau und Charakterisierung des verwendeten FIA-Systems.....</i>	<i>32</i>
3.3.1.	Aufbau des FIA Systems.....	32
3.3.2.	Steuerung des FIA Systems.....	34
3.3.3.	Bestimmung des Dispersionskoeffizienten.....	36
3.4.	<i>Optimierung und Kalibration des Multitestersystems mit dem Modellorganismus Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>37</i>
3.4.1.	Auswertung der FIA-Signale.....	38
3.4.2.	Optimierung des Volumenstroms.....	41
3.4.3.	Optimierung der Messzonenhöhe des Mikroskops.....	44
3.4.4.	Kalibration des Multitestersystems.....	46
3.4.5.	Variation des Injektionsvolumens.....	49
3.5.	<i>Einsatz faseroptischer Sauerstoffsensoren in der Messzelle.....</i>	<i>50</i>
3.5.1.	Integration faseroptischer Sauerstoffsensoren in Messzelle 1.....	50
3.5.2.	Kalibration der faseroptischen Sauerstoffsensoren im Durchfluss- und FIA-Betrieb.....	52
4.	Anwendungen des Multitestersystems in der Zellkultur.....	54
4.1.	<i>Zellkultivierungen mit Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>54</i>
4.1.1.	Testkultivierungen mit Messzellen 1 und 2.....	54
4.1.2.	Untersuchungen der Agglomeratbildung während einer Testkultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
4.1.3.	Parallele Beobachtung von 2 Kultivierungen.....	62
4.1.4.	Parallele Beobachtung von 3 Kultivierungen.....	65
4.1.5.	Bestimmung der Sauerstoffsättigung während der Kultivierung.....	68
4.1.6.	Bestimmung der Sauerstoffsättigung in einem Durchflusssystem bei einer Schüttelkolbenkultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
4.1.7.	Theoretische Berechnung des Sauerstoffeintrags in einem Schüttelkolben während einer Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
4.2.	<i>Zellkultivierungen mit Bacillus megaterium.....</i>	<i>78</i>
4.2.1.	<i>Bacillus megaterium</i> pMM1525.....	78
4.2.2.	Testkultivierungen und Auswertungen mit dem Multitester für <i>Bacillus megaterium</i>	79
4.2.3.	Kalibration des Multitesters mit <i>Bacillus megaterium</i>	83
4.3.	<i>Parallele Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae und Bacillus megaterium.....</i>	<i>85</i>
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	88
5.1.	<i>Zusammenfassung.....</i>	<i>88</i>

5.2.	<i>Ausblick</i>	91
6.	Anhang	94
6.1.	<i>Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	94
6.2.	<i>Verwendete Chemikalien</i>	95
6.3.	<i>Medien und Lösungen</i>	97
6.3.1.	Herstellung der Methylenblau Lösungen	97
6.3.2.	Hefesuspensionen für Optimierung und Kalibration	97
6.3.3.	Kalibrationslösung für den Sauerstoffsensor	98
6.3.4.	Schatzmann Medium	98
6.3.5.	LB-Medium	99
6.4.	<i>Standardmethoden</i>	99
6.4.1.	Standardkultivierungsvorschrift für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
6.4.2.	Stammhaltung für <i>Bacillus megaterium</i>	100
6.4.3.	Standardkultivierungsvorschrift für <i>Bacillus megaterium</i>	100
6.4.4.	Bestimmung der Zelldichte mit einer Neubauer Kammer	100
6.4.5.	Bestimmung der Ethanolkonzentration mittels Gaschromatographie (GC)	101
6.4.6.	Bestimmung der Glukosekonzentration mit einer Enzymelektrode	102
6.5.	<i>Pumpenkalibration</i>	102
6.6.	<i>Mittelwertbildung und Standardabweichung</i>	103
	Literatur	104

Abbildungsverzeichnis

2. Theoretische Grundlagen

Abbildung 2.1: Funktionsprinzip der In-situ Mikroskopie an einem Bioreaktor

Abbildung 2.2 : Schematischer Aufbau einer FIA

Abbildung 2.3 : Dispersion in einem FIA System

Abbildung 2.4: Wachstumskurve einer typischen batch-Kultivierung

Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines faseroptischen Sauerstoffsensors

3. Aufbau und Optimierung des Multitestersystems

Abbildung 3.1: Aufbau des In-situ Mikroskops Typ III-XTF

Abbildung 3.2: Bedienoberfläche von In-situ control

Abbildung 3.3: A: Beispielbild von Hefezellen, aufgenommen mit dem ISM im Durchfluss;
B: binarisiertes Ergebnisbild

Abbildung 3.4: A: Messzelle 1 und B: Anschluss an das ISM

Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau von Messzelle 1; A) Seitenansicht B)

Abbildung 3.6: A: Messzelle 2 und Einsätze sowie B: Anschluss an das ISM

Abbildung 3.7: Schematischer Aufbau von Messzelle 2; A) Seitenansicht, B)

Abbildung 3.8: Messaufbau zur Bestimmung der Verweilzeitverteilung

Abbildung 3.9: $E(t)$, aufgenommen mit verschiedenen Messzellen sowie ohne Messzelle

Abbildung 3.10: Mittlere Verweilzeit (t_{mittel}) für verschiedene Messzellen bei unterschiedlichen Messzonenhöhen

Abbildung 3.11: Varianz (σ^2) für verschiedene Messzellen bei unterschiedlichen Messzonenhöhen

Abbildung 3.12: Simulation der Strömungsverhältnisse in Messzelle 2 O = Detektionszone des Mikroskops

Abbildung 3.13: Aufbau des verwendeten FIA Systems

Abbildung 3.14: Aufbau eines 6-Port Injektors in der A) Load (L) und B) Inject (I) Position

Abbildung 3.15: Labview Bedienoberfläche zur Steuerung der FIA

- Abbildung 3.16: FIA Peaks für verschiedene Messzellen zur Bestimmung der Dispersionskoeffizienten
- Abbildung 3.18: FIA-Peaks für Messzelle 1 in Dreifachbestimmung bei $c=5$ g/L
- Abbildung 3.19: FIA-Peaks für Messzelle 2 in Dreifachbestimmung bei $c=5$ g/L
- Abbildung 3.20: FIA Peaks bei Variation des Volumenstroms für Messzelle 1
- Abbildung 3.21: FIA Peaks bei Variation des Volumenstroms für Messzelle 2
- Abbildung 3.22: Einfluss der Messzonenhöhe auf die FIA-Integrale für Messzelle 1
- Abbildung 3.23: Bilder von Hefen im Durchfluss bei Messzonenhöhen von A: $80\ \mu\text{m}$ und B: $150\ \mu\text{m}$
- Abbildung 3.24: Kalibrationsgerade für *Saccharomyces cerevisiae* mit Messzelle 1
- Abbildung 3.25: Kalibrationsgerade für *Saccharomyces cerevisiae* mit Messzelle 2
- Abbildung 3.26: Kalibrationsgerade für Messzelle 1 mit einem Injektionsvolumen von $200\ \mu\text{L}$
- Abbildung 3.27: Aufbau des Sauerstoff- Messadapters und Integration in Messzelle 1
- Abbildung 3.28: FIA-Peaks für die Dreifachinjektion einer Probe mit 100% O_2 in einen mit N_2 gesättigten Trägerstrom

4. Anwendungen des Multitestersystems in der Zellkultur

- Abbildung 4.1: Messaufbau für die Analyse einer Schüttelkolbenkultivierung mit dem Multitestersystem
- Abbildung 4.2: Kultivierungsverlauf einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt mit dem Multitester in Messzelle 1
- Abbildung 4.3: Kultivierungsverlauf einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt mit dem Multitester in Messzelle 2
- Abbildung 4.4: Beobachtung des Anteils von Einzelzellen, Doppelzellen und Zellclustern während einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*
- Abbildung 4.5: Messaufbau zur parallelen Untersuchung zweier Kultivierungen mit dem Multitester
- Abbildung 4.6: Beobachtung zweier paralleler Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester unter Variation der Animpfzellichte
- Abbildung 4.7: Messaufbau zur parallelen Untersuchung von 3 Kultivierungen mit dem Multitester

- Abbildung 4.8: Beobachtung von 3 parallelen Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester unter Variation der Animpfzellichte
- Abbildung 4.9: FIA-Peaks der Sauerstoffmessung mit dem Multitester bei einer Testkultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae*
- Abbildung 4.10: Simultane Beobachtung von Zelldichte und Sauerstoffsättigung mit dem Multitester sowie Glukose und Ethanol über offline-Analytik
- Abbildung 4.11: Bestimmung der Sauerstoffsättigung in einem Durchflusssystem bei einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*
- Abbildung 4.12: Sauerstoffsättigung während einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* in einem Durchflusssystem
- Abbildung 4.13: Gegenüberstellung der Sauerstoffsättigungen aus theoretischen Berechnungen und Messungen mit dem Multitester
- Abbildung 4.14: Beispielbilder von *Bacillus megaterium* aufgenommen mit dem Multitester nach A) 3 h und B) 7h Kultivierungsdauer
- Abbildung 4.15: FIA-Peak für *Bacillus megaterium* aufgenommen nach einer Kultivierungsdauer von 3 h und einer Zelldichte von $6 \cdot 10^6$ Zellen/mL
- Abbildung 4.17: Kalibrationsgerade für *Bacillus megaterium*
- Abbildung 4.18: Beobachtung einer Kultivierung von *Bacillus megaterium* mit dem Multitester und durch Handzählung mit einer Neubauer-Kammer.
- Abbildung 4.19: Kultivierungsverläufe bei paralleler Untersuchung von *Bacillus megaterium* und *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester.
- Abbildung 4.20: Beispielbilder nach 7 h bei einer parallelen Kultivierung von A) *Saccharomyces cerevisiae* und B) *Bacillus megaterium*

6. Anhang

Abbildung 6.1: Neubauer-Improved-Zählkammer

Abbildung 6.2: Pumpenkalibration Ismatec Pumpe

Tabellenverzeichnis

3. Aufbau und Optimierung des Multitestersystems

Tabelle 3.1: Belegung der Relais des FIA Systems

Tabelle 3.2: Dispersionskoeffizienten für verschiedene Messzellen

Tabelle 3.3: Integrale (Peakflächen) für Messzellen 1 und 2

Tabelle 3.4: FIA-Peak Integrale und Fehler bei unterschiedlichen

Tabelle 3.5: Wichtige Parameter der Kalibrationsgeraden ($Y = A \cdot X$) für Messzellen 1 und 2

4. Anwendungen des Multitestersystems in der Zellkultur

Tabelle 4.1: Integralwerte sowie Anteile von Einzelzellen, Doppelzellen und Clustern, bestimmt mit dem Multitester mit Messzelle 2 bei einer Kultivierungsdauer von 4 h

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der parallelen Beobachtung von 2 parallelen Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester unter Variation der Animpfzellichte

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der parallelen Beobachtung von 3 parallelen Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester unter Variation der Animpfzellichte

Tabelle 4.4: Bestimmung der Sauerstoffsättigung und Fehler mit dem Multitester an 2 Beispielwerten während einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

6. Anhang

Tabelle 6.1: Verwendete Hefesuspensionen für Kalibration und Optimierung

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
A/D	analog/digital
BHK	Baby Hamster Kidney
c	Konzentration
c_0	Anfangskonzentration
c_{\max}	Konzentration am Peak-Maximum
$c_{\text{sättigung}}$	Sättigungskonzentration
C-Quelle	Kohlenstoff-Quelle
CCD	charge coupled device
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIP	cleaning in place
cd	Candela
D	Dispersionskoeffizient
d	Durchmesser
DYCC	Double Yeast Cell Counter
et. al.	und andere
F	Verdünnungsfaktor
FDA	Food and Drug Administration
F & E	Forschung und Entwicklung
FIA	Fließinjektionsanalyse (<i>Flow-Injection-Analysis</i>)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
ISM	In-situ Mikroskop
$K_{L,a}$	spezifischer Sauerstoffübergangskoeffizient
kPa	Kilopascal
L	Liter
LED	Light Emitting Diode
mL	Mililiter
min	Minute
N	Zahl der Messungen

nm	Nanometer
N-Quelle	Stickstoffquelle
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
n_0	Anfangsstoffmenge
NIR	nahes-Infrarot
$n_{O_2\text{start}}$	Anfangssauerstoffmenge
$n_{O_2\text{eintrag}}$	eingetragene Sauerstoffmenge
$n_{O_2\text{verbrauch}}$	verbrauchte Sauerstoffmenge
PAT	Process Analytical Technology
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck
q_{O_2}	spezifische Sauerstoffaufnahme
rpm	rounds per minute
R^2	Bestimmtheitsmaß
s	Standardabweichung
s	Sekunde
t	Zeit
t_{mittel}	mittlere Verweilzeit
t_{tot}	Totzeit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
\dot{V}	Volumenstrom
vgl.	vergleiche
x_i	Messwert
x_{mittel}	arithmetisches Mittel
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer
μs	Mikrosekunde
μL	Mikroliter
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ε	molarer Absorptionskoeffizient
λ	Wellenlänge
σ^2	Varianz
2D	zweidimensional

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Einleitung

Biotechnologische Prozesse beruhen zum großen Teil auf der Verwendung von Mikroorganismen und Zellen zur Herstellung bestimmter Produkte. Sie werden schon seit 5.000 Jahren bei der Herstellung von Nahrungsmitteln und vor allem bei der alkoholischen Gärung durch Hefen eingesetzt. Durch bemerkenswerte Fortschritte in der Mikrobiologie und Gentechnik hat die Bedeutung der Biotechnologie in den letzten Jahren enorm zugenommen, und sie konnte sich in der chemischen Industrie und vor allem in der Pharmabranche etablieren. Im Jahr 2005 wurden z.B. in der chemischen Industrie bereits 5 %¹ aller Produkte auf biotechnologischem Weg erzeugt und es wird in den nächsten Jahren ein Anteil von 20 %² angestrebt. Es kommen dabei verschiedene Produktionsstämme von Bakterien, Hefen und Tierzellen zum Einsatz, die beispielsweise für die Herstellung von Proteinen, Antikörpern und Antibiotika eingesetzt werden können. Abhängig von den entsprechenden Anwendungsgebieten unterscheidet man dabei zwischen „weißer Biotechnologie“, die in der industriellen Produktion zum Einsatz kommt, „grüner Biotechnologie“ für den Agrarsektor und „roter Biotechnologie“ für den medizinischen und pharmazeutischen Bereich.

Die Überwachung von Bioprozessen und die Entwicklung innovativer Methoden zur Prozessanalytik sind dabei von entscheidender Bedeutung. Dies wurde vor allem durch die PAT (Process-Analytical-Technology)-Initiative der FDA (Food and Drug Administration) in den USA forciert, die eine genaue Überwachung und Dokumentation von Prozessen in der Pharma- und Nahrungsmittelindustrie verlangt³. Neben der Überwachung von Prozessvariablen wie dem Sauerstoffpartialdruck in der Lösung (pO_2), dem pH-Wert und der Konzentration von Nährstoffen und Metaboliten ist vor allem die Beobachtung von Zelldichte und –morphologie sehr wichtig, denn daraus lassen sich direkte Informationen über den Zustand der entsprechenden Kultur gewinnen. Die Überwachung dieser Variablen erfolgt in der Praxis häufig immer noch durch manuelle Probennahme und offline –Analytik, was sehr arbeitsintensiv ist und vor allem mit einer starken Zeitverzögerung verbunden ist. Deshalb besitzt vor allem die In-situ Mikroskopie, die eine automatisierte inline-Überwachung von Bioprozessen ermöglicht, sehr viel Potential. Sie beruht auf einem Lichtmikroskop, das direkt in einen Bioreaktor eingefügt werden kann und Bilder aus dem Reaktorinneren aufnimmt. Diese Bilder

können über fortschrittliche Bildauswertungsalgorithmen ausgewertet werden und geben nahezu in Echtzeit Informationen über die Zellsysteme in einem Bioprozess, wodurch eine Prozessregelung ermöglicht wird. Ein entscheidender Nachteil dabei ist aber, dass das In-situ Mikroskop nicht für die parallele Überwachung mehrerer Reaktoren eingesetzt werden kann und der Einsatz aufgrund seiner Bauweise auf Rührkesselreaktoren beschränkt ist. Gerade bei der Entwicklung und Optimierung neuer Kultivierungsprozesse im F & E-Bereich kommen aber oft Schüttelkolbenkultivierungen oder Untersuchungen in Screening-Systemen zum Einsatz, die schnell und zuverlässig parallel überwacht werden müssen. Zudem besteht in der industriellen Praxis ein Trend hin zu Disposable-Reaktoren wie beispielsweise der von Wave Biotech (Tagelswangen, Schweiz) entwickelte und von der Sartorius Stedim Biotech S.A. (Göttingen, Deutschland) vertriebene Beutelreaktor⁴, der aufgrund seines Aufbaus für einen Einsatz des In-situ Mikroskops ungeeignet ist. Für diese Anwendungen bietet es sich an, das In-situ Mikroskop in ein atline betriebenes Durchfluss-Multitestersystem umzubauen. Dieses kann über einfache sterile Schlauchverbindungen und ein Fließinjektionsanalysensystem an mehrere Kultivierungen angeschlossen werden und ermöglicht somit die automatisierte Untersuchung mehrerer paralleler Kultivierungen.

1.2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Prototyp eines Durchfluss-Multitestersystems zur parallelen Überwachung mehrerer Kultivierungen und zur gleichzeitigen Untersuchung von Zelldichte und Sauerstoffsättigung in der Lösung entwickelt und getestet werden. Der Multitester soll auf der Technologie des In-situ Mikroskops basieren und deren fortschrittliche Bildauswertungsalgorithmen nutzen. Dazu soll das bestehende Mikroskop genutzt werden, um sowohl einen In-situ als auch einen Multitester Einsatz mit dem gleichen Mikroskop realisieren zu können.

Der Multitester soll aus einer Durchflusszelle bestehen, die über die Messzone des Mikroskops geschoben und konvektiv durchströmt wird. Die genauen Strömungsverhältnisse in der Messzelle sollen durch die Aufnahme der Verweilzeitverteilung und einer Simulation aufgeklärt werden.

Die Ankopplung an entsprechende Kultivierungen soll über ein FIA-System erfolgen, das zu konzipieren und mit einer entsprechenden Steuerungssoftware zu automatisieren ist. Dabei ist vor allem ein Studium der Dispersion in dem entwickelten System durchzuführen.

Das so entwickelte Multitestersystem soll mit Hilfe von definierten Proben des Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* getestet und optimiert werden, wobei als wichtige Variablen des Systems, die Messzonenhöhe des Mikroskops, der eingestellte Volumenstrom und das Injektionsvolumen der FIA variiert werden. Dabei ist vor allem auf eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit und ein möglichst großes Messsignal zur Erhöhung der Empfindlichkeit zu achten.

Um eine Korrelation zwischen den mit dem Multitestersystem erhaltenen Messwerten und der Zelldichte herzustellen, sollen Proben mit definierten Zelldichten vermessen und daraus eine Kalibration für *Saccharomyces cerevisiae* erstellt werden.

Zur Überwachung der Sauerstoffsättigung sollen kommerziell erhältliche Sensoren der Firma Presens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland) in die entwickelte Messzelle integriert und entsprechend im FIA-Betrieb kalibriert werden.

Es soll dann ein Test des Systems an Schüttelkolbenkultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt werden und die mit dem Multitester erhaltenen Werte für die Zelldichte mit offline-Werten verglichen werden. Weiterhin soll ermittelt werden ob eine weitergehende Untersuchung der Agglomeratbildung der Zellen mit dem Multitester möglich ist.

Um eine Eignung des Systems als Multitester zu untersuchen, also die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Kultivierungen und Messvariablen, sollen mehreren Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* parallel beobachtet werden und außerdem im parallelen Betrieb sowohl Zelldichte, als auch die Sauerstoffsättigung in der Lösung bestimmt werden.

Nach einer ausführlichen Charakterisierung des Systems an dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* soll untersucht werden, ob das Multitestersystem auch für die Beobachtung anderer schnellwachsender Organismen, wie einem Produktionsstamm von *Bacillus megaterium*, geeignet ist. Weiterhin sollen erste Tests zur parallelen Beobachtung mehrerer verschiedener Organismen durchgeführt werden.

2. Theoretische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die zum Verständnis der Arbeit essentiellen Grundlagen kurz zusammengefasst. Dabei wird ein kurzer Überblick über Online-Messverfahren zur Bestimmung von Zelldichte gegeben. Insbesondere auf die In-situ Mikroskopie wird näher eingegangen, da das entwickelte Multitestersystem auf der Technik des In-situ Mikroskops basiert. Des Weiteren folgt eine Vorstellung der Fließinjektionsanalyse. Diese wird verwendet um das System atline an Kultivierungen anzuschließen. Zudem wird das Funktionsprinzip der verwendeten faseroptischen Sauerstoffsensoren beschrieben. Da das System an Beispielkultivierungen getestet wurde, werden kurz die Grundlagen der Kultivierung von Mikroorganismen dargestellt und die verwendeten Beispielorganismen *Saccharomyces cerevisiae* sowie *Bacillus megaterium* vorgestellt.

2.1. *Online*-Messverfahren zur Bestimmung von Zelldichte

Da in dieser Arbeit hauptsächlich die Entwicklung eines Online-Messverfahrens zur automatisierten Bestimmung von Zelldichte und anderen Zellvariablen beschrieben wird, sollen an dieser Stelle die Standardmethoden auf diesem Gebiet vorgestellt werden.

In einer Vielzahl von biotechnologischen Prozessen erfolgt die Bestimmung der Zelldichte immer noch durch manuelle Probennahme, was sowohl mit einem erhöhten Arbeitsaufwand, als auch mit einem erhöhten Kontaminationsrisiko verbunden ist. Es wurden daher eine Reihe von Verfahren entwickelt, mit denen die Zelldichte automatisiert und online bestimmt werden kann. Zum größten Teil handelt es sich hierbei um spektroskopische Verfahren, die häufig in Form von In-situ Messsonden direkt in den Reaktor implementiert werden können und sich in der Biotechnologie bereits etablieren konnten. Sie basieren im Wesentlichen auf Trübungsmessung (Junker et. al. 1994)⁵, Absorptionsspektroskopie (Maxwell et. al. 1987)⁶ und Fluoreszenzspektroskopie⁷, wobei beispielsweise die intrazelluläre Fluoreszenz von NADH als Messparameter verwendet werden kann (Wang et. al. 1991)⁸. Auch NIR-spektroskopische Methoden sind bekannt (Finn et. al. 2006)⁹, die sich jedoch als in-situ Methode noch nicht etablieren konnte. Als wichtige nicht optische Methoden zur Bestimmung von Zelldichte sind hier noch Dielektrizitätsspektroskopie (Impedanzspektroskopie) (Harris et.al.1987)¹⁰, (Cannizzaro et. al. 2003)¹¹ sowie akustische Spektroskopie (Lindgren et. al. 2006)¹² zu nennen.

Der Hauptnachteil all dieser Verfahren ist, dass sie die Zelldichte nur indirekt messen, stark von der entsprechenden Medienzusammensetzung abhängen und die verwendeten Sonden oft kalibriert werden müssen. Sie ermöglichen keinen detaillierten Einblick in einen Bioprozess. Die vielversprechendsten Methoden zur direkten Bestimmung von Zellvariablen sind atline Durchflusszytometrie (Kacmar et. al. 2005)¹³ sowie bildgebende Verfahren wie die In-situ Mikroskopie. Da das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Multitestersystem auf der Technik des In-situ Mikroskops basiert, wird die In-situ Mikroskopie im folgenden Abschnitt genauer vorgestellt.

2.2. In-situ Mikroskopie

Unter In-situ Mikroskopie versteht man ein bildgebendes Messverfahren zur direkten Beobachtung von Prozessen in einem Reaktor. Hauptanwendungsgebiet sind biotechnologische Kultivierungsprozesse, bei denen das autoklavierbare Mikroskop direkt in einen Bioreaktor implementiert wird, gewöhnlich über einen Seitenport. Damit ersetzt sie die sehr arbeitsintensive manuelle Probennahme und minimiert das Kontaminationsrisiko der untersuchten Kultivierung. Die vom Mikroskop aufgenommenen Bilder können direkt von einer geeigneten Bildverarbeitungssoftware ausgewertet werden, wodurch Informationen über den Zustand der Kultivierung nahezu in Echtzeit erhalten werden. Es lassen sich auf diese Weise direkt und nicht invasiv Informationen über den Bioprozess gewinnen. Das Funktionsprinzip der In-situ Mikroskopie ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

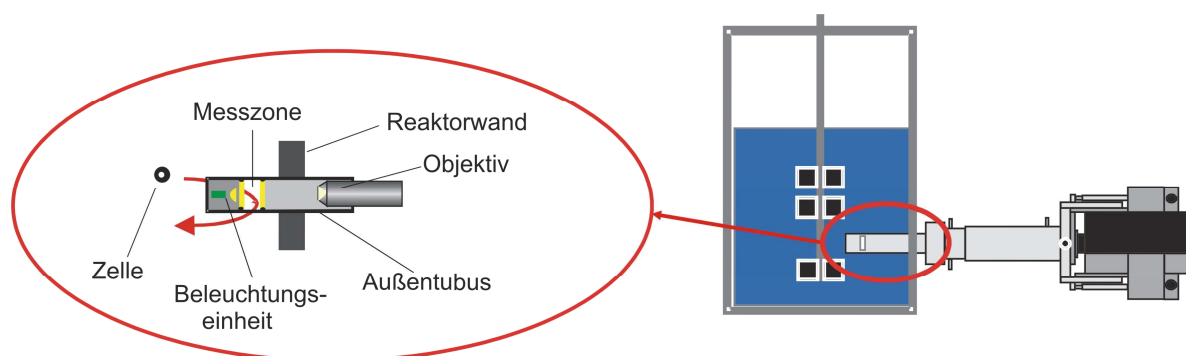


Abbildung 2.1: Funktionsprinzip der In-situ Mikroskopie an einem Bioreaktor

Mit Hilfe des In-situ Mikroskops können Bilder von Zellen direkt aus der Kultivierung aufgenommen werden. Dies ermöglicht eine detaillierte Bestimmung der Zelldichte, sowie der

Zellgröße und –morphologie. Die Fokussierung auf eine einzige Zelle in der Messzone des In-situ Mikroskops kann dabei sowohl mechanisch, als auch auf rein optischem Weg erfolgen. Bei der mechanischen Fokussierung durchströmt die untersuchte Probe ein kleines mechanisch variables Volumen, das nur eine Lage Zellen enthält, so dass alle Objekte fokussiert werden. Bei der rein optischen Fokussierung wird ein deutlich größeres festes Volumen durchströmt und damit mehrere Zellen abgebildet. Es wird dann eine bestimmte optische Ebene fokussiert und die dreidimensionale Struktur im Bereich um diese Ebene über den Grad der Defokussierung der Objekte bestimmt. Diese Methode hat den Vorteil, dass keine beweglichen Teile nötig sind, sie ist also weniger stör anfällig und das Risiko eines Verstopfens der Zone ist deutlich reduziert. Hauptnachteil ist dabei, dass eine komplexere Bildanalyse-Software benötigt wird^{14 15}.

Da ein System mit rein optischer Fokussierung für die durchgeführten Arbeiten nicht verfügbar war, wurde ausschließlich mit mechanischer Fokussierung gearbeitet. Das verwendete Mikroskop wird im Abschnitt 3.1.1 näher beschrieben.

2.2.1. Digitale Bildverarbeitung in der In-situ Mikroskopie

Die digitale Bildverarbeitung dient dazu Charakteristika von Bildern hervorzuheben und zu analysieren. In der In-situ Mikroskopie sind dies zumeist Zellen, die von einem Hintergrund zu segmentieren und bezüglich ihrer Größe und Morphologie zu charakterisieren sind. Dabei sind gewisse Filter und Operatoren auf das Originalbild anzuwenden. Bei der Analyse in-situ mikroskopischer Bilder wird der Sobel-Operator auf das monochrome 8 bit Bild (256 Graustufen) angewendet. Dieser analysiert den Graustufenwert des Bildes und erkennt starke Helligkeitsgradienten, also Kanten von Objekten. Diese werden im erzeugten Ergebnisbild als weiße Linien auf schwarzem Hintergrund dargestellt. Das Bild wird so binarisiert, es gibt nur noch schwarze und weiße Pixel. Wird nun ein Kantenverfolgungsoperator angewendet, können Objekte vom Hintergrund segmentiert werden. Über die Anzahl der Pixel pro Objekt kann so auch deren Größe bestimmt werden. Nähere Informationen zur digitalen Bildverarbeitung sind bei Lindner (2006)¹⁶ und Brückerhoff (2006)¹⁷ nachzulesen.

Der in dieser Arbeit verwendete Double Yeast Cell Counter Algorithmus zur Erkennung von Hefezellen basiert auf dem oben beschriebenen Prinzip und wird in Abschnitt 3.1.3 näher beschrieben.

2.2.2. Anwendungen und Grenzen der In-situ Mikroskopie in der Biotechnologie

Haupteinsatzgebiet der In-situ Mikroskopie ist die inline Beobachtung zur Regelung von Kultivierungsprozessen in Bioreaktoren. Erste Untersuchungen wurden von Suhr et. al. (1995)¹⁵, sowie Bittner et. al. (1998)¹⁸ an Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Es konnten Zelldichte und Biomasse im Bereich von 10^6 - 10^9 Zellen/mL (0,01-12 g/L Biomasse), sowie die Zellgröße und Morphologie bei einer aeroben batch-Reaktorkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt werden.

Detaillierte Untersuchungen zur Zellmorphologie wurden von Camisard et. al. (2001)¹⁹ beschrieben. Hier wurden sowohl Zellgröße als auch Zellwachstum der osmophilen Hefe *Hansenula anomala* über die Kultivierung verfolgt und dabei konnte eine Reduktion des Zellvolumens zum Ende der Kultur festgestellt werden. Zudem wurden die Zellen einem osmotischen Schock ausgesetzt und die Veränderung des Zellvolumens konnte klar detektiert werden. Weitere morphologische Untersuchungen wurden an dem Geißeltierchen *Euglena gracilis* durchgeführt und von Rudolph et. al. (2008)²⁰ beschrieben. Unter optimalen Kultivierungsbedingungen weisen sie eine längliche Form auf und sind sehr beweglich, bei Sauerstoff-, Licht- oder Nährstoffmangel nehmen sie eine runde Form an, was mit dem In-situ Mikroskop detektiert werden kann.

Ein wichtiger Entwicklungsschritt war die Anpassung des In-situ Mikroskops an industrielle Standards wie er von Frerichs et. al. (2002)²¹ und Joeris et. al. (2002)²² beschrieben wurde. Die Autoren beschreiben hier auch erstmalig den Einsatz der In-situ Mikroskopie auf dem wichtigen Gebiet der Tierzellkultivierung. Es wurde die Überwachung einer Suspensionskultur von Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen mit einer Animpfzelldichte von 10^6 Zellen/mL beschrieben, wobei die erhaltenen Werte der Zelldichte mittels offline-Methoden (Handzählung, automatischer Zellzähler) verifiziert wurden. Im Bereich tierischer Suspensionszellen wurden weiterhin Kultivierungen von Hybridoma (Guez et. al. (2004)²³ sowie Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen (Brückerhoff (2006))¹⁷ beschrieben.

Neuere Anwendungen beinhalten vorwiegend die in-situ mikroskopische Beobachtung adhärent wachsender Zellen auf Microcarriern in einem Bioreaktor. Dabei wurden von Anton et. al. (2007)²⁴ sowie Rudolph et.al (2008)²⁵ die Kultivierung von Maus-Fibroblasten auf verschiedenen Microcarriern beschrieben. Eine besondere Herausforderung stellte dabei die Bildanalyse dar, da der Bedeckungsgrad der Microcarrier mit Zellen aus dem Grauwert histogramm des Bildes, unter zu Hilfenahme von neuronalen Netzwerken, analysiert werden musste.

Die neueste Anwendung der In-situ Mikroskopie ist die Beobachtung von Kristallisationsprozessen, welche von Bluma (2009)²⁶ detailliert beschrieben wurde.

Die In-situ Mikroskopie ist eine fortschrittliche bildgebende Analysenmethode, die aber ausschließlich auf Rührkesselreaktoren mit technischer Skalierung begrenzt ist. Gerade die simultane automatisierte Beobachtung von mehreren parallelen Kultivierungen ist bei der Entwicklung und Optimierung von Kultivierungsprozessen von entscheidender Bedeutung. In diesem Bereich besitzt die Technik des In-situ Mikroskops mit ihrer fortschrittlichen Bildverarbeitung viel Potenzial. Dazu muss aber von einer in-situ Betriebsweise abgesehen werden und das Mikroskop in ein atline betriebenes Durchflusssystem umgebaut werden. Dies kann über ein Fließinjektionsanalytensystem (siehe 2.3) gesteuert werden und es können so mehrere Kultivierungen mit einem Messsystem parallel verfolgt werden.

2.3. Fließinjektionsanalyse (FIA)

Die FIA ist eine Analysenmethode, die zuerst von Ruzika und Hansen (1975)²⁷ beschrieben wurde. Sie gehört zu den Durchflussanalysenmethoden und basiert auf der Injektion eines präzise definierten Probenvolumens in einen nicht segmentierten Trägerstrom. Während die Probe durch den Probenstrom zu einem Detektor transportiert wird, stellt sich ein Histogramm ein, das reproduzierbar aufgezeichnet wird. Die Einführung der FIA stellte eine radikale Neuerung in der chemischen Analytik dar, da sie auf kontrollierter Dispersion und nicht auf der Einstellung eines Gleichgewichtszustandes basiert. Es dauerte daher einige Jahre, bis sie sich in der Routineanalytik etablieren konnte²⁸.

FIA-Systeme besitzen generell eine gute Reproduzierbarkeit; sie können mit hoher Flexibilität eingesetzt werden, ermöglichen einen hohen Probendurchsatz bei geringem Reagenzverbrauch und lassen sich vor allem relativ einfach automatisieren. Die FIA bedarf einer sehr präzisen Steuerung um ausreichende Reproduzierbarkeit zu erreichen. Das Injektionsvolumen muss bei jedem Analysezyklus sehr präzise stimmen und die Zeitverzögerung zwischen Injektion und Detektion muss identisch sein. Um zu gewährleisten, dass sich das Konzentrationsprofil in gleicher Weise einstellt, müssen zudem Schlauchlänge, -geometrie und Pumpengeschwindigkeit zu jeder Zeit konstant gehalten werden²⁸.

2.3.1. Aufbau von FIA-Systemen

Das einfachste FIA System besteht aus einer Pumpe, einem Injektor, einer Reaktionszone (Manifold) und einem Detektor. Dieser Aufbau ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt.

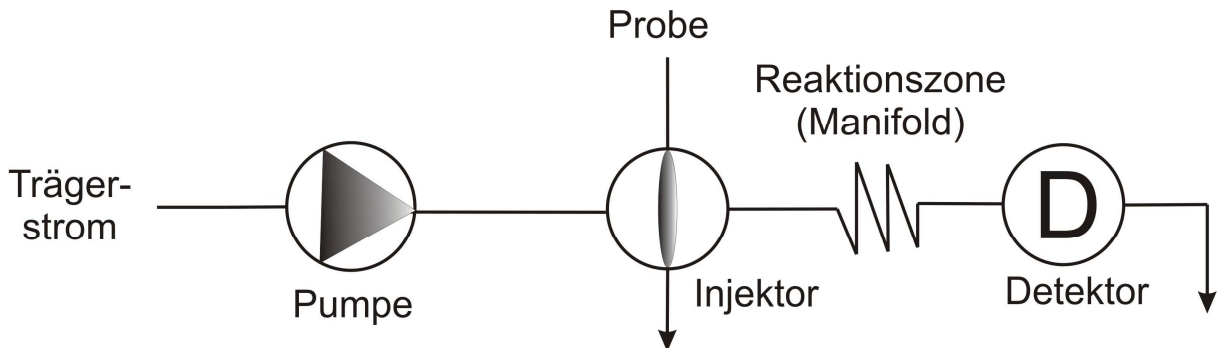


Abbildung 2.2 : Schematischer Aufbau einer FIA

Als Pumpen werden fast ausschließlich Peristaltikpumpen eingesetzt. Sie garantieren eine stabile Flussrate bei relativ einfachem Aufbau. Obwohl diese Pumpen gepulst arbeiten, ist dies Pulsen bei den meisten Systemen gut gedämpft. In den meisten FIA-Systemen wird mit Volumenströmen von 0,5 - 4 mL/min gearbeitet; Abweichungen sollten nur in seltenen Fällen vorgenommen werden, da sich vor allem bei höheren Flussraten das Pulsen der Pumpe stärker auswirkt. Es werden auch Gasdruck- oder Gravitationseinheiten für den Antrieb von FIA Systemen eingesetzt, sie haben sich aber, außer bei Spezialanwendungen, nicht durchgesetzt²⁹.

Am Injektor wird eine definierte Probenmenge in den Trägerstrom eingekoppelt. Die ersten Injektorsysteme bestanden aus Spritzen, mit denen die Proben über ein Septum in den Trägerstrom injiziert wurden. Als problematisch erwies sich, dass es dabei leicht zu einer Störung im Trägerstrom kommen konnte und diese Injektion nicht so leicht automatisierbar war. Aus diesem Grund werden heute in den meisten FIA-Systemen Injektoren verwendet, die auf den Einschluss definierter Volumenelemente in einem Schlauchstück basieren, welche dann vom Trägerstrom aufgenommen werden. Hier haben sich vor allem Rotationsventile durchgesetzt. Auf deren Funktionsprinzip wird in 3.3.1 näher eingegangen.

Die Reaktionszone besteht zumeist aus einem aufgewickelten Schlauch einer genau definierten Länge, in dem mögliche chemische Reaktionen zwischen Probe und Trägerstrom erfolgen können. Abhängig von speziellen Anwendungen, z.B. bei elektrochemischen Detektoren, die eine hohe Homogenität voraussetzen, können noch spezielle Mischkammern eingefügt wer-

den. Dies kann auch bei großen Temperatur- oder Viskositätsunterschieden zwischen Probe und Trägerstrom erforderlich sein²⁹.

In FIA-Systemen kommen eine große Anzahl verschiedene Detektortypen zum Einsatz, die stets auf den zu untersuchenden Analyten abgestimmt werden müssen. Prinzipiell sind aber alle Detektoren mit geringen Reaktionszeiten geeignet. Die häufigste Anwendung finden optische Detektoren, basierend auf UV-Vis Absorptionsspektroskopie³⁰, IR-Spektroskopie³¹ und Fluoreszenzspektroskopie³², sowie elektrochemische Detektoren, basierend auf Potentiometrie³³, Amperometrie³⁴ und Konduktometrie³⁵. Für genauere Informationen zu verschiedenen Detektortypen, sei auf die gängigen Lehrbücher verwiesen^{29,36}.

2.3.2. Dispersion in FIA-Systemen

Die aufgezeichneten Signale geben abhängig vom Detektortyp die Änderung einer physikalischen Größe über die Zeit wieder. Diese Signale sind normalerweise proportional zur Konzentration eines Analyten. Es ergeben sich charakteristische Peaks (Histogramme), die die Dispersion in dem System wiedergeben. Dieses ist in Abbildung 2.3 veranschaulicht.

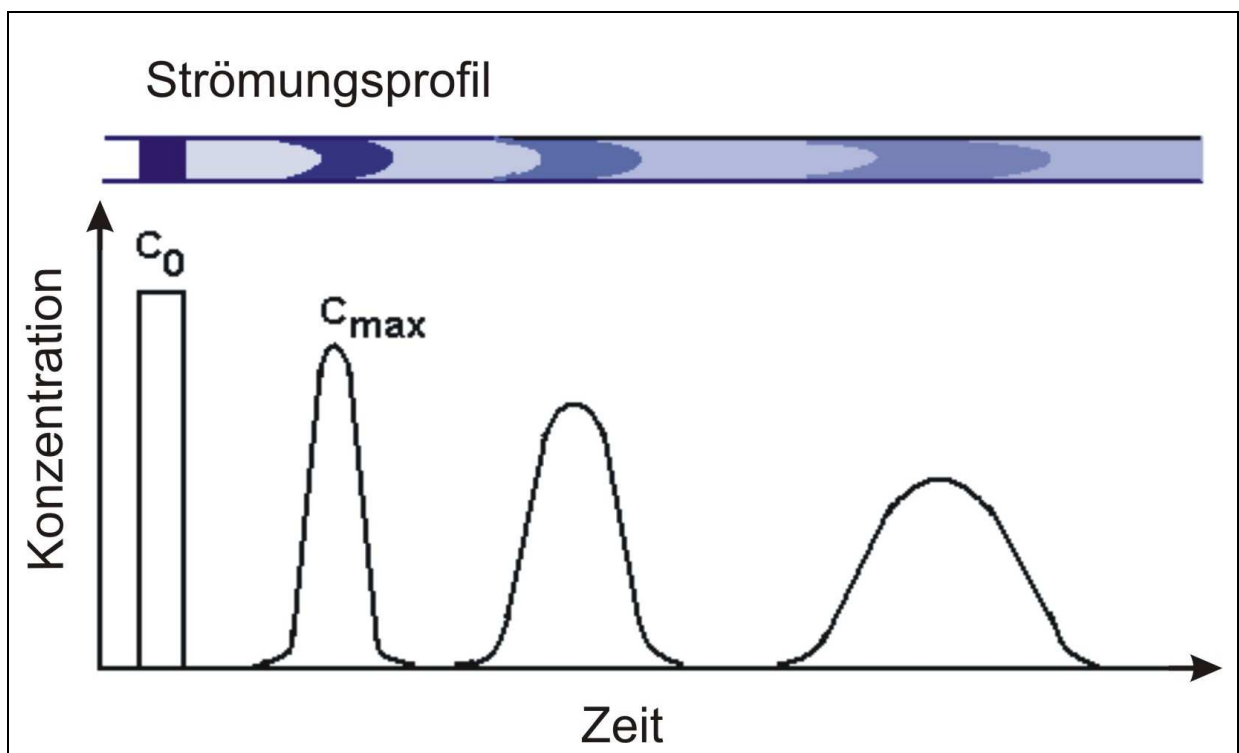


Abbildung 2.3 : Dispersion in einem FIA System

Wenn eine homogene Probe mit der Konzentration c_0 sich in der Injektionsschleife befindet und diese Probe ohne Dispersion zum Detektor transportiert werden könnte, ergäbe sich ein

rechteckiges Signal, das die Konzentration c_0 hat. Da die Probe nach der Injektion jedoch im Trägerstrom dispergiert wird, resultieren daraus die charakteristischen Peaks, die einen Konzentrationsgradienten innerhalb der dispergierten Zone anzeigen. Zur Quantifizierung der Dispersion wird der Dispersionskoeffizient (D) herangezogen, er beschreibt den Grad der Verdünnung der Probe durch den Trägerstrom und ist definiert als:

$$D = \frac{c_0}{c_{\max}} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Dabei ist c_{\max} die Konzentration, die am Peakmaximum gemessen wird. Im Allgemeinen unterscheidet man Systeme mit begrenzter ($D = 1-3$), mittlerer ($D = 3-10$) und großer ($D > 10$) Dispersion. Die Auswertung der erhaltenen Peaks kann sowohl über die Peakhöhe, die Peakfläche, als auch über die Peakbreite erfolgen. FIA-Systeme müssen kalibriert werden, damit die aus den Peaks gewonnenen Werte mit bestimmten Konzentrationen korreliert werden können.

