
ENTWICKLUNG EINES MULTISENSORADAPTERS ZUM EINSATZ IN DISPOSABLE BIOREAKTOREN

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. Steffen Henkel

geboren am 16. Juli 1984 in Hildesheim

2013

Be a physical chemist, an organic chemist, an analytical chemist, if you will; but above all be a chemist.

Ira Remsen (1846-1927)

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

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von Juni 2010 bis November 2012 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt. An dieser Stelle möchte ich bei all jenen bedanken, die während dieser Zeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Die ersten Worte des Dankes gehen an Prof. Dr. Thomas Scheper für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas, seine Unterstützung und interessanten Denkanstöße im Laufe der Promotion. Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats, trotz der weiten Anreise zur Prüfung. PD Dr. Ulrich Krings gilt mein Dank für die sofortige und kurzfristige Bereitschaft die Rolle des dritten Prüfers zu übernehmen. Der Firma Sartorius Stedim Biotech, Göttingen danke ich für die Zusammenarbeit im Verlauf der Promotion, insbesondere Dr. Christian Endres und Dr. Daniel Riechers. Dr. Sascha Beutel gilt mein Dank für die Betreuung, die kompetenten Tipps, Anregungen und Korrekturen. Martina Weiß danke ich für die Hilfe bei den HPLC-Analysen und Fragen des Laboralltags. Die Realisierung der Messwertaufnahme, Ansteuerung verschiedenster Geräte und Klärung sonstiger Fragen in Sachen Elektrotechnik wäre ohne Thorleif Hentrop und Burghard Probst nicht möglich gewesen. Der Feinmechanikwerkstatt, besonders Thorsten Stempel und Friedbert Gellermann, gilt mein Dank für den Bau des Testreaktors und anderer Kleinigkeiten.

Shaobin Lu und Tobias Finkel danke ich für die zeitweise Unterstützung im Labor, Dr. Daniel Landgrebe für die Zusammenarbeit bei der Kultivierung der Hybridoma-Zellen. Meinen Freunden Estabraq Abdulkerim (أختي), Dr. David Bulnes, Janis Dreimann, Anike Ohmes, Gustavo Roth, Daniel Schaper (GZ!), Anke Taborsky, Dr. Elias Tauchert (obrigado meu amigo), Katharina Urmann und Dr. Christoph Wolff (Hannooover!) danke ich für alles. Meinen Kollegen aus Büro 120 gilt mein Dank für die angenehme Atmosphäre über die Jahre. In chronologischer Reihenfolge sind dies: Dr. Andrea Mönster, Dr. Anne Schmidt, Dr. Iliyana Pepelanova, Isabelle Schoenbeck, Daniel Schaper, Robert Ulmann, Ki-Duk Seo, Nadine Rothgänger, Wendy Jane Musgrove, Tobias Finkel und Michailis Nakos. Ich danke allen Spielern des TCI-Fußballteams, inklusive der ständigen Gastspieler aus der Physikalischen Chemie, der II. Herren der Spielvereinigung Hüddessum/Machtsum und der alten Liebe von 1896 für die zeitweilige Ablenkung vom Ernst des Lebens.

Meinen langjährigen Wegbegleitern und Freunden Dr. Florian Bittner und Dr. Sebastian Fessel, die im Laufe der Zeit immer ein Quell der Inspiration waren gilt ebenso mein Dank wie allen weiteren Kollegen und Freunden am Institut für Technische Chemie, die zu nennen den Rahmen sprengen würde, für die schöne Zeit.

Ganz besonders danken möchte ich der Firma Petrofer Chemie H.R. Fischer GmbH + Co. KG, Hildesheim und deren Mitarbeitern für das in mich gesetzte Vertrauen und die Unterstützung während des Verfassens dieser Dissertation.

Last, but not least meinen Eltern und meinen Großeltern für ihre immerwährende Geduld und Unterstützung während des Studiums und im Verlauf der Promotion. Danke!

Zusammenfassung

In den vergangenen Jahrzehnten hat die Einwegtechnologie in verschiedene Bereiche der Biotechnologie Einzug gehalten. Verschiedenste Wirkstoffe in der Pharmaindustrie sowie Produkte der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie werden heute mit Hilfe von Einwegsystemen gefertigt. Während die Reaktortechnik in dieser Zeit große Fortschritte gemacht hat, konnte die Sensortechnologie mit dieser Entwicklung nicht Schritt halten. Für wichtige Prozessgrößen sind inzwischen Sensoren auf dem Markt, die speziell für Einwegreaktoren gefertigt werden. Mit zunehmender Verbreitung in der normalen, alltäglichen industriellen Fertigung wird die Einfachheit der für die Prozesssicherheit Handhabung zunehmend wichtig.

Diese Arbeit stellt die Konstruktion eines Multisensoradapters dar, einem einzigen Port auf welchem sämtliche Sensorik eines Beutelreaktor vereint vorliegt. Hierfür wurden Fluoreszenzsensoren für die Bestimmung von pH und Gelöstsauerstoff, ein Platinthermistor und verschiedene NTCs zur Temperaturmessung, ein Leitfähigkeitsmodul sowie Siebdruckelektroden zur Bestimmung der Metabolite Glucose, Laktat und Glutamat auf ihre Einsetzbarkeit in dem zu konstruierenden Multisensor getestet.

Neben Langzeittests wurde der Einfluss anderer Prozessparameter auf die Analysegröße betrachtet. Hauptaugenmerk lag dabei zum einen auf den empfindlichen Fluoreszenzsensoren, zum anderen auf dem eingesetzten Leitfähigkeitsmodul. Sämtliche Sensoren wurden dabei gegen Referenzanalysemethoden gemessen, um eine Aussage über die Messgenauigkeit der Einwegsensoren treffen zu können.

Nach der Auswahl der geeigneten Sensoren in Einzeltests wurde ein Prototyp des Multisensors konstruiert, welcher in einer Testkultivierung eingesetzt wurde. Dabei konnte die generelle Einsetzbarkeit der Sensoren in einer Kultivierung und die Realisierbarkeit eines solchen Multisensors festgestellt werden.

Abstract

Over the last decade single-use technology has found its' way into different areas of biotechnology. Various agents in pharmaceutical industry as well as products in the food and cosmetics industries nowadays are produced in single-use systems. Reactor technology moved quickly forward during this period, however sensor technology could not compete at this speed. Sensors for all important process parameter are available on the market now. These sensors are especially designed for single-use reactors. As a result of its progressive adoption in common, all-day industrial production, the requirements in regard to the handling of single-use reactors gain increasing importance in guaranteeing a high process reliability.

This work presents the construction of a multisensory adaptor, which combines all the sensors of in a bag reactor to just one port. Tested sensors include fluorescence-based sensors for pH and dissolved oxygen, platinum thermistors and NTCs for temperature, a conductivity module, and screen printed electrodes for the determination of metabolites such as glucose, lactate and glutamate.

In addition to extended duration tests, the influence of other process parameters on the analysed parameter was observed. On the one hand the main focus was on sensitive fluorescence sensors, on the other, the conductivity module. All sensors were tested in comparison to reference analysis methods to evaluate the precision of measurements from the disposable sensors.

After the selection of suitable sensors from their performance in single tests, a prototype of a multi sensor was constructed and tested in a cultivation. Therein determining a general applicability of the sensors to cultivations, and the realisation of a multi sensor.

Key words: disposable bioreactor, single-use sensor, fluorescence patch, multisensor, biotechnology

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Zielsetzung	11
3. Theoretischer Hintergrund	13
3.1. Bestimmung von Prozessgrößen	13
3.1.1. Potentiometrische Messmethoden.....	14
3.1.1.1. Arbeitselektroden.....	14
3.1.1.2. Referenzelektroden	16
3.1.1.3. Referenzelektroden mit Flüssigelektrolyt	18
3.1.1.4. Referenzelektroden mit Gelelektrolyt.....	19
3.1.1.5. Feststoffreferenzelektroden.....	19
3.1.1.6. Gefüllte Polymerelektroden	20
3.1.2. Amperometrische Messmethoden	20
3.1.2.1. Clark-Elektrode	20
3.1.2.2. Kohlenstoffpulverelektroden	21
3.1.3. Optische Messmethoden	22
3.1.3.1. Colorimetrie.....	22
3.1.3.2. Photometrie.....	23
3.1.3.3. Faseroptische Sensoren.....	23
3.1.3.4. Nanosensoren.....	25
3.1.4. Weitere Messmethoden.....	27
3.1.4.1. FETs.....	27
3.1.4.2. Elektrische Leitfähigkeit.....	28
3.1.4.3. Katalyse.....	28
3.1.4.4. pH-Email	28
3.1.4.5. Hydrogele	29
3.1.4.6. NMR.....	29
3.2. Einwegbioreaktorsysteme und ihre Überwachung	29

3.2.1.	Geschichtliche Entwicklung der Einwegreaktortechnik	30
3.2.2.	Einwegsensortechnik.....	31
3.2.3.	Anwendungsbereiche von Einwegreaktorsystemen	34
4.	Experimenteller Teil	36
4.1.	Einzeltests an den pH-Patches	36
4.1.1.	Quellverhalten	38
4.1.2.	Fluoreszenzeigenschaften des Patchmaterials	39
4.1.3.	Etablierung eines Kalibrationsmodells	40
4.1.4.	Kalibration mit unterschiedlichen Ionenstärken	41
4.1.5.	Temperatureinfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Patches.....	42
4.1.6.	Photobleaching.....	43
4.1.7.	Ansprechverhalten des pH-Patches	45
4.2.	Einzeltests an den DO-Patches	50
4.2.1.	Fluoreszenzeigenschaften des Patchmaterials	52
4.2.2.	Kalibration	55
4.2.3.	pH-Abhängigkeit des Patchmaterials	57
4.2.4.	Ionenstärkeabhängigkeit des Patchmaterials	59
4.2.5.	Einfluss der Temperatur auf das Patchmaterial	60
4.2.6.	Langzeittest – Photobleaching	61
4.2.7.	Ansprechverhalten des Patches	64
4.2.8.	Test in einem Modellsystems.....	66
4.3.	Einzeltests am Leitfähigkeitsmodul	69
4.3.1.	Einfluss der Füllhöhe auf die Zellkonstante.....	69
4.3.2.	Einfluss der Orientierung der Sensorkappe auf die Messung	75
4.3.3.	Simulation realer Einsatzbedingungen bei unterschiedlichen Füllständen	78
4.3.4.	Überprüfung der Ergebnisse in einem wippenden System.....	80
4.3.5.	Ansprechzeit des Leitfähigkeitssensors.....	83
4.3.6.	Test der Langzeitstabilität	84

4.4.	Einzeltests mit verschiedenen Temperatursensoren	86
4.4.1.	Test der Langzeitstabilität	87
4.4.2.	Einfluss der Temperaturdifferenz zwischen Medium und Umgebung auf die gemessene Temperatur.....	88
4.4.3.	Ansprechzeit des Temperatursensors	94
4.5.	Verwendbarkeit von Enzymsiebdruckelektroden zur Online-überwachung wichtiger Prozessparameter	98
4.5.1.	Performancetest anhand von Standardreihen.....	99
4.5.2.	In-situ Test	102
4.5.3.	Resultat des Tests.....	106
4.6.	Konstruktion eine Multisensorprototypen	107
4.7.	Test des Prototypen	108
5.	Zusammenfassung und Ausblick	117
6.	Literaturverzeichnis	120
7.	Abkürzungsverzeichnis	126
8.	Anhang	129
8.1.	Material.....	129
8.1.1.	Geräte.....	129
8.1.2.	Verbrauchsmaterialien	130
8.1.3.	Reagenzien	130
8.1.4.	Medien und Puffer	132
8.2.	Methoden	135
8.2.1.	Probenentnahme.....	135
8.2.2.	Lebendzellzählung	135
8.2.3.	Parallele Bestimmung von Glucose- und Laktatgehalt via YSI	135
8.2.4.	Bestimmung des Glutamatgehalts via HPLC	135
8.2.5.	Parallele Bestimmung von Glucose- und Laktatgehalt via HPLC.....	136
8.2.6.	Bestimmung der optischen Dichte	137

8.2.7. Mikroskopische Aufnahme einer <i>Escherichia coli</i> K12 Kultur	137
8.3. Abbildungsverzeichnis	138
8.4. Tabellenverzeichnis.....	142
8.5. Mitarbeit an unterschiedlichen Versuchsteilen.....	143
8.6. Lebenslauf	144

1. Einleitung

Einwegtechnologie hat heutzutage in vielen Bereichen des alltäglichen Lebens Einzug gehalten. Ein Beispiel, das jedem bekannt sein dürfte, ist der Einweggetränkarton mit dem wohl bekanntesten Vertreter dem TetraPak. Hinter der Idee im Jahr 1943 und der weiteren Entwicklung 1946 steckten in erster Linie hygienische Gründe: Während gängige Gefäße wie Milchkannen oder -flaschen nach ihrem Gebrauch gereinigt werden mussten, bestand die Möglichkeit Kartonverpackungen nach steriler Befüllung zu entsorgen, wodurch die Gefahr von Fehlern bei der Reinigung des Gefäßes eliminiert werden konnte. Nebeneffekte waren Einsparungen an Arbeitskraft und Wasser bzw. Reinigungsmitteln. Bis zur letzten Markteinführung sollten weitere Jahre vergehen, doch aus dem heutigen Haushalt sind Verpackungen dieser Art nicht mehr wegzudenken [1].

Vergleicht man die damalige Form dieser Getränkekartons mit ersten Einwegentwicklungen im Bereich der Biotechnologie, so ist eine Ähnlichkeit unverkennbar. Doch nicht nur in der Form ist eine Ähnlichkeit zu sehen, vielmehr gleichen sich auch die Anforderungen in beiden Bereichen. In Bezug auf den Behälter sind es zum einen die Stabilität und zum anderen die Sterilität. Diese sind notwendig, um Kontaminationen und Bruch zu verhindern.

Überträgt man das TetraPak Einwegkonzept auf Bioreaktoren liegt der Unterschied darin, dass es sich bei Bioreaktoren in der Regel um ortsgebundene Anlagen und mit vergleichsweise größeren Volumen handelt. Dieses größere Volumen hat zur Folge, dass ungleich größere Mengen Reinigungschemikalien beim Einsatz von Einwegreaktoren eingespart werden können. Doch auch weitere Faktoren sprechen in der biotechnologischen Industrie für den Einsatz von Einwegreaktoren.

Durch immer stärkere Fluktuationen am Markt, müssen sich Firmen immer schneller auf neue Gegebenheiten einstellen. Kaum eine Firma vermag sich in der heutigen Zeit lange mit nur einem Produkt oder einer Produktlinie am Markt zu halten. Auch die Branchen der Pharmazie und Biotechnologie sind von diesen Mechanismen nicht ausgenommen.