Die Geometrie der erhaltenen Peaks und damit auch der Grad der Dispersion ist im Wesentlichen vom Vermischungsgrad innerhalb des Trägerstroms und der Verzögerungszeit zwischen Injektion und Detektion abhängig. Bei der praktischen Auslegung eines FIA-Systems kann dies über Durchflussgeschwindigkeit, sowie Geometrie und Länge der Schläuche variiert werden. Generell führt eine Reduktion der Flussrate zu einer Verringerung der Dispersion. Die Schlauchlänge zwischen Injektor und Detektor sollte generell so kurz wie möglich sein, da die Dispersion mit der Quadratwurzel der durchquerten Schlauchlänge ansteigt. Die Dispersion in FIA-Systemen wird auch nachhaltig durch den partiell laminaren Fluss in den Schläuchen hervorgerufen, die Volumenelemente in der Mitte des Schlauches bewegen sich schneller als an den Wandungen. Durch eine Änderung der Schlauchgeometrie von geraden Verbindungen hin zu aufgewickelten Schleifen, können Turbulenzen erzeugt werden, die die Gesamtdispersion verringern und symmetrischere Peaks erzeugen. In der Praxis ist auch das injizierte Probenvolumen von entscheidender Bedeutung. Ein größeres Volumen führt generell zu höheren Peaks und damit zu einer verbesserten Sensitivität der Messmethode, aber auch zu einem erhöhten Probenverbrauch. Es muss zudem berücksichtigt werden, dass die Analysenzeit sich dadurch erhöht³⁷.

2.3.3. Anwendungen der FIA in der Biotechnologie

FIA Systeme kommen in der Biotechnologie häufig zum Einsatz, um Sensoren, die für einen in-situ Einsatz nicht geeignet sind, da sie sich beispielsweise nicht sterilisieren lassen, in einem automatisierten atline Betrieb an einen Bioreaktor anzukoppeln. Einen großen Anteil machen dabei Biosensoren aus. Diese bestehen aus einer biologischen Komponente, die einen speziellen Analyten selektiv umsetzt und auf einem Detektor (Transducer) immobilisiert ist, der diese Umsetzung verfolgt³⁸. Weiterhin sind Systeme beschrieben, bei denen Detektor und biologische Komponente räumlich voneinander getrennt sind, wie in Enzymreaktoren. Als biologische Komponenten werden häufig Enzyme, aber auch Antikörper (Immunoassays)³⁹ und sogar Zellen und Zellorganellen⁴⁰ verwendet. Als Transducer sind generell auch alle Detektortypen geeignet, die in 2.3.1 beschrieben sind, sie müssen lediglich einen durch die Reaktion veränderten Prozesswert detektieren können. Wichtige Analyten, die standardmäßig mit FIA gekoppelten Biosensoren bestimmt werden sind beispielsweise Glukose, Acetat (Roscha et. al. 2002)⁴¹, Galaktose, Laktat (Vojinovic et. al. 2006)⁴² und Ethanol (Azevedo et. al. 2004)⁴³. Für weitere Informationen zum Thema Biosensoren sei auf diverse Übersichtsartikel verwiesen^{44 45 46 47 48}.

Die Bestimmung der Zelldichte über ein FIA-System findet sich in der Literatur selten. So wurden von Benthin et. al (1991)⁴⁹ die Zelldichten von Bakterien und Hefen mit einem FIA-basierten System bestimmt. Eine weitere Veröffentlichung zu dem Thema stammt von Meireles et. al (2002)⁵⁰, hier wurden Mikroalgen untersucht. In beiden Fällen wurde ein Absorptionsspektrometer als Detektor verwendet und damit die optische Dichte bestimmt, was nur einen oberflächlichen Einblick in den Bioprozess ermöglicht (vgl. 2.1). Der Einsatz eines fortschrittlichen Bildanalyse Systems als FIA-Detektor zur Bestimmung von Zelldichte ist bisher nicht beschrieben worden und stellt einen neuartigen Ansatz dar.

2.4. Mikroorganismen

Als Mikroorganismen werden einzellige Lebewesen bezeichnet, die zumeist Prokaryonten sind (Bakterien und Protozoen), es ist aber auch eine große Anzahl eukaryontische Mikroorganismen wie Mikroalgen, einzellige Pilze und Tiere bekannt. Eukaryontische Mikroorganismen besitzen im Vergleich zu Prokaryonten einen von einer Doppelmembran umschlossenen Zellkern und sind gewöhnlich deutlich größer (10-50 μm) als Prokaryonten (1-5 μm).

Mikroorganismen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit Biomasse stofflich umzusetzen eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung des Stoffwechselgleichgewichts der Natur. Ein Beispiel hierfür ist u.a. die biologische Abwasserreinigung. In der Biotechnologie werden Mikroorganismen zur Herstellung zahlreicher wichtiger Produkte verwendet und ihre Bedeutung auch in chemischen Prozessen und in der Nahrungsmittelindustrie nimmt stetig zu. Ihr Vorteil beruht auf der Tatsache, dass sie im Rahmen ihrer Stoffwechselprozesse aus einfachen Grundchemikalien hochkomplexe Biomoleküle wie z.B. Proteine, Antikörper oder Antibiotika produzieren. Diese Produkte können sowohl intrazellulär produziert werden und sind damit nur durch einen Zellaufschluss zugänglich, oder sie werden durch zelluläre Transportmechanismen ins Medium abgegeben (sekretiert). Mikroorganismen sind zudem aufgrund ihres einfachen Aufbaus und ihrer Robustheit sehr gut für gentechnische Optimierungen geeignet, was ihre Flexibilität beträchtlich erhöht.⁵¹

2.4.1. Kultivierung und Wachstumsverhalten von Mikroorganismen

In der Biotechnologie werden Zellkultivierungen hauptsächlich in Schüttelkolben (0,2-1 L), sowie in Bioreaktoren im Labor- (1-50 L), Technikums- (50-400 L) und Industriemaßstab (> 400 L) durchgeführt. Dabei müssen genau definierte Bedingungen bezüglich Temperatur, pH-Wert, Nährstoffmenge und Begasung eingehalten werden und es muss steril gearbeitet werden, um eine Kontamination der Kultur zu verhindern. Kultivierungen können generell kontinuierlich, halbkontinuierlich (fed-batch-Kultivierung) und diskontinuierlich (batch-Kultivierung) betrieben werden. Bei der kontinuierlichen Kultivierung werden ständig Zellen und Medium zu und abgeführt, so dass sich über die Zeit eine einheitliche Zelldichte im Reaktor ausbildet. Im batch-Betrieb wird dagegen eine gewisse Menge an Nährstoffen vorgelegt und das Wachstum der Zellen erfolgt so lange, bis alle Nährstoffe verbraucht sind. Bei der fed-batch-Kultivierung wird dagegen sequentiell neue Nährlösung zugegeben⁵².

Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich batch-Kultivierungen durchgeführt wurden, soll auf diese hier näher eingegangen werden. Generell wird dazu immer eine kleine Menge an Zellen aus einer Vorkultur in die Nährlösung gegeben. Eine typische Wachstumskurve ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

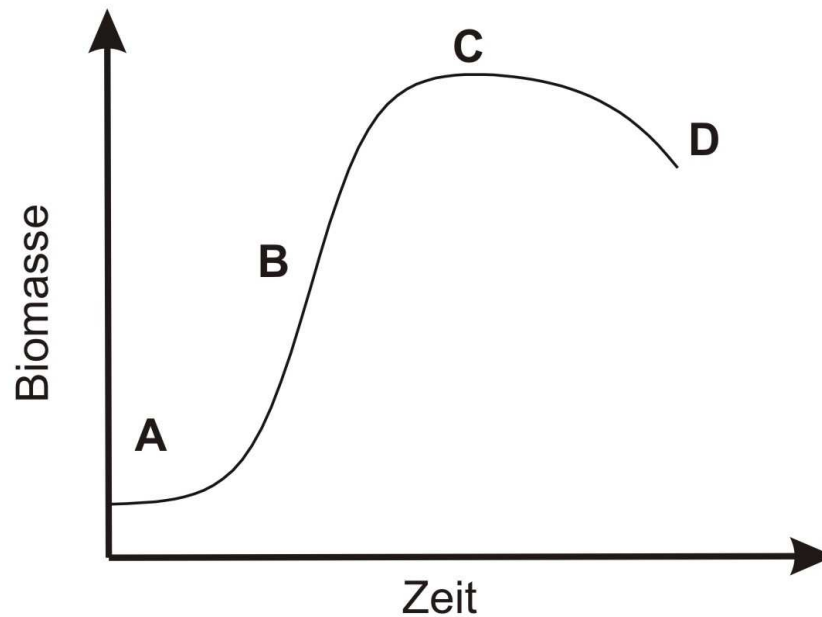


Abbildung 2.4: Wachstumskurve einer typischen batch-Kultivierung

Hierbei unterscheidet man prinzipiell 4 Wachstumsphasen. Zum Anfang der Kultivierung, in der lag-Phase (A) benötigen die Zellen Zeit, sich an veränderte Umgebungsbedingungen anzupassen und es erfolgt keine Zunahme der Biomasse. Es folgt daraufhin eine exponentielle Wachstumsphase (B) mit unlimitiertem Zellwachstum, in der die Vermehrungsrate deutlich größer ist, als die Sterberate. Irgendwann sind die angebotenen Nährstoffe aufgebraucht und die Kultur geht in eine stationäre Phase (C) über, in der Wachstums- und Absterbeprozesse gleich schnell verlaufen und somit die Biomassekonzentration konstant bleibt. Nach einiger Zeit tritt ein vermehrtes Absterben der Zellen auf (D) und die Konzentration lebendiger Biomasse nimmt ab. Dies kann aber nur verfolgt werden, wenn mit der verwendeten Analytik zwischen lebender und toter Biomasse unterschieden werden kann⁵³.

2.4.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) gehört zur Familie der Ascomyceten (Schlauchpilze) und gliedert sich in zahlreiche Stämme wie beispielsweise Wein-, Bier- oder Bäckerhefen. Die einzelnen Zellen haben eine runde bis ovale Morphologie und erreichen Größen von 3 - 8 μm . Die Vermehrung erfolgt gewöhnlich durch asexuelle Sprossung. Dabei wächst nach der Teilung des Zellkerns zunächst eine Tochterzelle als Knospe aus der Mutterzelle heraus und wird irgendwann abgetrennt. Diese Abtrennung kann aber auch verzögert werden, so dass sich Ketten von Zellen, so genannte Pseudomyceln ausbilden. Unter bestimmten Bedingungen

sind Hefezellen auch zu sexueller Reproduktion befähigt. Dabei wird aus einer diploiden Zelle ein Sporenbehälter mit 4 haploiden Sporen gebildet. Diese Sporen können sich durch Sprossung vermehren und dann mit einer anderen Spore wieder zu einer diploiden Zelle verschmelzen^{54 55}.

In der Biotechnologie werden Hefen aufgrund ihrer Robustheit und ihres schnellen Wachstums (Generationszeiten von 90 - 120 min) unter relativ einfachen Bedingungen (Minimalmedien mit Glukose als C-Quelle und Ammoniumsulfat als N-Quelle) oft als Modellorganismus zum Studium eukaryontischer Zellen herangezogen. Für lichtmikroskopische Untersuchungen sind sie zudem sehr gut geeignet, da sie nur in geringem Maße zur Agglomeratbildung neigen⁵⁶.

Saccharomyces cerevisiae stehen abhängig von den herrschenden Umgebungsbedingungen sowohl aerobe als auch anaerobe Stoffwechselwege offen, wobei in beiden Fällen einfache Zucker, hauptsächlich Glukose, als Nährstoffquelle dienen. Im aeroben Fall wird Glukose in Kohlendioxid und Wasser umgewandelt. Die Energieausbeute ist hier sehr gut und es erfolgt ein schnelles Zellwachstum und somit eine vermehrte Produktion von Biomasse. Im anaeroben Fall erfolgt die Umwandlung von Glukose in Kohlendioxid und Ethanol. Dieser als alkoholische Gärung bekannte Prozess ist bei der Wein- und Bierherstellung von großer Bedeutung, die Energieausbeute ist hier aber deutlich schlechter und das Wachstum entsprechend langsamer. Sind unter aeroben Bedingungen sämtliche Zucker als Energiequellen erschöpft, kann auch das selbst produzierte Ethanol verstoffwechselt werden (Diauxie), solange die Ethanolkonzentrationen nicht zu hoch sind und keine anderen Nährstoffe wie Salze oder Aminosäuren limitierend wirken^{57 58}.

2.4.3. *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium ist ein stäbchenförmiges gram-positives Bakterium der Gattung *Bacillus*. Es kommt sowohl im Boden, als auch in getrockneten Lebensmitteln, Salzwasser, Sedimenten, Milch und Bienenhonig vor. Da es mit einer Breite von 1,5 µm und einer Länge von 4 µm für ein Bakterium ungewöhnlich groß ist, eignet es sich besonders für morphologische Studien von Zellmembran, Cytoplasma und Sporenstruktur. Aufgrund seiner Größe wurde *Bacillus megaterium* auch im Rahmen dieser Arbeit als Beispielorganismus für lichtmikroskopische Untersuchungen herangezogen^{59 60}.

Bacillus megaterium wurde in Bezug auf sein biotechnologisches Potential sowie in genetischer und physiologischer Hinsicht sehr intensiv erforscht. Seine Bedeutung in der Biotechnologie beruht aber vor allem darauf, dass es sehr gut als Wirt für die Expression homologer und

heterologer Gene geeignet ist. Dies ist vor allem auf die hohe Stabilität rekombinanter Plasmide gegenüber *Bacillus megaterium* sowie die geringe extrazelluläre Proteaseaktivität zurückzuführen. Wichtige biotechnologische Produkte, die mit Hilfe von *Bacillus megaterium* hergestellt werden können, sind Zucker wie beispielsweise α - und β -Amylasen (Takasaki (1989)⁶¹, Metz et. al. (1988)⁶²), Vitamin B 12 (Raux et.al. (1998)⁶³) sowie zahlreiche Proteine, wie beispielsweise neutrale Proteasen (Meinhardt et.al. (1994)⁶⁴), Glukose-Dehydrogenase (Nagao et.al. (1992)⁶⁵), Penicillin-Acylasen (Martin et.al. (1995)⁶⁶) und Levansucrase (Bice (2008)⁶⁷).

2.5. Faseroptische Sauerstoffsensoren

Faseroptische Sauerstoffsensoren enthalten Fluorophore, deren Fluoreszenz in Gegenwart von Sauerstoff dynamisch oder statisch gequencht (gelöscht) wird. Je höher dabei die Sauerstoffkonzentration ist, desto geringer werden die Intensität des Fluoreszenzlichts und die Lebenszeit des Fluorophors im angeregten Zustand⁶⁸. Intensitätsmessungen sind dabei apparativ sehr einfach, zeichnen sich aber auf Grund des Ausbleichens des Farbstoffs durch eine geringe Stabilität aus. Lebenszeitmessungen sind etwas aufwändiger und nur für Fluorophore mit hohen Lebenszeiten ($> 1 \mu\text{s}$) geeignet. Das Messsignal ist dabei aber weniger von der Gesamtintensität abhängig. Die Lebenszeit wird entweder aus dem Abklingen der Fluoreszenzintensität nach dem Ausschalten der Lichtquelle bestimmt oder bei Modulation des Anregungslichtes aus der Phasenverschiebung der Fluoreszenz errechnet⁶⁹. Eine weitere Möglichkeit, um Fluoreszenzsignale von der Gesamtintensität unabhängig zu machen, besteht in der Verwendung interner Referenzen. Dazu wird ein Farbstoff oder ein Farbstoffgemisch mit zwei optisch klar differenzierbaren Anregungs- oder Emissionsmaxima benötigt, von denen idealerweise eines unabhängig von der Sauerstoffkonzentration ist. Der Quotient der Intensitäten der beiden Maxima ist dann eine von der Gesamtintensität unabhängige Messgröße⁷⁰.

Der typische Messaufbau eines faseroptischen Sauerstoffsensors findet sich in Abbildung 2.5. Der verwendete Farbstoff wird in eine Silikonmatrix eingefasst und am Ende einer Glasfaser immobilisiert. Als Farbstoffe werden dabei häufig Metallchelate wie z.B. Tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin-Ruthenium(II)⁷¹ oder Platinoporphyrine⁷² eingesetzt. Die Anregung des Farbstoffs erfolgt über einen Lichtleiter durch eine passende Lichtquelle, zumeist eine LED. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird wieder in die gleiche Faser eingekop-

pelt, zur Abtrennung von Streulicht über einen dichroitischen Spiegel gelenkt, und mit einem Photomultiplier oder einer Photodiode als Detektor gemessen^{73 74}.

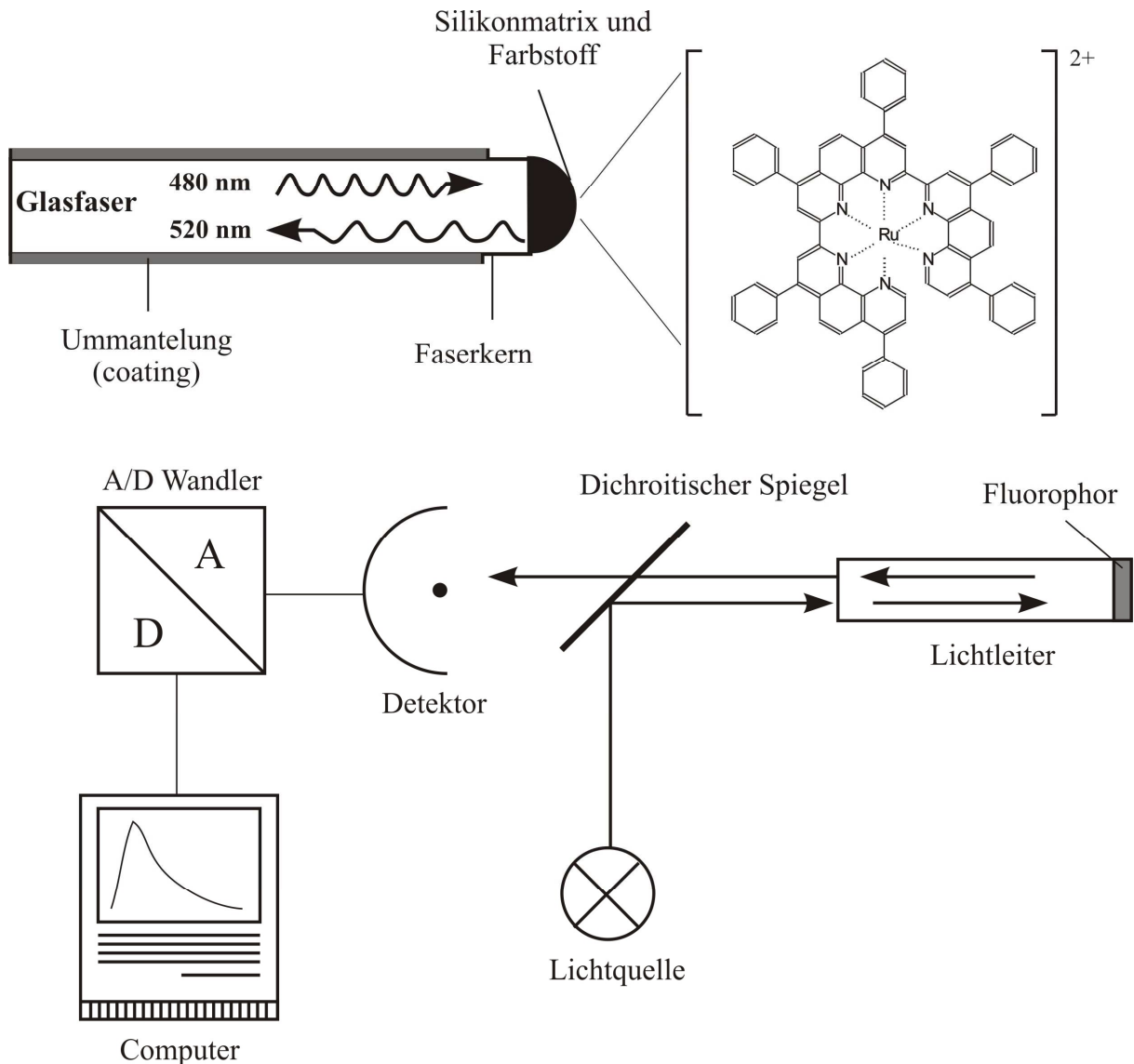


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines faseroptischen Sauerstoffsensors

Die Vorteile faseroptischer Sauerstoffsensoren gegenüber elektrochemischen Systemen bestehen vor allem darin, dass sie zerstörungsfrei und nicht invasiv arbeiten und den Analyten nicht verbrauchen. Sie werden zudem nicht durch elektrische Felder beeinflusst und der gleiche Messaufbau kann sowohl in Flüssigkeiten, als auch in der Gasphase eingesetzt werden. Als nachteilig erweist sich hingegen die geringe Fotostabilität des Fluorophors, die zu einem starken Drift des Sensors führt und eine häufige Kalibration nötig macht³⁸.

3. Aufbau und Optimierung des Multitestersystems

Dieser Abschnitt dient dazu, die integralen Bestandteile des entwickelten Multitestersystems im Detail zu beschreiben und zu charakterisieren. Diese Komponenten sind das als Detektor fungierende In-situ Mikroskop mit der zugehörigen Steuer- und Bildanalysesoftware, die automatisierte FIA-Anlage bestehend aus Pumpen, Injektor und Selektoren sowie die eingesetzten, faseroptischen Sauerstoffsensoren. Es erfolgt eine Vorstellung der verwendeten Durchflusszellen, über die sämtliche Komponenten des Multitesters verbunden werden, und eine Aufklärung der Strömungsverhältnisse in diesen Zellen mittels Verweilzeitverteilung und Simulationsrechnungen. Es wird zudem beschrieben, wie das so entwickelte Gesamtsystem mit Hilfe des Beispielorganismus *Saccharomyces cerevisiae* für den geplanten Kultivierungseinsatz optimiert und kalibriert wird. Dabei werden der eingestellte Volumenstrom, das Injektionsvolumen der FIA sowie die Messzonenhöhe des Mikroskops als relevante Größen für eine Optimierung herangezogen.

3.1. Aufbau und Steuerung des Mikroskops

3.1.1. Aufbau des verwendeten Mikroskops

Das verwendete Mikroskop basiert auf dem In-situ Mikroskop (ISM), das ursprünglich für den Einsatz in Rührkessereaktoren mit technischer Skalierung konzipiert wurde (vgl. 2.2). Das verwendete ISM des Typs III-XTF (III. Baureihe, XTF= extended final) ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

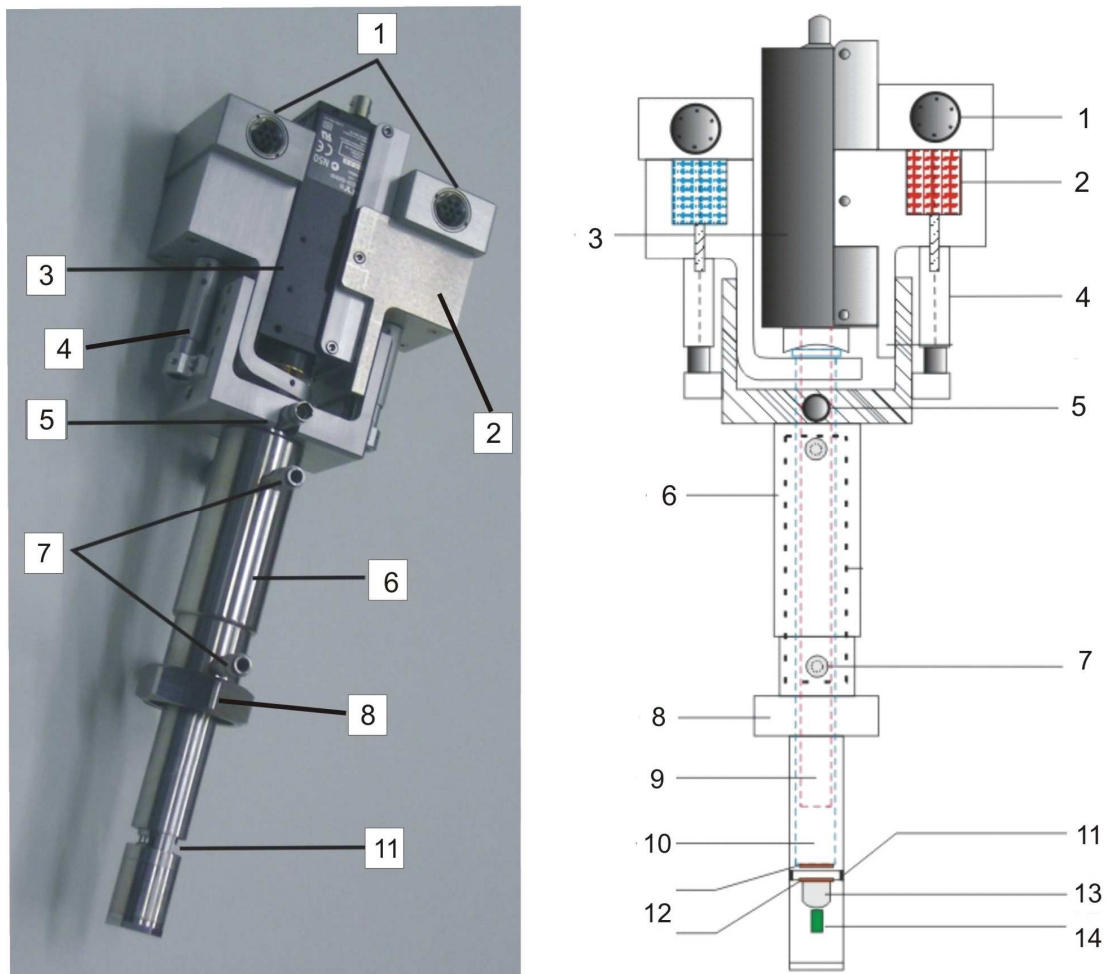


Abbildung 3.1: Aufbau des In-situ Mikroskops Typ III-XTF ⁷⁵

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 1) Anschlüsse für Controller | 8) Überwurfmutter |
| 2) Schrittmotor | 9) Innentubus mit Objektiv |
| 3) CCD-Kamera | 10) Außentubus |
| 4) Mikrometerschraube | 11) Messzone |
| 5) LED-Stromversorgung | 12) Saphirscheiben |
| 6) Mikroskopkörper | 13) Kondensorlinse |
| 7) Anschlüsse für Heißdampf (CIP) | 14) LED |

Das ISM ist ein Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop mit einer endlich korrigierten Optik. Es kann standardmäßig mit 4x, 10x und 20x Objektiven verwendet werden, wobei in dieser Arbeit nur die 10x Vergrößerung zum Einsatz kam. Es besteht aus einem optischen Segment und einem Reaktorsegment.

Das Reaktorsegment ist vollständig autoklavierbar und wird im Standardbetrieb zusammen mit dem Reaktor sterilisiert und kann mit einer Überwurfmutter in ein Standard-Seitenport des Reaktors eingefügt werden. Hierzu gehört die nach außen abgeschlossene Beleuchtungs-

einheit, die aus einer superhellen LED (510 nm, 12 cd) und einer Kondensorlinse besteht, sowie die von zwei Saphirscheiben begrenzte Messzone, deren Volumen über einen beweglichen Außentubus variiert werden kann. Das Volumen berechnet sich dabei aus dem Gesichtsfeld des jeweiligen Objektivs und der Höhe der Messzone. Das Reaktorsegment enthält zudem Extraanschlüsse für Heißdampf, mit denen das Mikroskop während einer Kultivierung aus dem Reaktor gezogen, gereinigt und steril zurückgeführt werden kann (Cleaning in place=CIP).

Das optische Segment besteht aus einem Innentubus, der das entsprechende Objektiv enthält und in den Außentubus gesteckt wird. Am Ende des Innentubus ist eine monochrome CCD-Kamera (Sony XCD SX-910) montiert, mit der die Bilder aus dem Reaktorinneren aufgezeichnet werden können. Innen- und Außentubus sind mit zwei Lineartischen verbunden, mit denen über Mikrometerschrauben und Schrittmotoren die Tubushöhen eingestellt werden können. Die eingesetzten Schrittmotoren ermöglichen eine Regelung in mehreren Schritten, wobei ein Schritt bei dem Außentubus einer Höhe von 1,25 μm entspricht. Somit lassen sich Messzonenhöhe und Bildfokussierung unabhängig voneinander regeln.

Die Berechnung der Gesamtvergrößerung des ISM unterscheidet sich deutlich von herkömmlichen Lichtmikroskopen, da am Ende des Tubus kein Okular sondern die CCD-Kamera platziert wird. Die optische Vergrößerung berechnet sich aufgrund einer abweichenden Tubuslänge bei einem 10x Objektiv zu 12,5 (Bluma 2006)⁷⁵ und die Gesamtvergrößerung ist dabei von der Größe des verwendeten CCD-Chips abhängig.

Die Steuerung des ISM erfolgte über das Programm In-situ control und die Bildauswertung erfolgte über das Programm In-situ analysis mit Double Yeast Cell Counter (DYCC).

3.1.2. In-situ control

Das Programm In-situ control wird verwendet, um die wichtigsten Funktionen des ISM zu steuern. Es wurde in der Programmiersprache Delphi 7.0 geschrieben und am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover entwickelt. Es sollen hier nur die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Funktionen beschrieben werden. Genauere Informationen finden sich bei Lindner (2006)¹⁶. Der Hauptbildschirm von In-situ control ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

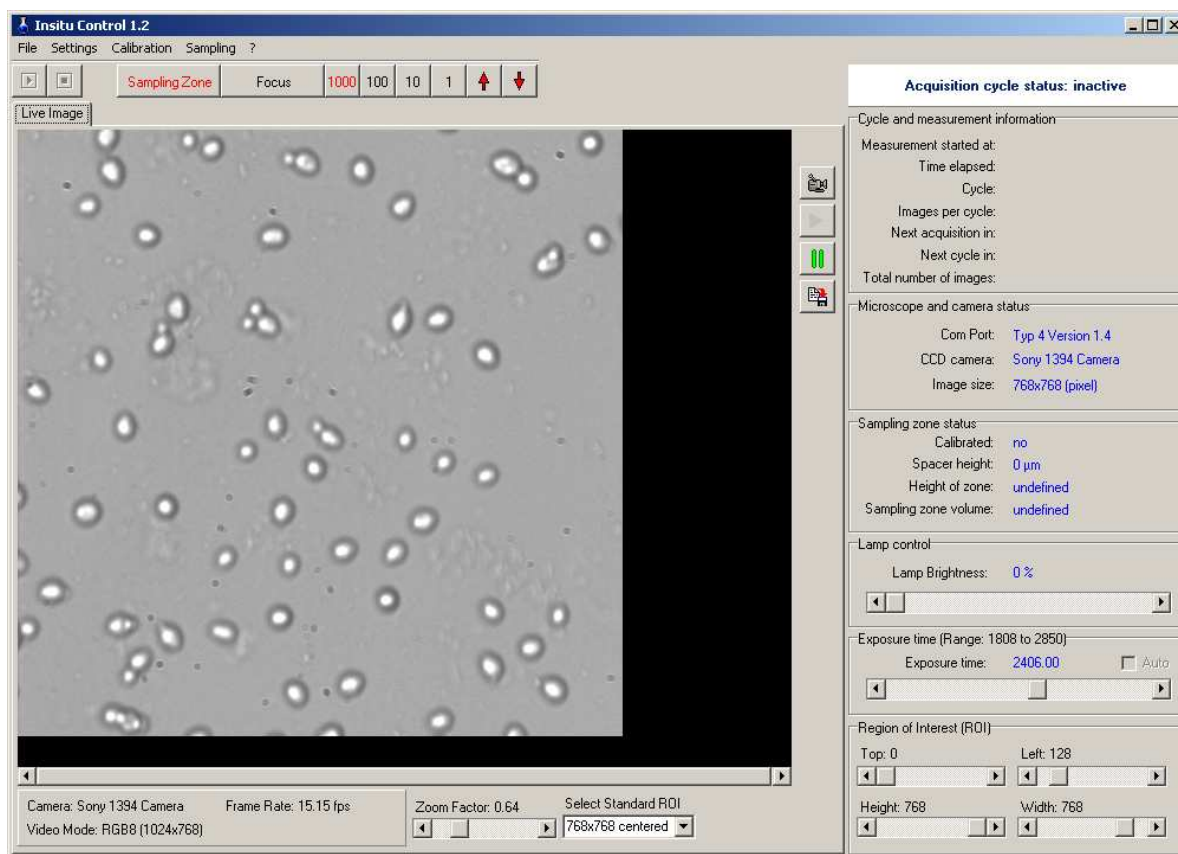


Abbildung 3.2: Bedienoberfläche von In-situ control ¹⁶

Über die Bedienoberfläche können die beiden Schrittmotoren zur Regelung von Messzonenhöhe und Fokus eingestellt werden. Dabei ist zu beachten, dass das Programm keine Voreinstellung für eine geschlossene Messzone hat. Diese muss manuell geschlossen werden und dieser Zustand dann über die Funktion *calibrate* als Nullwert kalibriert werden. Der größte Teil der Bedienoberfläche wird vom Kamerabild eingenommen, hier kann sowohl ein live-Bild der Kamera angezeigt werden, als auch das Bild eingefroren werden. Am unteren Ende des Bildes lassen sich Auflösung und Vergrößerung, sowie Helligkeit der LED und Belichtungszeit einstellen. Über die Funktion *settings* können bestimmte Parameter von Mikroskop und Kamera eingestellt werden. Zur korrekten Berechnung des Messzonenvolumens muss hier unter dem Unterpunkt *microscope*, abhängig vom eingesetzten Objektiv, die Pixelfläche eingestellt werden. Diese beträgt für das in dieser Arbeit benutzte 10x Objektiv bei einer Auflösung von 1.024×768 Pixel $0,137 \mu\text{m}^2$. Über das Menü *settings* Unterpunkt *acquisition cycle* lassen sich Bildaufnahmezyklen einstellen, die in bestimmten Zeitabständen Bildsequenzen aufnehmen und dann als Bitmap-Dateien abspeichern. Zudem wird zu jedem Bild eine Protokolldatei erstellt, die sämtliche relevante Geräteeinstellungen bei der Aufnahme angibt.

3.1.3. In-situ analysis und Double Yeast Cell Counter (DYCC)

Das Programm In-situ analysis ist eine ebenfalls auf Delphi 7.0 basierende Auswertesoftware, mit der von In-situ control aufgenommenen Bilder analysiert werden können. Es ist modular aufgebaut und verschiedene Analysealgorithmen können als DLLs nach dem Start des Programms geladen werden. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Algorithmus ist der DYCC, der von Krabichler (2005)⁷⁶ am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover entwickelt wurde.

Der DYCC dient zur Erkennung von Hefezellen und kann zwischen Einzelzellen, Doppelzellen und Zellclustern unterscheiden sowie die Zellgröße ermitteln. Für eine bessere Erkennung müssen die Hefezellen in defokussierter Weise aufgenommen werden. So wirken die kugelförmigen Hefen wie Linsen, die das Durchlicht in ihr Zentrum fokussieren. Dadurch sind sie in der Mitte hell und am Rand dunkel, was den Kontrast des Bildes beträchtlich erhöht. Mit den in 2.2.1 beschriebenen Methoden der digitalen Bildverarbeitung werden dann die Zellen vom Hintergrund segmentiert. Dabei werden zunächst unabhängig von der Morphologie und Größe Objekte erkannt. Später wird ermittelt, wie viele helle Kerne (kernels) diese Objekte enthalten und danach in Einzelzellen (1 Kern), Doppelzellen (2 Kerne) und Zellcluster (≥ 3 Kerne) ausdifferenziert. Zudem kann über die Anzahl der Pixel pro Kern die Größe der Zellen ermittelt werden und somit die Einzelzellen kategorisiert werden. Die Ergebnisse der Bildanalyse werden in txt.-Dateien ausgegeben und können für aufgenommene Bildserien mit In-situ analysis grafisch ausgewertet und exportiert werden.

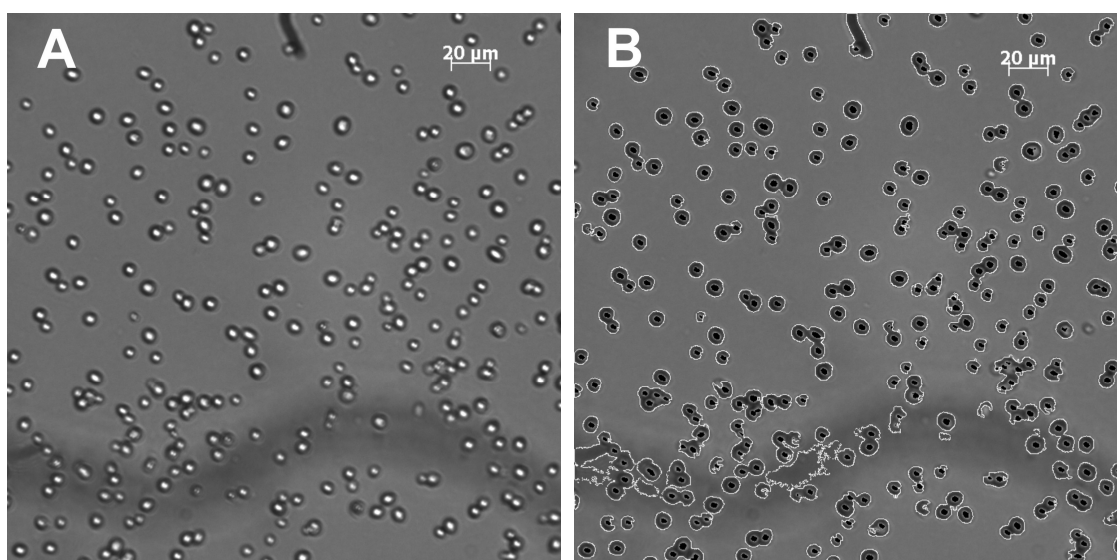


Abbildung 3.3: A: Beispielbild von Hefezellen, aufgenommen mit dem ISM im Durchfluss; B: binarisier-tes Ergebnisbild

In Abbildung 3.3 sind ein Beispielbild von Hefezellen im Durchfluss sowie das zugehörige binarisierte Ergebnisbild dargestellt. Sämtliche erkannte Zellkerne sind dort als schwarze Punkte markiert. Aus dem Bild ist ersichtlich, dass die Hefezellen sich auch vor einem durch Verunreinigungen nicht einheitlichen Hintergrund klar identifizieren lassen, obwohl ein einheitlicher Hintergrund die Erkennung verbessert. Es wurden in diesem Fall 292 Kerne und 198 Objekte erkannt, die sich in 123 Einzelzellen, 47 Doppelzellen und 21 Zellcluster unterteilen. Es wurden aber auch 7 Objekte ohne erkennbare Kerne registriert, die deshalb nicht klassifizierbar sind. Dies können Verunreinigungen und Luftblasen sein, es können aber auch einige Zellen nicht korrekt fokussiert worden sein. Dieses Problem steht in Durchflusssystemen sehr stark mit der eingestellten Messzonenhöhe in Zusammenhang und wird in 3.4.3 näher untersucht.

3.2. Aufbau und Charakterisierung der Messzellen

Um nun das verwendete ISM für den Einsatz als Durchflusssystem umzubauen, wurden Messzellen konzipiert, die über die Messzone gesteckt werden konnten und die über eine Peristaltikpumpe mit einer Trägerlösung durchströmt wurden. Der Durchfluss der Messzellen erfolgte ausschließlich von unten nach oben, um eine gleichmäßige Befüllung der Zelle zu garantieren und mögliche Strömungstotzonen zu minimieren.

3.2.1. Aufbau der verwendeten Messzellen

Die erste konzipierte Messzelle (Messzelle 1) bestand aus Edelstahl und war in der Höhe der Messzone des ISM mit zwei Gummiringen abgedichtet. In der Mitte der so eingeschlossenen Durchflusszone befanden sich zwei Bohrungen, über die Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm angeschlossen werden konnten. Sie bedeckte die gesamte Beleuchtungseinheit des Mikroskops und konnte so über die Messzone geschoben werden. Diese Messzelle und ihr Anschluss an das ISM ist in Abbildung 3.4 abgebildet.

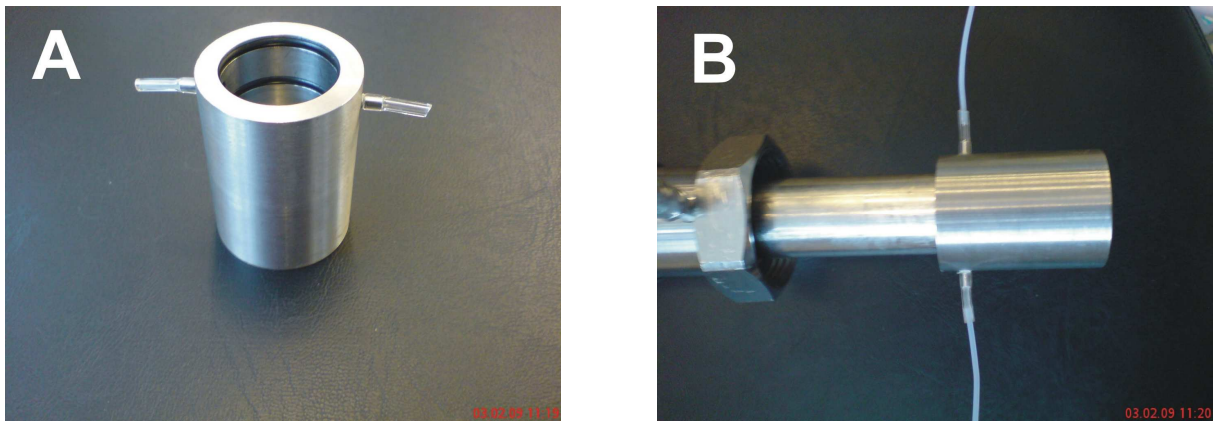


Abbildung 3.4: A: Messzelle 1 und B: Anschluss an das ISM

Bedingt durch den Aufbau des ISM hatte diese Messzelle ein sehr großes Totvolumen vor und hinter der Messzone, was ein reproduzierbares Durchströmen der Messzelle erschwerte. Dieses ist in Abbildung 3.5 gezeigt.

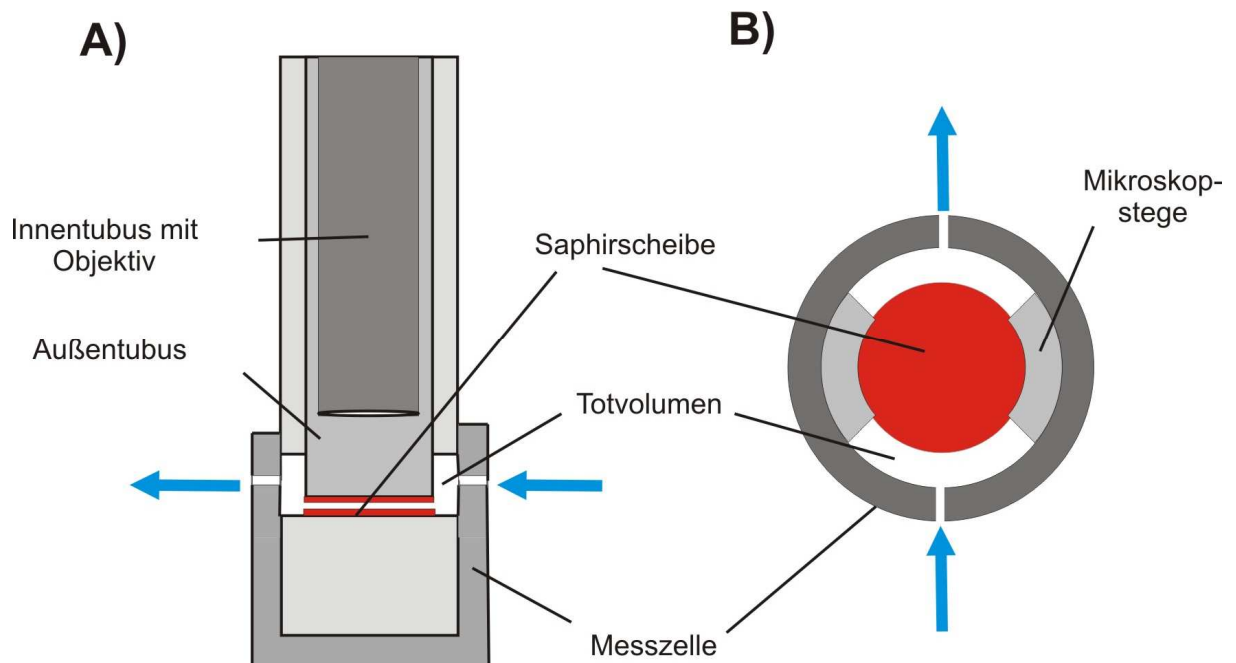


Abbildung 3.5: Schematischer Aufbau von Messzelle 1; A) Seitenansicht B) Aufsicht

Um die auftretenden Totvolumina deutlich zu verringern wurde eine verbesserte Messzelle (Messzelle 2) konzipiert. Die Bohrungen für die Schläuche wurden hier auf Höhe der Durchflusszone angebracht und das Totvolumen durch speziell gefertigte Einsätze eliminiert. Die Zelle wurde aus Plexiglas gefertigt, um die Strömungen auch visuell verfolgen zu können und die Dichtigkeit besser kontrollieren zu können. Sie wurde als Ring konzipiert, um mögliche

spätere Modifikationen an der Beleuchtungseinheit nicht zu behindern. Die Messzelle ist in Abbildung 3.6 gezeigt.