In der Vergangenheit musste bereits während der klinischen Phasen eine Produktionsanlage aus Edelstahl errichtet werden, was im Falle eines Misserfolges in den klinischen Phasen für die Firmen ein enormes finanzielles Risiko darstellte, da die Möglichkeit einer Umnutzung dieser Anlagen nicht in jedem Fall gegeben ist. Durch die Umstellung auf Produktionsstraßen auf Einwegtechnologie kann dieses finanzielle Risiko vermindert werden. Scheitert ein potentieller Wirkstoff in den klinischen Phasen, so können die nicht verwendeten Einwegreaktoren ohne Probleme in einer anderen Produktion eingesetzt werden. Neben einer flexiblen Reaktion auf Marktgegebenheiten, d.h. eine gesteigerte Nachfrage im Falle einer Epidemie oder eine einbrechende Nachfrage durch ein auf den

Markt drängendes Konkurrenzprodukt, können die Pharmafirmen schnell Kapazitäten auf andere Projekte umschichten.

Wie kritisch der Übergang zwischen den Phasen ist, zeigt ein Blick in die Statistik der deutschen Biotechnologie-Branche in Abbildung 1-1. Während sich in den Jahren 2008 bis 2010 stets um die 45 Wirkstoffe in den klinischen Phasen I und II befanden, schafften es nicht einmal jeder Vierte in die klinische Phase III. Bis zur Zulassung reduzierte sich die Zahl der Wirkstoffe noch einmal.

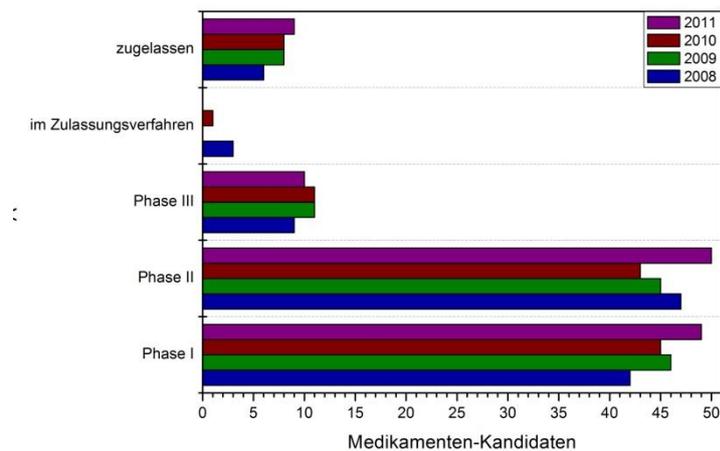


Abbildung 1-1: Medikamenten-Kandidaten deutscher Biotechnologie-Unternehmen [2].

Hier ist die erwähnte flexible Reaktion auf Marktgegebenheiten bzw. auf Ergebnisse der klinischen Phasen gefragt. Einwegreaktoren können die Firmen flexibler und ohne das Risiko einer Fehlinvestition reagieren lassen.

Ein, für den nutzenbringenden Einsatz von Einwegreaktoren, unverzichtbarer Punkt ist das Vorhandensein entsprechender Einwegsensoren, um die Prozesse zu überwachen und gegebenenfalls zu steuern. Die Einwegsensoren hinkt dabei der Entwicklung der entsprechenden Reaktoren hinterher, sodass weitere Forschungen in diesem Bereich notwendig sind.

2. Zielsetzung

Die Biotechnologie stellt in Deutschland einen Wachstumsmarkt dar. Zwischen 2007 und 2011 stieg die Zahl der einschlägig in der Biotechnologie operierenden Firmen in der Bundesrepublik um 11 %, während in der gleichen Zeit die Firmen ihren Umsatz um 30 % erhöhen konnten [2].

Die biotechnologische Produktion von Zusatz- und Wirkstoffen für Pharma-, Kosmetik- und Nahrungsmittelindustrie in Einwegreaktoren bedarf einer angemessenen und zuverlässigen Prozessüberwachung. Diese sollte nach Möglichkeit auf Basis von Einwegsensoren durchführbar sein, da durch jeden unsachgemäß sterilisierten Sensor eine zusätzliche Kontaminationsgefahr in das System eingebracht wird. Ein zweiter wichtiger Aspekt bei der Nutzung von Einwegreaktoren ist die Handhabung durch den Anwender, die möglichst intuitiv und möglichst ohne potentielle Fehlerquellen erfolgen soll.

Der Status quo ist das räumlich voneinander getrennte Vorliegen der Sensoren, wie sie in Abbildung 2-1 am Beispiel von Gelöstsauerstoff- und pH-Sensor im CultiBag (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) gezeigt ist. Zur Prozessbetrachtung müssen die Lichtleiter, welche an die Prozesssteuerungseinheit gekoppelt sind, an den jeweiligen Steckplätzen mit den optischen Sensoren verbunden werden. Durch die vermehrten Handgriffe ergibt sich hier die Gefahr von Fehlanbindungen zwischen Steuereinheit und Sensorpatch. Eine weitere Gefahr stellt die Leckage dar, die durch jede Schweißnaht auf der Außenhaut der Reaktors steigt.

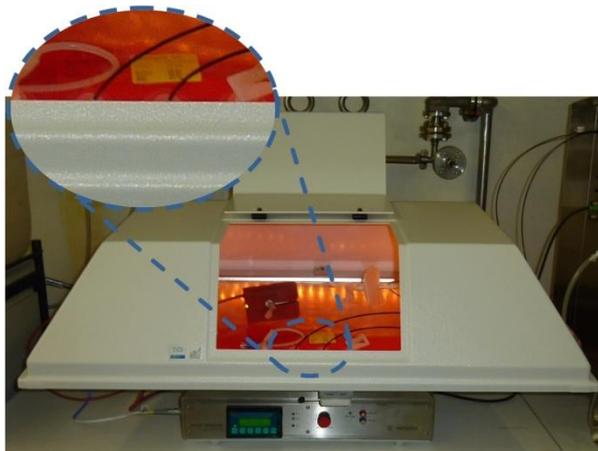


Abbildung 2-1: CultiBag; Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.

Um die Handhabung zu erleichtern und die Gefahr der Leckage zu verringern, wurden im Rahmen dieser Arbeit Sensoren auf ihre Anwendbarkeit in Einwegreaktoren getestet und in einem Multisensoradapter vereinigt. Ausgiebige Tests erfolgten dabei mit Einwegsensoren zur Bestimmung des pH-Werts, des Gelöstsauerstoffs, der elektrischen Leitfähigkeit, der Temperatur und der Metabolite Glucose, Glutamin und Laktat.

Neben einer generellen Einsetzbarkeit wurden die Sensoren dabei auf den Einfluss unterschiedlicher, durch das Messprinzip verursachter, Effekte wie z.B. dem Bleaching getestet. Effekte, die durch das Mischverfahren von Beutelreaktoren auf Rockersystemen hervorgerufen werden können, wurden durch die Simulation einer Wellenbewegung im Reaktor untersucht. Nach einer finalen Auswahl der zu verwendenden Einwegsensorenik wurde ein Multisensordapter konstruiert und im Folgenden in einer Kultivierung getestet.