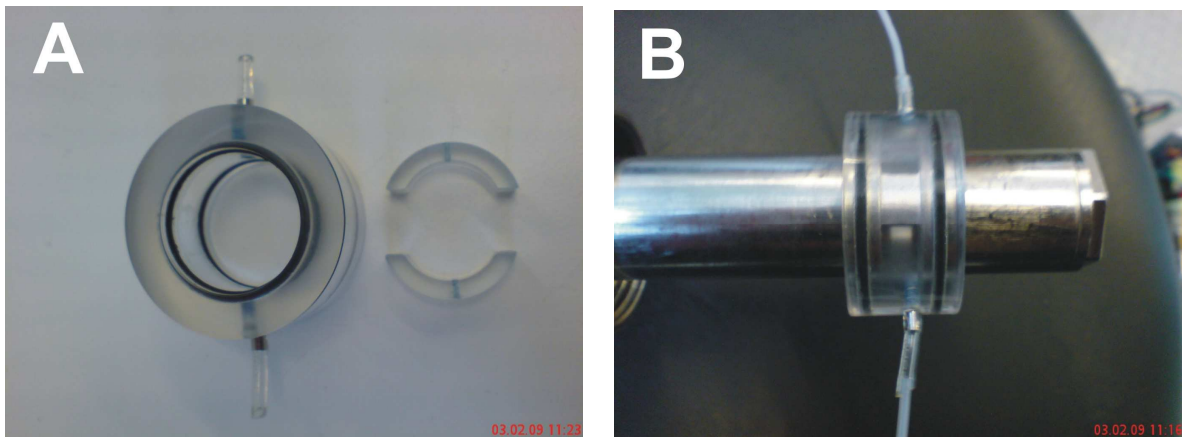


Abbildung 3.6: A: Messzelle 2 und Einsätze sowie B: Anschluss an das ISM

Eine schematische Darstellung, in der die Verringerung des Totzonenvolumens noch einmal demonstriert wird, findet sich in Abbildung 3.7.

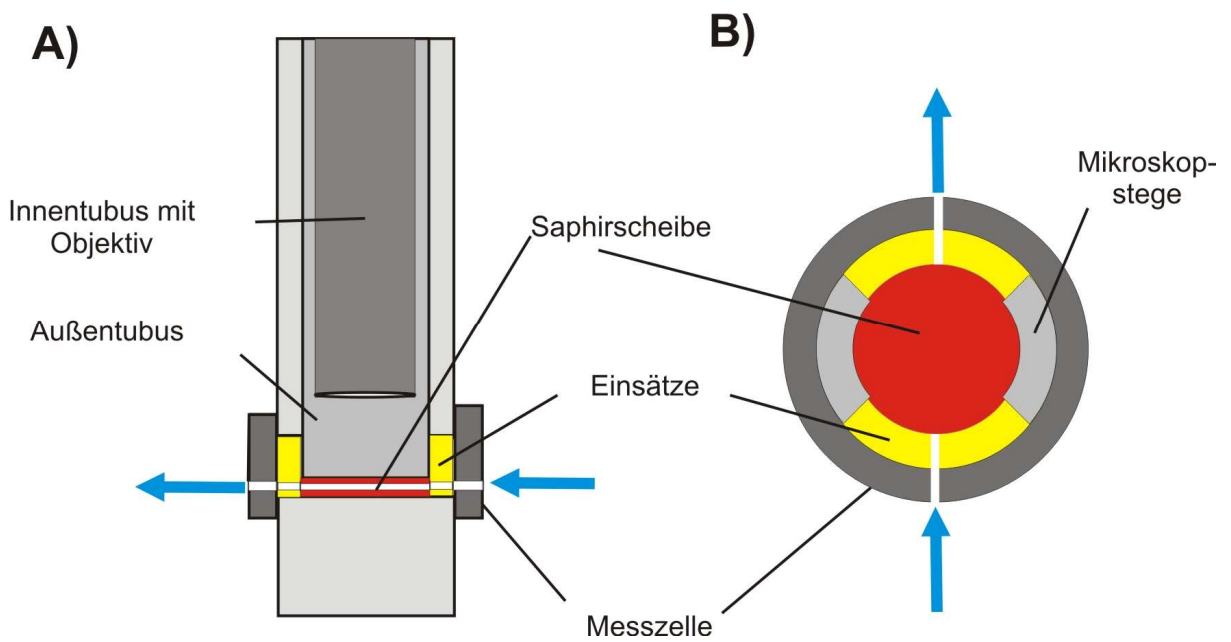


Abbildung 3.7: Schematischer Aufbau von Messzelle 2; A) Seitenansicht, B) Aufsicht

3.2.2. Charakterisierung der Messzellen über Verweilzeitverteilung

Um die Strömungsverhältnisse in den konzipierten Messzellen zu bestimmen, wurde eine Verweilzeitverteilung aufgenommen. Dabei sollten die mittleren Verweilzeiten der jeweiligen Messzellen sowie der Einfluss der Messzonenhöhe des Mikroskops untersucht werden. Dazu wurde die jeweilige Messzelle über eine Peristaltikpumpe mit einem konstanten Volumenstrom ($\dot{V} = 6,1 \text{ mL/min}$) eines Trägerstroms (VE-Wasser) durchströmt. Über einen 6-Port-Injektor wurden für jede Messung $100 \mu\text{L}$ des Tracers Metylenblau ($c = 0,135 \text{ mmol/L}$) injiziert (vgl. 6.3.1). Die Antwort auf die so aufgebene Pulsfunktion wurde mit einem UV-Vis-Absorptionsspektrometer (Varian Cary 50) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 664 \text{ nm}$ in einer hinter die Messzelle geschalteten Durchflussküvette über einen Zeitraum von 1 min spektroskopisch aufgezeichnet. Der Messaufbau ist in Abbildung 3.8 gezeigt.

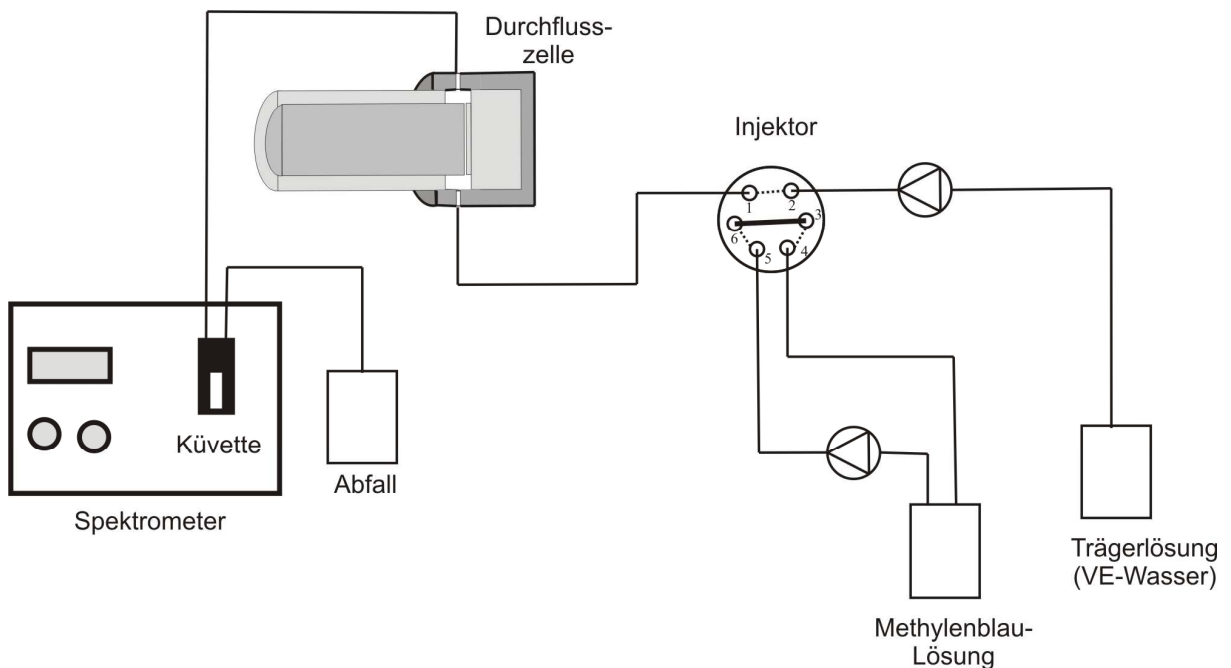


Abbildung 3.8: Messaufbau zur Bestimmung der Verweilzeitverteilung

Die so erhaltenen Absorptions-Zeit Kurven wurden über das Lambert-Beersche Gesetz

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Gleichung 3.1: Lambert-Beersches Gesetz

mit A = Absorption, ε = molarer Absorptionskoeffizient ($74.028 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$), c = Konzentration [mol/L] und d = Weglänge der Küvette (1 cm) in Konzentrationen umgerechnet. Aus den resultierenden $c(t)$ -Kurven wurde nun die Verweilzeitverteilung $E(t)$ berechnet. Die $E(t)$ -

Funktion gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Teilchen, das zum Zeitpunkt $t = 0$ in den Reaktor eintritt, diesen zum Zeitpunkt t wieder verlassen hat. Ihre Einheit ist der Anteil des Gesamtstroms pro Zeiteinheit. Für den Fall einer Pulsfunktion als Tracersignal berechnet sie sich nach

$$E(t) = \frac{\dot{V}}{n_0} \cdot c(t) \quad \text{Gleichung 3.2: } E(t) \text{ für Pulsfunktion als Eingangssignal}^{77}$$

$n_0 = 1,35 \cdot 10^{-5}$ mmol ist hierbei die eingesetzte Tracerstoffmenge. In Abbildung 3.9 sind die $E(t)$ -Funktionen für ein System ohne Messzelle, nur bestehend aus Schläuchen und Injektor, sowie für die Messzellen 1 und 2 bei einer Öffnung der Messzone des Mikroskops von $500 \mu\text{m}$, dargestellt.

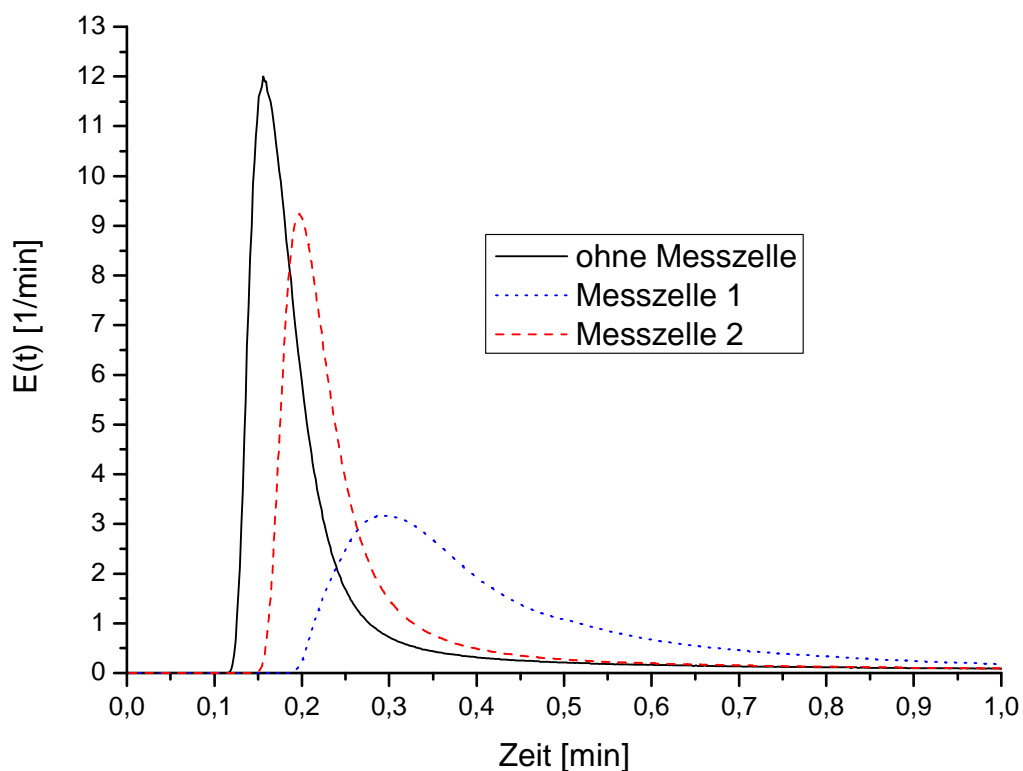


Abbildung 3.9: $E(t)$, aufgenommen mit verschiedenen Messzellen sowie ohne Messzelle

Die Messzellen 1 und 2 zeigen ein sehr unterschiedliches Verweilzeitverhalten. Die Peakhöhe verkleinert sich von dem System ohne Messzelle über Messzelle 2 zu Messzelle 1. In der gleichen Weise verschiebt sich das Peakmaximum hin zu höheren Verweilzeiten. Die Peakbreite nimmt von Messzelle 2 zu Messzelle 1 hin deutlich zu. Zwischen Messzelle 2 und

dem System ohne Messzelle ist dagegen nur ein geringer Unterschied zu erkennen. Es zeigt sich hier deutlich, dass mit den großen Totvolumina in Messzelle 1 eine höhere Rückvermischung einhergeht.

Um wichtige Charakteristika der $E(t)$ Funktionen zu quantifizieren, wurden die mittlere Verweilzeit (t_{mittel}) sowie die Varianz der Messwerte um t_{mittel} (σ^2) berechnet. σ^2 ist dabei ein Maßstab für die Breite der Kurve. Diese Parameter lassen sich nach folgenden Gleichungen berechnen:

$$t_{\text{mittel}} = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot c(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} c(t) \cdot dt} \approx \frac{\sum_i t_i \cdot c_i \cdot \Delta t}{\sum_i c_i \cdot \Delta t} \quad \text{Gleichung 3.3}^{77}$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} (t - t_{\text{mittel}})^2 \cdot c(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} c(t) \cdot dt} \approx \frac{\sum_i (t_i - t_{\text{mittel}})^2 \cdot c_i \cdot \Delta t}{\sum_i c_i \cdot \Delta t} \quad \text{Gleichung 3.4}^{77}$$

Im Folgenden wurden Verweilzeitverteilungen bei verschiedenen Messzonenhöhen aufgenommen. Dabei wurde die Höhe mit beiden Messzellen jeweils auf 10 μm , 250 μm , 500 μm , 750 μm und 1.250 μm eingestellt. Die für die jeweiligen Messzellen und Messzonenhöhen erhaltenen Werte für t_{mittel} und σ^2 sind in Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11 zusammengefasst.

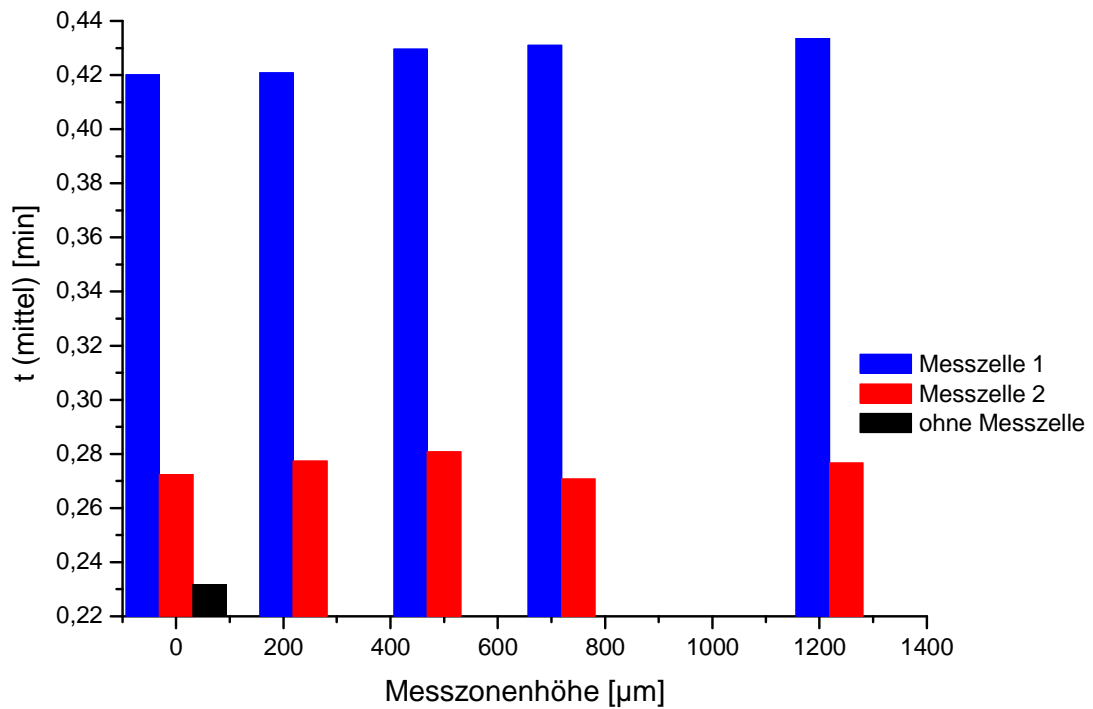


Abbildung 3.10: Mittlere Verweilzeit (t_{mittel}) für verschiedene Messzellen bei unterschiedlichen Messzonenhöhen

Für Messzelle 1 ist ein leichter konstanter Anstieg von t_{mittel} von 0,42 min auf 0,43 min erkennbar. Dies lässt sich auf eine Zunahme des durchströmten Volumens zurückführen; der Effekt scheint aber klein zu sein. Bei Messzelle 2 ist t_{mittel} deutlich kleiner, als bei Messzelle 1. Eine Abhängigkeit der mittleren Verweilzeit von der Messzonenhöhe kann hier nicht beobachtet werden, es ergibt sich hier ein Mittelwert von $t_{\text{mittel}} = 0,28$ min. Die mittlere Verweilzeit für ein System ohne Messzelle ist wie erwartet deutlich kleiner und liegt bei $t_{\text{mittel}} = 0,22$ min.

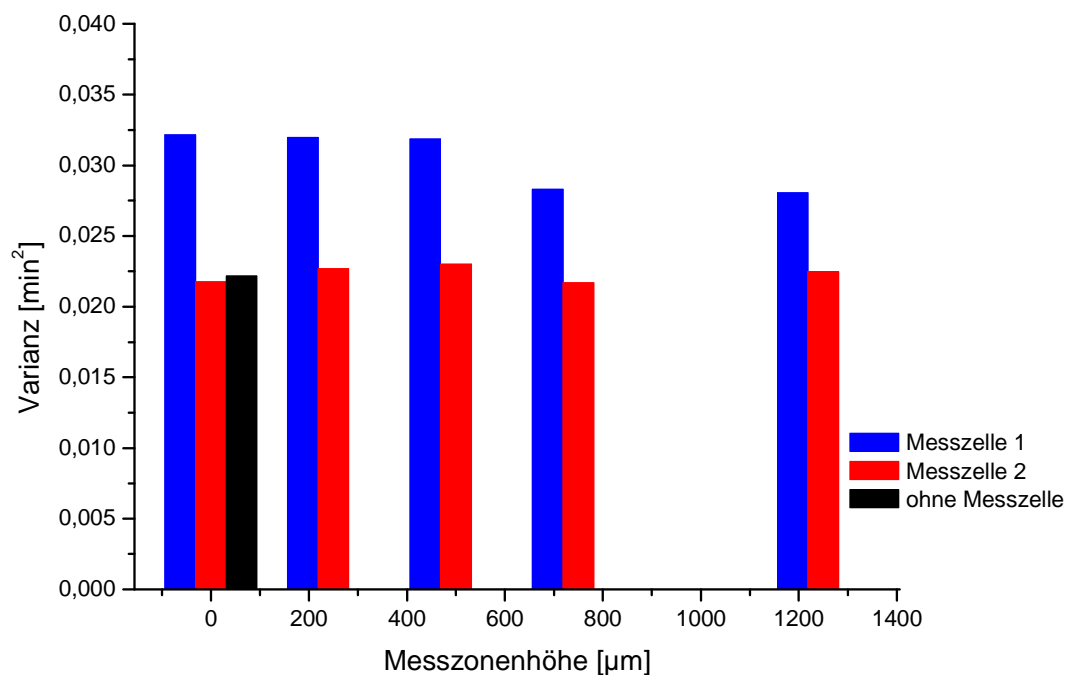


Abbildung 3. 11: Varianz (σ^2) für verschiedene Messzellen bei unterschiedlichen Messzonenhöhen

Die gemessenen Werte für die Varianz zeigen keine signifikante Abhängigkeit von der eingestellten Messzonenhöhe, für Messzelle 1 ergibt sich ein Mittelwert von $\sigma^2=0,030 \text{ min}^2$ und für Messzelle 2 von $\sigma^2=0,022 \text{ min}^2$. Der Wert für Messzelle 2 stimmt gut mit dem Wert für das System ohne Messzelle überein.

Zusammenfassung

Durch die Untersuchung der Verweilzeitverteilung konnte festgestellt werden, dass die mittlere Verweilzeit der Messzellen von dem System ohne Messzelle über Messzelle 2 bis hin zu Messzelle 1 deutlich zunimmt. Die Varianz ist auch bei Messzelle 1 deutlich höher, während sie für Messzelle 2 praktisch der im System ohne Messzelle entspricht. Ein signifikanter Einfluss der Messzonenhöhe auf die Verweilzeit konnte nicht beobachtet werden. Die eingestellten Volumenänderungen durch eine Variation der Messzonenhöhe scheinen im Vergleich zum Gesamtvolumen der Zelle vernachlässigbar klein zu sein.

3.2.3. Simulation der Strömungsverhältnisse in der Messzelle

Zur genaueren Untersuchung der entsprechenden Messzellen wurde mit Hilfe des Computerprogramms COMSOL-Multiphysics (COMSOL AS, Stockholm, Schweden) und mit freundlicher Unterstützung von Daniel Riechers (Sartorius Stedim Biotech S.A. Göttingen) eine Simulation der Strömungsverhältnisse berechnet. Der verwendete Algorithmus basiert auf einer Berechnung von Näherungslösungen der inkompressiblen Navier-Stokes-Gleichung für bestimmte Geometrien⁷⁸, woraus Geschwindigkeitsprofile erstellt werden können. Es wurde eine 2D-Simulation für Messzelle 2 durchgeführt; aufgrund der komplexeren Geometrie mit 2 Totzonen am Ein- und Ausgang (vgl. Abbildung 3.5) war eine entsprechende Simulation für Messzelle 1 nicht möglich. Es wurde dabei eine ideale kreisförmige Messzelle mit einem Durchmesser von 18 mm angenommen, die der unteren Saphirscheibe des ISM entspricht, wobei die Detektionszone des Mikroskops in der Mitte angeordnet ist und einen Durchmesser von 1 mm aufweist. Die Anschlüsse der Schläuche sind in der Simulation ideal im 180° Winkel angeordnet und haben einen Durchmesser von 0,8 mm. Als Volumenstrom am Ein- und Ausgang wurde ein Wert von 6,1 mL/min angenommen, was in der vorliegenden Geometrie einer Geschwindigkeit von 0,51 m/s entspricht. In der Simulation wurden zusätzlich sämtliche Rauigkeiten und Rauigkeitsunterschiede sowie Inhomogenitäten in der Messzelle vernachlässigt, weshalb es sich bei der gesamten Berechnung um eine grobe Näherung handelt. Das durch die Berechnung erhaltene Strömungsprofil ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Dabei sind die verschiedenen Geschwindigkeitsfelder durch unterschiedliche Farben markiert, während entsprechend die eingezeichneten Isolinien Bereiche gleicher Geschwindigkeit markieren. Es zeigt sich, dass die Hauptströmung in der Messzelle in einem schmalen Bereich von 1-1,5 mm im Zentrum in Höhe des Ein- und Auslasses der Zelle verläuft. Es ist zudem zu erkennen, dass die Geschwindigkeit in dieser Zone vom Eingang zum Ausgang deutlich von 0,51 m/s auf etwa 0,15 m/s abfällt. Außerhalb der Hauptströmung kommt es vermehrt zu Wirbelbildungen und Kreisströmen, weshalb die Gesamtgeschwindigkeit hier nahe Null ist. Die Detektionszone des Mikroskops liegt innerhalb der Hauptströmung und wird dadurch relativ schnell durchströmt. Es sollte also in diesem Bereich möglich sein, die Passage von Volumenelementen oder Objekten wie Zellen reproduzierbar zu messen. Weiterhin ergeben sich durch diese Strömungsverhältnisse klare Vorgaben für die Integration von Sensoren in die entsprechenden Messzellen. Um hier ein reproduzierbares Überströmen zu garantieren, sollten diese möglichst im Bereich des Ein- oder Auslasses des Fluids platziert werden.

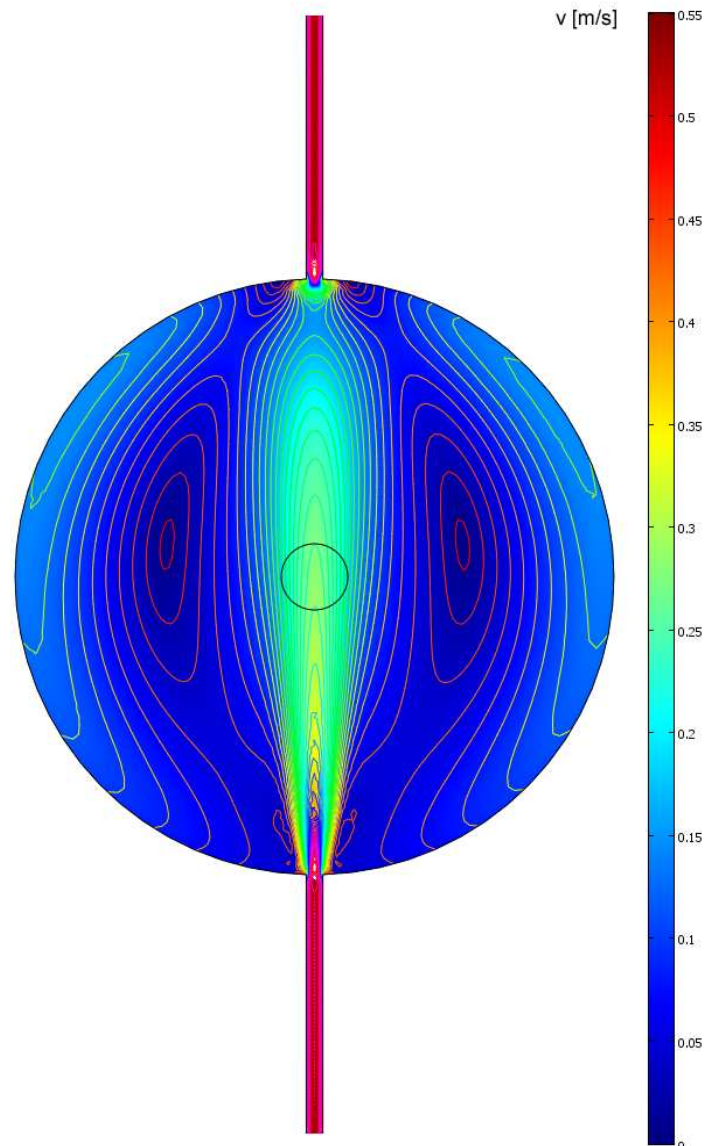


Abbildung 3.12: Simulation der Strömungsverhältnisse in Messzelle 2 O = Detektionszone des Mikroskops

3.3. Aufbau und Charakterisierung des verwendeten FIA-Systems

3.3.1. Aufbau des FIA Systems

Das verwendete FIA-System der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) bestand aus zwei 6-Port-Injektoren und zwei 6-Port-Selektoren, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur ein Injektor verwendet wurde. Verbunden wurden die verschiedenen Komponenten über Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm. Hierbei wurde darauf geachtet, dass vor allem die

Strecke zwischen Injektor und verwendeter Durchflusszelle möglichst klein war. Die in das System integrierten Pumpen waren nicht leistungsstark genug, um einen stabilen Fluss durch die Messzellen zu garantieren, weshalb eine externe Peristaltik-Pumpe der Firma Ismatec (Glattbrugg, Schweiz) für den Transport von Träger und Probenstrom verwendet wurde. deren Geschwindigkeit ließ sich in 100 Schritten regeln, wodurch ein Volumenstrom von $\dot{V} = 1,2-6,1 \text{ mL/min}$ realisiert werden konnte. Angaben zur Kalibration der Pumpe finden sich im Anhang (6.5). Der Aufbau der verwendeten FIA ist in Abbildung 3.13 gezeigt.

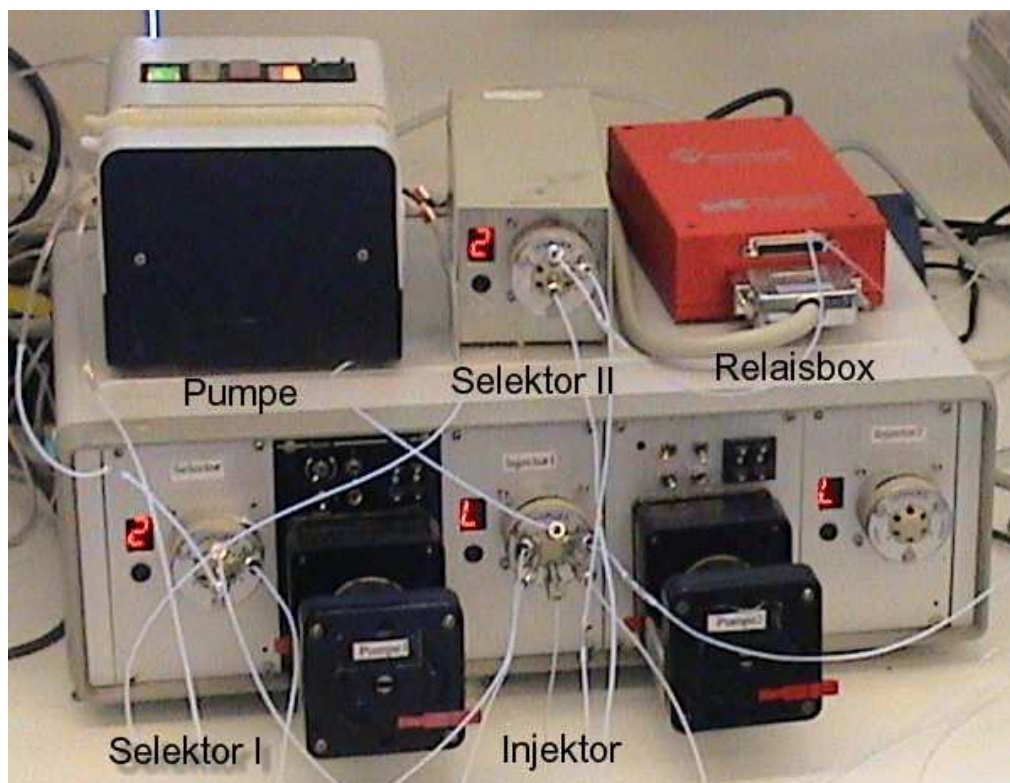


Abbildung 3.13: Aufbau des verwendeten FIA Systems

Das Funktionsprinzip des verwendeten Injektors ist in Abbildung 3.14 gezeigt. Er besteht aus 6 Ports, zwischen denen über eine bewegliche Scheibe 3 Verbindungen (gestrichelte Linien) realisiert werden können. Die Probenschleife (200 und 500 μL), über die die Injektion erfolgt, befindet sich zwischen Position 3 und 6. Der Trägerstrom, der zum Detektor führt, befindet sich an Positionen 1 und 2 und der Strom der zu injizierenden Probe ist an 4 und 5 angeschlossen. Beim Beladen (Load-Modus(L)) wird die Probenschleife mit Probe befüllt. Bei der Probeninjektion (Inject-Modus (I)) wird die Probe aus der Probenschleife vom Trägerstrom aufgenommen und zum Detektor transportiert.

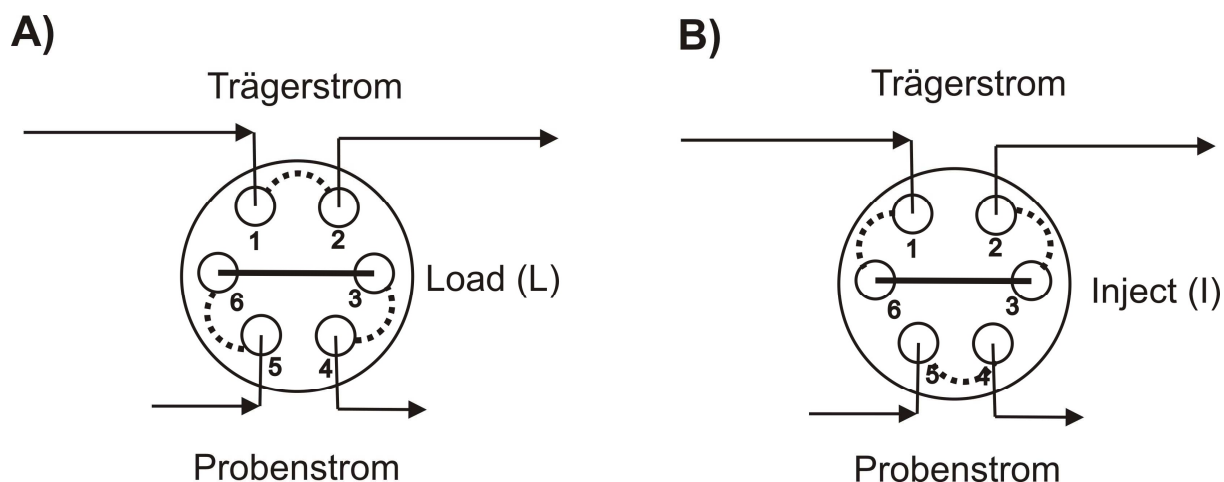


Abbildung 3.14: Aufbau eines 6-Port Injektors in der A) Load (L) und B) Inject (I) Position

Die Selektoren werden verwendet, um Ströme in verschiedene Richtungen umzulenken. Die verwendeten 6-Port Selektoren bestehen aus einem zentralen Port, das über eine bewegliche Scheibe mit 6 äußeren Ports verbunden ist. Dadurch kann ein Strom in 6 verschiedene Richtungen umgeleitet werden.

3.3.2. Steuerung des FIA Systems

Die Steuerung der FIA erfolgte über 8 Relais, die über eine Relaisbox (Meilhaus ME 630_16_USB) und eine Labview-basierte Steuersoftware angesteuert wurden, die speziell für diese Anwendung von Daniel Riechers am Institut für Technische Chemie der Leibniz-Universität Hannover geschrieben wurde. Die Bedienoberfläche der Software ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Über die Schalter lassen sich die Relais zeitabhängig ein- und ausschalten und es können beliebige Schaltzyklen programmiert werden, die einmal oder beliebig oft abgearbeitet werden können. Die Belegung der entsprechenden Relais ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

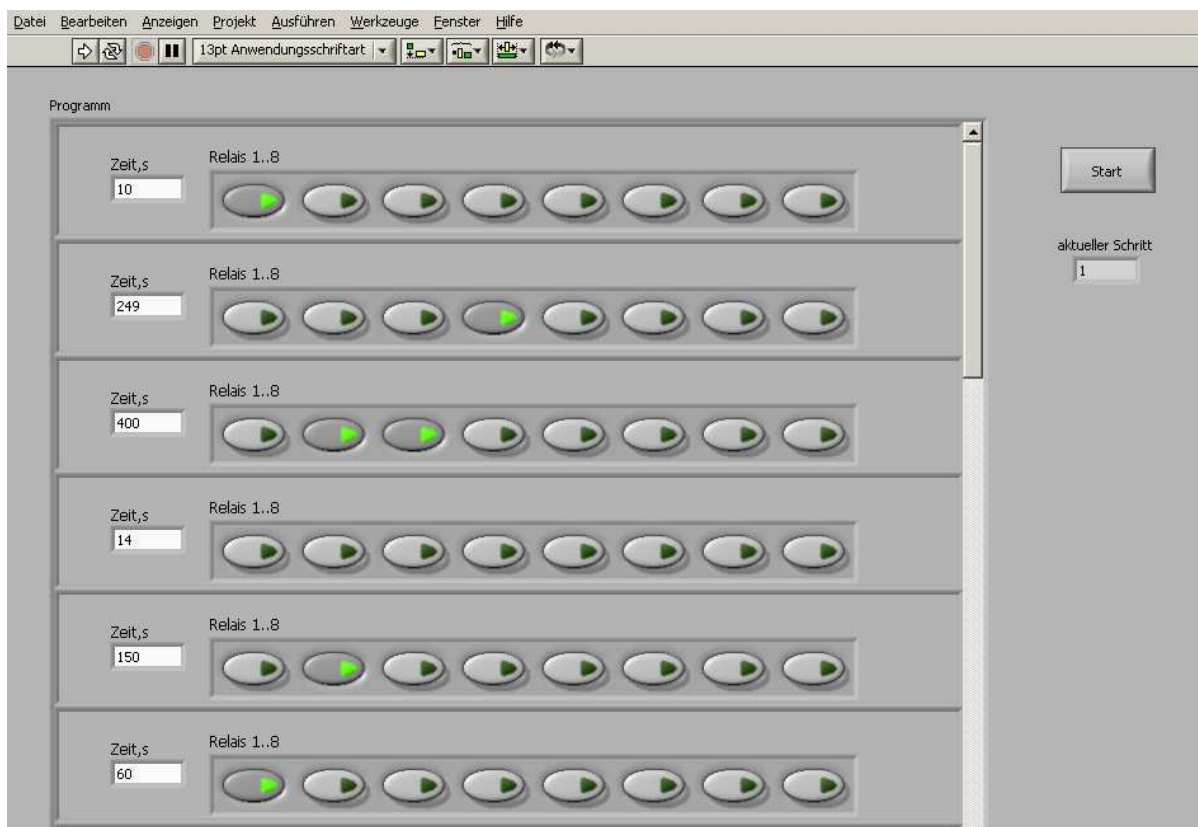


Abbildung 3.15: Labview Bedienoberfläche zur Steuerung der FIA

Tabelle 3.1: Belegung der Relais des FIA Systems

Relais Nr.	FIA Komponente	Funktion
1	Selektor I	Reset (Port 1)
2	Selektor I	1 Port weiter
3	Injektor I	I-L; L-I (auf Änderung)
4	Injektor II	I-L; L-I (auf Änderung)
5	Selektor II	Reset (Port 1)
6	Selektor II	1 Port weiter
7	Pumpe I	ein/aus
8	Pumpe II	ein/aus

3.3.3. Bestimmung des Dispersionskoeffizienten

Zur Bestimmung der Dispersionskoeffizienten in dem betrachteten FIA-System wurde der gleiche Aufbau und das gleiche Messverfahren wie zur Bestimmung der Verweilzeitverteilung verwendet (vgl. 3.2.2). Um die Verhältnisse im Routinebetrieb richtig wiederzugeben, wurde aber das Injektionsvolumen auf 500 μL erhöht und die Konzentration des Tracers Methylblau auf $c_0 = 0,0135 \text{ mmol/L}$ gesenkt (vgl. 6.3.1), da ansonsten zu hohe Absorptionswerte erhalten wurden.

Es wurden die Dispersion ohne Messzelle sowie mit Messzellen 1 und 2 ermittelt. Die Bestimmung der Dispersionskoeffizienten erfolgte durch graphische Ermittlung der Konzentrationen am Peakmaximum (c_{max}) und die Berechnung anhand von:

$$D = \frac{c_0}{c_{\text{max}}} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Die entsprechenden Peaks sind in Abbildung 3.16 dargestellt, während in Tabelle 3.2 die berechneten Dispersionskoeffizienten zusammengefasst sind.

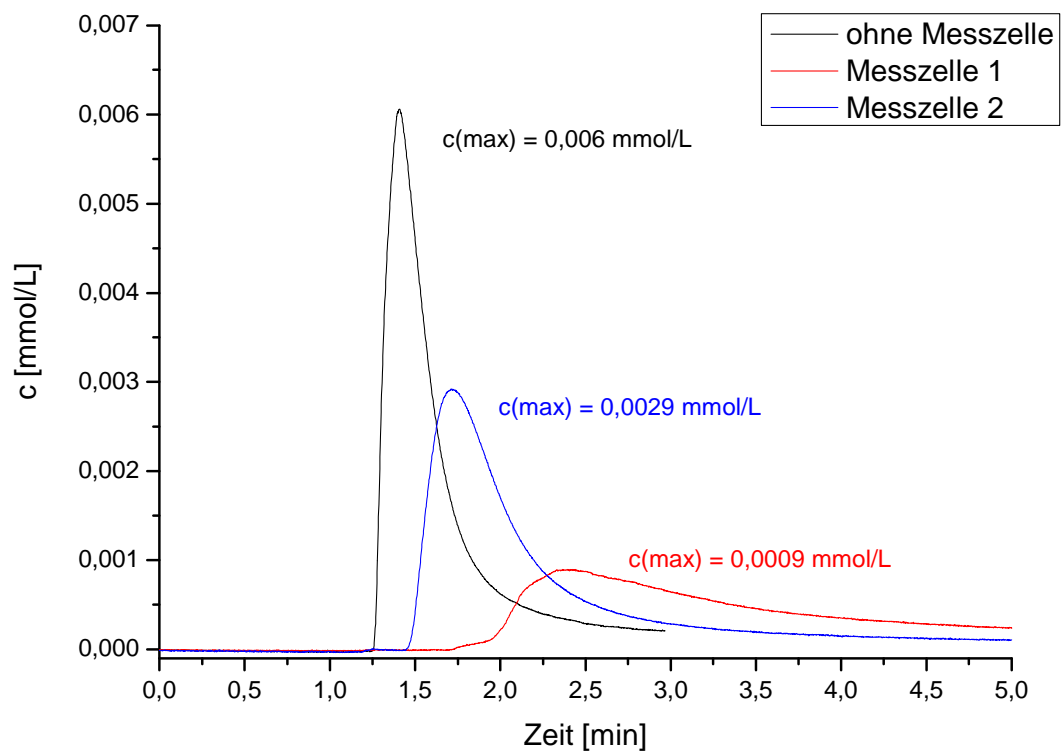


Abbildung 3.16: FIA Peaks für verschiedene Messzellen zur Bestimmung der Dispersionskoeffizienten

Tabelle 3.2: Dispersionskoeffizienten für verschiedene Messzellen

Messzelle	Dispersionskoeffizient
ohne	2,25
1	15,12
2	4,66

Es zeigt sich dabei, dass die, nur durch die Schläuche in der FIA ausgelöste, Dispersion relativ gering ist. Durch das Zuschalten einer Messzelle wird die Dispersion deutlich erhöht, dabei ist sie bei Messzelle 1 sehr hoch, was auf die in 3.2 beschriebenen Totvolumina zurückzuführen ist. In Messzelle 2 wurden diese beinahe vollständig eliminiert, was sich an einer deutlichen Verringerung der Dispersion zeigt.

3.4. Optimierung und Kalibration des Multitestersystems mit dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*

Um das so entwickelte Multitestersystem mit dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* zu testen, wurden bestimmte Mengen kommerziell erhältlicher Bäckerhefe in VE-Wasser suspendiert und diese über einen Injektor in den Trägerstrom eingebracht und zum Mikroskop transportiert. Der für sämtliche Messungen verwendete Versuchsaufbau findet sich in Abbildung 3.17.