Ziel bei dieser Entwicklung ist es durch den Multisensordapter die Prozesssicherheit eines Einwegreaktorsystems zu verbessern und die Handhabung für den Endanwender zu erleichtern. Zudem soll eine verbesserte Prozessüberwachung erreicht werden, die neben den bereits eingesetzten Sensoren für Gelöstsauerstoff und pH die Detektion weiterer Prozessgrößen erlaubt.

3. Theoretischer Hintergrund

Schon in der Antike kamen Mikroorganismen zur Produktion von Produkten wie Käse, Wein oder Bier zum Einsatz. Bevorzugt fanden hierbei Hefen Anwendung. Mit der Zeit wuchs die Zahl der angewendeten Verfahren, bis im 19. Jahrhundert mit Louis Pasteur schließlich im 19. Jahrhundert die Ära der Biotechnologie als Wissenschaft begann.

Um die biotechnologischen Prozesse besser zu verstehen, setzte eine zunehmende Instrumentierung der Verfahren ein. Auf diese Weise wurde zum einen das Verständnis dieser Prozesse verbessert, zum anderen ihre Kontrolle und die Effektivität erhöht. Aus diesem Grund liegt auch in heutiger Zeit noch ein Fokus auf der Entwicklung und Verbesserung der Sensortechnologie.

3.1. Bestimmung von Prozessgrößen

In vielen naturwissenschaftlichen Zweigen ist die Überwachung der Prozesse durch entsprechende Instrumentierung vergleichsweise einfach durchführbar. Bedingt durch die Komplexität biotechnologischer Prozesse und der Verknüpfung der Prozessgrößen untereinander, lässt sich die Überwachung in der Biotechnologie schwerer realisieren. Die Komplexität der Prozessüberwachung begründet sich dabei in den erhöhten Anforderungen an die Sensortechnik. So müssen eingesetzte Sensoren zum einen den Bedingungen von Sterilisationsprozessen widerstehen, zum anderen stabil und zuverlässig sein sowie einen ausreichenden dynamischen Messbereich besitzen. Wichtig für die Einsetzbarkeit in der Biotechnologie ist zudem die Stabilität der Sterilbarriere. Probleme im Einsatz können durch Biofouling und enzymatischen Abbau des Sensors verursacht werden [3].

Ein gravierender Unterschied zwischen der Prozessüberwachung in der Biotechnologie und anderen naturwissenschaftlichen Bereichen ist auch die Vielzahl der betrachteten Prozessparameter. Während letztere häufig mit wenigen Standardparametern wie Temperatur und pH-Wert auskommen, werden in biotechnologischen Prozessen auch verschiedenste Stoffwechselprodukte und für die betrachtete Kultivierung wichtige Einflussparameter miteinbezogen. Aus dieser Vielfalt an Prozessgrößen resultiert eine ebenso große Anzahl an Messprinzipien und Sensoren. Je nach Prozess muss aus der Gesamtheit der zur Verfügung stehenden Sensoren eine Auswahl in Bezug auf Prozessgröße, Messbereich und Anwendbarkeit getroffen werden.

Um im Folgenden eine Einschränkung treffen zu können wurde das Augenmerk bei der Beschreibung unterschiedlicher Sensoren das Augenmerk auf die Detektionsmöglichkeiten des pH-Werts gelegt. Teile dieser Darstellung wurden dabei dem Artikel *Determination of pH Value in Biotechnology* [4] entnommen, in dem auch einige Sachverhalte ausführlicher dargestellt wurden. Diese Einschränkung erscheint sinnvoll, da biotechnologische Prozesse in wässrigen Lösungen grundsätzlich einer

Überwachung des pH-Werts bedürfen [5]. Die Messung der Prozessgröße kann dabei in Abhängigkeit der Positionierung des Sensors *in situ* oder *ex situ* erfolgen. Hierbei ermöglicht die *ex situ* Analyse neben der für die Prozesssteuerung wertvollen online Messung, wie sie ebenfalls bei der *in situ* Analyse erhalten werden, auch eine offline Analyse [6].

Die betrachteten Sensormethoden zur Bestimmung des pH-Werts werden in der Folge nach ihren Messprinzipien, beginnend mit der Potentiometrie, aufgeführt.

3.1.1. Potentiometrische Messmethoden

Die Potentiometrie bietet ein breites Spektrum an Möglichkeiten zur Bestimmung des pH-Wertes. Voraussetzung für potentiometrische Messungen ist eine definierte Potentialverteilung bzw. ein gleichbleibendes Potential an der gesamten Messelektrode [7]. Die Messung wird dabei ohne elektrischen Stromfluss durchgeführt. Generell kommen ideal polarisierte und unpolarisierte Elektroden in Frage. Real umsetzbar sind jedoch nur unpolarisierte Elektroden, an deren Oberfläche mindestens eine geladene Spezies mit dem Messmedium wechselwirkt [4, 8].

3.1.1.1. Arbeitselektroden

Zur Durchführung einer elektrochemischen Messung wird ein geschlossener Stromkreis benötigt, in dem mindestens zwei Elektroden zum Einsatz kommen. Dies sind die Referenzelektrode und die Arbeitselektrode [8]. In den folgenden Abschnitten sollen einige Arbeitselektroden vorgestellt werden.

3.1.1.1.1. Glaselektrode

Die gängigste Methode zur Bestimmung des pH-Werts im Laboralltag stellt sicherlich die Messung mit einer Glaselektrode dar. Sie lässt sich im gesamten pH-Bereich einsetzen und ist mit den meisten Messmedien verträglich. Das sensitive Element einer Glaselektrode ist eine Membran aus pH-sensitivem Silikatglas. Bei der Messung bildet sich an der Membran zwischen den im Silikatglas gebundenen Alkaliionen und in der Probe befindlichen Protonen ein Gleichgewicht aus. Dabei entsteht ein elektrisches Potential, welches mit dem pH-Wert korreliert werden kann, wenn sich auf der anderen Seite der Glasmembran eine Arbeitselektrode in einer Lösung mit bekanntem pH-Wert befindet [4, 9-11].

Häufig werden Glaselektroden als Einstabmessketten konstruiert, wobei die Potentialableitung bereits integriert ist. Abbildung 3-1 zeigt den schematischen Aufbau einer solchen Einstabmesskette.

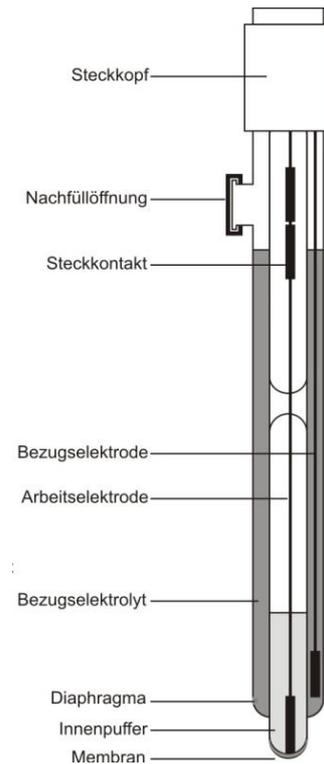


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung einer Einstabmesskette [4].

Die Glasmembran besteht aus einem Spezialglas (rund 70 % SiO_2 , erhebliche Anteile Alkali- und Erdalkalimetalloxide). Die Arbeitselektrode wird vom Innenpuffer umgeben, die Bezugsselektrode vom Bezugsselektrolyten. Das Diaphragma stellt dabei den Kontakt zwischen Bezugs- und Mess-elektrolyten her, so dass die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden mit dem pH-Wert in Bezug gesetzt werden kann [4, 9, 10].