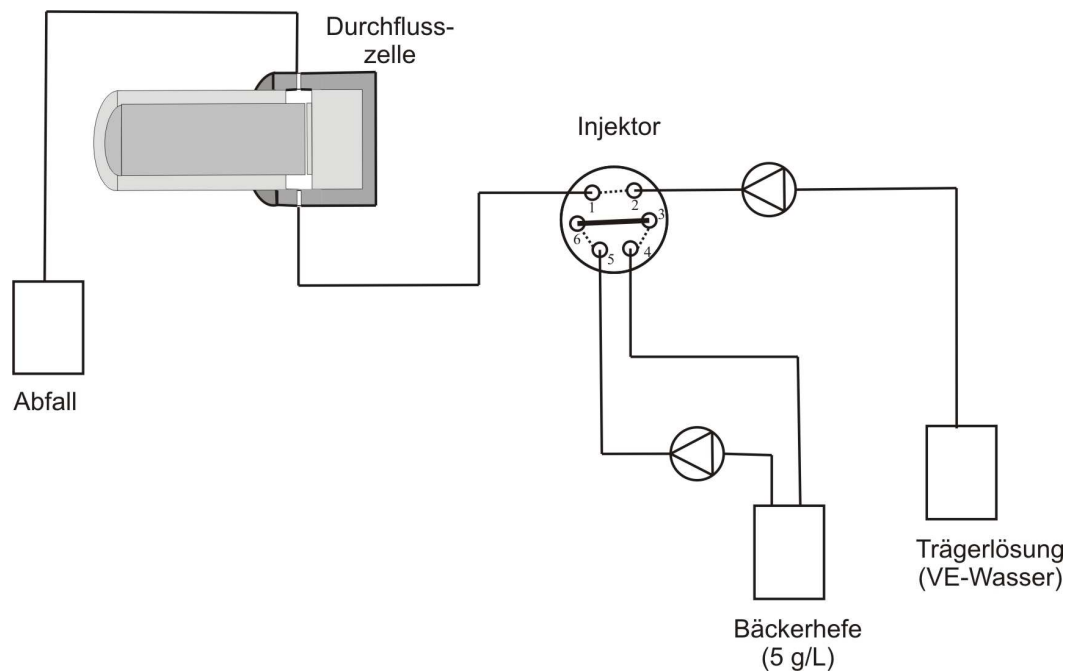


Abbildung 3.17: Messaufbau zur Optimierung des Durchflussmikroskops mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.4.1. Auswertung der FIA-Signale

Die Auswertung der erhaltenen Messsignale soll am Beispiel der Injektion einer Hefesuspension ($c = 5 \text{ g/L}$), bei einem Volumenstrom von $\dot{V} = 6,1 \text{ mL/min}$ mit einer Messzonenhöhe von $125 \text{ }\mu\text{m}$ und einem Injektionsvolumen von $500 \text{ }\mu\text{L}$ demonstriert werden. Es wurden dazu die Messzellen 1 und 2 eingesetzt und miteinander verglichen. Die Bildaufnahme wurde simultan mit der Injektion gestartet und es wurden pro Messung 100 Bilder im Abstand von 1 s aufgenommen, wobei jeweils eine Dreifachbestimmung der Probe durchgeführt wurde. Injektionen erfolgten bei 0 s , 100 s und 200 s .

Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem DYCC von In-situ analysis ausgewertet. Detaillierte Angaben zu dieser Auswertung finden sich in 3.1.3. Die detektierten Kerne (kernels) wurden als relevante Messgröße herangezogen und ihre Anzahl auf jedem der Bilder bestimmt. Es erfolgte dann eine Auftragung der Kerne auf den jeweiligen Bildern über die Zeit, was durch das konstante Zeitintervall von 1 s zwischen den Bildern ermöglicht wurde. Die daraus resultierenden charakteristischen Histogramme sind für die jeweiligen Messzellen in Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19 gezeigt.

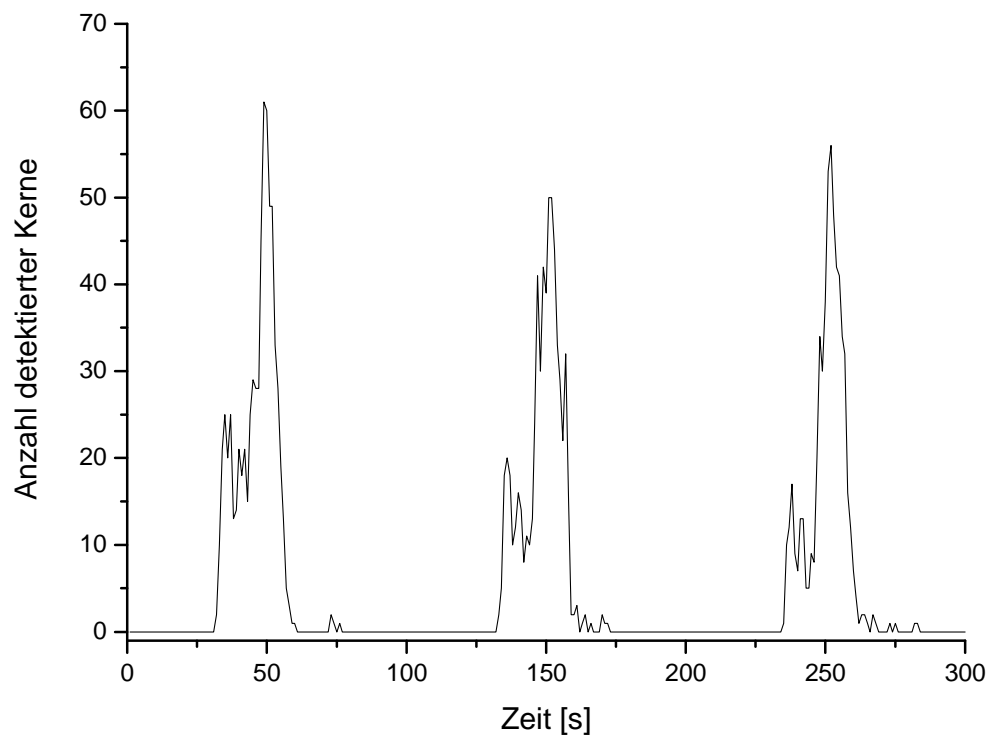


Abbildung 3.18: FIA-Peaks für Messzelle 1 in Dreifachbestimmung bei $c=5$ g/L

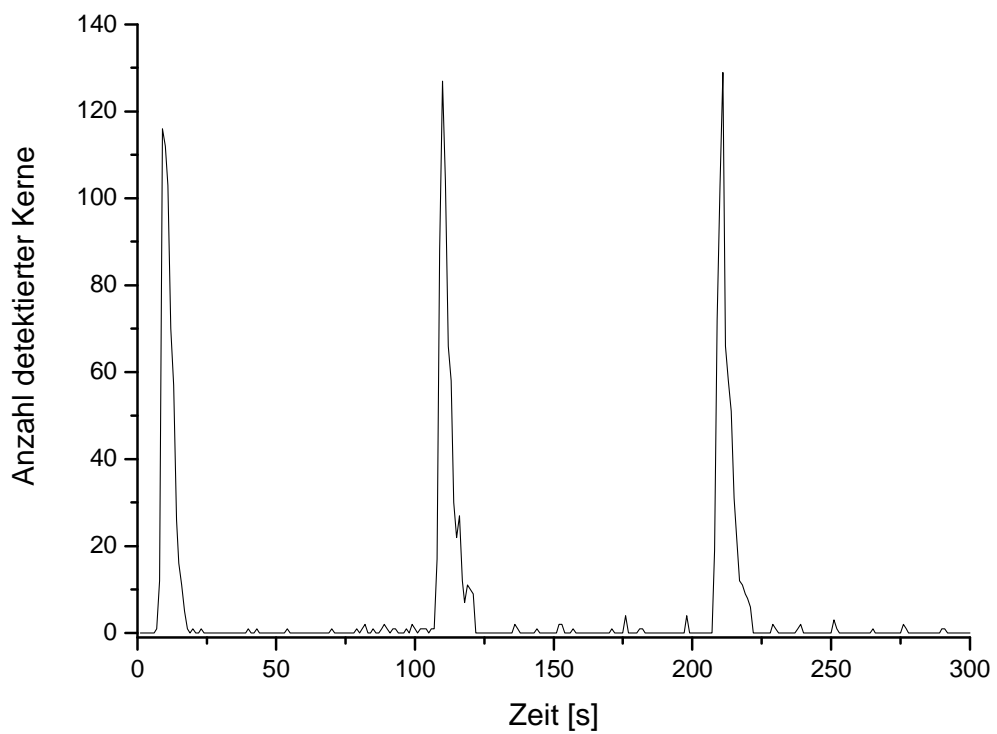


Abbildung 3.19: FIA-Peaks für Messzelle 2 in Dreifachbestimmung bei $c=5$ g/L

Es sind dabei deutliche Unterschiede in der Form der erhaltenen Histogramme zu erkennen. Die mit Messzelle 1 aufgenommenen Peaks sind deutlich breiter und ungleichmäßiger strukturiert und weisen alle einen kleinen Vorpeak auf, während die mit Messzelle 2 aufgenommenen Peaks deutlich schmaler, gleichmäßiger und höher sind. Zudem sind die Totzeiten zwischen Injektion und Detektion der ersten Hefezellen bei Messzelle 2 ($t_{\text{tot}} = 7,67 \pm 0,58$ s) deutlich kleiner als bei Messzelle 1 ($t_{\text{tot}} = 32,33 \pm 1,53$ s). Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen vom arithmetischen Mittel (siehe Anhang 6.6), die, wenn nichts anderes angegeben ist, für sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fehlerberechnungen herangezogen wurden.

Die erhaltenen Ergebnisse sind im wesentlichen konsistent mit den in 3.2.2 und 3.3.3 angestellten Untersuchungen zu Verweilzeitverteilung und Dispersionskoeffizienten und die Unterschiede in der Peakform bei den beiden Messzellen sind auf die großen Totvolumina in Messzelle 1 zurückzuführen. In die Messzelle eintretende Zellen werden in den Totzonen abgebremst und strömen ungleichmäßiger durch die Detektionszone des Mikroskops. Die bei Messzelle 1 beobachteten Vorpeaks lassen auf Kurzschlussströme innerhalb der Totzonen der Messzelle schließen, die sich aber ausschließlich auf im Trägerstrom vorhandene Partikel wie Zellen auswirken und deshalb bei den vorher durchgeführten Verweilzeit- und Dispersionsmessungen nicht beobachtet werden konnten.

Um die auf diese Weise erhaltenen Peaks zu quantifizieren, wurden die Peakflächen, bestimmt durch Integration, als relevante Messgröße herangezogen. Aufgrund der unregelmäßigen Peakformen, vor allem bei Messzelle 1, wäre eine alternativ mögliche Bestimmung der Peakhöhe mit einem zu großen Fehler behaftet. Die Ergebnisse für das oben aufgeführte Beispiel sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Integrale (Peakflächen) für Messzellen 1 und 2

Messzelle	Integral [Kerne]	Mittelwert [Kerne]	Fehler [Kerne]	Fehler [%]
1	733	695,3	39,6	5,7
	654			
	699			
2	541	568,2	24	4,2
	577			
	587			

Die errechneten Fehler sind wie zu erwarten für Messzelle 2 etwas kleiner als für Messzelle 1, der Unterschied ist aber nicht so gravierend, wie es anhand der ungleichförmigen Peakform und damit ungleichmäßigen Durchströmung bei Messzelle 1 zu erwarten war. Die detektierten Integralwerte sind für Messzelle 1 deutlich größer als für Messzelle 2. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass in Messzelle 1 die Detektionszone des Mikroskops generell langsamer von den Zellen durchquert wird und so bei der Bildaufnahme Hefezellen öfter doppelt gezählt werden. Es zeigt sich, dass generell mit beiden Messzellen reproduzierbare Werte erhalten werden können.

3.4.2. Optimierung des Volumenstroms

Es wurde der Einfluss des eingestellten Volumenstroms auf die erhaltenen FIA-Peaks bei Messzellen 1 und 2 untersucht. Dabei sollte ermittelt werden, welcher Wert für die Messung am besten geeignet ist. Hauptkriterium waren hierbei ein stabiles Signal, eine möglichst große Peakfläche zur Erhöhung der Empfindlichkeit sowie eine schnelle Messung, um einen hohen Probendurchsatz zu erreichen.

Dazu wurde der Volumenstrom an der verwendeten Peristaltikpumpe in 3 Schritten auf $\dot{V} = 6,1$ mL/min (99 U/min), $\dot{V} = 4,3$ mL/min (69 U/min) und $\dot{V} = 2,0$ mL/min (29 U/min) eingestellt. Es wurde jedes Mal eine Hefekonzentration von $c = 5$ g/L, eine Messzonenhöhe von 125 μm und ein Injektionsvolumen von 500 μL verwendet. Es erfolgte wiederum eine Dreifachbestimmung, wobei für Messzelle 2 Injektionen im Abstand von 100 s durchgeführt wurden, während bei Messzelle 1 die Messzeit aufgrund höherer Dispersion auf 200 s erhöht wurde. Die erhaltenen FIA-Peaks für die jeweiligen Messzellen sind in Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21 dargestellt. Die berechneten Integrale und Fehler sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

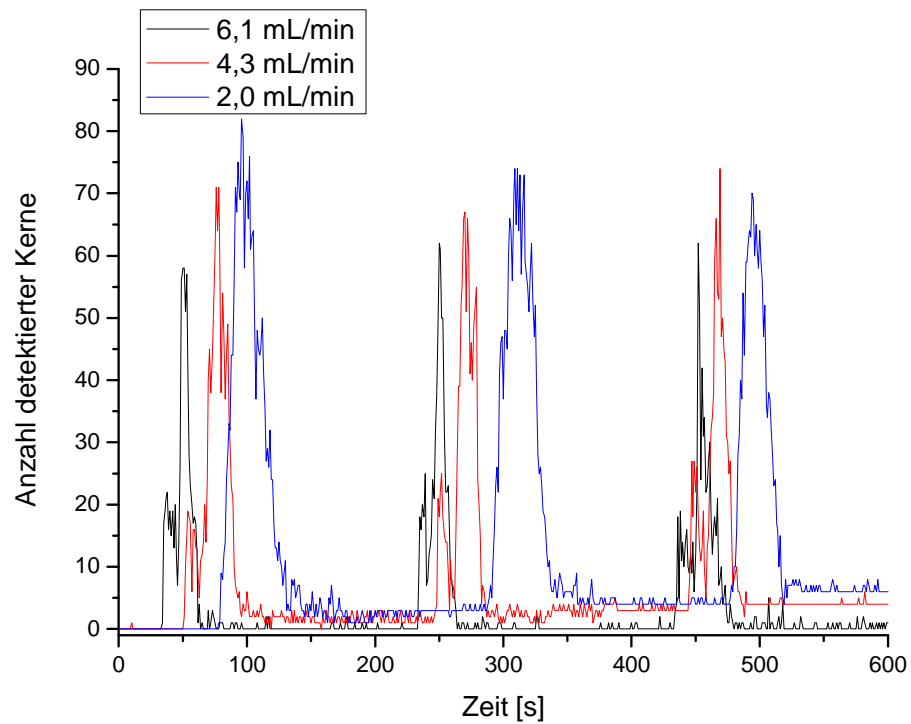


Abbildung 3.20: FIA Peaks bei Variation des Volumenstroms für Messzelle 1

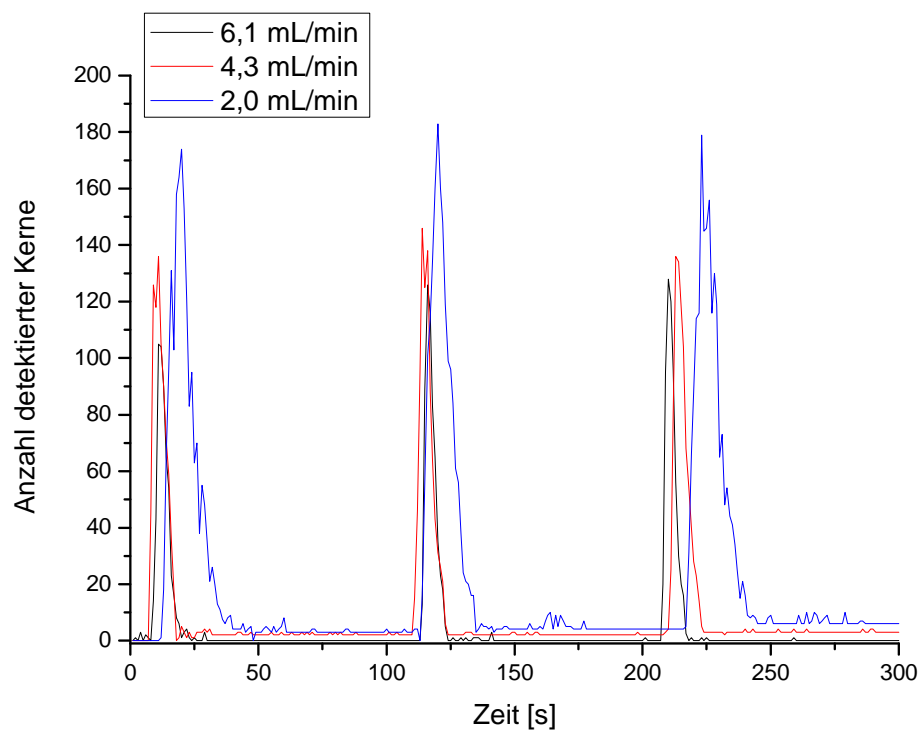


Abbildung 3.21: FIA Peaks bei Variation des Volumenstroms für Messzelle 2

Tabelle 3.4: FIA-Peak Integrale und Fehler bei unterschiedlichen Volumenströmen

\dot{V} [mL/min]	Messzelle 1 Integral (Mittelwert) [Kerne]	Messzelle 1 Fehler [Kerne]	Messzelle 2 Integral (Mittelwert) [Kerne]	Messzelle 2 Fehler [Kerne]
6,1	695,3	39,6 (5,7 %)	568,2	24,0 (4,2 %)
4,3	1.116,3	69,9 (6,3 %)	847,3	17,2 (2,0 %)
2,0	1.806,0	203,5 (11,3 %)	1.754,7	44,2 (2,5 %)

Für Messzelle 1 ist, wie erwartet, mit einer Reduktion des Volumenstroms auch eine deutliche Erhöhung der Totzeit zu beobachten. Sie steigt von $t_{\text{tot}} = 33,3 \pm 0,6$ s bei $\dot{V} = 6,1$ mL/min auf $t_{\text{tot}} = 83,3 \pm 4,9$ s bei $\dot{V} = 2,0$ mL/min, die Messzeit wird also deutlich erhöht. Zudem können bei einem eingestellten Volumenstrom von $\dot{V} = 2,0$ mL/min keine Kurzschlussströme mehr festgestellt werden. Die Peakflächen werden mit abnehmendem Volumenstrom deutlich größer, dies ist wiederum auf den langsameren Durchfluss und damit auf die vermehrte Doppelzählung von Zellen zurückzuführen. Dadurch steigt zwar prinzipiell die Messempfindlichkeit, gleichzeitig werden aber auch die relativen Fehler deutlich größer. Zudem besteht bei langsamerer Passage der Zellen die Gefahr, dass diese permanent in der Detektionszone anhaften und die Messung nachhaltig stören. Dies ist deutlich an der Verschiebung der Grundlinie in Abbildung 3.20 zu erkennen und das Problem würde sich bei wiederholter Probeninjektion weiter verschärfen. Aus diesen Gründen wurde für Messzelle 1 in allen zukünftigen Messungen ein einheitlicher Volumenstrom von $\dot{V} = 6,1$ mL/min gewählt.

Für Messzelle 2 ist ebenfalls eine Erhöhung der Totzeit mit abnehmendem Volumenstrom festzustellen, sie steigt von $t_{\text{tot}} = 10,3 \pm 3,3$ s bei $\dot{V} = 6,1$ mL/min auf $t_{\text{tot}} = 14,3 \pm 2,2$ s bei $\dot{V} = 2,0$ mL/min. Die Änderungen sind aber hier deutlich kleiner, als bei Messzelle 1 und führen so zu keiner nennenswerten Erhöhung der Messzeit. Die Integralwerte steigen ebenfalls deutlich mit sinkendem Volumenstrom, die Empfindlichkeit nimmt also zu. Zudem sinken bei Messzelle 2 die relativen Fehler der Integralwerte mit abnehmender Durchflussgeschwindigkeit. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre bei Messzelle 2 ein niedriger Volumenstrom von $\dot{V} = 2,0$ mL/min am günstigsten. Da aus Abbildung 3.21 jedoch hervorgeht, dass auch hier ein permanentes Anhaften der Zellen in der Detektionszone auftritt, wurde auch bei Messzelle 2 ein hoher Volumenstrom von $\dot{V} = 6,1$ mL/min gewählt.

3.4.3. Optimierung der Messzonenhöhe des Mikroskops

Um den Einfluss der Messzonenhöhe des Mikroskops auf die FIA-Integrale zu untersuchen, wurde diese mit Messzellen 1 und 2 im Bereich zwischen 70 Schritten (87,5 μm) und 130 Schritten (150 μm) in Zehnerschritten variiert. Unterhalb von 70 Schritten konnte kein Durchfluss von Zellen durch die Messzone beobachtet werden. Dazu wurde jeweils eine Hefetest-suspension mit $c = 5 \text{ g/L}$ injiziert, das Injektionsvolumen betrug 500 μL und der Volumenstrom wurde auf $\dot{V} = 6,1 \text{ mL/min}$ eingestellt. Es wurden wiederum Dreifachmessungen durchgeführt und die Injektionen erfolgten für beide Messzellen in Abständen von 200 s. Im Rahmen einer Optimierung sollte die Messzonenhöhe ausgewählt werden, bei der ein möglichst hoher Integralwert, also eine möglichst hohe Empfindlichkeit erreicht wird. Gleichzeitig sollten die Zellen in einer gut detektierbaren Weise fokussiert sein.

In Abbildung 3.22 sind die erhaltenen Integralwerte für Messzelle 1 in Abhängigkeit von der Messzonenhöhe aufgetragen. Die Daten für Messzelle 2 ergaben einen vergleichbaren Verlauf, weshalb hier auf eine Darstellung verzichtet wurde. Um die Qualität der Zellerkennung zu beschreiben, wurde zusätzlich der Anteil an nicht klassifizierten Objekten, d.h. Objekte die von In-situ analysis nicht als Zellen erkannt werden, aufgetragen.

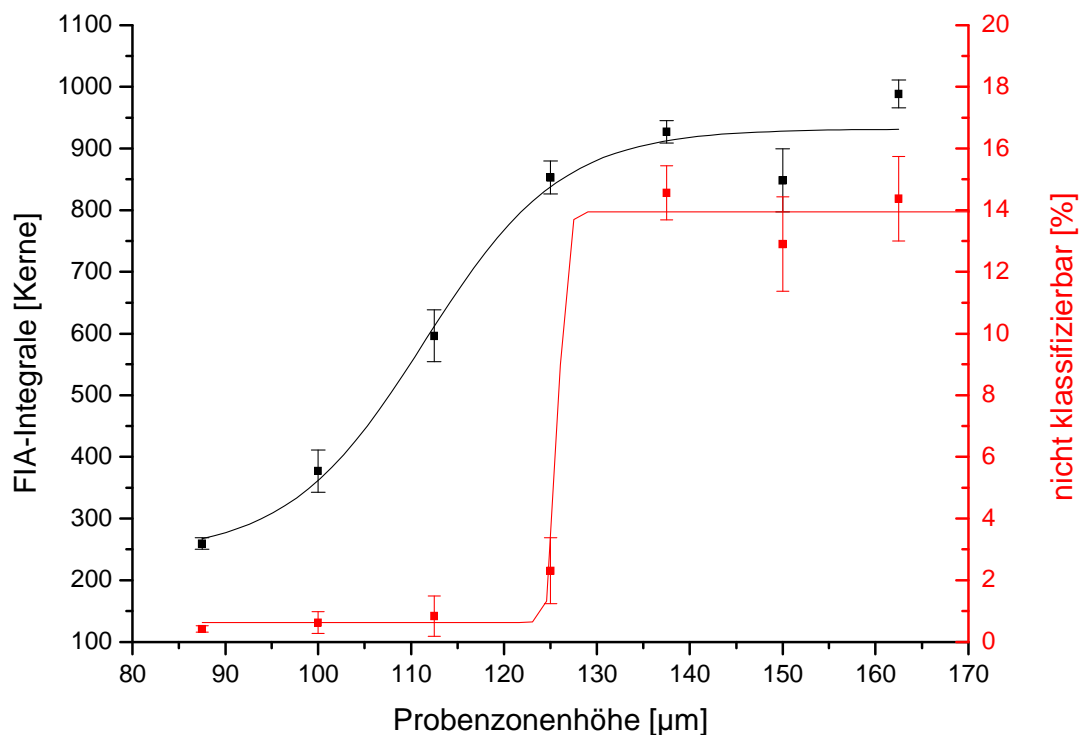


Abbildung 3.22: Einfluss der Messzonenhöhe auf die FIA-Integrale für Messzelle 1

Zwischen $87,5 \mu\text{m}$ und $125 \mu\text{m}$ steigen die Integralwerte mit der Zunahme der Messzonenhöhe. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Strömungsverhältnisse in der Messzelle vermutlich stark von der Messzonenhöhe abhängen. Wahrscheinlich werden bei geringerer Messzonenhöhe große Teile der Zellen nicht durch die Detektionszone im Zentrum des Mikroskops (vgl. Abbildung 3.12) sondern seitwärts daran vorbeigeführt. Nimmt die Messzonenhöhe weiter zu, so strömen mehr Zellen durch die Detektionszone im Zentrum. Entsprechend werden mit zunehmender Messzonenhöhe mehr Zellen detektiert. Eine genauere Aufklärung der Strömungsverhältnisse in Abhängigkeit von der Messzonenhöhe würde eine 3D-Simulation der Verhältnisse in der Messzelle erfordern, was den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde.

Oberhalb von $125 \mu\text{m}$ laufen die Integralwerte gegen einen Sättigungswert. Dieses liegt daran, dass auf Grund der begrenzten Schärfentiefe des verwendeten Objektivs nicht mehr alle durchströmenden Objekte korrekt fokussiert und damit vom DYCC als Zellen erkannt werden können. Dieser Trend spiegelt sich auch in dem Anteil der nicht klassifizierbaren Objekte wider, der bis zu einem Wert von $112,5 \mu\text{m}$ deutlich unter 1 % liegt, für $125 \mu\text{m}$ auf 2,3 % ansteigt und ab $137,5 \mu\text{m}$ auf 14 % springt. Um dies zu veranschaulichen, sind in Abbildung 3.23 zwei Beispielbilder bei Messzonenhöhen von $80 \mu\text{m}$ und $150 \mu\text{m}$ gezeigt.

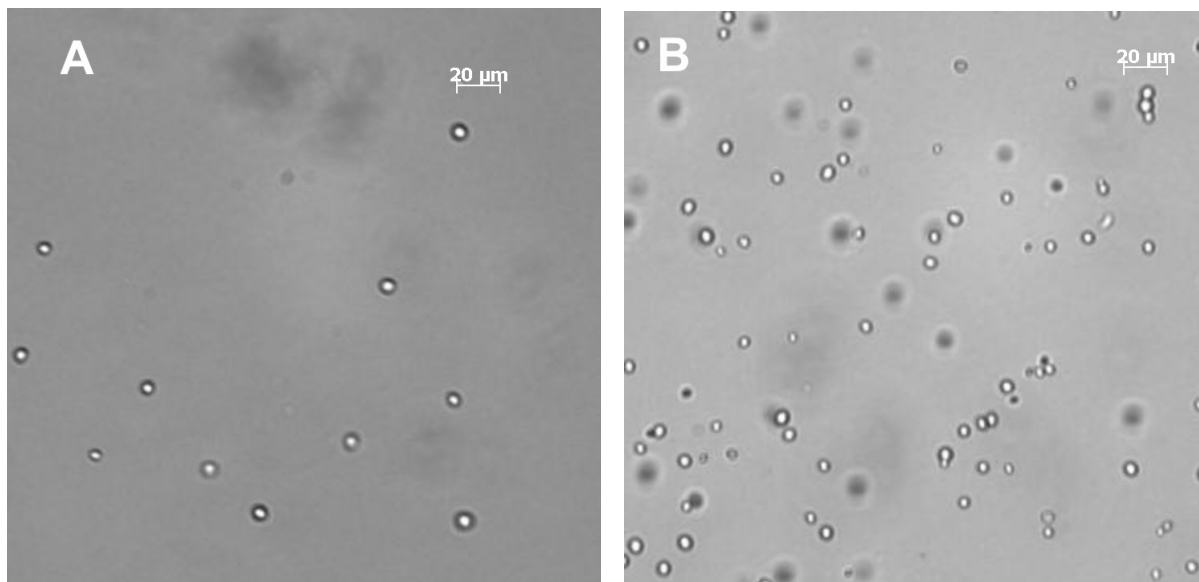


Abbildung 3.23: Bilder von Hefen im Durchfluss bei Messzonenhöhen von A: $80 \mu\text{m}$ und B: $150 \mu\text{m}$

Während bei einer Messzonenhöhe von 80 μm alle Zellen klar als Kerne detektiert werden können sind bei einer Messzonenhöhe von 150 μm mehrere Zelllagen vorhanden, von denen nur eine in richtiger Weise fokussiert werden kann. Sämtliche verschwommenen schwarzen Flecken in diesem Bild werden als nicht klassifizierbare Objekte registriert.

Als Kompromiss wurde für alle folgenden Messungen eine Messzonenhöhe von 125 μm verwendet. Bei diesem Wert ist der ermittelte Integralwert beinahe am Maximum und es lässt sich somit die maximale Empfindlichkeit erreichen. Zudem ist der Anteil an nicht klassifizierbaren Objekten mit 2,3 % noch auf einem tolerierbaren Niveau.

3.4.4. Kalibration des Multitestersystems

Für einen sinnvollen Einsatz des entwickelten Multitestersystems ist eine Kalibration erforderlich, um so den erhaltenen Integralwerten bestimmte Zelldichten zuzuordnen. Dazu wurden verschiedene Suspensionen mit kommerziell erhältlicher Bäckerhefe im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 - 50 g/L angesetzt und deren Zelldichten durch manuelles Auszählen mit einer Neubauer-Kammer bestimmt. Dies entspricht einem Bereich von $1 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^8$ Zellen/mL. Genauere Informationen zu diesem Verfahren und die genaue Zusammensetzung der Suspensionen finden sich im Anhang (6.4.4 ; 6.3.2). Die Suspensionen wurden dann in Dreifachbestimmung mit dem Multitester gemessen und die FIA-Integrale bestimmt. Der Volumenstrom betrug 6,1 mL/min, als Messzonenhöhe wurden 125 μm eingestellt und es wurden jeweils Probenvolumina von 500 μL injiziert. Die resultierende Kalibrationsgeraden für die Messzellen 1 und 2, in denen die FIA-Integrale gegen die eingesetzte Zelldichte aufgetragen sind finden sich in Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25.

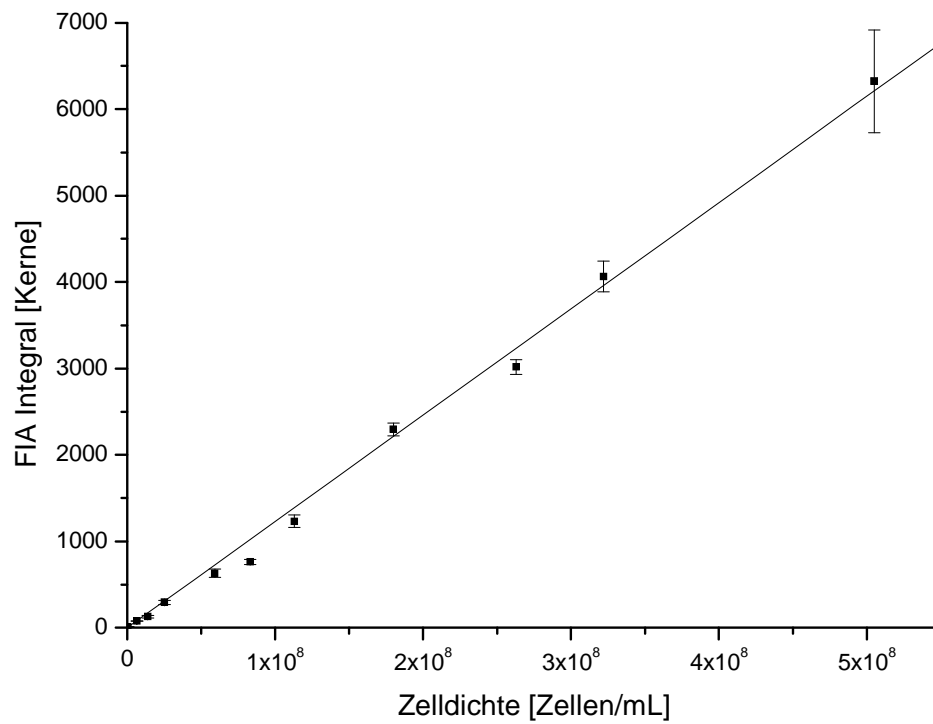


Abbildung 3.24: Kalibrationsgerade für *Saccharomyces cerevisiae* mit Messzelle 1

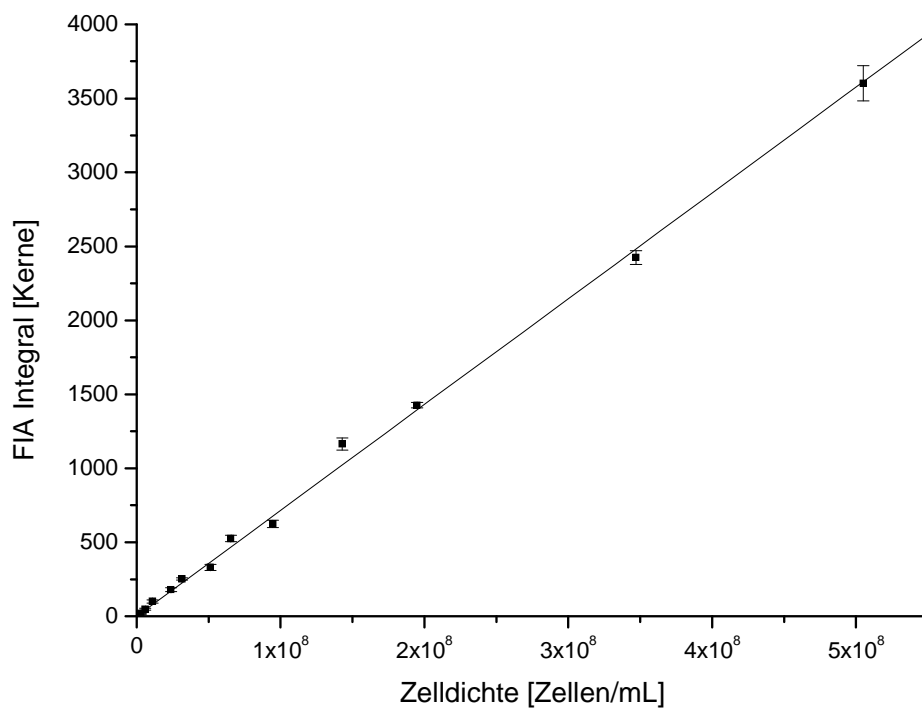


Abbildung 3.25: Kalibrationsgerade für *Saccharomyces cerevisiae* mit Messzelle 2

Es zeigt sich, dass für beide Messzellen über den gesamten eingestellten Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^8$ Zellen/mL ein linearer Zusammenhang zu den bestimmten FIA-Integralen besteht. Wie anhand der vorher angestellten Beobachtungen zu erwarten war, sind die Integralwerte für Messzelle 1 deutlich größer als für Messzelle 2. Im Messbereich unter $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL ergaben sich Integralwerte < 10 , die mit sehr großen relativen Fehlern behaftet sind und entsprechend nicht mehr sinnvoll ausgewertet werden konnten. Für sehr hohe Zelldichten zeigt sich ebenfalls eine deutlich sichtbare Zunahme der Fehler. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich in diesem Konzentrationsbereich sehr häufig Hefezellen permanent in der Detektionszone des Mikroskops festsetzen und somit die Messung nachhaltig stören. Weiterhin ergaben sich in diesem Konzentrationsbereich bereits Schwierigkeiten die Hefe vollständig zu lösen, so dass Inhomogenitäten in der Probe eine reproduzierbare Messung verhinderten. Für Konzentrationen oberhalb von $5 \cdot 10^8$ Zellen/mL verstärkten sich die genannten Probleme noch weiter und zudem kam es häufig zu Verstopfungen der Schlauchverbindungen, so dass ein störungsfreier Betrieb nicht garantiert werden konnte. Die generierten Kalibrationsgeraden wurden für sämtliche in 4.1 verwendeten Kultivierungen zur Berechnung der Zelldichte verwendet. In Tabelle 3.5 sind die wichtigsten Parameter zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Wichtige Parameter der Kalibrationsgeraden ($Y = A \cdot X$) für Messzellen 1 und 2

Messzelle	Steigung (A) [mL·Kerne·Zellen ⁻¹]	Bestimmtheitsmaß (R ²)
1	$1,23 \cdot 10^{-5}$	0,9983
2	$7,15 \cdot 10^{-6}$	0,9989

Zur genaueren Charakterisierung des verwendeten Messverfahrens ist es hilfreich, die während einer Injektion aufgegebenen Zellen den wirklich am Mikroskop wiedergefundenen Zellen gegenüber zu stellen. Dabei wurde als Beispiel eine eingestellte Zelldichte von $1 \cdot 10^8$ Zellen/mL gewählt. Dieses entspricht bei einem Injektionsvolumen von 500 μ L einer Aufgabe von $5 \cdot 10^7$ Zellen. Mit dem Multitester wird davon mit Messzelle 2 ein Wert von 715 Kernen detektiert, das heißt lediglich 0,0014 % der aufgegebenen Zellen werden auch wiedergefunden. Für Messzelle 1 ergibt sich bei der gleichen Zelldichte ein detektierter Integralwert von 1250 Kernen und damit eine höhere Wiederfindungsrate von 0,0025 %. Dies ist aber darauf zurück zu führen, dass in Messzelle 1 die Detektionszone des Mikroskops generell langsamer

durchströmt wird und damit Zellen häufiger doppelt gezählt werden und die Integralwerte sich dadurch erhöhen (vgl. 3.4.1).

Diese insgesamt sehr geringen Wiederfindungsraten bestätigt die auch schon in 3.4.3 geäußerte Vermutung, dass bedingt durch die Geometrie der In-situ Mikroskops große Teile der Zellen nicht durch die Detektionszone des Mikroskops strömen sondern seitlich daran vorbeigeführt werden. Eine Verbesserung dieses Wertes wäre aber nur durch einen kompletten Umbau des zu Grunde liegenden In-situ Mikroskops zu erreichen, was in der Aufgabenstellung aber ausgeschlossen wurde.

3.4.5. Variation des Injektionsvolumens

Da das bisher verwendete Injektionsvolumen von 500 μL für den normalen FIA-Einsatz relativ groß ist und mit einem relativ hohen Probenverbrauch einhergeht, wurde untersucht, inwieweit sich eine Reduktion des Injektionsvolumens auf die Empfindlichkeit der Messung auswirkt. Es wurden analog zu 3.4.4 verschiedene Konzentrationen von Bäckerhefe mit dem Multitester und Messzelle 1 gemessen, wobei das Injektionsvolumen auf 200 μL reduziert wurde. Die resultierende Kalibrationsgerade findet sich in Abbildung 3.26.

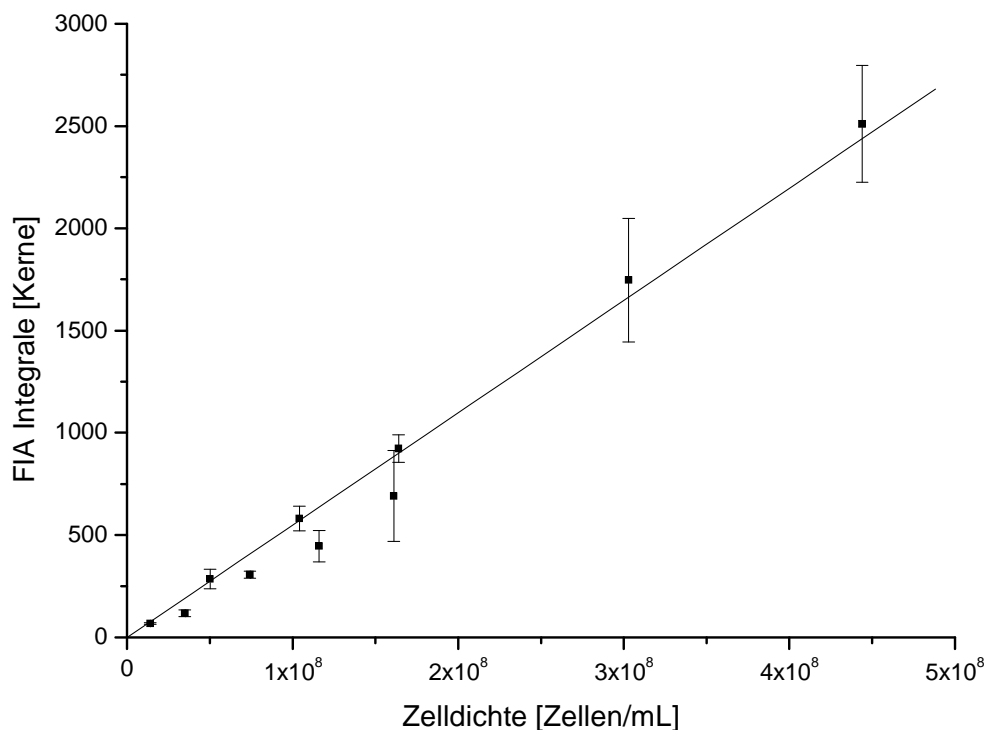


Abbildung 3.26: Kalibrationsgerade für Messzelle 1 mit einem Injektionsvolumen von 200 μL

Auch hier ist ein linearer Zusammenhang deutlich zu erkennen, wobei die Steigung bei einem Wert von $5,49 \cdot 10^{-6} \text{ mL} \cdot \text{Kerne} \cdot \text{Zellen}^{-1}$ liegt. Allerdings ergeben sich durch die Reduktion des Injektionsvolumens wesentlich größere Fehler der Einzelmessungen sowie eine wesentlich schlechtere lineare Korrelation der Werte ($R^2 = 0,9936$). Die absoluten Integralwerte werden durch die Reduktion des Injektionsvolumens ebenfalls deutlich kleiner. Während der Messbereich analog zu 3.4.4 am oberen Ende auf Grund schlechter Probenlöslichkeit und Verstopfung der Schläuche auf $5 \cdot 10^8$ Zellen/mL begrenzt ist, wird das untere Detektionslimit des Verfahrens durch die Reduktion des Injektionsvolumens um eine halbe Größenordnung auf $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL verschoben. Darunter war keine reproduzierbare Zelldetektion möglich. Die erhaltene Wiederfindungsrate liegt hier bei 0,0027 % und unterscheidet sich damit nicht signifikant von dem Wert bei einem Injektionsvolumen von 500 μL .

Aufgrund dieser durch eine Reduktion des Injektionsvolumens hervorgerufenen Nachteile, wurde trotz eines höheren Probenverbrauchs für alle weiteren Messungen ein Injektionsvolumen von 500 μL verwendet.

Zusammenfassung

Im Rahmen des in diesem Abschnitt durchgeführten Optimierungsprozesses mit dem Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* konnte ein geeigneter Volumenstrom von 6,1 mL/min für Messzellen 1 und 2 ermittelt werden. Eine Reduktion der Geschwindigkeit führte häufig zu permanentem Anhaften von Zellen in der Detektionszone des Multitesters, was die Messung störte. Die am besten geeignete Messzonenhöhe betrug 125 μm , hier war die Größe der FIA-Peaks maximal, bei einem gleichzeitig tolerierbaren kleinen Anteil nicht klassifizierbarer Objekte. Eine Kalibration ergab für beide Messzellen eine gute lineare Korrelation in einem Messbereich von $1 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^8$ Zellen/mL. Das Injektionsvolumen wurde trotz des hohen Probenverbrauchs auf 500 μL eingestellt, da eine Reduktion zu einer signifikanten Erhöhung der Messfehler und einer Reduktion des Messbereichs um eine halbe Größenordnung führte.

3.5. Einsatz faseroptischer Sauerstoffsensoren in der Messzelle

3.5.1. Integration faseroptischer Sauerstoffsensoren in Messzelle 1

Die Integration faseroptischer Sensoren zur Bestimmung der Sauerstoffsättigung in der Lösung in den Multitester war nur bei Messzelle 1 möglich. In Messzelle 2 ist, aufgrund der Einsätze zur Reduktion der Totvolumina, der Platz in der Messzone zu gering, um einen Sensor

dort zu implementieren. Dazu wäre ein Umbau des gesamten ISM erforderlich, was in der Aufgabenstellung ausdrücklich ausgeschlossen wurde.

Als Sensoren wurden kommerziell erhältliche Sensor-Patches ($d = 5 \text{ mm}$) der Firma Presens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland) verwendet. Diese enthalten auf einer Seite den Fluoreszenzfarbstoff und auf der anderen Seite eine Schicht aus schwarzem Silikon zur optischen Isolierung. Die Patches wurden über einen speziell für diese Anwendung entwickelten Adapter in die Messzelle integriert. Der Adapter bestand aus einer transparenten Plexiglasscheibe mit einem Durchmesser von 5 mm, auf der das Sensor-Patch mit Silikon-Zweikomponentenkleber (Elastosil RT-601) aufgeklebt wurde. Auf der anderen Seite der Plexiglasscheibe konnte eine Glasfaser angeschlossen und mit einer Fixierschraube befestigt werden. Über eine Bohrung mit einem Durchmesser von 5 mm in der Höhe des Fluid Einlasses (vgl. 3.2.3) wurde der Adapter in Messzelle 1 integriert, wobei ein 5 mm Gummiring zum Abdichten verwendet wurden. Es wurde dafür gesorgt, dass der Adapter möglichst gut mit der Wand der Messzelle abschließt, und so eine Beschädigung des Patches beim Aufsetzen der Messzelle auf das ISM ausgeschlossen werden konnte. Der Aufbau des Adapters, sowie dessen Integration in Messzelle 1 sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

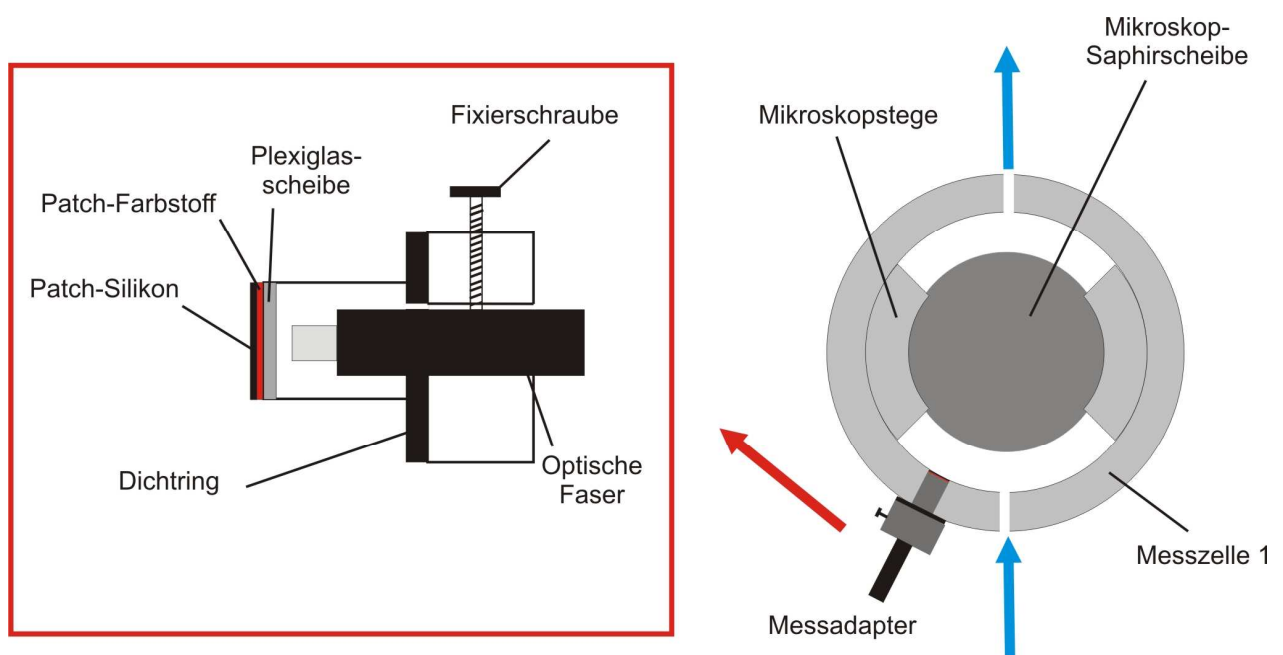


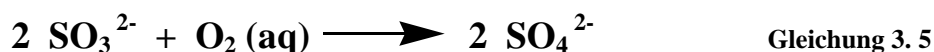
Abbildung 3.27: Aufbau des Sauerstoff-Messadapters und Integration in Messzelle 1

Die Messungen erfolgten mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen Sauerstoff-Messbox der Firma Presens (Fibox 3), deren Technik auf Fluoreszenz Lebenszeitmessungen durch Phasen-

verschiebung von moduliertem Licht basiert (vgl. 2.5) und die über eine Glasfaser ($d = 1\text{mm}$) mit dem Messadapter verbunden wurde. Das Gerät wurde mittels Com-Port an einen PC angeschlossen und das Auslesen und Bearbeiten der Daten erfolgte über die vom Hersteller mitgelieferte Software OxyView. Diese ermöglicht die Speicherung von manuellen Kalibrationsparametern (siehe 3.5.2), sowie die Aufnahme aller wichtigen Messgrößen, wie Intensität, Phasenverschiebung und errechnete Sauerstoffsättigung über die Zeit und deren Auslesen als txt-Dateien.

3.5.2. Kalibration der faseroptischen Sauerstoffsensoren im Durchfluss- und FIA-Betrieb

Zur Kalibration des Sauerstoffsensors im Durchfluss wurde eine 2-Punkt-Kalibration bei 100% und 0% Sauerstoffsättigung durchgeführt. Um 100% Sauerstoffsättigung durch Luft-sauerstoff zu realisieren wurden 20 mL VE-Wasser über eine Aquariumpumpe mit Druckluft begast und diese Lösung kontinuierlich durch die Messzelle gepumpt. Dabei wurde bewusst Druckluft anstatt reinem Sauerstoff verwendet, um die Verhältnisse während einer Schüttelkolbenkultivierung besser widerzugeben und eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen. Es wurde gewartet bis sich ein konstanter Wert der Phasenverschiebung eingestellt hatte und dieser Wert in dem Messprogramm OxyView als 100 % Sauerstoffsättigung abgespeichert. Zum Erreichen von 0 % Sauerstoffsättigung wurden 10 mL einer 1 % Natriumsulfidlösung verwendet (siehe Anhang 6.3.3), die unter Katalyse mit zweiwertigen Kobalt-Ionen den gelösten Sauerstoff chemisch entfernt.



Die Lösung wurde ebenfalls kontinuierlich durch die Messzelle gepumpt und der entsprechende Wert der Phasenverschiebung als 0 % Sauerstoffsättigung abgespeichert.

Zur Kalibration des Sauerstoffsensors im FIA-Betrieb wurde ein Aufbau analog zu Abbildung 3.17 verwendet. Der Trägerstrom wurde dabei mit N_2 gesättigt, um eine möglichst geringe Sauerstoffkonzentration einzustellen, es konnten dabei Werte von 14 % - 21 % Sauerstoffsättigung als Grundlinie realisiert werden. Es wurde dann eine Probe injiziert, die aus mit Druckluft begastem VE-Wasser bestand, das damit 100 % Sauerstoffsättigung aufwies. Simultan

mit der Injektion erfolgte eine Aufzeichnung der Sauerstoffsättigung über die Zeit, wobei alle 0,1 s ein Wert gemessen wurde. Es ergaben sich analog zu den gemessenen Zelldichten für eine FIA charakteristische Peaks, die für eine Dreifachinjektion der Probe mit 100 % Sauerstoffsättigung in Abbildung 3.28 dargestellt sind.

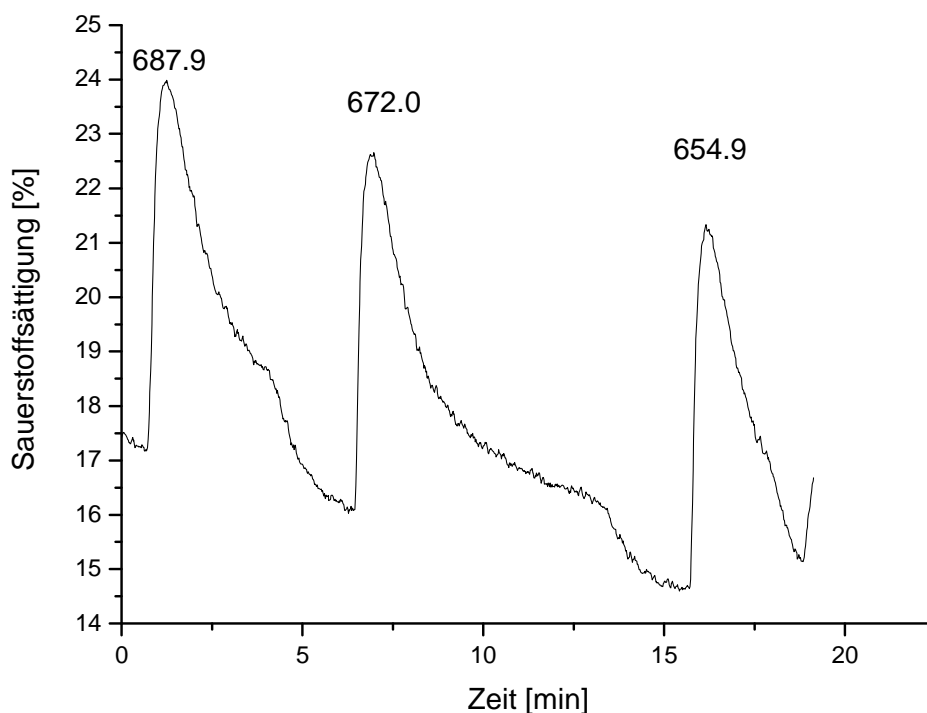


Abbildung 3.28: FIA-Peaks für die Dreifachinjektion einer Probe mit 100% O₂ in einen mit N₂ gesättigten Trägerstrom

Die Quantifizierung der erhaltenen FIA-Peaks erfolgte analog zu den Zelldichtemessungen durch Auswertung der Peakflächen über Integralbildung. Dazu wurden 200 Messwerte um das Peakmaximum aufsummiert. Die Integralwerte sind in Abbildung 3.28 über den Peaks dargestellt. Es ergab sich ein mittlerer Integralwert von $671,6 \pm 16,5$, der nun 100% Sauerstoffsättigung zugeordnet werden konnte. Alle später aufgenommenen Sauerstoffwerte konnten nun anhand dieses Wertes und der Grundlinie, die für 0 % Sauerstoffsättigung steht, berechnet werden. Die auf Standardabweichungen basierenden Fehler sind mit 2,4 % sehr klein, es zeigt sich aber auch eine deutlich instabile Grundlinie. Diese wurde bei der Bestimmung der Integrale mit einbezogen, wodurch sich aber ein zusätzlicher konstanter Fehlerwert ergab. Dieser erwies sich gerade bei der Messung kleinerer Werte der Sauerstoffsättigung als relativ hoch. Eine nähere Diskussion dieser Problematik erfolgt in Abschnitt 4.1.5.

4. Anwendungen des Multitestersystems in der Zellkultur

Das vorher im Detail beschriebene und charakterisierte Multitestersystem wurde in diesem Abschnitt an Zellkultivierungen von Beispielorganismen im Schüttelkolbenmaßstab getestet. Es erfolgte zunächst eine detaillierte Untersuchung von *Saccharomyces cerevisiae* und später eine Übertragung auf einen Produktionsstamm von *Bacillus megaterium*. Dabei sollte die Eignung des Multitesters für die routinemäßige Bestimmung von Zelldichte, Agglomeratbildung und Sauerstoffsättigung in der Lösung untersucht werden. Ein besonderer Schwerpunkt dieses Systems liegt auf der parallelen Beobachtung mehrerer Zellkultivierungen zur schnellen und automatisierten Optimierung von Kultivierungsparametern bei der Entwicklung neuer Kultivierungsprozesse. Dazu wurden mehrere Hefekultivierungen parallel untersucht sowie erste Tests zur parallelen Untersuchung verschiedener Organismen durchgeführt.

Es wurden dabei in allen Versuchen die während des Optimierungsprozesses in Kapitel 3 erhaltenen Einstellungen für den Multitester verwendet. Diese sind eine Messzonenhöhe von 125 μm , ein Injektionsvolumen von 500 μL und ein Volumenstrom von $\dot{V} = 6,1 \text{ mL/min}$.

4.1. Zellkultivierungen mit *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae wurde als Testorganismus ausgewählt, da er sehr robust ist, sich einfach kultivieren lässt sowie aufgrund seiner Größe und Morphologie sehr gut für lichtmikroskopische Untersuchungen geeignet ist. Zudem existierten aufgrund seines häufigen Einsatzes als Modellorganismus in der In-situ Mikroskopie bereits fortschrittliche Analysealgorithmen für diesen Zelltyp. Da zudem der in Abschnitt 3.4 durchgeführte Optimierungsprozess für den Multitester auf *Saccharomyces cerevisiae* basierte, war dieser Organismus die natürliche Wahl für erste Kultivierungsversuche.

4.1.1. Testkultivierungen mit Messzellen 1 und 2

Um den Einsatz des Multitestersystems an Zellkultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* zu testen und zu bewerten, sowie den Einfluss der verwendeten Messzellen zu untersuchen, wurden typische Kultivierungsverläufe aufgenommen und die vom Multitester erhaltenen Werte mit offline-Daten verglichen.

Dazu wurden Schüttelkolbenkultivierungen mit einem Volumen von 350 mL in Schatzmann-Medium (siehe Anhang 6.3.4) bei 30°C und 200 rpm für 20 h durchgeführt. Dabei betrug die Anfangs-Glukosekonzentration 28,6 g/L und die Animpfzellichte $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Eine detaillierte Kultivierungsvorschrift findet sich im Anhang (6.4.1). Es wurden dabei Messzellen 1 und 2 getestet. Eine Probennahme und Analyse durch den Multitester erfolgte in 15 min Intervallen. Zur Verifizierung der Daten wurden alle 60 min offline-Proben über eine Bakterienfalle entnommen und mittels Neubauer-Kammer ausgezählt. (vgl. 6.4.4). Der verwendete Messaufbau des FIA Systems findet sich in Abbildung 4.1 und die gesamte Steuerung erfolgte automatisiert über die in 3.3.2 beschriebene Labview-basierte Software.

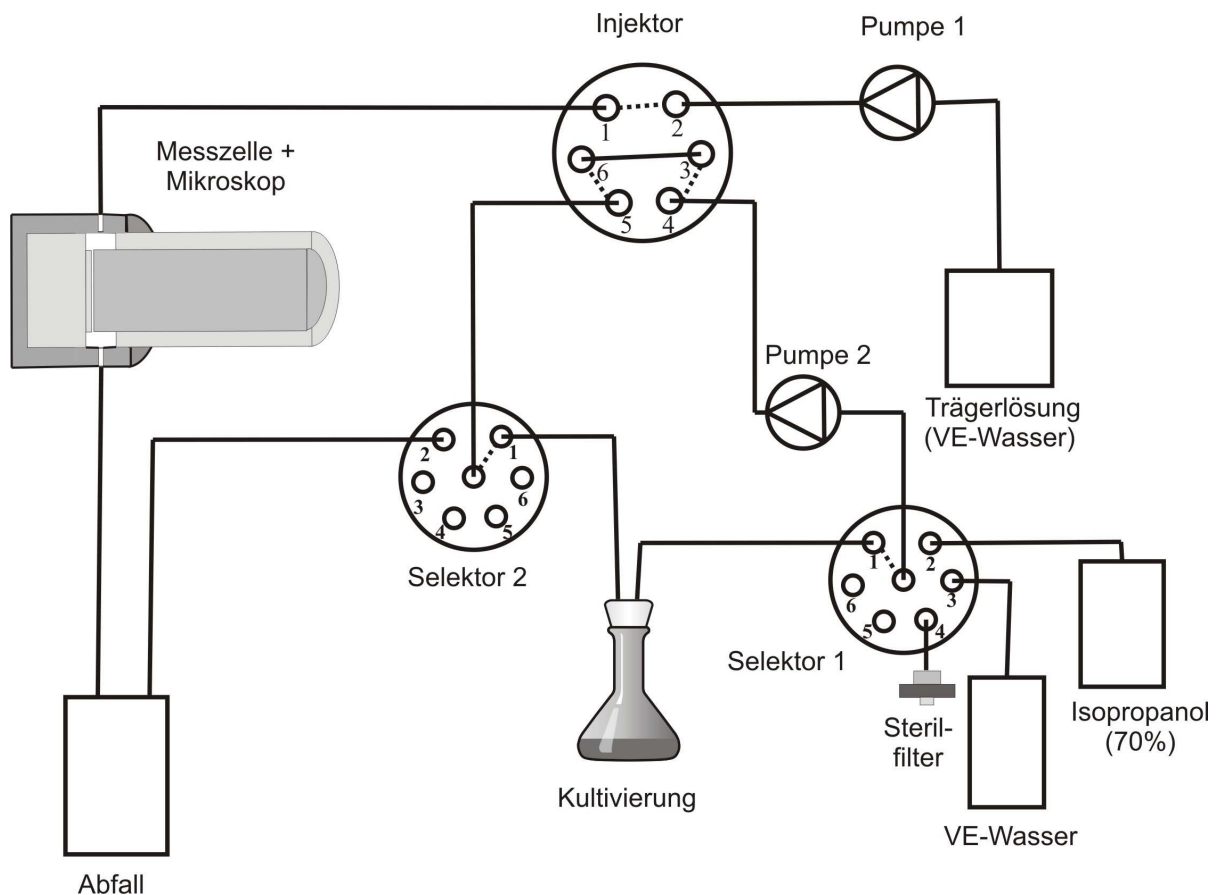


Abbildung 4.1: Messaufbau für die Analyse einer Schüttelkolbenkultivierung mit dem Multitestersystem

Der Trägerstrom aus VE-Wasser wurde dabei in einem kontinuierlichen Fluss über den Injektor durch die Durchflusszelle des Mikroskops in den Abfall gepumpt. Am Anfang des Zyklus befand sich der Injektor im Load-Modus. Die Kultivierungsbrühe wurde so im Kreislauf ge-

führt; sie wurde über Position 1 von Selektor 1 geleitet, durch die Probenschleife des Injektors gepumpt und über Position 1 von Selektor 2 in die Kultivierung zurückgeführt. Beim Start einer Messung wurde der Injektor auf Inject umgeschaltet, wobei gleichzeitig die Bildaufnahme über einen Zeitraum von 300 s gestartet wurde. Die Probe strömte nun durch die Durchflusszelle des Mikroskops und es wurden, wie in 3.4.1 beschrieben, die FIA-Peaks aufgenommen und ausgewertet sowie die errechneten FIA-Integrale mit den in 3.4.4 erhaltenen Kalibrationsgeraden in Zelldichten umgerechnet. Nach Beendigung der Messung wurde der Injektor zurück in die Load-Position und die beiden Selektoren auf Position 2 geschaltet, wodurch 70% iges Isopropanol durch das System gepumpt und es so sterilisiert wurde. Daraufhin wurde Selektor 2 auf Position 3 weitergeschaltet, wodurch das System zum Entfernen des Isopropanols mit VE-Wasser durchspült wurde. Es erfolgte dann ein Weiterschalten von Selektor 1 auf Position 4, so dass das System mit steriler Luft komplett leer gepumpt wurde, um eine Verdünnung der Kultivierung durch im System verbleibendes Wasser zu unterbinden. Im letzten Schritt erfolgte ein reset beider Selektoren auf Position 1, wodurch das System mit neuer Probe befüllt wurde und ein weiterer Messzyklus gestartet werden konnte. Die Zykluszeit betrug dabei jeweils 15 min. Durch diesen Messaufbau konnte eine automatische Probenahme aus der Kultivierung, eine Analyse der Proben sowie eine Reinigung des Systems unter Wahrung der Sterilität garantiert werden.

Die über die Kultivierungsdauer aufgenommenen Werte für die Zelldichte, bestimmt mit dem Multitester unter Verwendung von Messzellen 1 und 2 sowie durch offline-Zählung mit einer Neubauer-Kammer, sind für eine Beispielkultivierung in Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3 dargestellt.

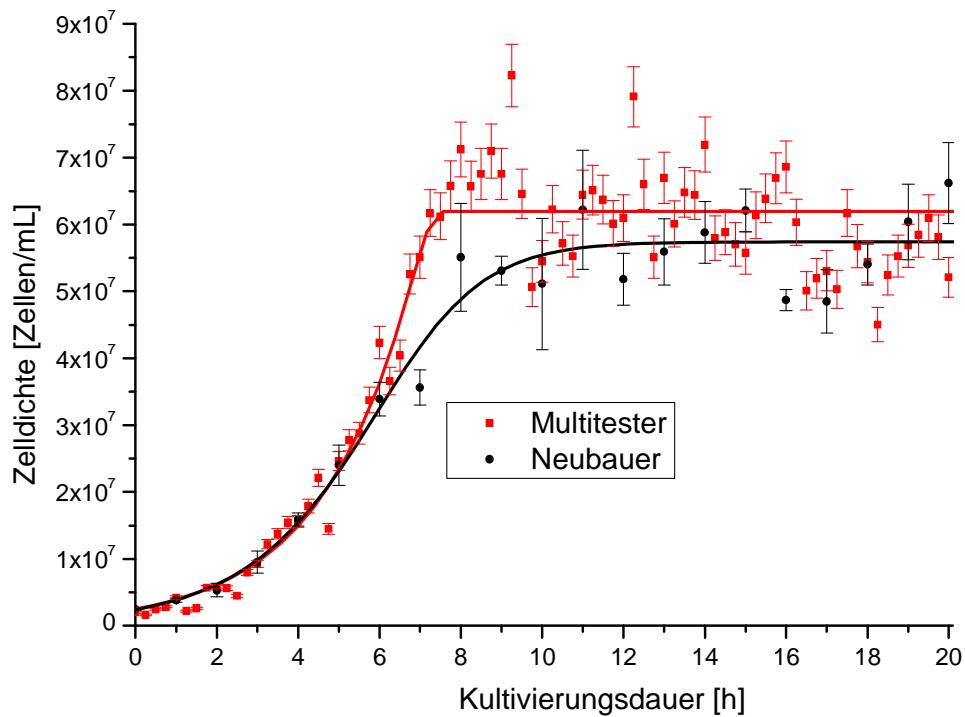


Abbildung 4.2: Kultivierungsverlauf einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt mit dem Multitester in Messzelle 1 sowie offline-Zählung mit einer Neubauer-Kammer

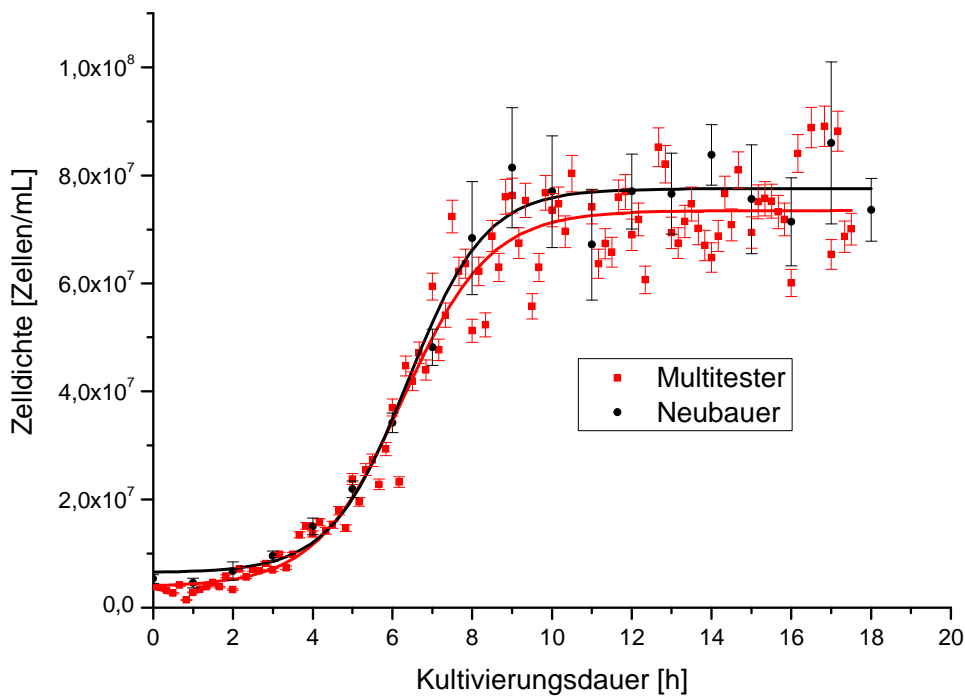


Abbildung 4.3: Kultivierungsverlauf einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt mit dem Multitester in Messzelle 2 sowie offline-Zählung mit einer Neubauer-Kammer

Da die mit dem Multitester bestimmten Werte jeweils nur einmal gemessen wurden, wurde der relative Fehler, ausgehend von den Ergebnissen in 3.4.1, für Messzelle 1 auf 5,7 % und für Messzelle 2 auf 4,3 % geschätzt. Die Fehler der offline-Werte errechnen sich aus dem einzelnen Auszählen der 4 Großquadrate (vgl. 6.4.4) und einer Bestimmung der Standardabweichungen (vgl. 6.6).

Es zeigt sich, dass mit beiden Messzellen ein typischer Kultivierungsverlauf bestehend aus lag-Phase, exponentieller Phase und stationärer Phase aufgezeichnet werden konnte, wobei die maximale Zelldichte für die Kultivierung mit Messzelle 1 auf $6 \cdot 10^7$ und für Messzelle 2 auf $8 \cdot 10^7$ Zellen/mL anstieg. Die Beobachtung der Absterbephase ist mit der verwendeten Analytik nicht möglich, da nicht zwischen lebenden und toten Zellen differenziert werden kann. Die mit Messzelle 2 aufgezeichnete Kultivierung weist dabei eine deutlich längere lag-Phase auf, was vermutlich auf unterschiedliche Aktivität der Zellen in der verwendeten Vor-kultur zurückzuführen ist, was aber für die Charakterisierung der Messzellen nicht von Bedeutung ist. Der für eine typische aerob geführte batch-Kultivierung charakteristische Diauxie-Effekt und die damit verbundene zweite Wachstumsphase der Zellen auf Ethanol Basis⁷⁵ kann hier nicht gefunden werden. Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Sauerstoff in einer Schüttelkolbenkultivierung limitierend wirkt und der Diauxie-Effekt entsprechend weniger ausgeprägt ist. Detaillierte Untersuchungen zu diesem Thema werden in 4.1.5 beschrieben.

Für Messzelle 1 zeigt sich eine sehr gute Korrelation zwischen Multitester und offline-Werten in der lag- und exponentiellen Phase. Beim Übergang in die stationäre Phase kommt es aber zu gravierenden Abweichungen und einer vermehrten Streuung der Werte bei längerer Kultivierungsdauer. Außerdem ist hier deutlich erkennbar, dass die mit dem Multitester gemessenen Werte um bis zu 27,3% über den offline-Werten liegen. Dieses ist vermutlich auf Zellen zurückzuführen, die mit zunehmender Kultivierungsdauer und Zelldichte permanent in der Detektionszone des Multitesters anhaften. Dies führt entsprechend dazu, dass diese öfter mitgezählt werden, wodurch sich höhere Zelldichten ergeben. Dadurch unterscheidet sich der Kultivierungsverlauf mit Messzelle 1 deutlich von den offline-Werten.

Bei Messzelle 2 ist die Korrelation zwischen Multitester und offline-Werten deutlich besser. Die Kultivierungsverläufe sind hier sehr ähnlich und die Abweichungen betragen auch im Bereich der stationären Phase lediglich 5,2 %. Eine vermehrte Streuung der Multitester-Messwerte mit zunehmender Kultivierungsdauer und Zelldichte ist dagegen auch hier zu beobachten; das permanente Anhaften von Zellen in der Detektionszone des Mikroskops scheint hier aber kein derart großes Problem darzustellen wie bei Messzelle 1. Dies ist vermutlich auf

die schmalen FIA-Peaks und die damit verbundenen einheitlichere und schnellere Passage der Zellen durch die Detektionszone (vgl. 3.4.1) zurückzuführen.

Zusammenfassung

Es zeigte sich, dass mit beiden Messzellen der Kultivierungsverlauf einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* aufgezeichnet werden konnte, ein Diauxie Effekt konnte aber aufgrund von Sauerstofflimitierung nicht beobachtet werden. Im Vergleich mit offline-Werten zeigte Messzelle 2 aber eine deutlich bessere Übereinstimmung. Deshalb wurde bei weiteren Kultivierungsexperimenten bevorzugt Messzelle 2 verwendet. Lediglich bei der Bestimmung der Sauerstoffkonzentrationen während der Kultivierung in 4.1.5 musste Messzelle 1 verwendet werden, da ein Einsatz der Sauerstoffsensoren in Messzelle 2 nicht möglich war.

4.1.2. Untersuchungen der Agglomeratbildung während einer Testkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Neben der Bestimmung der Zelldichte sind auch weitergehende Untersuchungen der Zellkultur wie beispielsweise die Agglomeratbildung der Hefen über den Kultivierungsverlauf von entscheidender Bedeutung. Daraus lassen sich Rückschlüsse über das Teilungsverhalten der Zellen und den Wachstumszustand einer Kultur erhalten. Dafür wurde analog zu 4.1.1 eine weitere Kultivierung mit Messzelle 2 durchgeführt und die erhaltenen Daten weitergehend ausgewertet. Wie in 3.1.3 beschrieben, lassen sich mit der Bildanalysesoftware In-situ analysis mit DYCC neben Informationen über die Gesamtzahl der erkannten Kerne, die für die Zelldichtbestimmung verwendet wurden, auch die Gesamtzahl der erkannten Objekte sowie die Anzahl an Einzelzellen, Doppelzellen und Zellclustern bestimmen. Es wurden alle diese Größen über die Zeit aufgetragen und es wurden wiederum für die jeweiligen Variablen FIA-Peaks erhalten. Analog zu 3.4.1 wurden die Peaks jeweils über Integration der Peakflächen ausgewertet. Aus diesen Integralwerten ließ sich berechnen, welcher Anteil der detektierten Objekte Einzelzellen, Doppelzellen oder Cluster waren. In Tabelle 4.1 sind exemplarisch für eine Kultivierungsdauer von 4 h die entsprechenden FIA-Integrale sowie die Anteile zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Integralwerte sowie Anteile von Einzelzellen, Doppelzellen und Clustern, bestimmt mit dem Multitester mit Messzelle 2 bei einer Kultivierungsdauer von 4 h

	Integralwerte	Anteil [%]
Objekte	171	-
Einzelzellen	58	33,9
Doppelzellen	65	38,0
Zellcluster	42	24,6
nicht klassifizierte Objekte	6	3,5

Es zeigt sich ein relativ hoher Anteil an Doppelzellen (38,0 %), ein etwas niedrigerer Anteil von Einzelzellen (33,9 %) und deutlich weniger Cluster (24,6 %). Der verbleibende Anteil ist auf nicht klassifizierbare Objekte zurückzuführen, dieses können schlecht fokussierte Zellen aber auch Luftblasen oder Fremdpartikel sein. Dieser Anteil ist aber mit 3,5% relativ klein. In Abbildung 4.4 sind die auf diese Weise gewonnenen Anteile über die gesamte Kultivierungsdauer aufgetragen. Weiterhin wurde die zugehörige Wachstumskurve dargestellt, damit die entsprechenden Wachstumsphasen parallel verfolgt werden können

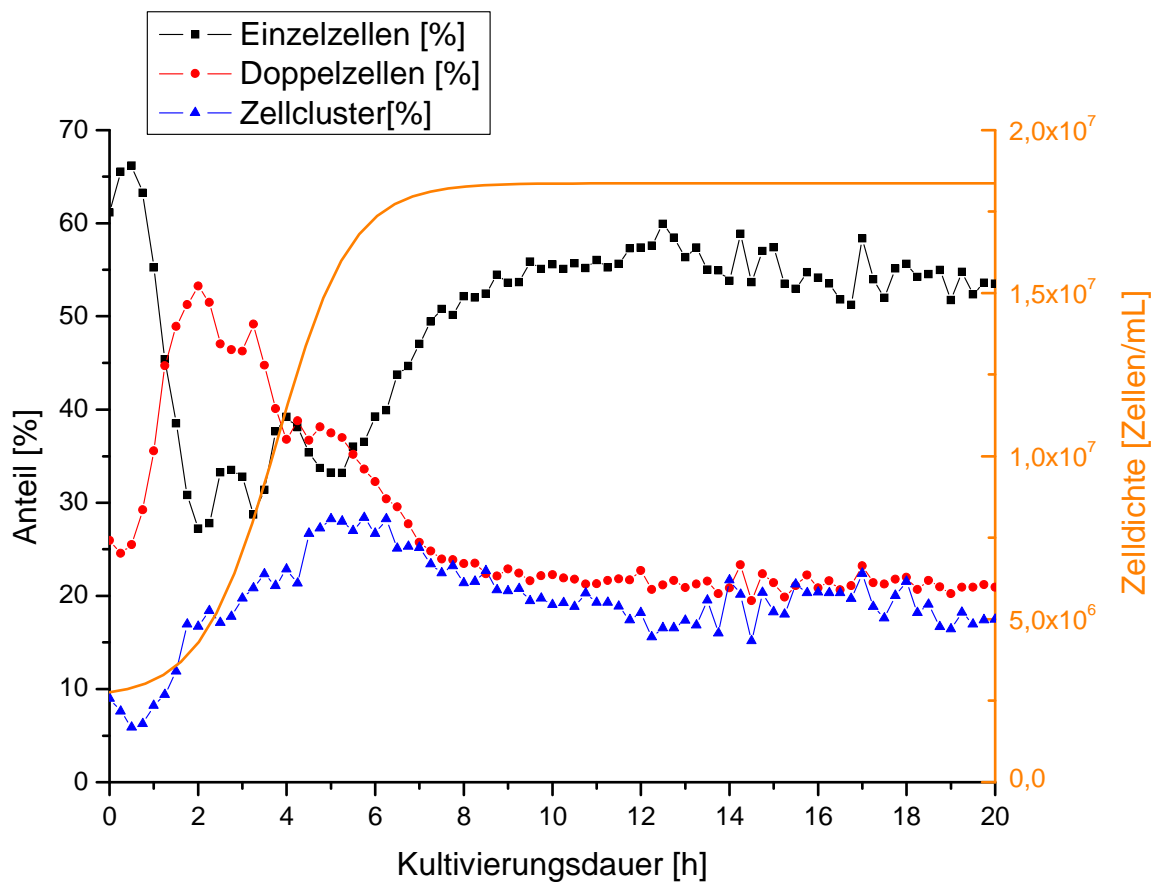


Abbildung 4.4: Beobachtung des Anteils von Einzelzellen, Doppelzellen und Zellclustern während einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Am Anfang der Kultivierung, während der lag-Phase, sind sehr viele Einfachzellen (65%) vorhanden, aber wenige Doppelzellen (25%) und sehr wenige Cluster (8%). Dies ist darauf zurückzuführen, dass hier kein Wachstum und damit auch kaum Zellteilung stattfinden. Beim Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase fällt der Anteil der Einzelzellen stark auf 25-30 % ab, während sowohl Doppelzellen, als auch Zellcluster ansteigen, was auf vermehrte Zellteilung hindeutet. Die Doppelzellen erreichen zwischen 2 - 3 h ein Maximum von 52%, daraufhin fallen sie wieder auf Kosten der Cluster, die nach 6 h ihr Maximum von 27% erreichen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass während der exponentiellen Wachstumsphase die Zellteilung so schnell erfolgt, dass vor der vollständigen Abtrennung der Tochterzellen schon der nächste Teilungszyklus eingeleitet wird (Pseudomycel, vgl. 2.4.2), was zur Clusterbildung führt. Beim Eintritt in die stationäre Phase nimmt der Anteil an Einzelzellen wieder deutlich zu und steigt auf einen konstanten Wert von 55%. Gleichzeitig sinkt der Anteil an Doppelzellen und Zellclustern jeweils auf einen konstanten Wert von 21%.

Zusammenfassung

Anhand des mit dem Multitester durchgeführten Studiums der Agglomeratbildung konnten die einzelnen Wachstumsphasen der Kultivierung anhand der Anteile von Einzelzellen, Doppelzellen und Clustern klar differenziert werden. Es ließe sich auf diesem Weg eine Analytik etablieren mit der detaillierte Informationen über den Wachstumszustand der Kultur erhalten werden könnten. Das System ist mit seiner fortschrittlichen Bildauswertung also prinzipiell auch für tiefergehende Untersuchungen von Wachstumsprozessen bei Mikroorganismen geeignet.

4.1.3. Parallele Beobachtung von 2 Kultivierungen

Eine wichtige Funktion des Multitesters besteht darin, mehrere Kultivierungen parallel zu beobachten. Hierdurch kann bei der Entwicklung und Optimierung neuer Kultivierungsprozesse der Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf den Wachstumsverlauf schnell und vollständig automatisiert untersucht werden. Als Einstieg in derartige Untersuchungen diente dabei eine Parallelkultivierung zweier Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*. Zu Testzwecken wurden dazu zwei Kultivierungen mit unterschiedlichen Animpfzellichten untersucht. Der verwendete Messaufbau findet sich in Abbildung 4.5.

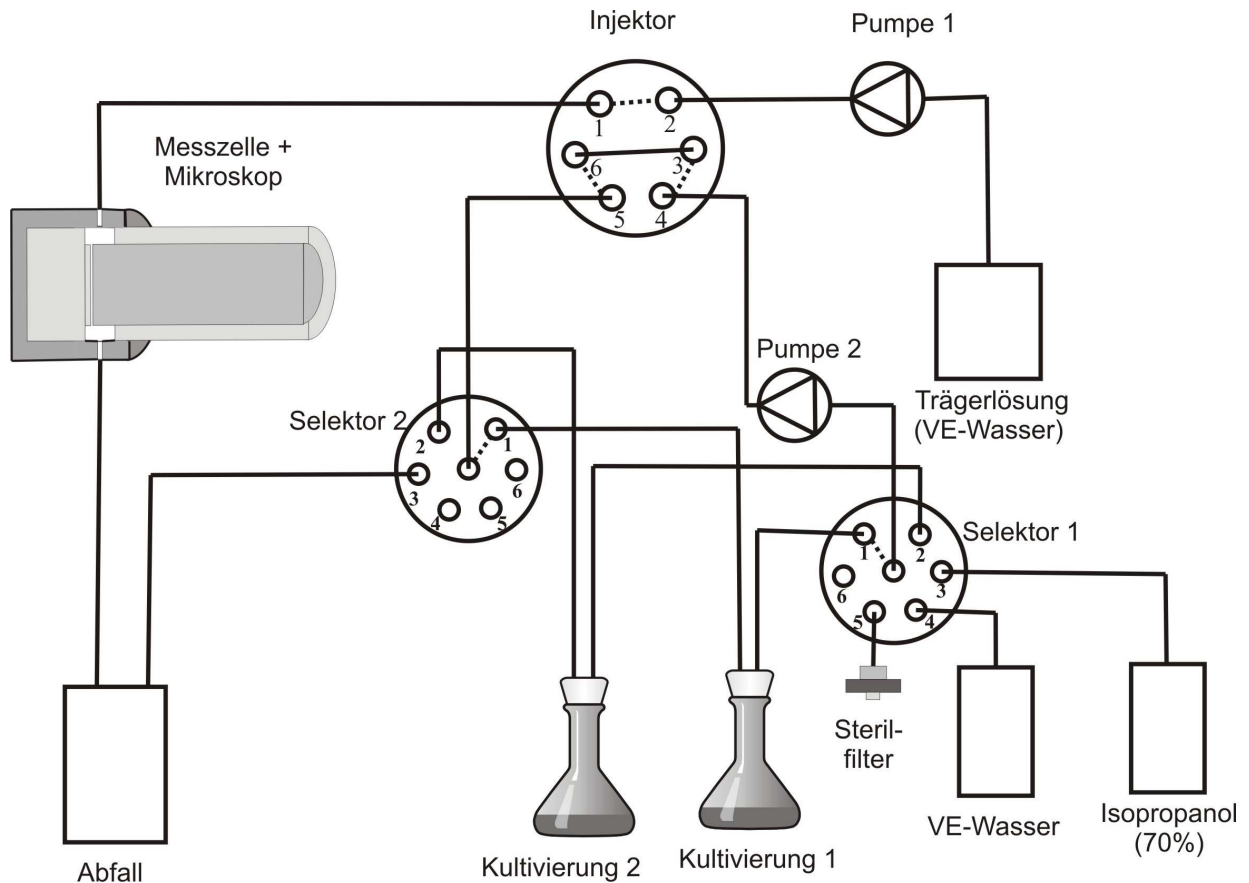


Abbildung 4.5: Messaufbau zur parallelen Untersuchung zweier Kultivierungen mit dem Multitester

Der Messaufbau ist dem in 4.1.1 dargestellten und beschriebenen sehr ähnlich, er wurde lediglich um eine zweite Kultivierung erweitert, die über Position 2 der Selektoren angeschlossen wurde. Beim Start des entsprechenden Messzyklus wurde der Injektor von Kultivierung 1 durchströmt und es erfolgte eine Injektion und Messung. Zum Sterilisieren mit Isopropanol (70%), Spülen mit VE-Wasser und Leerpumpen mit steriler Luft, wurden nacheinander die Positionen 3, 4 und 5 an Selektor 1 durchgeschaltet und alles über Position 3 an Selektor 2 verworfen. Danach erfolgte an beiden Selektoren ein Umschalten auf Position 2, so dass Kultivierung 2 analog gemessen werden konnte. Am Ende des Zyklus wurde die Probenschleife wieder mit Kultur 1 befüllt und der Zyklus neu gestartet. Die gesamte Zyklusdauer betrug 30 min, so dass Kultivierungen 1 und 2 abwechselnd in 15 min Abständen gemessen werden konnten.