Die elektrische Leitfähigkeit und die mechanische Belastbarkeit der Membran lassen sich durch unterschiedliche Zusätze einstellen. Die Form der Membran kann dabei dem Anwendungsgebiet angepasst werden [4, 9]. Ein Austrocknen der Membran kann durch die Lagerung in 3 - 3,5 M Kaliumchlorid-Lösung verhindert werden [4, 12].

Auch das Diaphragma kann in seiner Form der Beanspruchung durch die Anwendung angepasst werden. Faserdiaphragmen sind günstig, liefern aber schlecht reproduzierbare Ergebnisse. Glasfritten kommen bei hoher Salzfracht und Verschmutzungsgefahr zum Einsatz. Keramikdiaphragmen mindern den Ausfluss des Bezugsselektrolyten, neigen aber zur Verblockung. Platindiaphragmen sind chemisch reinigbar, weisen aber einen hohen Ausfluss auf und können nicht in aggressiven Medien eingesetzt werden. Kommen Kapillardiaphragmen zum Einsatz, wird der Referenzelektrolyt meist eingedickt, um den Ausfluss zu minimieren. Entsprechend werden Lochdiaphragmen nur in Verbindung mit Elektrolytpolymerisaten eingesetzt und eignen sich gut für Messungen in stark verschmutzten

Medien. Schliffdiaphragmen werden für Präzisionsmessungen verwendet, tendieren aber zu hohen Ausflussgeschwindigkeiten [4, 9].

Der Innenelektrolyt ist in der Regel eine Puffersubstanz (z.B. KCl [13]), welche die Alterung der Messkette verhindern soll und nicht ausgetauscht werden kann. Bei der Elektrode handelt es sich meist um einen mit Silberchlorid beschichteten Silberdraht mit konstantem Potential [4, 9].

Verminderte Druck- und Temperaturstabilität beschränken die industrielle Einsetzbarkeit. Spezialgläser ermöglichen den Einsatz unter rauerer Bedingungen. Auch kommen hier Teflon-Diaphragmen und Edelstahlelektroden zum Einsatz [14]. Proteinablagerungen können bei der Messung mit Glaselektroden das Diaphragma verblocken [4, 15]. Sie können jedoch mit Hilfe einer Pepsinlösung entfernt werden [9].

3.1.1.1.2. Antimonelektroden

Die Antimonelektrode hat spezielle Nischenanwendungen z.B. in der Lebensmittelüberwachung, da die Verwendung von Glasbauteilen hier nicht zugelassen ist [4, 16]. Potentialbestimmend ist die Reaktion des Sb_2O_3 zu schwerlöslichem Antimonhydroxid. Problematisch ist die Bildung anderer Oxide in Abhängigkeit von Sauerstoffpartialdruck. Komplexbildner wie Oxalat oder Kationen wie Kupfer können Fehlmessungen verursachen [4, 17].

3.1.1.1.3. Metalloxydelektroden

Andere Metalle wie Iridium, Molybdän und Zirkon können ebenfalls für die Konstruktion von Metalloxydelektroden verwendet werden. Dabei sind sie in eine bis zu 50 μm dicke Kunststoffschicht einpolymerisiert. Trotz eines sehr guten Einstellverhalten (Gleichgewichtseinstellung <1 min) besitzen Metalloxydelektroden ein äußerst beschränktes Einsatzgebiet [4, 9]. Ein Vorteil dieser Elektroden ist es, dass sie sich sehr gut miniaturisieren lassen [4, 18].

Neue Anwendungsbereiche können Iridiumoxid pH-Sensoren auf flexiblen Substraten eröffnen. Gutes Ansprechverhalten, geringe Quer- und Temperaturempfindlichkeit sowie Verformbarkeit sprechen hierfür [4, 18]. In Form von Nanostäbchen werden u.a. Zinkoxydelektroden in Array-Anordnungen eingesetzt [4, 19].

3.1.1.2. Referenzelektroden

Die Potentialbestimmung einer Elektrode setzt das Vorhandensein einer Referenzelektrode voraus. Gängige Referenzelektroden in der Potentiometrie sind die Wasserstoff-, Kalomel- und Silber/Silberchloridelektrode. Verwendung finden sie meist mit flüssigem oder gelförmigem Elektrolyten. Doch auch Referenzelektroden können Probleme verursachen. Diffusionspotentiale

zwischen Referenzelektrolyt und Analyt oder auch die Diffusion selbst sollen hier genannt werden. Verblockungen des Diaphragmas können durch einen leicht erhöhten Innendruck vermindert werden. Auch Austrocknung und Störpotentiale können problematisch sein. Weitere Probleme der jeweiligen Elektroden werden in den einzelnen Unterabschnitten genannt [4, 12, 20, 21].

Tabelle 3-1 zeigt eine Aufstellung möglicher Referenzelektroden.

Tabelle 3-1: Referenzelektroden für die pH-Messung.

Referenzelektrode	Elektrolyt	I/s	Potential [mV]	Literatur
Wasserstoff	HCl	I	0	[22]
Chinhydron	Chinon/Hydrochinon	I	700	[23]
Kalomel	KCl	I	268	[22]
Silber/Silberchlorid	KCl	I	289	[10, 22]
Silber/Silberbromid	0,1 M NaOH	I	71	[22]
Quecksilber/Quecksilber(II)oxid	0,1 M H ₂ SO ₄ 0,1 M NaOH	I	165	[22]
Quecksilber/Quecksilbersulfat	0,1 M H ₂ SO ₄	I	682	[22]
Silber/Silberoxid	0,1 M NaOH	I	165	[22]

3.1.1.2.1. Wasserstoffelektrode

Die Wasserstoffelektrode ist in der Physikalischen Chemie die Standardelektrode. Edelmetalle wie Platin oder Palladium können als Wasserstoffelektrode wirken. Auf dieser Basis definierte Nernst den Nullpunkt der elektrochemischen Potentialskala. Voraussetzung hierfür ist eine Elektrode in einer Lösung der Protonenaktivität von 1 M, umspült von Wasserstoff mit einem Druck von 101,3 kPa. Per Definition ist das Potential einer solchen Elektrode 0 V. Heute wird diese Elektrode wegen der problematischen Handhabung aufgrund der Wasserstoffentwicklung meist nur noch zur Kalibration elektrochemischer Systeme eingesetzt [4, 22].

3.1.1.2.2. Redoxelektroden

Eine der bekanntesten Redoxelektroden ist die Chinhydronelektrode, bei der das Redoxgleichgewicht zwischen Chinon und Hydrochinon genutzt wird. Zum Abtransport der Elektronen wird auch hier Platindraht oder -blech eingesetzt. Das Potential unterscheidet sich gegenüber der Wasserstoffelektrode nur um einen konstanten Faktor, womit die Chinhydronelektrode ohne vorherige Kalibration einsetzbar ist. Ein praxisrelevanter Nachteil ist die Notwendigkeit einer gesättigten Chinhydronlösung, was jedoch durch die Verwendung von Chinhydron-Komposit-Elektroden umgangen werden kann [4, 10, 23, 24].

Die Redoxelektroden der Systeme $\text{Pt}/\text{I}^-/\text{I}_3^-$, $\text{Pt}/\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{Pt}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ und $\text{Pt}/\text{Br}_2/\text{Br}^-$ können ebenfalls als Bezugs Elektroden eingesetzt werden. Da es sich um homogene Systeme handelt, stellt sich bei ihnen schnell ein Gleichgewichtszustand ein [4, 22].

3.1.1.3. Referenzelektroden mit Flüssigelektrolyt

Neben den bereits erwähnten Bezugs Elektroden werden noch weitere Elektroden verwendet. Diese werden nach der Art des standardmäßig in der Elektrode verwendeten Elektrolyten unterteilt. Als erste Gruppe werden im Folgenden die Referenzelektroden mit Flüssigelektrolyt vorgestellt.

3.1.1.3.1. Kalomel-Elektrode

Bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts wird die Kalomel-Elektrode als Alternative der Wasserstoffelektrode eingesetzt. Namensgeber ist die mineralische Bezeichnung des Hg_2Cl_2 , das Kalomel. Durch stetige Verbesserungen und Vereinfachungen in der Handhabung, konnten Potentialschwankungen auf wenige Mikrovolt reduziert werden [4, 22]. Das Standardpotential gibt die Literatur bei 25 °C mit 0,26796 V [25] bzw. 0,26795 V [26] an.

Die Ausfällung von HgS aus dem Analyten durch Disproportionierung des Kalomels kann die Messung verfälschen. Komplexbildner können diesen Effekt verringern, oft ist der Zusatz eines Reduktionsmittels, welches Hg^+ -Ionen zu elementarem Hg reduziert, jedoch sinnvoller. Umgesetzt werden kann dies durch die Zugabe eines edleren Metalles [4, 20].

3.1.1.3.2. Silber/Silberchlorid-Elektroden

Die Silber/Silberchlorid-Elektrode ist eine ungiftige Alternative zur Kalomel-Elektrode, kann aber nur kurzzeitig oberhalb von 50 °C eingesetzt werden kann. [4, 22]. Häufig werden sie als Mikroelektroden eingesetzt, wobei der Draht bei der Herstellung in eine AgCl -Schmelze getaucht werden, um einen AgCl -Vorrat zu gewährleisten [4, 27]. Die Bildung des Komplexions $[\text{AgCl}_4]^{3-}$ in gesättigten Chloridlösungen und die mit der Temperatur steigende Löslichkeit des Silberchlorids stellt ein Problem bei der Applikation der Elektrode dar. Das Standardpotential der Elektrode wird in 0,1 M Kaliumchlorid-Lösung bei 25°C mit 0,2895 V angegeben [4, 10].

3.1.1.3.3. Weitere Flüssigelektrolytelektroden

Weitere Flüssigelektrolytelektroden kommen deutlich seltener zum Einsatz. In erster Linie handelt es sich hierbei um die Systeme Ag/AgBr in 0,1 M NaOH sowie Hg/HgO und Hg/HgSO_4 in 0,1 M H_2SO_4 . Die quecksilberhaltigen Systeme kommen meist anstelle der entsprechenden chloridhaltigen Variante zum Einsatz, wenn ausfließendes Chlorid die Messung stört. Alternativ können in solchen Fällen auch die Systeme $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{O}$ und Hg/HgO in 0,1 M NaOH verwendet werden [4, 22].

Zudem sind Systeme basierend auf Cadmiumoxiden und Thalliumamalgam-Elektroden in einem TlCl/KCl- Elektrolyten literaturbeschrieben. Vermengungen des Amalgams und der TlCl-Paste können Instabilitäten verursachen [22]. Elektrolytisch auf Platin abgeschiedenes Thallium weist hier eine höhere Stabilität auf [4, 28]. Gesättigte Lösungen verursachen starke Hysterese und können zu einer Verblockung des Diaphragmas führen. Daher müssen die Elektrolytkonzentrationen den Elektroden angepasst werden [4, 12]. Um zuverlässige Messwerte zu erhalten, muss der Elektrolyt regelmäßig gewechselt werden und in ausreichender Menge vorliegen [4, 9].

3.1.1.4. Referenzelektroden mit Gelelektrolyt

Ein inhärentes Problem von Elektroden mit Flüssigelektrolyten ist das Ausfließen des Elektrolyten. Dies kann durch die Gelierung des Elektrolyten umgangen werden. Früher kamen hierfür Agar und Gelatine Einsatz, heute vorwiegend Polyacrylamid und Polyvinylalkohol, welche auch in der Lage sind gesättigte Salzlösungen zu fixieren. Ihre grobe Netzstruktur setzt die Beweglichkeit der Ionen im Elektrolyten nur unwesentlich herab. Zudem wird die Druckfestigkeit der Elektrode erhöht, wodurch der Elektrolytverbrauch herabgesetzt und die Haltbarkeit verlängert wird. Auch sind eingedickte Elektroden lageunabhängig verwendbar, d.h. dass hier im Bedarfsfall auch eine Überkopfmontage möglich ist [4, 22].

Diffusion der Messlösung in das Bezugssystem, Phasentrennung, Austrocknung sowie Memory-Effekte, welche die Lebensdauer einer Elektrode herabsetzen können, erweisen sich bei der Messung als problematisch [4, 22]. Die Einbringung von Luftkissen in den Gelelektrolyten kann diese Probleme unter Erhöhung der Druckwechselbeständigkeit teilweise ausgleichen [4, 29].

3.1.1.5. Feststoffreferenzelektroden

Das Potential von Feststoffreferenzelektroden ist in der Messlösung von deren Konzentration und Zusammensetzung unabhängig, wenn die Verteilungskoeffizienten der ausgetauschten Ionen gleich sind. Da dies bei unlöslichen Verbindungen nicht vorkommen kann, konnten bisher keine feststoffkontaktierten Bezugselektroden gefunden werden, die zur äußeren Potentialableitung in der Potentiometrie verwendet werden können [4, 22, 30].

Für ionenselektive Elektroden werden teilweise Feststoffe als inneres Bezugssystem verwendet. Eine solche Elektrode ist das System Ag/AgI/Graphit, welche mit Iod beladen ist [4, 31]. Ein Nachteil feststoffkontaktierter Elektroden ist der außerhalb des Messbereichs befindliche Isothermenschnittpunkt, was die Anwender auf Grund der Robustheit der Elektroden jedoch oft in Kauf nehmen [4, 22].

3.1.1.6. Gefüllte Polymerelektroden

Gefüllte Polymerelektroden werden als Ideallösung für elektrochemische Bezugselektroden angesehen. Dabei ist es erwünscht, dass der Feststoff elektrisch leitend, jedoch im Analyten unlöslich ist. Bei Kaden et al. werden einige Ansätze für gefüllte Polymerelektroden vorgestellt [4, 22].

3.1.2. Amperometrische Messmethoden

Die Gruppe der amperometrischen Sensoren bezieht seine Informationen aus der Beziehung zwischen Stromstärke und Konzentration, d.h. bei der Amperometrie liegt ein Stromfluss mit konstantem elektrochemischen Potential vor. Die amperometrischen Messmethoden leiten sich daher von der Voltammetrie ab, bei der eine zeitliche Änderung der Spannung durchfahren wird [4, 8].

3.1.2.1. Clark-Elektrode

Da amperometrische Messmethoden für die pH-Messung nicht gebräuchlich sind, soll an dieser Stelle auch auf die bekannteste amperometrische Messmethode eingegangen werden, die Clark-Elektrode zur Bestimmung des Gelöstsauerstoffgehaltes eines wässrigen Mediums.