Die Kultivierungen erfolgten analog zu 6.4.1 in einem Inkubator für 20 h bei 30°C und 200 rpm mit einer Glukosekonzentration von 28,6 g/L. Zu Testzwecken wurde der Einfluss der Animpfzellichte auf den Kultivierungsverlauf mithilfe des Multitesters untersucht. Dazu wurde die Kulturen mit 30 mL (Kultur 1) und 15 mL (Kultur 2) aus derselben Vorkultur angeimpft. Die resultierenden Kultivierungsverläufe sind in Abbildung 4.6 dargestellt und wichti-

ge Messgrößen wie die Animpfzelldichte, die Dauer der *lag*-Phase, die maximale Zelldichte (Endzelldichte) sowie der Vermehrungsfaktor sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Der Vermehrungsfaktor beschreibt hier die relative Zunahme der Zelldichte über den gesamten Kultivierungszeitraum und ist definiert als:

$$\text{Vermehrungsfaktor} = \frac{\text{Endzelldichte}}{\text{Animpfzelldichte}} \quad \text{Gleichung 4.1}$$

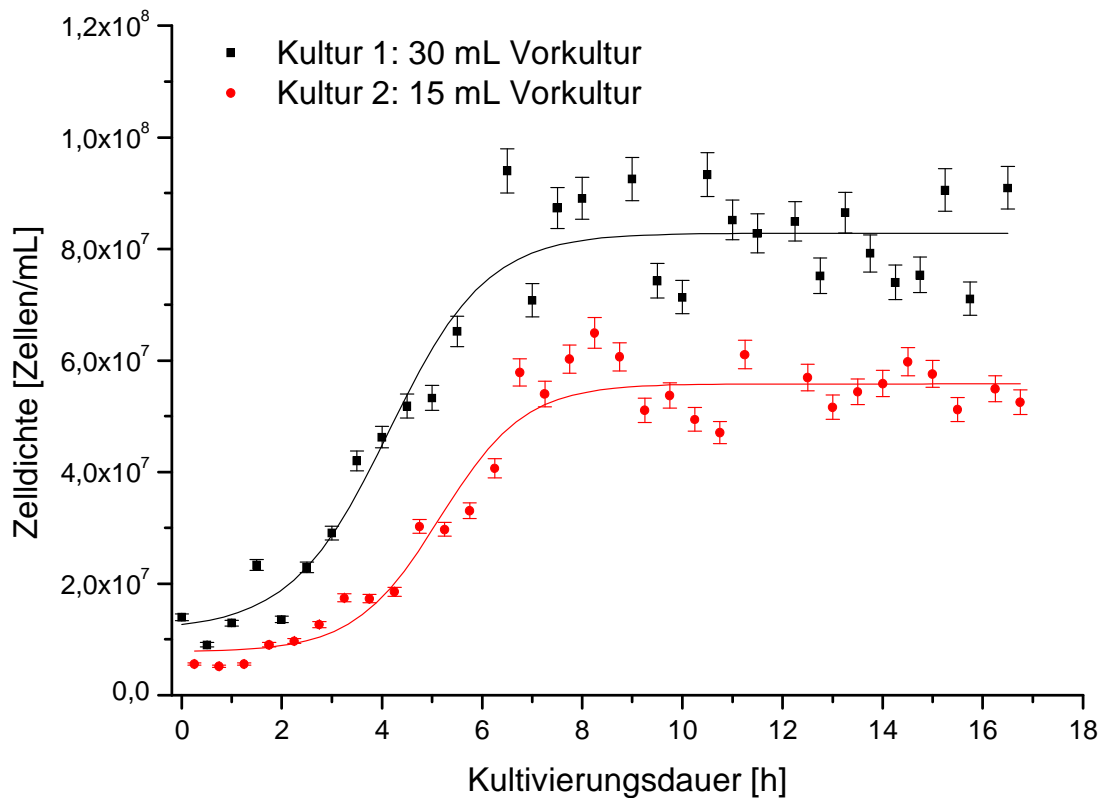


Abbildung 4.6: Beobachtung zweier paralleler Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester unter Variation der Animpfzelldichte

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der parallelen Beobachtung von 2 parallelen Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester unter Variation der Animpfzellichte

Kultur	Animpfzellichte [Zellen/mL]	Dauer lag-Phase [h]	Endzellichte [Zellen/mL]	Vermehrungsfaktor
1	$1,31 \cdot 10^7$	2	$8,29 \cdot 10^7$	6,2
2	$7,72 \cdot 10^6$	4	$5,62 \cdot 10^7$	7,4

Insgesamt ist ein deutlicher Einfluss der Animpfzellichte auf das Wachstum der beiden Kulturen zu erkennen. Kultur 1 hatte eine wesentlich kürzere lag-Phase als Kultur 2, eine höhere Zelldichte scheint also ein schnelleres Anwachsen der Zellen zu begünstigen. Die Steigungen in der exponentiellen Phase waren bei beiden Kulturen etwa gleich groß und die resultierenden Zelldichten am Maximum waren wie erwartet für Kultur 1 deutlich größer als für Kultur 2. Die relative Steigerung der Zelldichte, angegeben durch den Vermehrungsfaktor, war aber für Kultur 2 größer. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass eine Kultur mit geringerer Animpfzellichte bei gleichem Nährstoffangebot entsprechend mehr Teilungszyklen durchlaufen kann, bevor eine Limitierung auftritt und sie dadurch in eine stationäre Phase eintritt.

Zusammenfassung

Das Wachstumsverhalten von 2 parallelen Kultivierungen ließ sich mit dem Multitester erfolgreich analysieren. Es ergaben sich abhängig von den eingestellten Kultivierungsbedingungen deutlich differenzierbare Wachstumskurven. Das System ist also prinzipiell für einen Einsatz zur parallelen automatisierten Optimierung von Kultivierungsvariablen geeignet.

4.1.4. Parallele Beobachtung von 3 Kultivierungen

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob sich das verwendete Multitestersystem auch für die parallele Beobachtung von 3 Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* eignet. Dazu wurde der Messaufbau um eine weitere Kultivierung erweitert und zu Testzwecken erfolgte wiederum eine Variation der Animpfzellichten. Der schematische Versuchsaufbau für die Messungen findet sich in Abbildung 4.7.

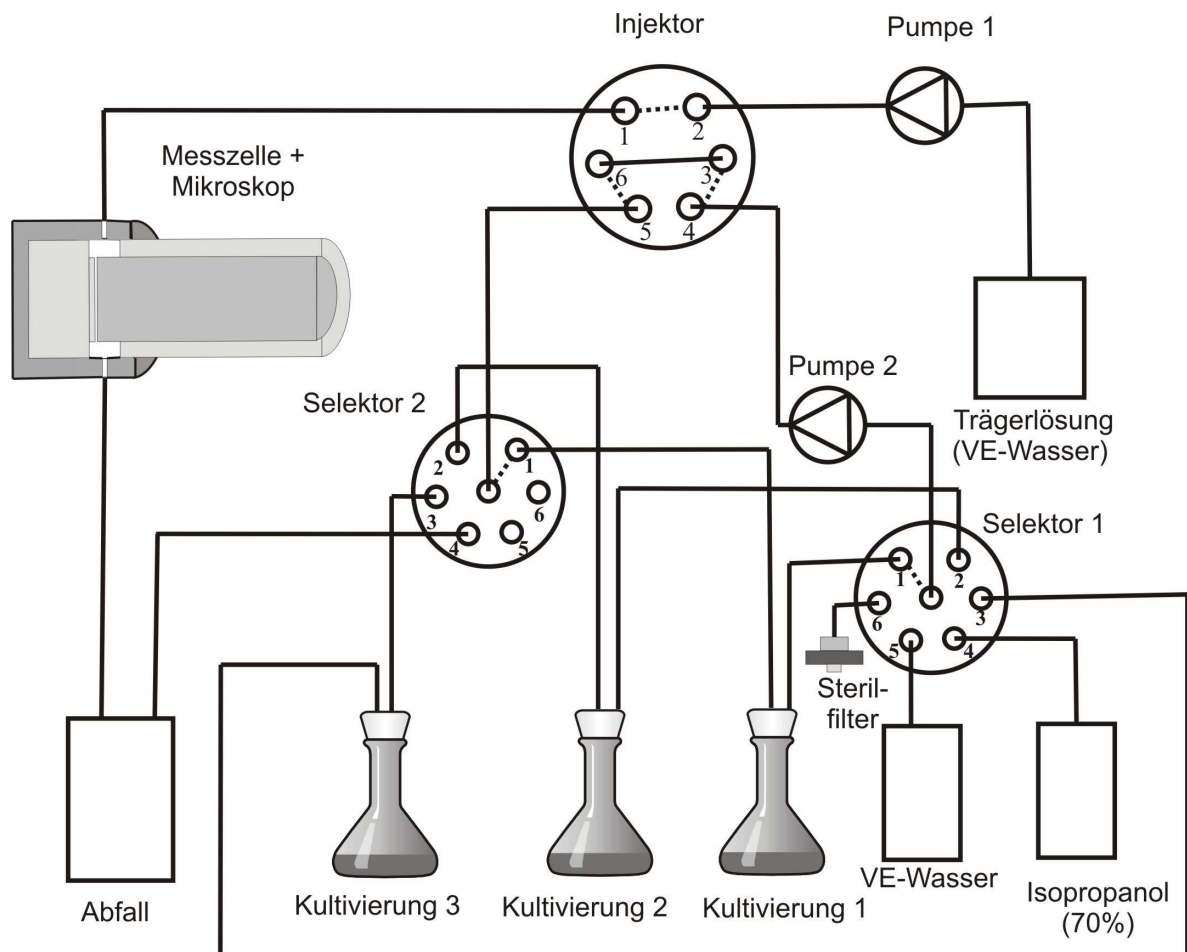


Abbildung 4.7: Messaufbau zur parallelen Untersuchung von 3 Kultivierungen mit dem Multitester

Aufbau und Messprinzip sind dem für 2 Kultivierungen in 4.1.3 sehr ähnlich, es wurden hier lediglich Positionen 1, 2 und 3 beider Selektoren genutzt, um die 3 Kultivierungen im Kreislauf zu pumpen. Während eines Messzyklus wurden nacheinander Proben aus den Kultivierungen 1, 2 und 3 gemessen und zwischen den Messungen erfolgten Sterilisation, Spülen und Leerpumpen jeweils über Positionen 4, 5 und 6 von Selektor 1 und über Position 4 an Selektor 2 wurden die Spüllösungen verworfen. Die gesamte Zykluszeit betrug 30 Minuten wobei zwischen den einzelnen Kultivierungen jeweils 10 min lagen.

Zum Testen des Systems wurden 3 Kultivierungen mit unterschiedlichen Animpfzellichten untersucht. Die Kultivierungen erfolgten wiederum analog zu 6.4.1 in einem Inkubator bei 30°C und 200 rpm über einen Zeitraum von 14 h. Dazu wurde je 30 mL (Kultur 1), 20 mL (Kultur 2) und 10 mL (Kultur 3) derselben Vorkultur zum Animpfen verwendet. Die aufgezeichneten Kultivierungsverläufe finden sich in Abbildung 4.8 und die relevanten Messgrößen der 3 Kultivierungsverläufe, die Animpfzellichten, die Dauer der lag-Phasen, die maximalen Zelldichten und die Vermehrungsfaktoren sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

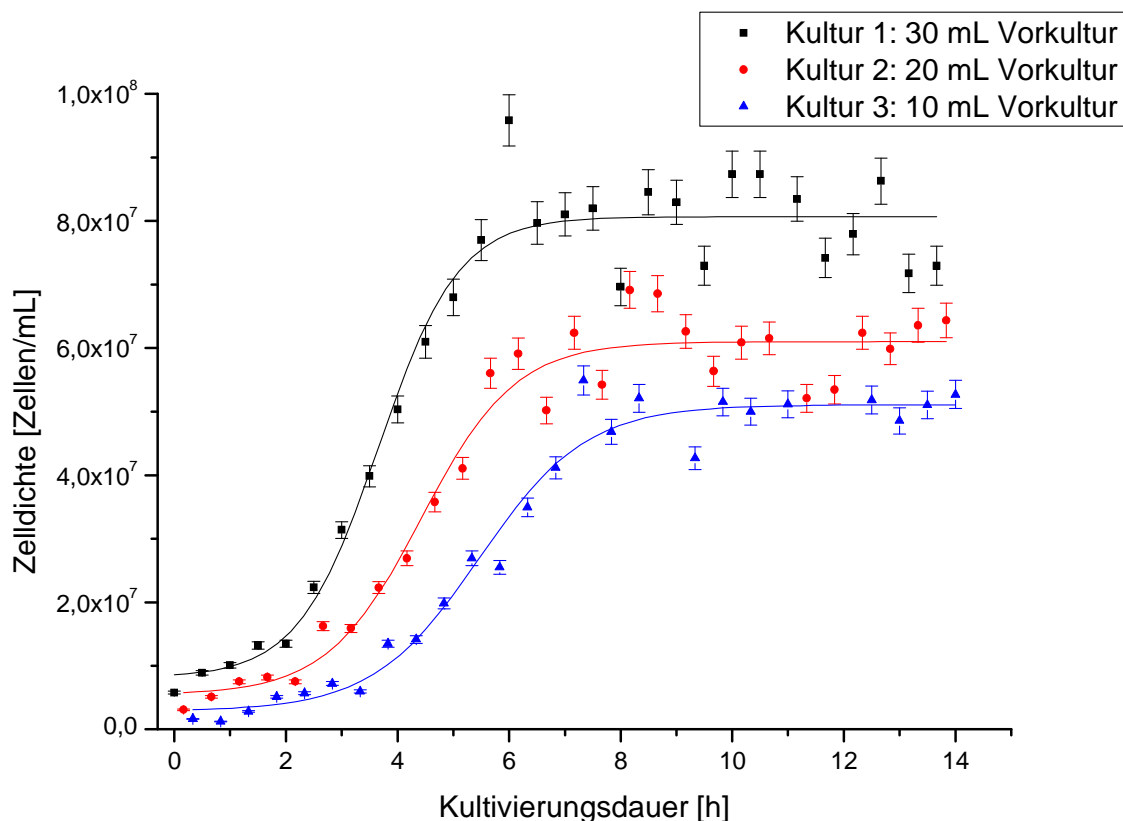


Abbildung 4.8: Beobachtung von 3 parallelen Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester unter Variation der Animpfzellichte

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der parallelen Beobachtung von 3 parallelen Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester unter Variation der Animpfzellichte

Kultur	Animpfzellichte [Zellen/mL]	Dauer lag-Phase [h]	Endzellichte [Zellen/mL]	Vermehrungsfaktor
1	$8,76 \cdot 10^6$	1,5	$8,08 \cdot 10^7$	9,2
2	$5,84 \cdot 10^6$	2,5	$6,09 \cdot 10^7$	10,4
3	$3,21 \cdot 10^6$	3,5	$5,06 \cdot 10^7$	15,8

Mit einer Zunahme der Animpfzellichte sinkt die Dauer der lag-Phasen deutlich ab und die resultierenden Zelldichten am Maximum steigen. Gleichzeitig sinkt aber der Vermehrungsfaktor der Kulturen mit Zunahme der Animpfzellichte deutlich ab. Es bestätigen sich dabei die gleichen Trends, die schon für 2 parallele Kultivierungen in 4.1.3 bei Variation der Animpfzellichte gefunden wurden. Auch eine parallele Untersuchung von 3 Kulturen von *Sac-*

charomyces cerevisiae war mit dem entwickelten Multitestersystem möglich. Auch hier ergaben sich klar differenzierbare Wachstumskurven bei Variation von Kultivierungsparametern.

Zusammenfassung

Es zeigte sich, dass das verwendete System auch beim Einsatz in komplexeren Systemen, bestehend aus 3 Kultivierungen stabil funktioniert. Es ließen sich auch hier mehrere Kultivierungen mit klar unterschiedlichen Wachstumskurven parallel beobachten. Das Potential des eingesetzten Testsystems ist mit 3 parallelen Kultivierungen ausgeschöpft, durch den Einsatz von Selektoreinheiten mit einer größeren Anzahl von Ports sollte eine Erweiterung auf mehr Kultivierungen aber problemlos möglich sein.

4.1.5. Bestimmung der Sauerstoffsättigung während der Kultivierung

Nachdem die Möglichkeiten paralleler Kultivierungen mit dem Multitester erfolgreich getestet wurden, soll in diesem Abschnitt untersucht werden, ob das System auch zur parallelen Messung mehrerer Analyten während eines Kultivierungsprozesses geeignet ist. Dazu wurde neben der Zelldichte auch die Sättigung mit gelöstem Sauerstoff mit einem auf faseroptischen Sensoren basierendem Messadapter bestimmt. Der Adapter konnte ausschließlich in Messzelle 1 eingesetzt werden und ist in 3.5.1 im Detail beschrieben. Der verwendete Messaufbau ist analog zu dem in Abbildung 4.1 dargestellten. Es erfolgte lediglich eine Sättigung des Trägerstroms mit N_2 und in die Messzelle wurde entsprechend der Adapter eingebaut. Die verwendete Testkultivierung erfolgte, wie in 6.4.1 beschrieben, in einem Inkubator bei 30°C und 200 rpm über 14 h mit einer Anfangs-Glukosekonzentration von 28,6 g/L und einer Animpfzellendichte von $5,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Eine Bestimmung der Sauerstoffsättigung erfolgte alle 0,1 s. Es wurde zunächst gewartet, bis sich eine Grundlinie eingestellt hatte und dann der Messzyklus mit Probeninjektionen in 15 min Intervallen gestartet. Die resultierenden FIA-Peaks der Sauerstoffmessung über die ersten 5 h der Kultivierung sind exemplarisch in Abbildung 4.9 dargestellt.

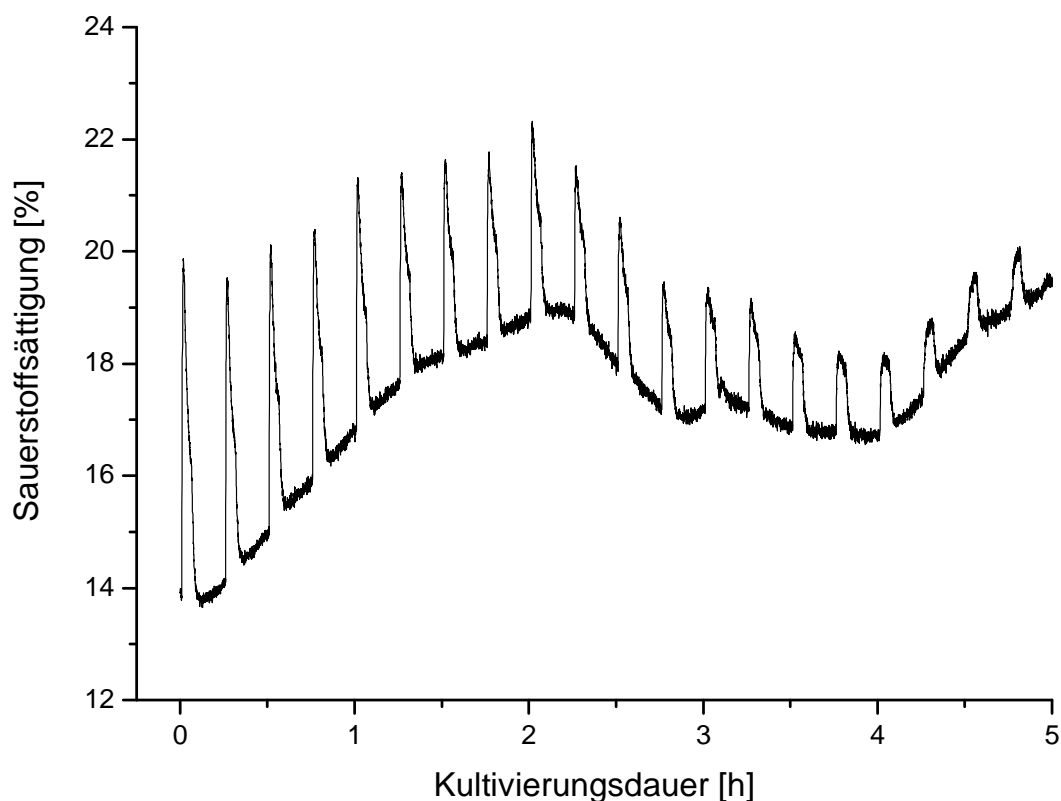


Abbildung 4.9: FIA-Peaks der Sauerstoffmessung mit dem Multitester bei einer Testkultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae*

Es lässt sich erkennen, dass die Größe der FIA-Peaks mit zunehmender Kultivierungsdauer deutlich abnimmt; der Sauerstoff wird also während der Kultivierung verbraucht. Die Quantifizierung der erhaltenen Peaks erfolgte wiederum über die Peakflächen, die durch Integration in einem Intervall von 200 Messwerten um das Peakmaximum bestimmt wurden. Die Umrechnung der resultierenden FIA-Integrale in Werte für die Sauerstoffsättigung in der Probe erfolgte über die in Abschnitt 3.5.2 erhaltenen 2-Punkt-Kalibration. Diese weist 0 % Sauerstoffsättigung einen Integralwert von 0 zu, es ist also keine Unterscheidung von der Grundlinie möglich. Für 100% Sauerstoffsättigung ergab sich entsprechend durch Injektion von mit Druckluft begastem VE-Wasser ein Integralwert von $671,6 \pm 16,5$; dies entspricht einem relativen Fehler von 2,4 %. Da während der Kultivierung nur Einfachmessungen durchgeführt wurden, wurde dieser relative Fehler für alle berechneten Werte angenommen. Es erwies sich aber als schwierig, über den gesamten Kultivierungszeitraum eine konstant mit N_2 gesättigte Trägerlösung herzustellen. Dieses zeigt sich an einem erheblichen Drift der Grundlinie, der bei der Integralbildung stets mit eingerechnet werden musste und den Fehler dieses Verfah-

rens deutlich steigerte. Dieser zusätzliche durch den Grundliniendrift bedingte Fehler wurde auf $\pm 0,25\%$ Sauerstoffsättigung abgeschätzt. Dieses entspricht in etwa dem Drift der Grundlinie während einer Injektion. Um die Vorgehensweise bei der Auswertung, zu verdeutlichen sind in Tabelle 4.4 exemplarisch für 2 Werte nach 1 h und 7 h Kultivierungsdauer, Integrale, Grundlinienkorrektur sowie Fehlerrechnung dargestellt.

Tabelle 4.4: Bestimmung der Sauerstoffsättigung und Fehler mit dem Multitester an 2 Beispielwerten während einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

	nach 1 h	nach 7 h
Integral (200 Werte) [% O ₂ -Sättigung]	3.984,3	4.338,5
Grundlinie [% O ₂ -Sättigung]	16,8	21,3
Integral nach Grundlinienkorrektur [% O ₂ -Sättigung]	624,3	70,5
Sauerstoffsättigung in der Probe [% O ₂ -Sättigung]	93,0	10,5
Fehler aus Standardabweichung [% O ₂ -Sättigung]	2,2	0,3
Fehler aus Grundlinienkorrektur [% O ₂ -Sättigung]	7,4	7,4
Gesamtfehler (absolut) [% O ₂ -Sättigung]	9,6	7,7
Gesamtfehler (relativ) [%]	10,3	73,3

Wie aus den dargestellten Beispielwerten deutlich hervorgeht, sinkt im beobachteten Bereich die Sauerstoffsättigung mit der Kultivierungsdauer. Der relative Fehler für hohe Werte der Sauerstoffsättigung in der Probe liegt mit 10,3 % in einem tolerierbaren Bereich. Durch den konstanten Fehler, der bei der Grundlinienkorrektur entsteht, ist bei der Messung kleiner Sauerstoffsättigungen aber ein relativer Fehler von 73,3 % zu beobachten, was bedeutet, dass das System für die Bestimmung geringer Sauerstoffsättigungen ungeeignet ist.

Ergänzend zu der online-Bestimmung der Sauerstoffsättigung wurde, wie in 4.1.1 beschrieben, auch die Zelldichte mit dem Multitester aufgezeichnet. Es erfolgte zudem eine manuelle Probennahme in 1 h Intervallen und es wurden daraus die Konzentrationen von Glukose und Ethanol mittels Enzymelektrode (6.4.6) und Gaschromatographie (6.4.5) bestimmt. Die Pro-

ben wurden dazu sofort nach der Entnahme durch Zentrifugation (4.000 g) von Zellen befreit, um ein Weiterwachsen und damit eine Veränderung der Probenzusammensetzung zu verhindern. Der Verlauf all dieser Werte über den Kultivierungszeitraum von 14h ist in Abbildung 4.10 gezeigt.

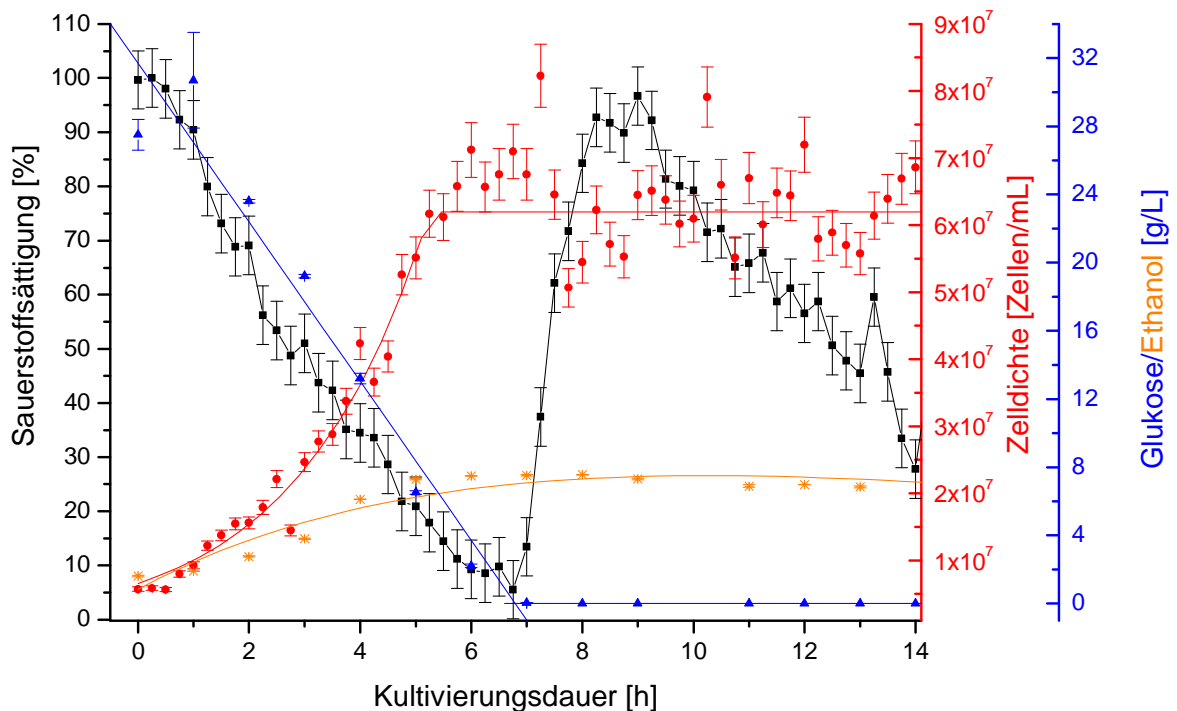


Abbildung 4.10: Simultane Beobachtung von Zelldichte und Sauerstoffsättigung mit dem Multitester sowie Glukose und Ethanol über offline-Analytik

Es zeigt sich, dass während der ersten 6 h der Kultivierung die Sauerstoffsättigung nach einer kurzen Anlaufphase von 30 min von 100% auf 0% Sauerstoffsättigung abfällt. Gleichzeitig durchläuft die Kurve der Zelldichte nach einer kurzen lag-Phase ihre exponentielle Wachstumsphase, der hohe Sauerstoffverbrauch wird also durch die intensive Zellteilung in diesem Bereich hervorgerufen. Dieses korreliert damit, dass Glukose, mit einer Startkonzentration von 28,6 g/L, als einzige C-Quelle in diesem Zeitraum vollständig aufgebraucht wird. Da während dieses Vorgangs die Sauerstoffsättigung aber absinkt, ist der Stoffwechsel der beobachteten Hefen auch partiell anaerob, was an der Zunahme des durch Fermentation gebildeten Ethanols zu sehen ist. Die Ethanolkonzentration ist nach 7 h auf ihren Maximalwert von 7,5 g/L angestiegen. Nach etwa 7 h beginnt die Sauerstoffsättigung wieder steil bis auf 100% anzusteigen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich die Zellkultur nun in ihrer stationären Phase mit reduzierter Zellteilung befindet und somit der Sauerstoffverbrauch deut-

lich kleiner ist. Der Anstieg der Sauerstoffsättigung ist auf den kontinuierlichen Sauerstoffeintrag innerhalb des Schüttelkolbens zurückzuführen. Nach etwa 9 h ist wiederum ein langsamer Abfall der Sauerstoffsättigung zu beobachten. Gleichzeitig ist in diesem Zeitraum auch eine leichte Abnahme der Ethanolkonzentration auf 5,6 g/L nach 14 h zu beobachten. Dies ist vermutlich auf den in 2.4.2 erwähnten Diauxie-Effekt zurückzuführen. Die Hefe stellt unter aeroben Bedingungen ihren Stoffwechsel um und verstoffwechselt das fermentativ produzierte Ethanol. Die Initiation einer weiteren exponentiellen Wachstumsphase, wie sie in vollständig aerob geführten Kultivierungen zu finden ist, kann jedoch nicht beobachtet werden, da die Sauerstoffmenge dafür wohl nicht ausreicht. Es ist davon auszugehen, dass basierend auf dem Diauxie-Effekt lediglich ein leichtes Wachstum der Zelldichte erfolgen kann, dass aber bei allen durchgeführten Kultivierung durch die Streuung der Messwerte bei langen Kultivierungsdauern und hohen Zelldichten überlagert wurde und somit nicht klar nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassung

Es zeigt sich, dass der Verlauf der Sauerstoffsättigung über die Kultivierung mit dem Multitester qualitativ richtig wiedergegeben werden konnte. Es besteht eine sinnvolle Korrelation mit der Zelldichte und der Glukose- und Ethanolkonzentration. Prinzipiell ist das entwickelte Multitestersystem also für die parallele Beobachtung mehrerer Analyten geeignet. Es ergaben sich aber einige Probleme, die vor allem aus der ungleichmäßigen Sauerstoffkonzentration im Trägerstrom und der damit zusammenhängenden instabilen Grundlinie resultierten. Weiterhin erwies es sich für die Genauigkeit der Methode als nachteilig, dass lediglich eine Zweipunktkalibration möglich war. Die aus diesen Problemen resultierenden konstanten Fehlerwerte sorgen dafür, dass das System für die Bestimmung niedriger Sauerstoffkonzentrationen ungeeignet ist. Es ist daher fraglich, ob eine FIA basierte Bestimmungsmethode zur Messung der Sauerstoffkonzentration am besten geeignet ist.

4.1.6. Bestimmung der Sauerstoffsättigung in einem Durchflusssystem bei einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Da die mit dem Multitester bestimmten Werte für die Sauerstoffsättigung aufgrund der hohen Fehler bei geringen Werten relativ ungenau sind, wird in diesem Abschnitt ein alternativer Messaufbau, basierend auf kontinuierlichem Durchfluss beschrieben. Dieser bietet den Vorteil erhöhter Genauigkeit, da die Sauerstoffsättigung in viel kleineren Messintervallen direkt ge-

messen werden kann, und könnte so als Referenzmethode für die Sauerstoffmessung mit dem Multitester fungieren. Hauptnachteil dieses Verfahrens ist aber, dass nur eine Kultivierung gleichzeitig überwacht werden kann.

Dazu wurde während einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* der in 3.5 beschriebene Messadapter mit dem faseroptischem Sauerstoffsensor und Messzelle 1 direkt an eine Schüttelkolbenkultivierung angeschlossen. Die Kultivierungsbrühe wurde kontinuierlich mit einem Volumenstrom von 6,1 mL/min im Kreislauf durch die Messzelle gepumpt und die Sauerstoffsättigung direkt alle 0,1 s gemessen. Zur Sterilisierung wurde die Messzelle vor ihrem Anschluss für 5 min mit 70%-igem Isopropanol gespült. Der Messaufbau findet sich in Abbildung 4.11.

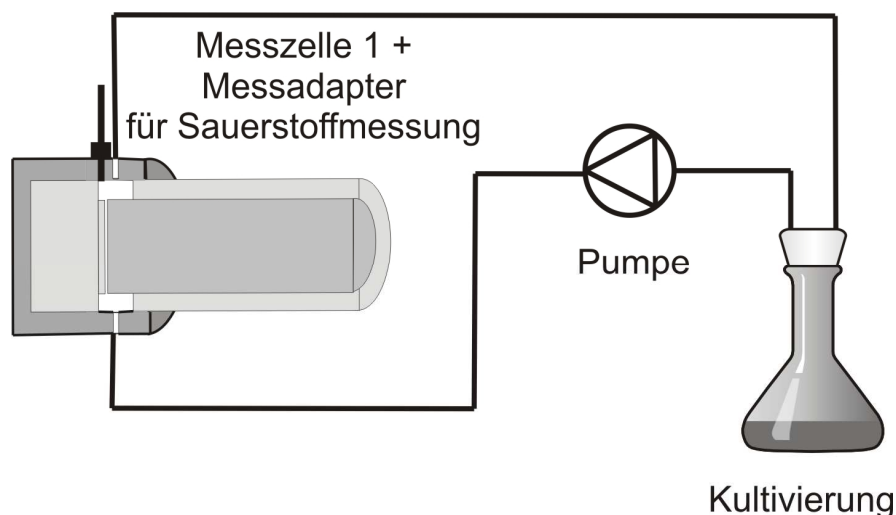


Abbildung 4.11: Bestimmung der Sauerstoffsättigung in einem Durchflusssystem bei einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung erfolgte analog zu 6.4.1 bei 30°C, 200 rpm mit einer Anfangsglukosekonzentration von 28,6 g/L und einer Animpfzelldichte von $5,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL über einen Zeitraum von 15 h in einem Inkubator. Die mit dem Sauerstoffsensor aufgezeichneten Werte der Sauerstoffsättigung sind in Abbildung 4.12 über die Kultivierungsdauer aufgetragen.

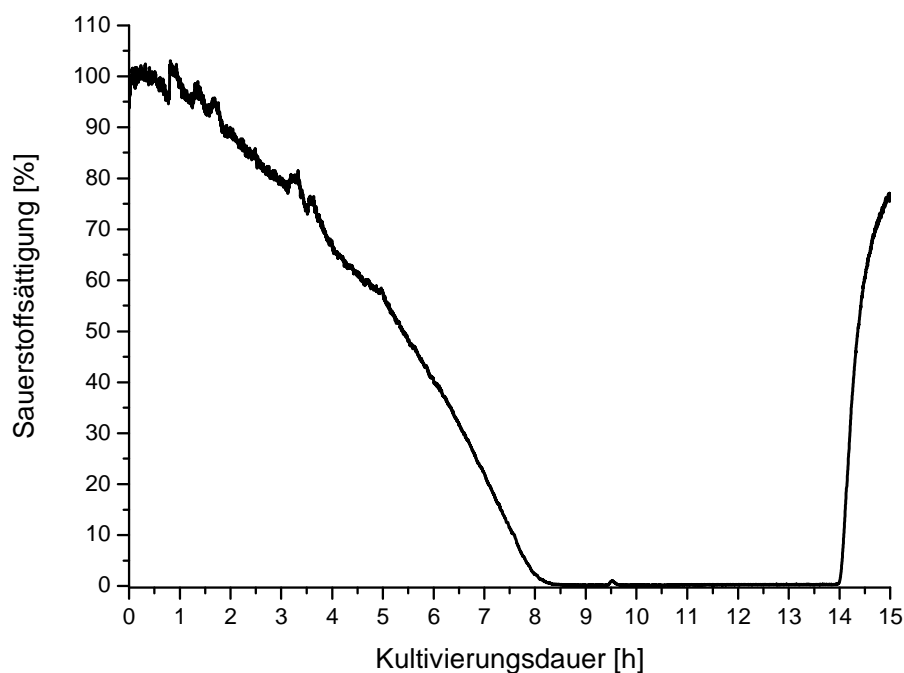


Abbildung 4.12: Sauerstoffsättigung während einer Schüttelkolbenkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* in einem Durchflusssystem

Auch in dem untersuchten Durchflusssystem ist zu beobachten, dass der gelöste Sauerstoff am Anfang der Kultivierung verbraucht wird und nach 8 h auf 0 abfällt. Es zeigt sich, dass in diesem Bereich sowohl Multitester als auch Durchflusssystem einen ähnlichen Verlauf aufzeigen. Die Abweichungen zwischen den beiden Systemen sind wohl darauf zurückzuführen, dass unterschiedliche Kulturen mit leicht abweichenden Wachstumscharakteristika untersucht wurden. In diesem Bereich werden die Ergebnisse des Multitesters also durch das Durchflusssystem bestätigt.

Ein Anstieg der Sauerstoffsättigung durch den konstanten Sauerstoffeintrag im Schüttelkolben ist in dem Durchflusssystem dagegen zunächst nicht festzustellen. Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich mit zunehmender Kultivierungsdauer vermehrt Zellen in der Messzelle absetzen und die Zelldichte dort damit deutlich größer ist als im Kolben. Entsprechend wird aller Sauerstoff verbraucht bevor er den Sensor erreichen kann. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer, bei sehr hoher Zelldichte in der Messzelle, kommt es wahrscheinlich aufgrund mangelhafter Nährstoffversorgung zu einem Absterben der Zellen, so dass nach etwa 14 h die Sauerstoffsättigung wieder ansteigt. Da also bei langen Kultivierungsdauern und hohen Zelldichten die Verhältnisse im Kolben nicht mehr richtig wiedergegeben werden

konnten, und beispielsweise ein Studium des Diauxie-Effektes nicht möglich war, erwies sich das Durchflusssystem als Referenz als weniger geeignet.

Durchflusssysteme dieser Art könnten aber durchaus für das Studium von Kultivierungen mit geringerer Zelldichte nützlich sein, da hier die Gefahr eines Anhaftens der Zellen in der Messzelle weniger groß ist; dies könnten beispielsweise Kultivierungen tierischer Zellen sein. Hier könnte das System beispielsweise auch genutzt werden, um im stopped-flow Betrieb Sauerstoffabbauraten durch Zellen aufzunehmen, was mit dem Multitester im FIA-Betrieb nicht zu realisieren ist.

4.1.7. Theoretische Berechnung des Sauerstoffeintrags in einem Schüttelkolben während einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Um die mit dem Multitester bestimmten Werte für die Sauerstoffsättigung weiter zu verifizieren, wurden theoretische Berechnungen angestellt, bei denen aus dem theoretischen Sauerstoffverbrauch der Hefe und dem Sauerstoffeintrag in dem verwendeten Schüttelkolben die Sauerstoffsättigungen berechnet wurden. Es handelt sich um ein Verfahren, bei dem über einen Zeitraum von 14 h jeweils in Berechnungsintervallen von $t = 900$ s Werte für die Sauerstoffsättigung berechnet wurden. Die Ergebniswerte der vorherigen Berechnung wurden dabei als Startwert für die nächste Rechnung verwendet. Es wurde zum Anfang der Kultivierung von einer Sauerstoffsättigung von 100% ausgegangen. Die in einem Berechnungsintervall t verbrauchte Sauerstoffmenge $n_{\text{O}_2\text{verbrauch}}$ berechnet sich nach:

$$n_{\text{O}_2\text{verbrauch}} [\text{g O}_2] = q_{\text{O}_2} \cdot t \cdot \text{Zelldichte} \cdot V \quad \text{Gleichung 4. 2}$$

Dabei steht V für das Volumen der Kultivierung, in diesem Fall 350 mL, die Zelldichte wurde aus Messungen mit dem Multitester erhalten und q_{O_2} ist die spezifische Sauerstoffaufnahme-rate. Für eine nicht wachsende Hefe findet sich in der Literatur $q_{\text{O}_2} = 15 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g Hefe}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ⁷⁹. Mit dem Wissen, dass 1 g Hefe in etwa 10^{10} Zellen (experimentell bestimmt vgl. 6.3.2) entspricht lässt sich dieser Wert umrechnen zu $q_{\text{O}_2} = 1,33 \cdot 10^{-17} \text{ g O}_2 \cdot \text{Hefezelle}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Der so erhaltene Wert wurde für die Berechnung der Sauerstoffabnahme während der lag – Phase (0 - 0,75 h) und der stationären Phase (7 – 14 h) herangezogen. Wachsende Hefezellen hingegen haben etwa einen um den Faktor 2 höheren Sauerstoffverbrauch⁸⁰, weshalb während der exponentiellen Phase (1 - 6,75 h) ein Wert von

$q_{O_2} = 2,66 \cdot 10^{-17} \text{ g O}_2 \cdot \text{Hefezelle}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ verwendet wurde. Die in einem entsprechenden Zeitintervall t eingetragene Sauerstoffmenge $n_{O_2\text{eintrag}}$ berechnet sich nach:

$$n_{O_2\text{eintrag}} [\text{g O}_2] = K_{La} \cdot t \cdot V \cdot (c_{\text{Sättigung}} - c_{\text{Lösung}})^{81} \quad \text{Gleichung 4. 3}$$

Dabei ist der K_{La} -Wert ein spezifischer Stoffübergangskoeffizient für Sauerstoff, gelöst in Wasser. Er ist sehr stark von der Austauschfläche zwischen Flüssig- und Gasphase abhängig und muss zumeist experimentell bestimmt werden. In der Literatur wurde für einen in diesen Experimenten verwendeten Schüttelkolben mit Schikanen bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 rpm ein Wert von $K_{La} = 0,076 \text{ s}^{-1}$ ⁸² gefunden. Weiterhin hängt der Sauerstoffeintrag sehr stark vom Konzentrationsgradienten des Sauerstoffs in der Lösung ab. Dieser setzt sich aus der Sättigungskonzentration von Sauerstoff in Wasser (dies sind für 30°C $c_{\text{Sättigung}} = 7,55 \cdot 10^{-3} \text{ g/L}$ ⁸³) und der tatsächlichen Konzentration $c_{\text{Lösung}}$ in der Lösung zusammen. Diese Konzentration $c_{\text{Lösung}}$ ist ohne Messung eigentlich nicht zugänglich. Deshalb wurde als Näherungsrechnung zunächst der Sauerstoffverbrauch $n_{O_2\text{verbrauch}}$ im Intervall t berechnet und daraus die Konzentration $c_{\text{Lösung}}$ unter der Voraussetzung bestimmt, dass Sauerstoffabbau und Sauerstoffeintrag unabhängige Vorgänge sind, die hintereinander ablaufen. Der Wert für $c_{\text{Lösung}}$ berechnet sich damit nach:

$$c_{\text{Lösung}} = \frac{n_{O_2\text{start}} - n_{O_2\text{verbrauch}}}{V} \quad \text{Gleichung 4. 4}$$

Dabei ist $n_{O_2\text{start}}$ die am Anfang des jeweiligen Intervalls vorhandene Sauerstoffmenge und $V = 0,35 \text{ L}$ das Volumen der Kultivierung. Aus dieser Näherungsrechnung ergibt sich immer ein zu hoher Wert für $n_{O_2\text{eintrag}}$, da stets der maximale Konzentrationsgradient angenommen wurde, dieser Fehler wurde aber bei diesem Modell toleriert. Die endgültige Sauerstoffkonzentration c_{gesamt} für das jeweilige Intervall berechnet sich damit nach:

$$c_{\text{gesamt}} = \frac{n_{O_2\text{start}} - n_{O_2\text{verbrauch}} + n_{O_2\text{eintrag}}}{V} \quad \text{Gleichung 4. 5}$$

Die Sauerstoffsättigung in [%] für das jeweilige Intervall berechnet sich dann entsprechend nach:

$$\text{Sauerstoffsättigung} = \frac{C_{\text{gesamt}}}{C_{\text{Sättigung}}} \cdot 100$$

Gleichung 4. 6

Die durch diese Rechnung erhaltenen theoretischen Werte sind in Abbildung 4.13 den experimentell mit dem Multitester erhaltenen Werten gegenübergestellt.

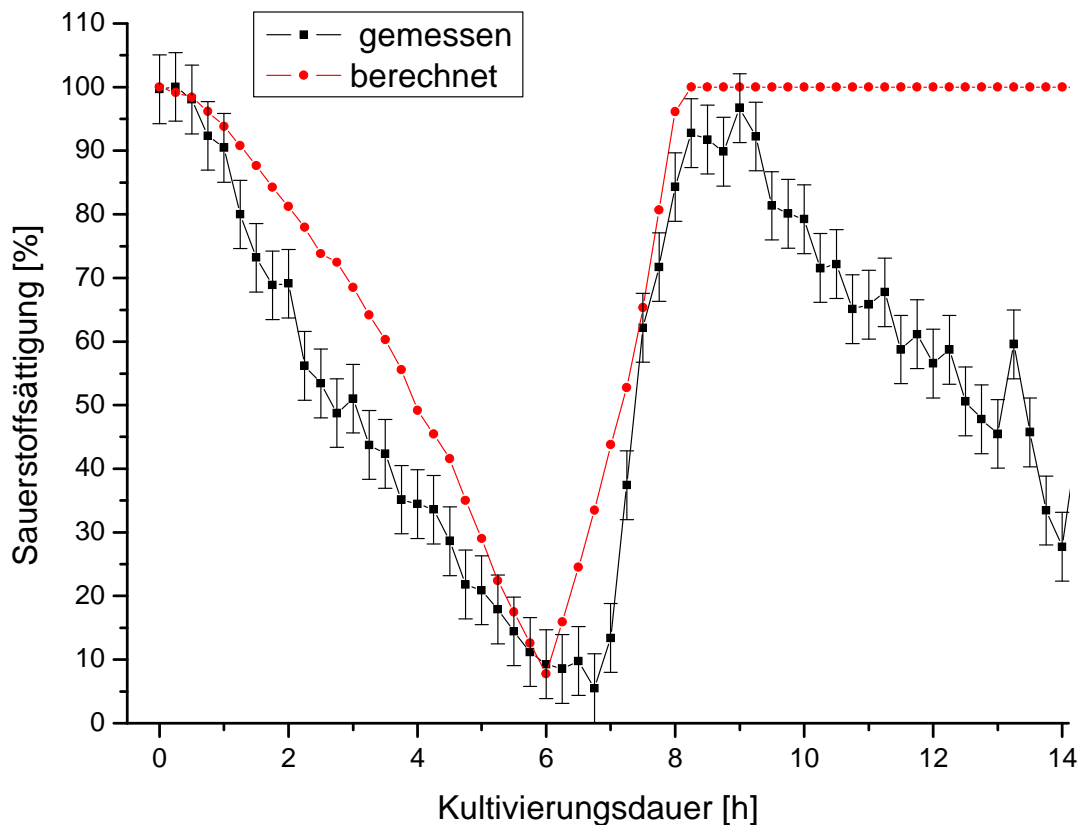


Abbildung 4.13: Gegenüberstellung der Sauerstoffsättigungen aus theoretischen Berechnungen und Messungen mit dem Multitester

Es zeigt sich, dass in den ersten 8 h der Kultivierung die gemessenen Werte sehr gut mit den theoretisch berechneten übereinstimmen. Dabei erfolgt der Abfall der Sauerstoffkonzentration beim Eintritt in die exponentielle Phase bei den gemessenen Werten deutlich schneller. Dafür erfolgt der Anstieg der theoretischen Werte beim Eintritt in die stationäre Phase schneller als bei den experimentellen Werten. Beide Phänomene sind wahrscheinlich auf die erwähnten Fehler im verwendeten Modell zurückzuführen. Da der theoretisch berechnete Sauerstoffeintrag deutlich höher ist als in der Realität, fällt die Sauerstoffsättigung bei den theoretischen Werten entsprechend nicht so schnell ab und steigt auch schneller wieder an. Der Bereich ab einer Kultivierungsdauer von 9 h kann durch die theoretischen Werte nicht richtig wiederge-

geben werden. Die Stoffwechsellage der Hefen auf Ethanol als Nahrungsquelle konnte nicht berechnet werden, da q_{O_2} -Werte für auf Ethanol wachsende Hefen in der Literatur nicht zu finden sind.

Zusammenfassung

Eine Durchflussmessung als Referenzmethode zeigte in den ersten 7 h der Kultivierung eine gute Übereinstimmung mit den Multitesterwerten. Für längere Kultivierungsdauern erwies sie sich hingegen als ungeeignet, weshalb zusätzlich theoretische Berechnungen des Sauerstoffverlaufes durchgeführt wurden. Trotz einigen groben Näherungen und Annahmen im verwendeten Modell zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen theoretisch berechneten und experimentell bestimmten Werten während der ersten 8 h der Kultivierung. Dies zeigt, dass der Verlauf der Sauerstoffsättigung während einer Testkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester auch quantitativ korrekt bestimmt werden konnte.

4.2. Zellkultivierungen mit *Bacillus megaterium*

Nach intensivem Studium von *Saccharomyces cerevisiae* als Beispielorganismus soll in diesem Abschnitt untersucht werden, ob das Multitestersystem auch zur Beobachtung anderer Organismen geeignet ist. Dazu wurden erste Untersuchungen mit einem Produktionsstamm von *Bacillus megaterium* durchgeführt. Dieser Organismus wurde ausgewählt, weil er leicht zu kultivieren, biotechnologisch bedeutsam und aufgrund seiner Größe sehr gut für lichtmikroskopische Untersuchungen geeignet ist (vgl. 2.4.3). Seine Größe liegt zudem mit einer Breite von 1,5 μm und einer Länge von 4 μm im Bereich von *Saccharomyces cerevisiae* ($d = 3\text{--}8 \mu\text{m}$) so dass prinzipiell sämtliche Einstellungen des Multitesters, die auf einer Optimierung mit *Saccharomyces cerevisiae* basieren (vgl. 3.4) auch für *Bacillus megaterium* übernommen werden konnten.

4.2.1. *Bacillus megaterium* pMM1525

Für die Testkultivierungen mit *Bacillus megaterium* wurde ein Produktionsstamm (MS 941, pRBBm15, PxylA-SPlipA-lev773His) eingesetzt, der von Prof. Dr. Dieter Jahn (Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurde. Er wird in biotechnologischen Prozessen zur extrazellulären Produktion des Enzyms Levansucrase

eingesetzt und enthält das Levansucrasegen von *Lactobacillus reuteri* und das Plasmid pMM 1525, das die Xylose basierte Produktion und Sekretion von Proteinen in *Bacillus megaterium* ermöglicht. Der Stamm enthält als Selektionsmarker zusätzlich eine Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin. Für nähere Informationen zu dem Stamm sei auf die entsprechende Literatur verwiesen⁶⁷.

4.2.2. Testkultivierungen und Auswertungen mit dem Multitester für *Bacillus megaterium*

Die Kultivierungen von *Bacillus megaterium* erfolgten in einem Schüttelkolben in 350 mL LB-Medium (vgl. 6.3.5) in einem Inkubator bei 37 °C und 200 rpm über einen Zeitraum von 7 h, wobei mit einer Gefrierkultur angeimpft wurde. Eine genaue Kultivierungsvorschrift findet sich im Anhang (6.4.3).

Der Versuchsaufbau für die Messungen mit dem Multitester ist analog zu dem in Abbildung 4.1 dargestellten und auch das Messverfahren entspricht dem für *Saccharomyces cerevisiae*, wie es in 4.1.1 beschrieben ist. Es wurde aber bei allen Messungen ausschließlich Messzelle 2 eingesetzt. Die Einstellungen am Multitester waren eine Messzonenhöhe von 125 µm, ein Volumenstrom von $\dot{V} = 6,1$ mL/min und ein Injektionsvolumen von 500 µL, wie sie sich aus dem Optimierungsprozess in 3.4 ergaben.

Zur Auswertung der mit dem Mikroskop aufgenommenen Bilder stand kein spezieller Bildanalysealgorithmus für *Bacillus megaterium* zur Verfügung, weshalb auch hier der DYCC (vgl. 3.1.3) herangezogen wurde. Als Bezugsgröße wurde hier die Gesamtzahl der detektierten Objekte verwendet. Dies ist mit einem deutlich größeren Fehler verbunden, da mögliche Verunreinigungen und Luftblasen mitgezählt werden; dieser Fehler wurde aber für die hier beschriebenen ersten Testversuche toleriert. In Abbildung 4.14 sind typische mit dem Multitester aufgenommene Bilder nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer dargestellt.

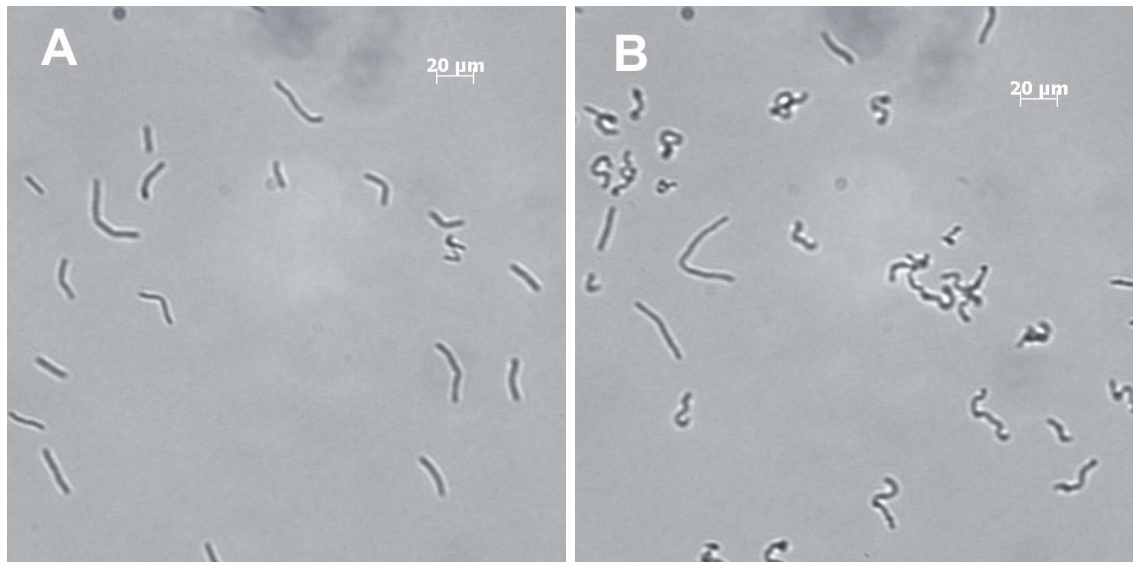


Abbildung 4.14: Beispielbilder von *Bacillus megaterium* aufgenommen mit dem Multitester nach A) 3 h und B) 7h Kultivierungsdauer

Am Anfang der Kultivierung ist die stäbchenförmige Struktur der Bakterien klar zu erkennen und die Zellen lassen sich über die Objektdetektion klar registrieren. Nach einer Kultivierungsdauer von 7 h sind vermehrt Zellen mit gekrümmter Struktur vorhanden, dies könnten tote Zellen sein. Sie sind über die Objekterkennung des DYCC schwerer zu erfassen und neigen in diesem Zustand vermehrt zu Agglomeratbildung. Diese Agglomerate tendierten zum Verstopfen der Messzone, weswegen eine Kultivierungsdauer über 7 h keine sinnvollen Ergebnisse erbrachte. Es zeigt sich, dass auch für *Bacillus megaterium* Morphologieuntersuchungen der Zellen mit dem Multitester möglich sind. Mit einem geeigneten Auswertalgorithmus ließe sich damit möglicherweise ein System zur Unterscheidung von lebenden (stäbchenförmigen) und toten (gekrümmten) Zellen etablieren, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt werden konnte.

Ein typischer FIA-Peak für *Bacillus megaterium*, aufgenommen nach einer Kultivierungsdauer von 3 h, bei einer durch offline-Bestimmung mit einer Neubauer-Kammer ermittelten Zelldichte von $6 \cdot 10^6$ Zellen/mL ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Die analog zu 3.4.1 durchgeführte Auswertung der Peaks durch eine Bestimmung der Peakflächen mittels Integration ergab ein Integralwert von 70 Objekten.

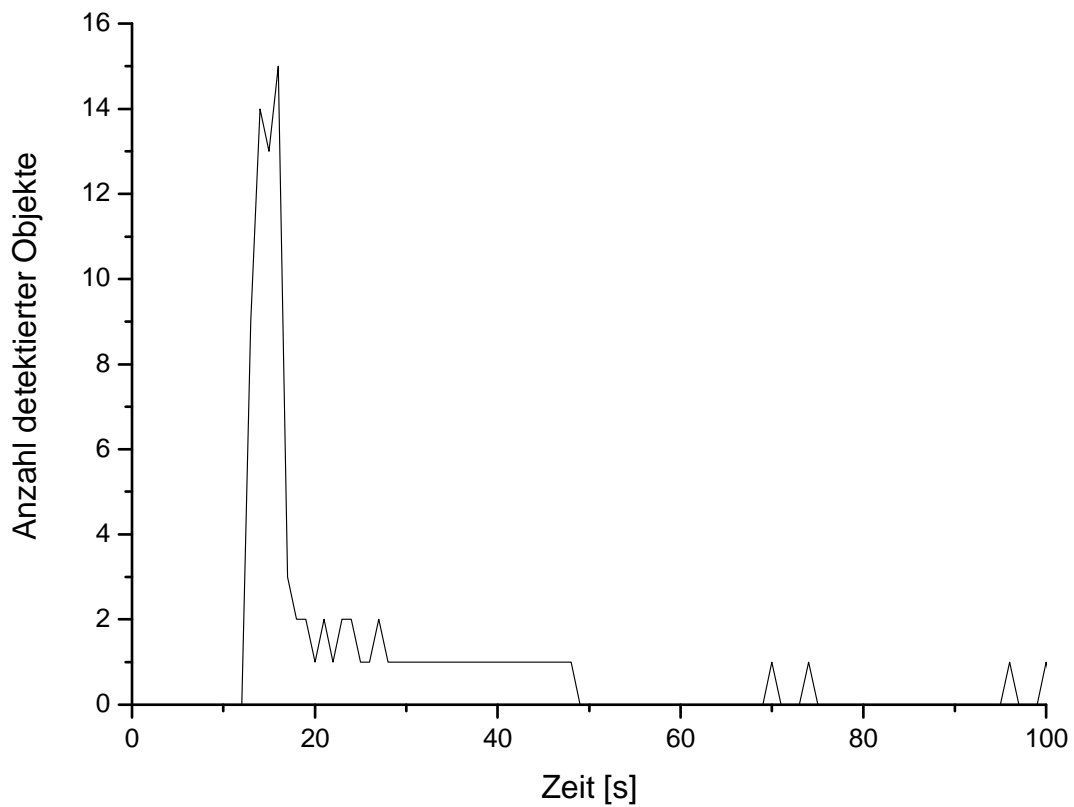


Abbildung 4.15: FIA-Peak für *Bacillus megaterium* aufgenommen nach einer Kultivierungsdauer von 3 h und einer Zelldichte von $6 \cdot 10^6$ Zellen/mL

Die für eine Beispielkultivierung über die gesamte Kultivierungsdauer von 7 h mit dem Multitester gemessenen Integralwerte finden sich in Abbildung 4.16. Dabei wurde mit einer durch offline-Zählung bestimmten Animpfzelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/mL gearbeitet, während die Endzelldichte nach 7 h $1 \cdot 10^7$ Zellen/mL betrug.

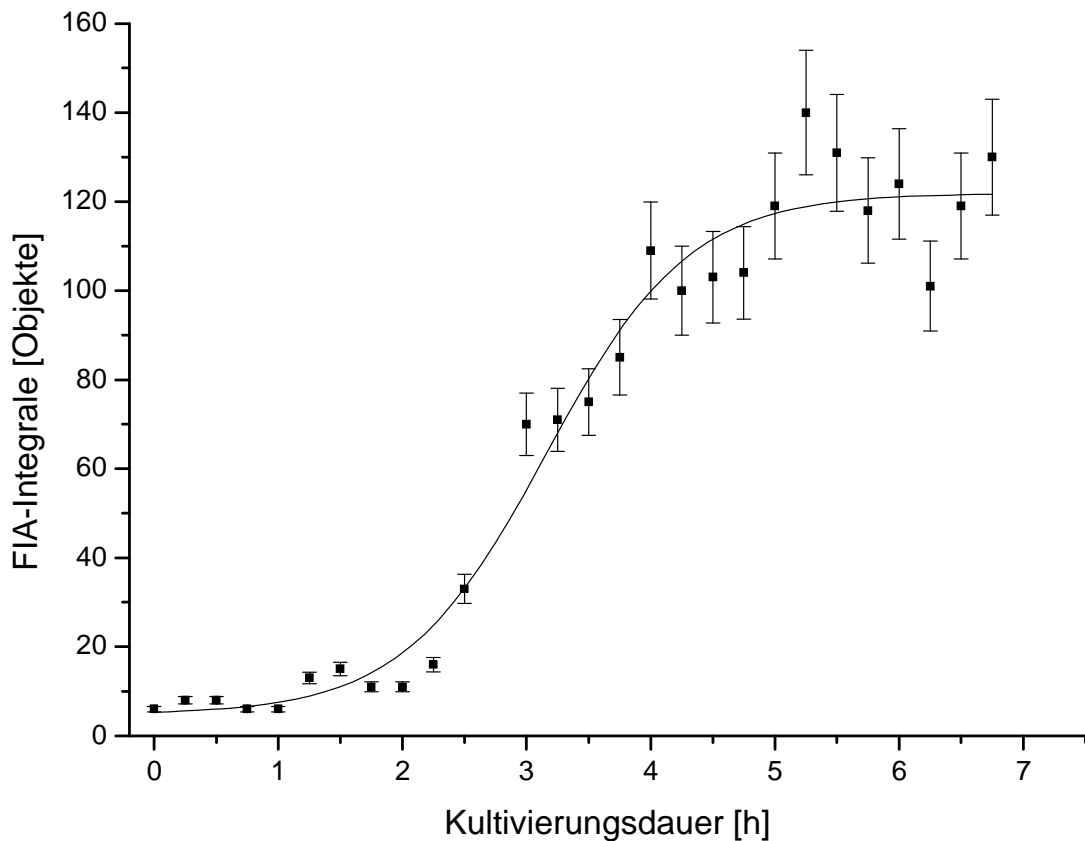


Abbildung 4.16: FIA-Integrale für *Bacillus megaterium*, aufgenommen über einen Kultivierungsdauer von 7 h

Es zeigt sich, dass für die Kultivierung von *Bacillus megaterium* eine typische sigmoide Wachstumskurve aufgezeichnet werden konnte. Es ergab sich eine *lag*-Phase von 0 - 2 h, daran schloss sich eine exponentielle Wachstumsphase an, die nach etwa 5 h Kultivierungsdauer in eine stationäre Phase überging. Da während der Kultivierung jeder Wert nur einfach gemessen wurde, wurden zur Kalkulation der Messfehler jeweils die Integralwerte in der stationären Phase (5 - 7 h) verglichen, da die Zelldichte dort einen konstanten Wert aufweist. Es ergab sich ein Durchschnittswert von $123,3 \pm 12,4$ Objekten und somit ein relativer Fehler von 10 %. Dieser wurde für alle weiteren Messungen angenommen. Der Fehler ist somit deutlich größer als für *Saccharomyces cerevisiae*, hier wurden für Messzelle 2 nur 4,2 % ermittelt (vgl. 3.4.1). Der wesentlich größere Fehler für *Bacillus megaterium* ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass lediglich Objekte mit dem DYCC gezählt wurden und somit Luftblasen und Verunreinigungen wie Zellen detektiert und bei der Berechnung der Integrale mitgezählt wurden.

4.2.3. Kalibration des Multitesters mit *Bacillus megaterium*

Um den über die Kultivierungsdauer aufgezeichneten Integralwerten entsprechende Zelldichten zuzuordnen wurde eine Kalibration durchgeführt. Dazu wurden 3 Testkultivierungen mit Animpfzellichten von $4,5 \cdot 10^5$, $4,8 \cdot 10^5$ und $5,6 \cdot 10^5$ Zellen/mL mit dem Multitester gemessen und jeweils in 30 min Intervallen offline-Proben gezogen und diese mit einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die erhaltenen FIA-Integrale wurden dann gegen die eingesetzte Zelldichte aufgetragen. Die resultierende Kalibrationsgerade ist in Abbildung 4.17 dargestellt.

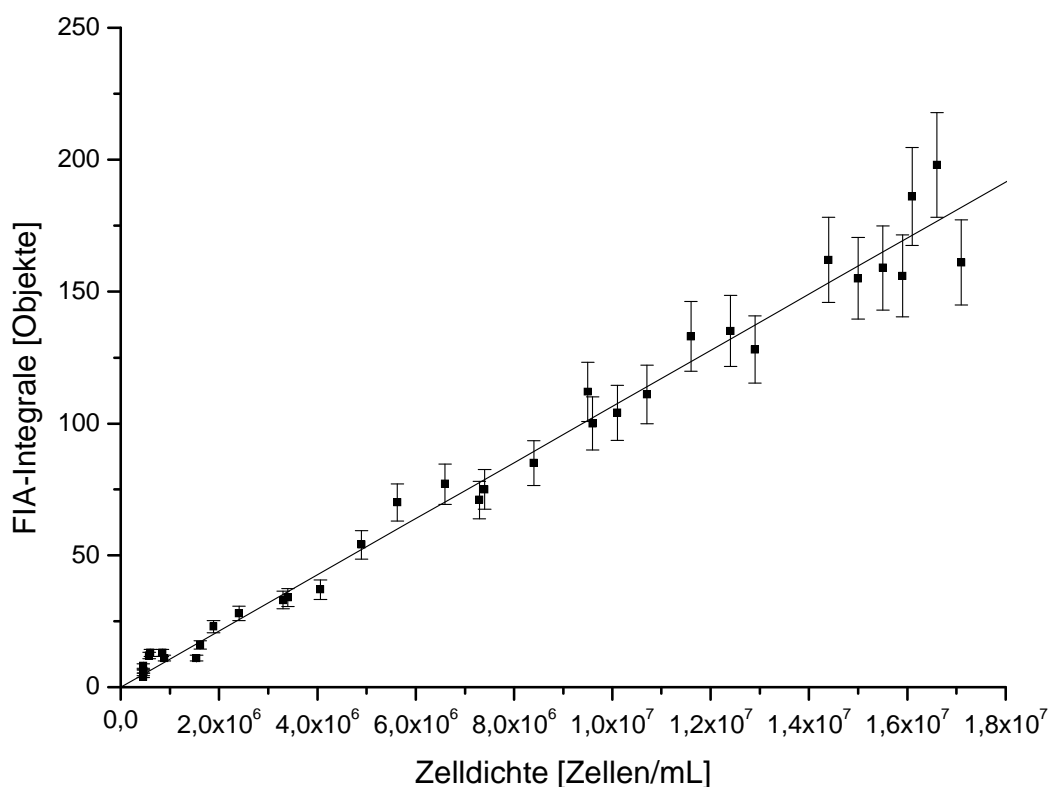


Abbildung 4.17: Kalibrationsgerade für *Bacillus megaterium*

Es ist eine gute lineare Korrelation zwischen der Zelldichte und den FIA-Integralen zu erkennen. Es errechnet sich eine Steigung von $A = 1,06 \cdot 10^{-5}$ Objekte \cdot mL \cdot Zellen⁻¹ ($Y = A \cdot X$) und ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9916$. Der Messbereich ist hier durch das Wachstum der entsprechenden Testkultivierungen limitiert und liegt zwischen $4,5 \cdot 10^5$ Zellen/mL und $1,7 \cdot 10^7$ Zellen/mL. Die Wiederfindungsrate liegt mit 0,0011 % auf einem ähnlich schlechten Niveau wie sie für eine Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* mit Messzelle 2 gefunden wurde (vgl.3.4.4).

Um die so erhaltene Kalibration zu testen, wurde eine weitere Testkultivierung mit dem Multitester analysiert, die resultierenden FIA-Integrale über die Kalibrationsgerade in Zelldichte umgerechnet und diese dann mit für die Kultivierung gemessenen offline-Werten verglichen. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 4.18.

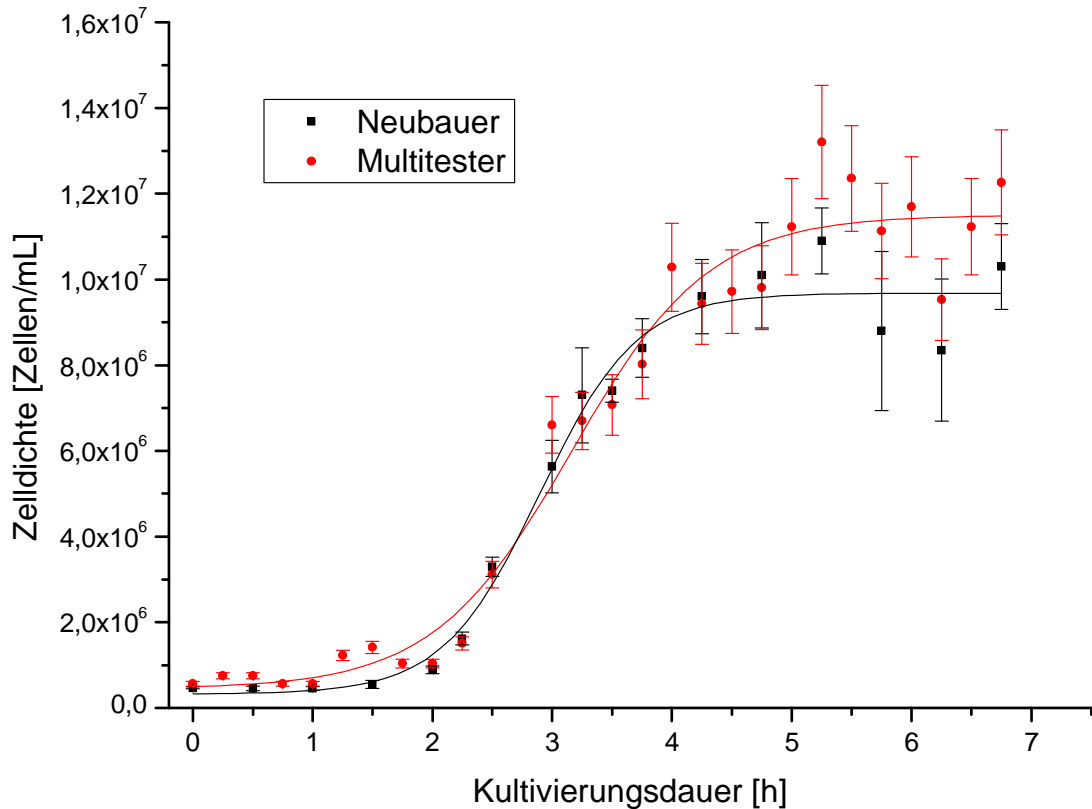


Abbildung 4.18: Beobachtung einer Kultivierung von *Bacillus megaterium* mit dem Multitester und durch Handzählung mit einer Neubauer-Kammer.

Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den mit dem Multitester bestimmten und den offline-Werten. Die erstellte Kalibration ist also geeignet, um die FIA-Integrale einer unbekannt Kultivierung korrekt in Zelldichte umzurechnen.

Zusammenfassung

An den in diesem Abschnitt durchgeführten ersten Testversuchen mit *Bacillus megaterium* zeigt sich, dass der Multitester neben *Saccharomyces cerevisiae* auch erfolgreich für die Untersuchung anderer Mikroorganismen verwendet werden kann. Trotz des für diesen Zelltyp nicht ausgelegten Bildauswertungsalgorithmus konnte auch mit der Objektdetektion des

DYCC der Kultivierungsverlauf richtig wiedergegeben und über eine geeignete Kalibration quantifiziert werden. Es zeigt sich zudem, dass die erhaltenen Bilder von *Bacillus megaterium* prinzipiell auch eine Morphologieanalyse und möglicherweise eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ermöglichen. Um dieses näher zu studieren, müsste aber ein für diesen Zelltyp optimierter Auswertalgorithmus entwickelt werden.

4.3. Parallele Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacillus megaterium*

Um das Potential des entwickelten Multitesters weiter zu testen, wurde in diesem Abschnitt untersucht, ob sich das System prinzipiell auch zur parallelen Untersuchung unterschiedlicher Organismen eignet. Dazu wurde als erster Test eine Parallelkultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacillus megaterium* durchgeführt und mit dem Multitester beobachtet.

Der verwendete Messaufbau ist analog zu dem in Abbildung 4.5 und auch das Messverfahren entspricht dem für zwei parallele Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae*, wie es in Abschnitt 4.1.3 im Detail beschrieben ist. Die Kultivierung beider Organismen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 200 rpm über einen Zeitraum von 8 h. Detailliertere Kultivierungsvorschriften für die jeweiligen Organismen finden sich in 6.4.1 und 6.4.3. Die resultierenden Kultivierungsverläufe sind in Abbildung 4.19 dargestellt.

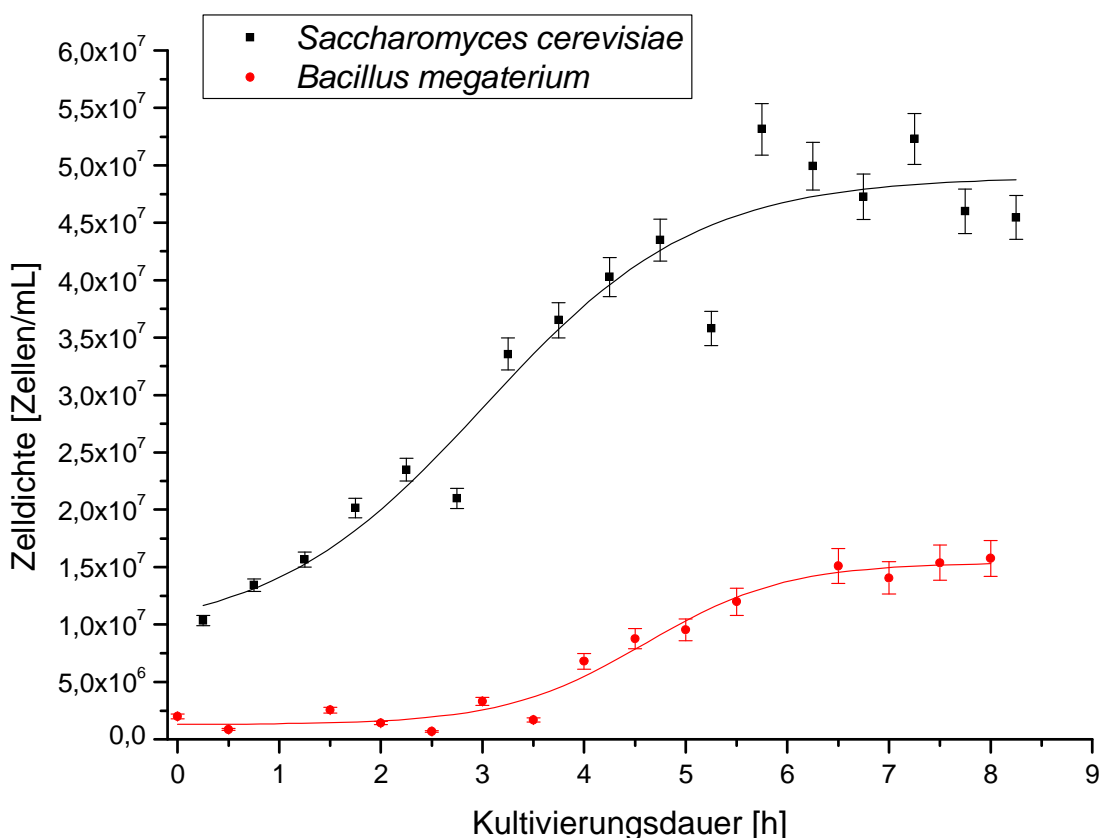


Abbildung 4.19: Kultivierungsverläufe bei paralleler Untersuchung von *Bacillus megaterium* und *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester.

Für beide Kultivierungen zeigte sich wie erwartet ein typischer sigmoider Wachstumsverlauf. Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein sehr schnelles Anwachsen der Kultur ohne eine lag-Phase beobachtet. Dies war wahrscheinlich sowohl auf die relativ hohen Animpfzellichte von $1,3 \cdot 10^7$ Zellen/mL als auch auf die im Vergleich zu 4.1 deutlich erhöhte Kultivierungstemperatur zurückzuführen. Es wurde eine exponentielle Wachstumsphase beobachtet, die nach etwa 6 h in eine stationäre Phase mit einer resultierenden Zelldichte von $4,8 \cdot 10^8$ Zellen/mL übergang. Für *Bacillus megaterium* war bei einer Animpfzellichte von $1,4 \cdot 10^6$ eine relativ lange lag-Phase von 3,5 h zu beobachten. Daran schloss sich auch hier eine exponentielle Wachstumsphase an, die nach 6,5 h in eine stationäre Phase mit einer Endzellichte von $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/mL übergang. Eine Untersuchung der Kreuzkontamination durch beide Organismen erfolgte visuell durch Beispielbilder vom Ende der jeweiligen Kultivierung, die in Abbildung 4.20 gezeigt sind. Es konnte dabei keine Kreuzkontamination nachgewiesen werden.

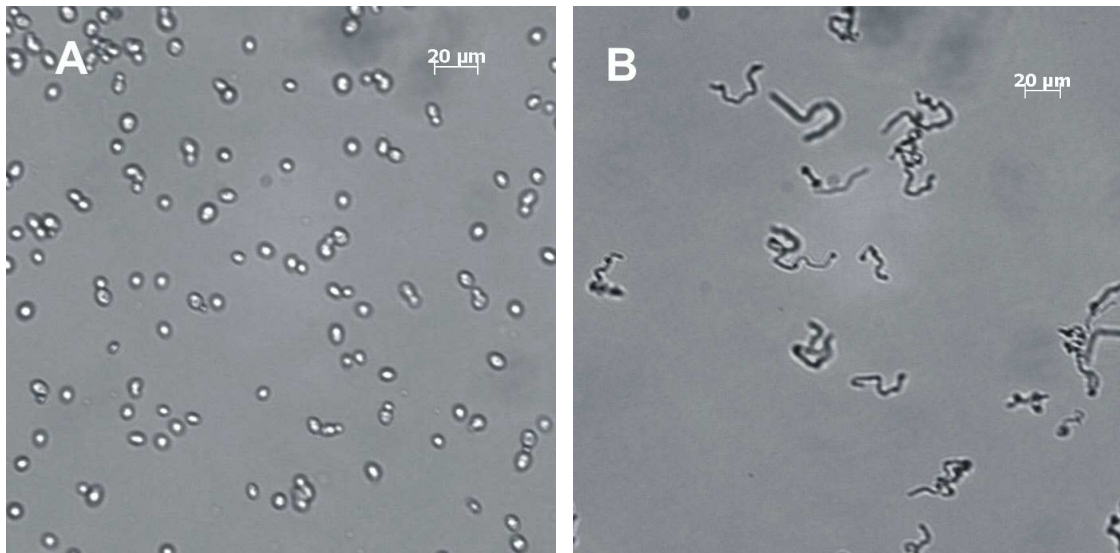


Abbildung 4.20: Beispielbilder nach 7 h bei einer parallelen Kultivierung von A) *Saccharomyces cerevisiae* und B) *Bacillus megaterium*

Zusammenfassung

Es zeigt sich, dass die Kultivierungsverläufe von *Bacillus megaterium* und *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich parallel aufgezeichnet werden konnten. Das entwickelte Multitestersystem ist also prinzipiell auch für die parallele Beobachtung mehrerer Mikroorganismen geeignet. Eine Kreuzkontamination konnte dabei nicht beobachtet werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf dem In-situ Mikroskop basierendes atline betriebenes Multitestersystem entwickelt, optimiert, kalibriert und an Beispielkultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacillus megaterium* getestet.

Es erfolgte die Entwicklung von zwei Messzellen, die reversibel über die Messzone des In-situ Mikroskops geschoben werden konnten und konvektiv von Fluid durchströmt wurden. Dabei hatte Messzelle 1 sehr große Strömungstotzonen, die in der optimierten Messzelle 2 durch spezielle Einsätze eliminiert wurden. Zur Charakterisierung der Messzellen wurde eine Verweilzeitverteilung aufgenommen; dabei ergab sich ein deutlicher Einfluss der jeweiligen Messzellen. So stieg die mittlere Verweilzeit von einem System ohne Messzelle ($t_{\text{mittel}} = 0,22 \text{ min}$) über Messzelle 2 ($t_{\text{mittel}} = 0,28 \text{ min}$) hin zu Messzelle 1 ($t_{\text{mittel}} = 0,43 \text{ min}$) stark an. Zudem nahm die Peakbreite, ausgedrückt durch die Varianz um den Mittelwert, in gleicher Weise zu. Ein deutlicher Einfluss der Messzonenhöhe des Mikroskops auf die Verweilzeit konnte nicht festgestellt werden. Bei einer Simulation der Strömungsverhältnisse in Messzelle 2 ergab sich, dass die Detektionszone des Mikroskops in der Hauptströmungszone lag und das System deshalb für eine Durchflussmessung prinzipiell geeignet ist. In großen Teilen der Messzone waren jedoch Strömungstotzonen vorhanden, weswegen Sauerstoffsensoren bevorzugt in der Nähe des Fluideinlasses platziert wurden.

Zur Steuerung und automatisierten atline-Probennahme wurde ein FIA-System bestehend aus zwei 6-Port-Selektoren und einem 6-Port-Injektor, sowie einer Peristaltikpumpe entwickelt. Es wurde eine Steuerung über eine Relaisbox und ein Labview basiertes Steuerprogramm realisiert. Ein Studium ergab für das FIA-System eine niedrige Dispersion mit $D = 2,25$. Wurden entsprechend die Messzellen eingefügt, stieg die Dispersion deutlich an; es ergab sich für Messzelle 2 $D = 4,66$ und für Messzelle 1 ein Wert von $D = 15,12$.

Mit definierten Proben des Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* wurde ein Auswertungsverfahren, basierend auf einer Bestimmung der detektierten Kerne während der Injektion einer bestimmten Probe in den Trägerstrom, etabliert. Es erfolgte dann eine Integration der resultierenden FIA-Peaks und die resultierenden Integralwerte wurden als relevante Messgrößen verwendet. Es wurde ein Vergleich der beiden Messzellen durchgeführt, wobei sich für

Messzelle 1 deutlich größere Integralwerte ergaben, da die Messzelle langsamer durchströmt und somit Zellen häufig doppelt gezählt wurden. Für beide Messzellen ergaben sich gut reproduzierbare Werte, wobei der relative Fehler für Messzelle 1 mit 5,7 % etwas höher lag als für Messzelle 2 mit 4,2 %. Basierend auf diesen Integralwerten erfolgte eine Optimierung von Volumenstrom, Messzonenhöhe und Injektionsvolumen der FIA. Als bester Volumenstrom ergab sich ein Wert von 6,1 mL/min. Eine Reduktion des Volumenstroms führte dazu, dass sich vermehrt Zellen permanent in der Messzone festsetzten. Als optimale Messzonenhöhe ergaben sich 125 µm. Darunter waren die ermittelten Integralwerte deutlich kleiner und die Empfindlichkeit damit gering. Bei größeren Zonenhöhen wurden die Zellen nicht mehr korrekt fokussiert und es ergab sich ein höherer Anteil an nicht klassifizierbaren Objekten. Das Injektionsvolumen wurde trotz hohem Probenverbrauch auf 500 µL eingestellt, da ein reduziertes Volumen zu geringeren Integralwerten und damit einer um eine Größenordnung reduzierten Empfindlichkeit sowie größeren Fehlern führte.

Um den erhaltenen Integralwerten entsprechende Zelldichten zuzuordnen, wurde eine Kalibration mit verschiedenen Zelldichten von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Es ergab sich für beide Messzellen eine gute lineare Korrelation zwischen Integralwerten und der Zelldichte in einem Messbereich von $1 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^8$ Zellen/mL. Bei kleineren Zelldichten waren zu wenige Zellen für eine sinnvolle Auswertung detektierbar und bei höheren Zelldichten kam es zu Löslichkeitsproblemen der eingesetzten Hefe und einem vermehrten Verstopfen der Schläuche.

Es wurden kommerziell erhältliche faseroptische Sauerstoffsensoren in die Messzelle 1 integriert und im FIA-Betrieb getestet und kalibriert. Dazu wurde der Trägerstrom der FIA mit N₂ gesättigt und es wurden mit Druckluft begaste Proben injiziert. Es wurden reproduzierbare FIA-Peaks erhalten, die wiederum durch Integration ausgewertet wurden. Es war lediglich eine Zweipunktkalibration aus Grundlinie (0 % Sauerstoffsättigung) und mit Druckluft gesättigter Probe (100 % Sauerstoffsättigung) möglich. Probleme ergaben sich zudem durch eine ungleichmäßige Sauerstoffkonzentration im Trägerstrom, was sich an einer instabilen Grundlinie zeigte.

Mit Hilfe der erstellten Kalibrationsgeraden und den optimierten Einstellungen wurde das Multitestersystem mit beiden Messzellen an Schüttelkolbenkultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Die mit dem Multitester aufgezeichnete Zelldichte wurde dabei mit offline-Werten verglichen. Mit beiden Messzellen konnte der Kultivierungsverlauf richtig aufgenommen werden, für Messzelle 1 waren die Abweichungen von den offline-Werten aber

deutlich größer als für Messzelle 2, weswegen für weitere Zelldichtebestimmungen bevorzugt Messzelle 2 verwendet wurde.

Es zeigte sich außerdem, dass mit dem Multitester eine weitergehende Auswertung der Zelldaten zur Untersuchung der Agglomeratbildung möglich war. Dazu wurde bei einer Testkultur von *Saccharomyces cerevisiae* die Anteile von Einzelzellen, Doppelzellen und Zellclustern über den Kultivierungsverlauf aufgezeichnet. Es zeigte sich ein hoher Anteil von Einzelzellen während der lag-Phase der Kultivierung. Während der exponentiellen Wachstumsphase konnte eine Zunahme der Doppelzellen und Cluster aufgezeichnet werden, was auf eine vermehrte Zellteilung und ein starkes Wachstum hindeutet. In der stationären Phase nahm der Anteil von Doppelzellen und Zellclustern auf Kosten der Einzelzellen wieder zu. Die verschiedenen Wachstumsphasen konnten anhand der Agglomeratbildung klar differenziert werden.

Das Multitestersystem wurde zudem erfolgreich für eine parallele Untersuchung von 2 und 3 Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Dazu wurden parallele Testkultivierungen mit unterschiedlichen Animpfzellichten untersucht und es konnten klar differenzierbare Kultivierungsverläufe aufgenommen werden, bei denen eine erhöhte Animpfzellichte immer zu einem schnelleren Anwachsen der Kultur und einer höheren Endzellichte führte.

Es konnte zudem eine parallele Beobachtung von Zelldichte und gelöstem Sauerstoff während einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt werden. Es ergab sich dabei während der exponentiellen Wachstumsphase eine Abnahme der Sauerstoffsättigung auf Null. Während der stationären Phase nahm die Sauerstoffsättigung durch den konstanten Sauerstoffeintrag im Schüttelkolben wieder zu und fiel nach Umstellung der Hefe auf Ethanol als Nährstoffquelle wieder deutlich ab. Dieser Trend konnte durch eine offline-Bestimmung von Glukose und Ethanol über den Kultivierungsverlauf untermauert werden und wurde auch durch ein Durchfluss-Referenzsystem und eine theoretische Berechnung des Sauerstoffgehalts, zumindest innerhalb der ersten 8 h der Kultivierung, bestätigt. Als problematisch erwies sich bei der Sauerstoffmessung aber wiederum die starke Grundlinienschwankung, die einen großen konstanten Fehler bewirkte, der Bestimmungen geringer Sauerstoffsättigungen sehr ungenau machte.

Nach einer Etablierung des Multitestersystems für *Saccharomyces cerevisiae* wurde es erfolgreich auf einen Produktionsstamm von *Bacillus megaterium* übertragen. Die aufgenommenen Bilder zeigen, dass hier prinzipiell auch eine Unterscheidung der Morphologie möglich ist. Zur Quantifizierung wurden wiederum FIA-Peaks aufgenommen und durch Integralbildung quantifiziert. Da aber hier ein für Hefen entwickelter Auswertalgorithmus verwendet wurde,

war die Bestimmung deutlich ungenauer und es ergaben sich relative Fehler von 10 %. Eine Kalibration erfolgte durch eine Messung von 3 Kultivierungen und eine Korrelation mit offline-Werten, wobei sich auch hier ein linearer Verlauf im Messbereich von $4,5 \cdot 10^5$ - $1,7 \cdot 10^7$ Zellen/mL ergab. Über diese Kalibration konnte auch der Verlauf einer unbekanntem Kultivierung richtig wiedergegeben werden.

Es wurde zudem eine parallele Kultivierung von *Bacillus megaterium* und *Saccharomyces cerevisiae* mit dem Multitester untersucht. Auch hier ergaben sich klar differenzierbare Wachstumskurven und es war keine Kreuzkontamination nachweisbar. Das Multitestersystem erwies sich auch für die parallele Untersuchung mehrerer Organismen als geeignet.