Die Clark-Elektrode, benannt nach ihrem Erfinder Leland Clark, der sie zwischen 1954 und 1956 entwickelte, besteht aus einer negativ geladenen Platin-Kathode und einer Referenzelektrode (i.d.R. aus Silber), die umgeben von einer Elektrolytlösung (z.B. Kaliumchlorid oder Kaliumbromid) vorliegt. Die Kathode ist von diesem Elektrolyten durch eine isolierende Glasschicht getrennt und endet knapp vor einer sauerstoffdurchlässigen Membran (z.B. aus PP oder PTFE) [32]. In der Zone zwischen der Kathode und der Membran wird der Sauerstoff reduziert, während an der Anode Silberionen in Lösung gehen und gemeinsam mit den Bromid-Ionen aus dem Elektrolyten als Silberbromid ausfallen [33]. Damit ergibt sich für die Messung die Reaktionsgleichung:

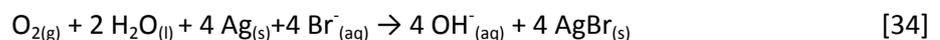


Abbildung 3-2 zeigt eine schematische Darstellung einer Clark-Elektrode.

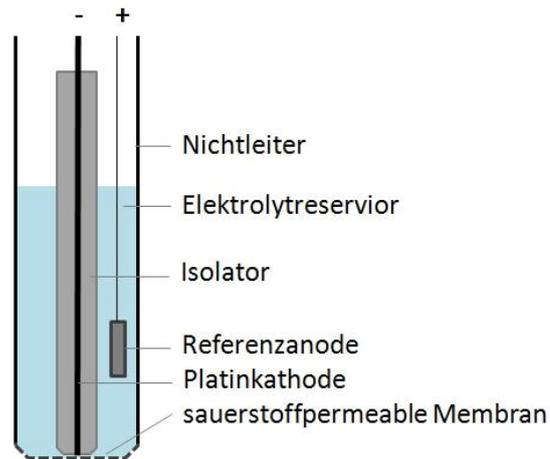


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung einer Clark-Elektrode.

Der Zusammenhang zwischen gemessenem Stromfluss und der Sauerstoffkonzentration ist linear. Um Messfehler zu vermeiden, ist es notwendig die Temperatur zu kontrollieren. Unerlässlich für die Nutzung von Clark-Elektroden ist das Vorliegen eines durchmischten Systems, da die Elektrode Sauerstoff in einem Maß verbraucht, das höher als die Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff in viskosen Medien ist. Zudem muss die Referenzanode regelmäßig von Ablagerungen des Silberhalogenids befreit und der Elektrolyt ausgetauscht werden [33, 34].

3.1.2.2. Kohlenstoffpulverelektroden

Auch für amperometrische Messverfahren zur Bestimmung des pH-Wertes wird auf semipermeable Membranen zurückgegriffen, welche für den Analyten durchlässig sind. An diese Membran wird während der Messung ein konstantes Potential angelegt. Der variierende Stromfluss erlaubt letztlich den pH-Wert einer Lösung zu bestimmen [4, 35].

Auf Basis verschiedener Antrachinonspezies lassen sich reagenzlose pH-Sonden konstruieren, wobei das Antrachinon auf einer Graphitelektrode immobilisiert wird. Mit *Square-Wave*-Voltammetrie kann mit diesen Elektroden in einem Temperaturbereich von 20 - 70 °C in einem pH-Fenster von 1 - 9 ein linearer Zusammenhang erreicht werden [4, 36].

Elektrodensysteme auf Basis von N,N'-diphenyl-p-phenylendiamin [37], Nickelhexacyanoferrat [38] und diversen Antrachinonderivaten [39] sind literaturbeschrieben. Die Lebensdauer einer solchen Elektrode wird mit mehreren Monaten beziffert. Durch Beimischungen ist die Konstruktion robuster, kostengünstiger und vielfältig einsetzbarer Elektroden möglich [40]. Ein Problem ist jedoch das Fehlen geeigneter Festkörper-Referenzelektroden [4, 35].

3.1.3. Optische Messmethoden

Die Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie lassen sich über einen weiten Frequenzbereich beobachten und auch zur Bestimmung des pH-Wertes nutzen; diese optischen Messverfahren sind dabei hochspezifisch. Oft werden die Messungen im Transmissionsmodus durchgeführt, wobei die Änderung des eingestrahlt Lichtes beim Durchtreten der Probe Rückschlüsse auf die untersuchte Prozessgröße erlaubt. Zum Einsatz kommt sowohl Licht mit kontinuierlichem Spektrum als auch monochromatisches Licht. Äußere Bedingungen wie Temperatur und Druck haben Einfluss auf das Messsignal. Weitere Messfehler sind meist durch die Parameter des Messgerätes bestimmt. Lichtquelle, Weglänge, Detektor und die Anordnung der optischen Bauteile sind hier bedeutende Einflussfaktoren [4, 8].

In den folgenden Abschnitten werden unterschiedliche Arten der optischen Messmethoden näher beleuchtet.

3.1.3.1. Colorimetrie

Im Rahmen von Titrations zur pH-Bestimmung wird häufig die Colorimetrie eingesetzt. Basis hierfür ist das Dissoziationsgleichgewicht zwischen protonierter und deprotonierter Form eines pH-sensitiven Indikatorfarbstoffes. Weisen diese Formen des Indikators unterschiedliche Farbigkeiten auf, so kann dies ausgenutzt werden um den pH-Wert einer Lösung zu bestimmen. Der Farbumschlag erfolgt dabei nicht sprunghaft, sondern langsam in einem pH-Bereich von etwa zwei pH-Einheiten, in dem sich eine Mischfarbe aus beiden Farben ausbildet [4, 10].

Indikatorfarbstoffe sind in zwei Kategorien unterteilt: Ein- und zweistufige Indikatoren. Erstere weisen einen Farbumschlag von farblos nach farbig (oder umgekehrt) auf, letztere von einer Farbe in eine andere. Fehler bei der pH-Messung entstehen durch äußere Einflüsse wie Tageslicht, Konzentration und diese Wahrnehmung des Auges. Eigenfärbungen von Salzlösungen können die Wahrnehmung beeinflussen (Salzfehler). Da Indikatoren selbst Säuren oder Basen sind, können sie in ungepufferten Systemen eine Veränderung des pH-Werts verursachen (Indikatorfehler). Eiweiße können durch ihren amphoteren Charakter Indikatoren binden, was eine Bestimmung im Extremfall unmöglich machen kann (Eiweißfehler). Dieses Verhalten ist auch von Kolloiden bekannt (Kolloidfehler). Fehler, die durch die Anwesenheit von Alkaloiden verursacht werden können, können durch die Verwendung von Nitrophenolen als Indikator umgangen werden. Andere Farbstoffe weisen in Anwesenheit von Alkaloiden ungewöhnliche Farbtöne auf (Alkaloidfehler). Ein Alkoholgehalt von 10 % kann eine Verschiebung von 0,1 pH-Einheiten verursachen. Dies steigert sich auf bis zu 1,5 pH-Einheiten bei einem Alkoholgehalt von 70 % (Alkoholfehler) [4, 41].

Die Colorimetrie ist auch die Grundlage für pH-Teststäbchen und Indikatorpapiere. Die Farbstoffe liegen dort in einer Matrix immobilisiert vor. Stäbchen bzw. Papier werden zur Messung in die Testlösung getaucht und mit Hilfe einer Vergleichsskala einem entsprechenden pH-Wert zugeordnet. Neben Fehlern, die mit der visuellen Bestimmung der Farbe einhergehen, spielen auch die zuvor genannten Fehler eine Rolle bei dieser Form der pH-Messung [4, 41].