5.2. Ausblick

Insgesamt konnten Schüttelkolbenkultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgreich mit dem Multitester untersucht werden. Mit abnehmender Durchflussgeschwindigkeit bzw. mit zunehmender Kultivierungsdauer und Zelldichte ergab sich aber vermehrt das Problem, dass sich Zellen permanent in der Detektionszone des Mikroskops festsetzten und die Messung nachhaltig störten. Um dies zu unterbinden, müsste ein automatisches Reinigungssystem für das Mikroskop entwickelt werden. Dieses könnte beispielsweise durch den Einbau eines Ultraschallgenerators zum Ablösen der Zellen erreicht werden.

Weitere Probleme ergaben sich bei der Integration der Sauerstoffsensoren. Hier sorgte vor allem der starke Grundliniendrift und dass lediglich eine Zweipunktkalibration im FIA-Betrieb möglich war für sehr hohe Fehlerwerte bei geringen Sauerstoffkonzentrationen. Es ist daher fraglich ob FIA-basierte Sauerstoffsensoren die beste Lösung zur Sauerstoffbestimmung in Kultivierungen darstellen. Es wäre vermutlich besser, hierfür auf ein Messsystem mit konstantem oder sequentielltem Durchfluss zurückzugreifen, da hier die Sauerstoffkonzentration direkt bestimmt werden kann. Hiermit könnten beispielsweise auch im stopped-flow-Betrieb Sauerstoffabbaurate in der Messzone des Mikroskops durch vorhandene Zellen untersucht werden. Zudem ist die direkte Messung der Sauerstoffkonzentration mit faseroptischer Sensorik im Schüttelkolben, im Vergleich zur Bestimmung der Zelldichte, bereits eine gut funktionierende und etablierte Methode. Die Systeme sind kommerziell erhältlich und werden beispielsweise von der Firma Presens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Deutschland) ⁸⁴ vertrieben.

Es wurde gezeigt, dass parallele Untersuchungen von bis zu drei Kultivierungen mit dem Multitester prinzipiell gut funktionieren. Durch den Einsatz von Selektoren mit einer größeren Anzahl von Ports wäre es möglich, eine noch größere Anzahl von Kultivierungen parallel zu überwachen. Weiterhin wäre es sinnvoll, das System neben Schüttelkolben auch an mehreren kleinen Rührkesselreaktoren, sowie an alternativen Reaktortypen wie beispielsweise einem disposable Beutelreaktor, wie er von der Sartorius Stedim Biotech S.A. (Göttingen, Deutschland) vertrieben wird, zu testen. In diesen Reaktoren ist eine bessere Kontrolle der Kultivierungsparameter möglich und sie entsprechen eher den industriellen Standards.

Zur weiteren Aufklärung der Strömungsverhältnisse in der Messzelle sollten weitergehende Simulationsrechnungen durchgeführt werden. Dabei müssten Inhomogenitäten und Rauigkeit der entsprechenden Materialien in die Simulation mit einbezogen werden. Zudem wäre eine Durchführung von 3D-Simulationen sinnvoll. Dadurch ließe sich vor allem der Einfluss der Messzonenhöhe auf den Durchfluss untersuchen und die dazu in Abschnitt 3.4.3 aufgestellten Vermutungen überprüfen.

Weiterhin wäre es sinnvoll noch andere Sensoren in die Messzelle des Multitesters zu integrieren und damit weitere wichtige Kultivierungsgrößen zu überwachen. Dazu sollte zunächst ein faseroptisches Messsystem zur Bestimmung des pH-Wertes integriert und getestet werden. Zudem besitzt die Integration elektrochemischer Biosensoren in die Messzelle ein großes Potential. Damit wäre eine parallele Konzentrationsbestimmung verschiedener Zucker, Alkohole und organischer Säure in der Kultivierung möglich.

Die durchgeführten Untersuchungen mit *Bacillus megaterium* ergaben, dass das Multitestersystem neben dem Studium von *Saccharomyces cerevisiae* auch ohne größere Schwierigkeiten auf andere schnellwachsende Organismen übertragen werden konnte. Zur Verbesserung der Messgenauigkeit sollte hier aber ein spezieller Auswertalgorithmus für eine bessere Erkennung von *Bacillus megaterium* entwickelt werden. Mit diesem könnten auch morphologische Unterschiede erfasst werden und es wäre damit prinzipiell ein detailliertes Studium des Kultivierungsverlaufes sowie eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen möglich.

Aufgrund ihrer wachsenden Bedeutung in der Biotechnologie wäre zudem eine Untersuchung von Tierzellkultivierungen mit dem Multitester wünschenswert. Obwohl in speziellen Reaktorkultivierungen von tierischen Zellen (z.B. CHO-Zellen) Zelldichten zwischen $3 \cdot 10^6$ und $1,8 \cdot 10^7$ Zellen/mL erreicht werden können⁸⁵, wachsen sie im Schüttelkolben häufig lediglich bis zu einer Zelldichten von $8 \cdot 10^5$ Zellen/mL⁸⁶. Diese Zelldichten sind zu niedrig, um mit dem Multitestersystem sinnvoll analysiert werden zu können, da die Wiederfindungsrate nur bei 0,0014 % liegt und dadurch das untere Detektionslimit bei $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL liegt (vgl.

3.4.4). Aus diesem Grund ist das entwickelte Multitestersystem zur Quantifizierung der Zelldichte in Tierzellkulturen nur bedingt geeignet. Für diesen Einsatz wäre es erforderlich das entwickelte System so umzubauen, dass entnommene Proben direkt und ohne eine Verdünnung durch einen Trägerstrom analysiert werden. Das FIA-System könnte verwendet werden, um zusätzlich beispielsweise Farbstofflösungen zu injizieren und die so angefärbten Zellen mit dem Mikroskop zu untersuchen und damit eine automatische lebend-tot-Analytik zu etablieren. Erste Untersuchungen zu diesem Thema wurden bereits von Abel (2009)⁸⁷ am Institut für Technische Chemie der Leibniz-Universität Hannover durchgeführt.

6. Anhang

6.1. Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Material	Typus, Hersteller, Ort
Aquariumspumpe	Elite 801, Hagen Deutschland GmbH, Holm, Deutschland
FIA-System	Knauer, Berlin, Deutschland
Fitting	Techlab GmbH, Erkerode, Deutschland
Gaschromatograph	Shimadzu GC-14B & TEX Systems, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Optische Glasfasern (1 mm)	Edmund optics, Karlsruhe, Deutschland
Inkubator	Heidolph Inkubator 1000, Unimax 10/0, Heidolph Elektro GmbH & Co. Kg, Kelheim, Deutschland
In-situ-Mikroskop	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Kleber Elastosil RT-601	Wacker Chemie AG; München, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus BH-2 Olympus Corporation, Tokio, Japan
Magnetrührer	IKAMAG RCT, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop	Olympus BX 41, Olympus Corporation, Tokio, Japan
Pumpe	ismatec, IPS Laboratoriumtechnik Zürich, Schweiz
Pipetten	Research [®] : 1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

Sauerstoffmessbox (Fibox 3)	Presens Precision GmbH, Regensburg, Deutschland
Sauerstoff Sensor- <i>patches</i> (5 mm)	Presens Precision GmbH, Regensburg, Deutschland
Spritzen	20 mL Henke, Sass, Wolf, Tuttlingen, Deutschland
Spritzenvorsatzsterilfilter	Minisart 0,2 µm Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sterilbank	Thermo scientific, HERAsafe KS, Langenselbold, Deutschland
UV-VIS-Spektrometer	Varian, Cary 50 Scan, Palo Alto, CA, USA
Schüttler	Vibrofix VF 1, Janke & Kunkel IKA Werk, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Arium 611, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
YSI	2700 Select biochemistry analyser, Yellow Springs Instruments, Letchworth, Großbritannien
Zählkammer	Neubauer-Improved, LO – Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Fresco17 centrifuge, Holding GmbH, Osterode, Deutschland

6.2. Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Ort
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bacto-Pepton	Biotechnica international, Oaxaca, Mexiko
Bäckerhefe	DHW Vital Gold, Deutsche Hefewerke GmbH, Nürnberg, Deutschland

Biotin	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Calciumdichlorid Dihydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Calcium-D-Pantothenat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Chloramphenicol	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Cobaltchlorid Hexahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
di-Ammonimhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
di-Ammoniumsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Eisentrichlorid Hexahydrat	Riedel-de Haën, heute Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Gentamycinsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Glukose Monohydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Hefeextrakt	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Kaliumhydroxid	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Kupfersulfat Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Mangansulfat Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylenblau	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
myo-Inosit(ol)	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Natriumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Natriumcitrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pyridoxolhydrchlorid (Vitamin B ₆)	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Schwefelsäure	Riedel-de Haën, heute Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Stickstoff	Linde-Gas, Deutschland
Tetracyclin	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland

Thiaminhydrochlorid (Vitamin B ₁)	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Zinksulfat Heptahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland

6.3. Medien und Lösungen

6.3.1. Herstellung der Methylenblau Lösungen

Für die durchgeführten Verweilzeitmessungen wurden 0,0043 g Methylenblau in 100 mL VE-Wasser gelöst und vor der Verwendung 15 min gerührt. Die Lösung für die Bestimmung des Dispersionskoeffizienten wurde durch eine 1:9 Verdünnung dieser Lösung hergestellt.

6.3.2. Hefesuspensionen für Optimierung und Kalibration

Für die Kalibrationsexperimente wurden Suspensionen mit kommerziell erhältlicher Bäckerhefe im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 50 g/L hergestellt. Für die Optimierungsversuche wurde stets eine Testsuspension mit einer Konzentration von 5 g/L verwendet. Es wurden entsprechende Mengen Hefe abgewogen und diese in einem Schnappdeckelgläschen ($V = 30$ mL) unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer in 20 mL VE-Wasser suspendiert. Zum Einstellen von Konzentrationen unter 1 g/L wurde aufgrund der großen Fehler beim Einwiegen kleiner Hefemengen eine Stammsuspension mit 1 g/L entsprechend mit VE-Wasser verdünnt. Es erfolgte eine Bestimmung der Zelldichte mit einer Neubauer Kammer (vgl. 6.4.4). Die verwendeten Suspensionen sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Über die gesamte Messdauer wurde kontinuierlich gerührt, um ein Absetzen der Hefe und damit Inhomogenitäten zu verhindern. Für Konzentrationen von 50 g/L und darüber konnte eine vollständige Homogenität der Lösungen nicht sichergestellt werden, da die Hefe nicht vollständig suspendiert werden konnte.

Tabelle 6.1: Verwendete Hefesuspensionen für Kalibration und Optimierung

Konzentration [g/L]	Einwaage/Verdünnung (auf 20 mL)	Zelldichte [Zellen/mL]
50	1 g	$5,05 \cdot 10^8$
40	0,8 g	$3,22 \cdot 10^8$
30	0,6 g	$2,63 \cdot 10^8$
20	0,4 g	$1,80 \cdot 10^8$
10	0,2 g	$1,13 \cdot 10^8$
7,5	0,15 g	$8,33 \cdot 10^7$
5	0,1 g	$5,94 \cdot 10^7$
3,5	0,07 g	$3,16 \cdot 10^7$
2	0,04 g	$2,53 \cdot 10^7$
1	0,02 g (Stamm)	$1,10 \cdot 10^7$
0,5	10 ml Stamm+10ml Wasser	$5,35 \cdot 10^6$
0,25	5 mL Stamm+15 mL Wasser	$2,79 \cdot 10^6$
0,1	2 mL Stamm+18 mL Wasser	$1,27 \cdot 10^6$
0,05	1 mL Stamm+19 mL Wasser	$6,25 \cdot 10^5$

6.3.3. Kalibrationslösung für den Sauerstoffsensor

Als Kalibrationslösung wurde eine 1 % Natriumsulfit-Lösung in NaKPP-Puffer pH=8 verwendet. Dazu wurden 0,1088 g KH_2PO_4 , 1,5762 g Na_2HPO_4 und 10 g Na_2SO_3 in 1 L VE-Wasser gelöst. Für die jeweiligen Kalibrationsmessungen wurden 10 mL der Lösung in ein Schnappdeckelgläschen gefüllt, mit 2,38 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10^{-3} M) versetzt und für 15 Minuten gerührt.

6.3.4. Schatzmann Medium

Es wurden 1100 mL VE-Wasser mit Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Anschließend wurden $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,725 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,896 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,960 g), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (4,05 g), KCl (1,92 g) und 2,1 mL einer Minerallösung hinzugefügt. Die Minerallösung wurde aus folgenden Salzen hergestellt, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,5 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,9 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,24 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,959 g) die in 100 mL VE-Wasser gelöst wurden.

Die Lösung wurde mit VE-Wasser auf 2000 mL aufgefüllt und gerührt, um alle Salze zu lösen. Der pH-Wert wurde dann mit H_2SO_4 und NaOH auf pH 5,5 eingestellt.

Zur Herstellung der zugehörigen Vitaminlösung, die erst nach dem Autoklavieren zugegeben wurde, wurden myo-Inosit(ol) (6,0 g), Calcium-D-Pantothenat (3,0 g), Vitamin B₁ (0,6 g), Vitamin B₆ (0,15 g) sowie Biotin (0,003 g) eingewogen und in 100 mL VE-Wasser gelöst.

Zur Herstellung der verwendeten Antibiotika Lösung wurden Ampicillin (0,005 g), Tetracyclin (0,002 g) und Chloramphenicol (0,003 g) eingewogen und in 100 mL VE-Wasser gelöst.

6.3.5. LB-Medium

Es wurden 10 g Bacto-Pepton, 10 g Hefeextrakt und 5 g NaCl in 1000 mL VE-Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt und das Medium wurde autoklaviert. Daraufhin erfolgte, unter sterilen Bedingungen, die Zugabe von 10 mg Tetracyclin.

6.4. Standardmethoden

6.4.1. Standardkultivierungsvorschrift für *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Vorkultur wurden in einem 100 mL Schüttelkolbe 50 mL Schatzmann Medium mit 0,29 g Natriumcitrat versetzt und autoklaviert. Als Nährlösung wurden 2,48 g Glukose in 10 mL Schatzmann Medium gelöst und jeweils 75 μL Vitamin- und Antibiotikalösung zugegeben. Unter einer Cleanbench erfolgte die Zugabe der Nährlösung über einen Sterilfilter. Das Abimpfen der Kultur wurde ebenfalls unter der Cleanbench über eine durch Abflammen sterilisierte Animpfnadel mit einer kleinen Menge auf Agarose gewachsener Hefe (Stamm H1022, ETH Zürich) durchgeführt. Die Vorkultur wurde in einem Inkubator bei 30°C und 200 rpm für 12 h inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden 300 mL Schatzmann Medium in einen 500 mL Schüttelkolben mit 2 Schikanen eingefüllt und zwei Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,8 mm zum Anschluss an den Multitester sowie eine Bakterienfalle zur manuellen Probennahme in den Kolben eingefügt. Sämtliche Komponenten wurden dann gemeinsam für etwa 5 h in einem Schnellkochtopf autoklaviert. Als Nährlösung wurden 10 g Glukose in 20 mL Schatzmann Medium gelöst sowie je 300 μL Vitamin- und Antibiotikalösung zugegeben. Diese wurde über einen Sterilfilter in die Kultur gegeben und dann mit 30 mL der Vorkultur angeimpft. Zum Anschluss der Kolben wurde der Multitester mit Isopropanol gespült und unter der Cleanbench an die Kultivierung angeschlossen. Die Hauptkultur wurde bei 30°C und

200 rpm in einem Inkubator (Heidolph Inkubator 1000, Unimax 10/0, Heidolph Elektro GmbH & Co. Kg, Kelheim, Deutschland) für 20 h inkubiert.

6.4.2. Stammhaltung für *Bacillus megaterium*

Für die Langzeitlagerung von *Bacillus megaterium* wurden Gefrierkulturen angelegt. Dafür wurden 100 mL LB-Medium in einem 500 mL- Schüttelkolben mit 2 Schikanen mit 1000 µL Zellkultur angeimpft und 6 h bei 37 °C und 130 rpm im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden jeweils 50 mL dieser Kultur mit 50 mL Glycerin versetzt, zur besseren Handhabung auf 50 Eppendorfgefäße mit einem Volumen von 2 mL aufgeteilt und bei -80 °C gelagert

6.4.3. Standardkultivierungsvorschrift für *Bacillus megaterium*

Für die Kultivierung von *Bacillus megaterium* wurden 2 Teflonschläuche zum Anschluss an den Multitester sowie eine Bakterienfalle für die manuelle Probennahme an einen 500 mL Schüttelkolben angeschlossen und alles im Kochtopf autoklaviert. Es erfolgte dann unter sterilen Bedingungen die Zugabe von 350 mL LB-Medium und es wurde, je nach gewünschter Animpfzellichte 2-6 mL Gefrierkultur zugegeben. Zum Anschluss der Kolben wurde der Multitester mit Isopropanol gespült und unter der Cleanbench an die Kultivierung angeschlossen. Es wurde bei 37°C und 200 rpm in einem Inkubator (Heidolph Inkubator 1000, Unimax 10/0, Heidolph Elektro GmbH & Co. Kg, Kelheim, Deutschland) für 7 h inkubiert.

6.4.4. Bestimmung der Zelldichte mit einer Neubauer Kammer

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit einer Zählkammer (Neubauer-Improved, LO – Laboroptik, Friedrichsdorf) und einem Forschungsmikroskop Olympus IX-50 mit 200 facher Vergrößerung (Olympus, Japan) durchgeführt. Die Zählkammer (Abbildung 6.1) besteht aus zwei quadratischen Gitternetzen (3 mm²), die in 9 Großquadrate (1 mm²) aufgeteilt sind. Alle 9 Großquadrate sind wiederum in kleinere Quadrate unterteilt. 16 Kleinquadrate mit einer Kantenlänge von 250 µm bilden ein Großquadrat (L). Das mittlere Großquadrat ist aus 25 Kleinquadraten (E) mit einer Kantenlänge von 200 µm aufgebaut, wobei 1 Kleinquadrat (E) aus weiteren 16 Quadraten mit einer Kantenlänge von 50 µm besteht.

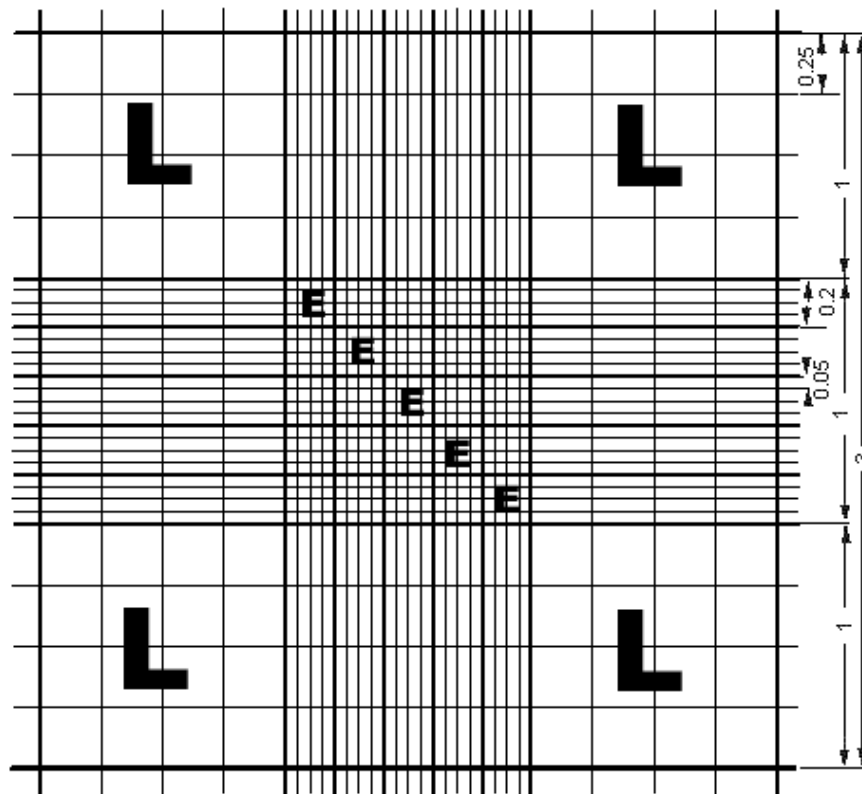


Abbildung 6.1: Neubauer-Improved-Zählkammer

Die Kammertiefe beträgt 0,1 mm, begrenzt wird die Neubauer-Improved-Zählkammer durch ein Deckglas. Somit ergibt sich ein definiertes Volumen pro Gitternetz von 0,9 mm³. Die Probe wird nach Homogenisierung mittels Vortexer direkt in die Kammer eingespritzt. In beiden Gitternetzen werden die Zellen in den vier Großquadraten (L) ausgezählt, wobei die auf der oberen und linken Kante liegenden Zellen mitgezählt werden, die auf der unteren und rechten Kante liegenden aber unberücksichtigt bleiben. Durch Mittelwertbildung und unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors F, sowie dem Faktor 10⁴ (Umrechnung von 0,1 µl auf mL) ergibt sich folgende Formel für die Zelldichte:

$$\text{Zelldichte [Zellen/mL]} = \text{Zellzahl} \cdot 10^4 \cdot F \quad \text{Gleichung 6.1}$$

6.4.5. Bestimmung der Ethanolkonzentration mittels Gaschromatographie (GC)

Die Ethanolkonzentration wurde mit dem Gaschromatographen Shimadzu GC-14B (TEX Systems) mit Kalibrationsstandards von 0,1 g/L (Level 4) und 10 g/L (Level 10) gemessen und anschließend ausgewertet. Die Temperaturen von Säule, Injektor und Detektor wurden auf 160 °C, 180 °C und 220 °C eingestellt. Die Drücke für die Trägergase betragen 65 kPa für

Wasserstoff, 50 kPa für synthetische Luft, 500 kPa für Carrier (P) und 220 kPa für Carrier (M). Das Injektionsvolumen der Probe, welches über ein Septum eingespritzt wurde, betrug 0,5 µL. Als interner Standard wurde jeder Probe *n*-Propanol mit einer Konzentration von $c = 8 \text{ g/L}$ zugesetzt. Im weiteren Verlauf der GC-Messung musste sichergestellt werden, dass die Ethanolkonzentration nicht über die maximale Kalibrationskonzentration von 10 g/L anstieg. Die Messzeit betrug 200 Sekunden und zur geeigneten Mittelwertbildung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte über eine Integration der Peaks mit der zugehörigen Software Shimadzu Class VP.

6.4.6. Bestimmung der Glukosekonzentration mit einer Enzymelektrode

Die Bestimmung der Glukosekonzentration erfolgte mit Hilfe von YSI (Yellow Springs Instruments) 2700 Select, biochemistry analyser. Die Proben werden hierbei direkt über einen Kanal aufgesaugt und analysiert. Die Glukose wird dabei an einer Enzymelektrode mit Glukoseoxidase zu Glukonsäure und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das Wasserstoffperoxid wird an einer Platinelektrode zersetzt. Der entstehende Strom ist direkt proportional zur Glukosekonzentration und wird vom Gerät, basierend auf einer internen Kalibration, automatisch berechnet und angezeigt.

Die messbare Konzentration der Glukose liegt bei 4 g/L, daher ist darauf zu achten, dass die Proben gegebenenfalls mit VE-Wasser verdünnt werden damit diese maximale Konzentration nicht überschritten wird. Die Proben wurden jeweils dreimal gemessen um über Mittelwertbildung eine hinreichende Genauigkeit zu erreichen.

6.5. Pumpenkalibration

Die verwendete Pumpe der Firma Ismatec ermöglichte eine Regelung der Pumpengeschwindigkeit von 1-99 Umdrehungen pro Minute (U/min). Zur Kalibration wurde bei fest eingestellten Werten von 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89 und 99 U/min die Zeit bestimmt in der ein festgelegtes Volumen von 5 mL VE- Wasser durchgepumpt wurde. Daraus wurde der Volumenstrom bestimmt und gegen die zugehörigen Umdrehungen pro Minute (U/min) aufgetragen. Es ergab sich ein streng linearer Verlauf.

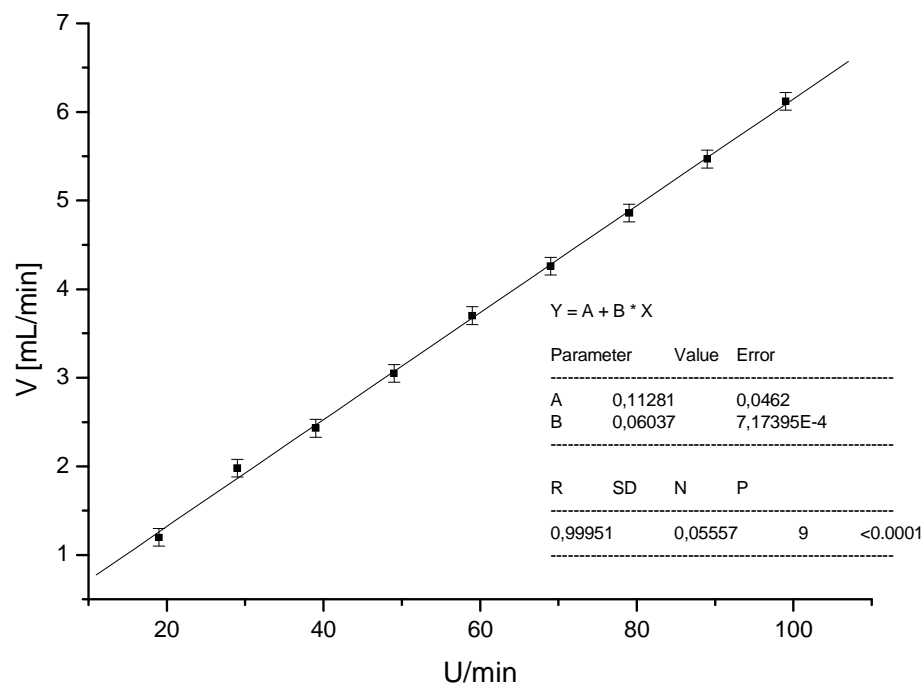


Abbildung 6.2: Pumpenkalibration Ismatec Pumpe

6.6. Mittelwertbildung und Standardabweichung

Wird eine Messgröße mehrfach gemessen wird häufig das arithmetische Mittel (x_{mittel}) dieser Werte bestimmt. Dies berechnet sich nach:

$$x_{\text{mittel}} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N x_i \quad \text{Gleichung 6. 2}$$

Um nun den Fehler dieses Mittelwertes anzugeben kann die Standardabweichung (s) verwendet werden. Sie berechnet sich nach:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - x_{\text{mittel}})^2} \quad \text{Gleichung 6. 3}$$

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardabweichungen wurden automatisch mit dem Computerprogramm Origin 7.5 berechnet.⁸⁸

Literatur

- ¹ Festel G., Knoll J., Götz H., Zinke H. 2004, „Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie, Chemie Ingenieur Technik 76 (3): 307-312
- ² Erb R.W., Heiden S., Gent R., Zinke H. 2005. Weiße Biotechnologie – Erfolgsstrategie für eine nachhaltige Chemieindustrie, CHEManger (6)
- ³ Junker, B H., Wang H Y .2006. Bioprocess monitoring and computer control: key roots of the current PAT initiative. Biotechnol Bioeng 95(2): 226-61.
- ⁴ Singh V. 1999. Novel disposable bioreactor - WaveBioreactor - Scalable cell culture for 100ml up to 500L. GENETIC ENGINEERING NEWS 19(5): 23-23.
- ⁵ Junker B, Reddy J, Gbewonyo K, Greasham R. 1994. Online and in-situ monitoring technology for cell-density measurement in microbial and animal-cell culture. BIOPROCESS ENGINEERING 10(5-6):195-207.
- ⁶ Maxwell G.M., Randall Allen E., Freese E. 1987. Immersible probe for continual monitoring of the population density of microorganisms grown in liquid media. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 53 (3):618-619
- ⁷ Marose S . 1999. Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie. Dissertation Universität Hannover
- ⁸ Wang N, Simmons M. 1991. Characterization of an online commercial fluorescence probe-modeling of the probe signal. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 38(11):1292-1301.
- ⁹ Finn B, Harvey L, McNeil B. 2006. Near-infrared spectroscopic monitoring of biomass, glucose, ethanol and protein content in a high cell density baker's yeast fed-batch bioprocess. YEAST 23(7):507-517.

-
- ¹⁰ Harris C, Todd R, Bungard S, Lovitt R, Morris J, Kell D. 1987. Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies-A novel method for the real time estimation of microbial biomass. *ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY* 9(3):181-186.
- ¹¹ Cannizzaro C, Gugerli R, Marison I, von Stockar U. 2003. On-line biomass monitoring of CHO perfusion culture with scanning dielectric spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 84(5):597-610.
- ¹² Lindgren T, Hamp S. 2006. Biomass monitoring using acoustic spectroscopy. *IEEE SENSORS JOURNAL* 6(5):1068-1075.
- ¹³ Kacmar J, Srienc F. 2005. Dynamics of single cell property distributions in Chinese hamster ovary cell cultures monitored and controlled with automated flow cytometry. *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 120(4):410-420.
- ¹⁴ Deutsche Offenlegungsschrift 4032002 Bioreaktor mit In Situ Mikroskopsonde und Messverfahren. Deutsches Patentamt, München Germany, 1990
- ¹⁵ Suhr H, Wehnert G, Schneider K, Bittner C, Scholz T, Geissler P, Jahne B, Scheper T. 1995. In-situ-microscopy for online characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 47(1):106-116
- ¹⁶ Lindner P. 2006. Entwicklung von Software-Systemen zur Planung, Datenaufnahme und –auswertung von Bioprozessen. Dissertation Universität Hannover
- ¹⁷ Brückerhoff T. 2006. Bildbasiertes Inline-Monitoring von Kultivierungsprozessen mit einem optimierten In-situ Mikroskopsystems. Dissertation Universität Hannover
- ¹⁸ Bittner C, Wehnert G, Scheper T. 1998. In situ microscopy for on-line determination of biomass. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 60(1):24-35.

-
- ¹⁹ Camisard V, Brienne JP, Baussart H, Hammann J, Suhr H. 2002. Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: Application to volume variation induced by osmotic stress (vol 78, pg 73, 2002). *Biotechnology and Bioengineering* 78(3):353-353.
- ²⁰ Rudolph G, Brückerhoff T, Bluma A, Korb G, Scheper T. 2008. Optische Inline-Messverfahren zur Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung in der Bioprozesstechnik, *Chemie Ingenieur Technik* 79 (1-2): 42-51.
- ²¹ Frerichs JG, Joeris K, Konstantinov K, Scheper T. 2002. Einsatz des In-situ Mikroskops zur online Beobachtung von Tierzellkultivierungen,. *Chemie Ingenieur Technik* 74(11):1629-1633.
- ²² Joeris K, Frerichs JG, Konstantinov K, Scheper T. 2002. In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures. *Cytotechnology* 38(1-2):129-134.
- ²³ Guez JS, Cassar JP, Wartelle F, Dhulster P, Suhr H. 2004. Real time in situ microscopy for animal cell-concentration monitoring during high density culture in bioreactor. *Journal of Biotechnology* 111(3):335-343.
- ²⁴ Anton F, Burzlaff A, Kasper C, Bruckerhoff T, Scheper T. 2007. Preliminary study towards the use of in-situ microscopy for the online analysis of microcarrier cultivations. *ENGINEERING IN LIFE SCIENCES* 7(1):91-96.
- ²⁵ Rudolph G, Lindner P, Gierse A, Bluma A, Martinez G, Hitzmann B, Scheper T. 2008. Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 99(1):136-145.
- ²⁶ Bluma A. 2009. Adaption mikroskopischer Verfahren an die Überwachung und Charakterisierung biotechnologischer Kristallisationsprozesse. Dissertation Leibniz-Universität Hannover

-
- ²⁷ Ruzicka J, Hansen E H. 1975. Flow Injection Analysis, Part I: A new concept of fast continuous Flow analysis. *Analytica Chimica Acta* 78: 145-157.
- ²⁸ Ruzicka J 2005. From Beaker Chemistry to programable microfluids. *Collec. Czech. Chem. Commun.* 70: 1737-1755
- ²⁹ Valcarcel M, Luque de Castro M D 1987. *Flow-Injection Analysis: principles and applications*. 1. English edition, Ellis Horwood Limited, West Sussex, England
- ³⁰ Kobayashi J, Baba M, Miyazaki M. 1994. Flow-Injection Analysis for Trace Aluminum with Online Preconcentration and Spectrophotometric Detection. *Analytical Sciences* 10(2):287-291.
- ³¹ Schindler R, Lendl B. 1999. FTIR spectroscopy as detection principle in aqueous flow analysis. *Analytical Communications* 36(4):123-126.
- ³² Hart SJ, Hall GJ, Kenny JE. 1999. A fiber optic laser induced fluorescence excitation emission detector applied to flow injection analysis. *Environmental Monitoring and Remediation Technologies* 3534:601-611-698.
- ³³ Turner DR, Knox S, Whitfield M, Dossantos M, Pescada C, Goncalves MD. 1989. An Integrated Gradient Chamber and Potentiometric Detector for Flow-Injection Analysis .1. Assessment of the System. *Analytica Chimica Acta* 226(2):229-238.
- ³⁴ Ma HC, Yan HY. 1983. The Development of an Amperometric Detector for Fia. *Kexue Tongbao* 28(1):138-139.
- ³⁵ Kumar SD, Maiti B, Mathur PK. 1999. Determination of boron by flow injection analysis using a conductivity detector. *Analytical Chemistry* 71(13):2551-2553.
- ³⁶ Trojanowicz M. 2000. *Flow Injection Analysis-Instrumentation and application*. World Scientific, Singapur, New Jersey, London, Hong Kong

-
- ³⁷ Ruzicka J, Hansen E H. 1988. Flow Injection Analysis. 2. Auflage. John Wiley & Sons, New York, Cichester, Brisbane, Toronto, Singapur
- ³⁸ Rehbock C, Beutel S, Brückerhoff T, Hitzmann B, Rudolph G, Riechers D, Stahl F, Schepfer T, Friehs K. 2008 . Bioprozessanalytik. Chemie Ingenieur Technik 80 (3): 267-286
- ³⁹ Khokhar MY, Miller JN, Seare NJ. 1994. Heterogeneous Fluorescence Immunoassays Using Flow-Injection Analysis with Protein-G Solid-Phase Reactors. Analytica Chimica Acta 290(1-2):154-158.
- ⁴⁰ Gu MB, Mitchell RJ, Kim BC. 2004. Whole-cell-based biosensors for environmental bio-monitoring and application. Adv Biochem Eng Biotechnol 87:269-305.
- ⁴¹ Rocha I, Ferreira E. 2002. On-line simultaneous monitoring of glucose and acetate with FIA during high cell density fermentation of recombinant E-coli. ANALYTICA CHIMICA ACTA 462(2):293-304.
- ⁴² Vojinovic V, Esteves F, Cabral J, Fonseca L. 2006. Bienzymatic analytical microreactors for glucose, lactate, ethanol, galactose and l-amino acid monitoring in cell culture media. ANALYTICA CHIMICA ACTA 565(2):240-249.
- ⁴³ Azevedo A, Prazeres D, Cabral J, Fonseca L. 2005. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. BIOSENSORS & BIOELECTRONICS 21(2):235-247.
- ⁴⁴ Scheller F, Schubert F, Pfeiffer D, Hintsche R, Dransfeld I, Renneberg R, Wollenberger U, Riedel K, Pavlova M, Kuhn M and others. 1989. Research and Development of Biosensors - a Review. Analyst 114(6):653-662.
- ⁴⁵ Ivnickii DM, Kurochkin IN, Varfolomeev SD. 1991. Electrochemical Biosensors - Review. Journal of Analytical Chemistry of the Ussr 46(8):1059-1072.
- ⁴⁶ Vadgama P, Crump PW. 1992. Biosensors - Recent Trends - a Review. Analyst 117(11):1657-1670.

-
- ⁴⁷ Leca-Bouvier B, Blum LJ. 2005. Biosensors for protein detection: A review. *Analytical Letters* 38(10):1491-1517.
- ⁴⁸ Leung A, Shankar PM, Mutharasan R. 2007. A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical* 125(2):688-703.
- ⁴⁹ Benthin S, Nielsen J, Villadsen J. 1991. Characterization and application of precise and robust flow-injection analyzers for online measurements during fermentations. *ANALYTICA CHIMICA ACTA* 247(1):45-50.
- ⁵⁰ Meireles L, Azevedo J, Cunha J, Malcata F. 2002. On-line determination of biomass in a microalga bioreactor using a novel computerized flow injection analysis system. *BIOTECHNOLOGY PROGRESS* 18(6):1387-1391.
- ⁵¹ H. Cypionka. 2005. *Grundlagen der Mikrobiologie*, 3.Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- ⁵² Schugerl, K. 2004. Process development in the biotechnology - A review." *Chemie Ingenieur Technik* 76(7): 989-1003.
- ⁵³ M.T. Madigan, J. M. Martinko. 2006. *Biology of Microorganisms*. 11. Auflage, Brock Pearson Prentice Hall, NJ, USA
- ⁵⁴ B.Alberts, D.Bray. 1995. *Molekularbiologie der Zelle*. 3.Auflage, VCH-Verlag, Weinheim, New York, S.519ff, 1039ff
- ⁵⁵ Duffus, J. H. 1971. Cell Cycle in Yeast - Review. *Journal of the Institute of Brewing* 77(6): 500-&.
- ⁵⁶ Frerichs J G. 2000. Entwicklung eines In-situ Mikroskops zur bildgestützten Überwachung von Kultivierungsprozessen. Dissertation Universität Hannover

-
- ⁵⁷ Zimmermann F K, Entian K D. 1997. Yeast Sugar Metabolism. Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania, USA
- ⁵⁸ Strathern J N, Jones E W, Broach J R. 1982. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
- ⁵⁹ Vary P S .1992. Development of genetic engineering in *Bacillus megaterium*. In: Doi R., Mcgloughlin M. (eds.). *Biology of Bacilli: Applications to industry*. Butterworth-Heinemann, Boston, London, Oxford, Singapore. Sydney, Toronto, Wellington: 251-310
- ⁶⁰ Vary P S .1994. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* 140; 1001-1013
- ⁶¹ Takasaki, Y. 1989. Studies on Enzymatic Production of Oligosaccharides .5. Novel Maltose-Producing Amylase from *Bacillus-Megaterium* G-2. *Agricultural and Biological Chemistry* 53(2): 341-347.
- ⁶² Metz, R. J., Allen L N. 1988. Nucleotide-Sequence of an Amylase Gene from *Bacillus-Megaterium*. *Nucleic Acids Research* 16(11): 5203-5203.
- ⁶³ Raux, E., Lanois A. 1998. Cobalamin (vitamin B-12) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* cobI operon. *Biochemical Journal* 335: 159-166.
- ⁶⁴ Meinhardt, F., Busskamp M. 1994. Cloning and Sequencing of the Leuc and Nprn Genes and a Putative Spoiv Gene from *Bacillus-Megaterium* Dsm319. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41(3): 344-351.
- ⁶⁵ Nagao, T., Mitamura T. 1992. Cloning, Nucleotide-Sequences, and Enzymatic-Properties of Glucose-Dehydrogenase Isozymes from *Bacillus-Megaterium* Iam1030. *Journal of Bacteriology* 174(15): 5013-5020.
- ⁶⁶ Martin, L , Prieto A. 1995. Cloning and Sequencing of the Pac Gene Encoding the Penicillin-G Acylase of *Bacillus-Megaterium* Atcc-14945. *Fems Microbiology Letters* 125(2-3): 287-292.

-
- ⁶⁷ Bice I. 2008. Untersuchung der spezifischen Enzymproduktion von rekombinantem *Bacillus megaterium* innerhalb unterschiedlicher Wachstumsphasen. Diplomarbeit Leibniz-Universität Hannover
- ⁶⁸ Fritzsche M. 2006. Entwicklung ratiometrischer optischer Chemosensoren. Dissertation Universität Hannover
- ⁶⁹ Lam HT. 2002 Entwicklung eines faseroptischen Chemo- und eines Biosensors und deren Einsatz in der Biotechnologie. Dissertation. Universität Hannover
- ⁷⁰ Park EJ et al. 2005. Ratiometric fiber optic sensors for the detection of inter- and intracellular dissolved oxygen. *J. Mater. Chem.* 15 (13): 2913-2319
- ⁷¹ Kim, H. J., Jeong Y C 2006. Synthesis of tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) complexes possessing a linker arm for use in sol-gel-based optical oxygen sensor." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 27(12): 2084-2086.
- ⁷² Papkovsky D B. 1995. New oxygen sensors and their application to biosensing. *Sensors and Actuators B*, 29: 213-218
- ⁷³ Amao, Y. 2003. Probes and polymers for optical sensing of oxygen. *Microchimica Acta* 143(1): 1-12.
- ⁷⁴ Wolfbeis OS. 2005. Materials for fluorescence based optical chemical sensors. *J. Mater. Chem.* 15: 2657-2669
- ⁷⁵ Bluma A. 2006. Überwachung und Validierung von biotechnologischen Prozessen mit neuen Bildverarbeitungstools der In-situ Mikroskopie. Diplomarbeit Universität Hannover
- ⁷⁶ Krabichler C. 2005. Erkennen von Hefezellen in der In-situ Mikroskopie mit Methoden der Bildverarbeitung. Diplomarbeit Universität Hannover

-
- ⁷⁷ M. Baerns, H. Hofmann, A. Renken. 1987. Chemische Reaktionstechnik, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Band 1, S. 321ff
- ⁷⁸ Noda, N H, Matsuura, et al. 2008. Two-dimensional simulation on liquid flows in vessels based on Navier-Stokes equations. International Journal of Innovative Computing Information and Control 4(2): 255-262.
- ⁷⁹ Van Hoek P, Van Dijken J P, Pronk T J. 1998. Effect of Specific Growth Rate on Fermentative Capacity of Baker's Yeast. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 64 (11) : 4226-4232
- ⁸⁰ Sousa M L, Teixeira J A. 1996. Characterization of oxygen uptake and mass transfer in flocculent yeast cell cultures with or without a flocculation additive. Biotechnology Letters 18 (3): 229-234
- ⁸¹ Van Suijdam J C, Kossen N W F, Joha A C. 1978. Model for Oxygen Transfer in a Shake Flask. Biotechnology and Bioengineering 20 : 1695- 1709
- ⁸² Henzler H J, Schedel M.1991. Suitability of the shaking flask for oxygen to microbiological cultures supply. Bioprocess Engineering 7: 123-131
- ⁸³ <http://www.der-brunnen.de/wasser/wasserdaten/wasserdaten.pdf> [07.04.2009]
- ⁸⁴ <http://www.presens.de/products/brochures/category/sensor-probes/brochure/non-invasive-oxygen-sensors/page/overview-1.html> [09.04.2009]
- ⁸⁵ Zhang, Y J, Zhou, et al. 2008. Optimization of seeding density in microencapsulated recombinant CHO cell culture. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 22(1): 105-111.
- ⁸⁶ Pirt S J 1964. Environmental Influences on Growth of L + Erk Mammalian Cells in Shake-Flask Cultures. Experimental Cell Research 33(3): 406-&.

-
- ⁸⁷ Abel A . 2009. Untersuchung zur kontinuierlichen Mikroskopierung von Zellsuspensionen. Diplomarbeit, Universität Hannover
- ⁸⁸ Merziger G, Wirth T. 1999. Repetitorium der höheren Mathematik. 4. Auflage. Binomi Verlag. Springe

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Christoph Rehbock
geb. am 12.03.1979 in Hannover

Schulbildung

1985-1989: Grundschule Glücksburger Weg, Hannover
1989-1991: Orientierungsstufe Ludwig-Windthorst-Schule, Hannover
1991-1998: Gymnasium Lutherschule, Hannover (bilinguales Abitur)

Zivildienst

1998-1999: kath. Pfarramt St. Maria, Hannover

Studium

1999-.2005 : Diplomstudium Chemie an der Leibniz Universität Hannover
14.09.2001: Diplomvorprüfung
26.11.2004: Diplomprüfung
11/ 2004–06 /2005: Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Leibniz
Universität Hannover auf dem Thema:
„Enzymimmobilisierung an superparamagnetischen Silicapartikeln“

Promotion

2005- 2009: Promotionsstudium am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität
Hannover