3.1.3.2. Photometrie

Fehlerquellen der Colorimetrie werden in der Photometrie durch den Einsatz eines anderen Detektors und einer anderen Lichtquelle kompensiert. Messungsgrundlage ist auch hier ein Indikatorfarbstoff. Fortschritte im Bereich der Spektralphotometer haben die Präzision der Photometrie deutlich verbessert [4, 42].

In der Photometrie wird monochromatisches Licht eingestrahlt, welches im Bereich des Absorptionsmaximum absorbiert wird. Durch Detektion des transmittierten Licht, kann der pH-Wert nach einer Kalibration ermittelt werden [4, 43].

3.1.3.3. Faseroptische Sensoren

Faseroptische Sensoren ersetzen den Strahlengang durch einen Lichtleiter, wodurch der Sensor räumlich flexibel eingesetzt werden kann. Die Entwicklung der faseroptischen Sensoren ist in den Bereichen Glasfasern, LEDs und Detektoren eng mit dem Fortschritt in der Telekommunikation gekoppelt [4, 44].

Eine Bauform von faseroptischen Sensoren ist die Optode, wobei die Eigenschaften eines immobilisierten Farbstoffes genutzt werden. Die Immobilisierung selbst kann in zwei unterschiedlichen Formen umgesetzt werden. Bei der Optode ist der Farbstoff direkt auf dem Ende des Lichtleiters aufgebracht, so dass dieser direkt in die Lösung eingebracht wird. Die zweite Möglichkeit ist eine modulare Bauform, die die Konstruktion eines Einwegsensors ermöglicht [4, 45]. Abbildung 3-3 zeigt schematisch den Aufbau einer Optode und eines modularen pH-Sensors.

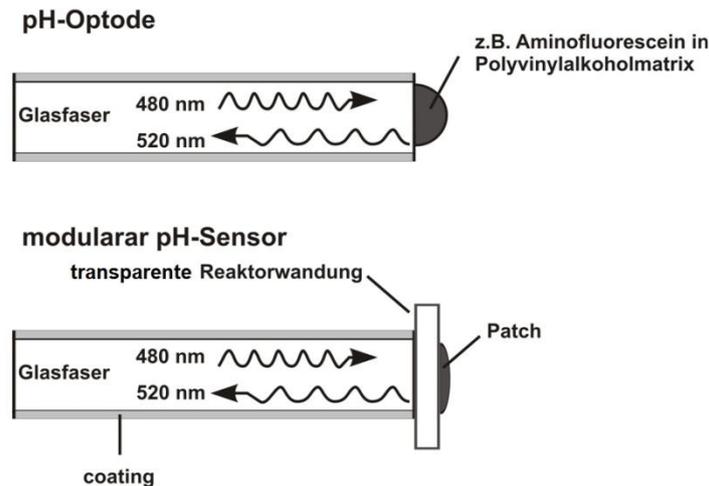


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung einer Optode und eines modularen pH-Sensors; nach [4].

Beide Messanordnungen nutzen die gleiche Messmethode. An einem Ende der Faser wird Licht eingestrahlt, am anderen erfolgt eine Wechselwirkung mit dem immobilisierten Farbstoff. Rückgestreutes Licht bzw. Fluoreszenzemission werden durch den Lichtleiter auf den Detektor zurück geleitet [4, 35].

Faseroptische Sensoren sind nicht stör anfällig gegenüber elektromagnetischen Feldern, jedoch muss eine ausreichende Abschirmung gegen das Umgebungslicht gewährleistet sein. Die eingesetzten Farbstoffe sind oft nicht langzeitstabil und bleichen durch die Bestrahlung aus. Mehrwellenlängen-Detektion kann diesen Effekt verringern.[4, 45].

Der Messbereich ist durch den Farbstoff begrenzt, zudem besteht eine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Ionenstärke. Dem stehen eine leichte Miniaturisierbarkeit, Druckunabhängigkeit und die Möglichkeit von Messungen über große Distanzen als Vorteile gegenüber [4, 45].

Durch ratiometrische Messungen können ungleiche Farbstoffverteilungen auf dem Patch, das Bleaching und Fluktuationen der Lichtquelle nahezu ausgeglichen werden. Grundvoraussetzung hierfür ist das Vorhandensein eines pH-abhängigen und eines pH-unabhängigen Intensitätsmaximums, aus denen das Intensitätsverhältnis gebildet wird. Die Lage der Fluoreszenzmaxima bestimmten dabei den Namen der Messmethode, wie sie in Tabelle 3-2 zusammengestellt sind. Liegen beide Fluoreszenzmaxima bei gleicher Exzitationswellenlänge bei zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen spricht man von *one excitation/two emission*. Entsprechend wird die Messmethode als *one emission/two excitation* bezeichnet, wenn eine Emissionswellenlänge bei zwei unterschiedlichen Exzitationswellenlängen gemessen wird. Unterscheiden sich beide Fluoreszenzmaxima sowohl in der Anregungs- als auch in der Emissionswellenlänge, so kann das das

two excitation/two emission Messprinzip angewandt werden. Ein Ausbluten des Patchmaterials führt in der ratiometrischen Messung nicht zu einer Veränderung des Intensitätsverhältnisses [4, 44].

Tabelle 3-2: Möglichkeiten der ratiometrischen Messung.

Messmethode	Exzitationswellenlängen	Emissionswellenlängen
<i>one emission/two excitation</i>	2	1
<i>one excitation/two emission</i>	1	2
<i>two excitation/two emission</i>	2	2

Tabelle 3-3 zeigt eine Übersicht über einsetzbare Farbstoffe in faseroptischen Messsystemen.

Tabelle 3-3: Für die Fluoreszenzmessung geeignete Farbstoffe [4].

Farbstoff	Messbereich	Messmethode	Literatur
Fluoresceinamin	3-9	Intensität	[46]
H7PS (8-Hydroxyl-1,3,6-Pyrentrisulfonsäure)	6-9	Ratiometrie	[47, 48]
CNF (5-(und 6-)carboxynaphthofluorescein)	6-9	Intensität	[49]
Fluorescein/Sulforhodamin B	5-8	Ratiometrie	[50, 51]
N-allyl-4-(4'-methyl-piperazinyl)-1,8-naphthalimid	6,8-8	Intensität	[52]
Fluorescein Derivate/3-Hydroflavon	5-8	Ratiometrie	[53]

3.1.3.4. Nanosensoren

In der Zellbiologie werden modifizierte Nanopartikel, bei denen die Farbstoffe in eine Matrix eingebunden vorliegen, zur Messung des intrazellulären pH-Wertes eingesetzt. Dies ist durch eine Immobilisierung von Indikator- und Referenzfarbstoff in einer Polyacrylamidmatrix möglich [4, 54].

Langzeitmessungen lassen sich besser mit kovalent angebundenen Farbstoffen durchführen. Dies ist in drei Varianten denkbar, wie sie in Abbildung 3-4 illustriert sind. Die einfachste Möglichkeit ist die homogene Verteilung von Referenz- und Indikatorfarbstoff in einem Partikel (a). Die Farbstoffe können aber auch räumlich getrennt voneinander vorliegen. Diese räumliche Trennung kann entweder durch eine kovalente Anbindung des Indikatorfarbstoffes an die Oberfläche (b) oder durch die Einbindung in unterschiedliche Schichten des Partikels (c) realisiert werden [55].

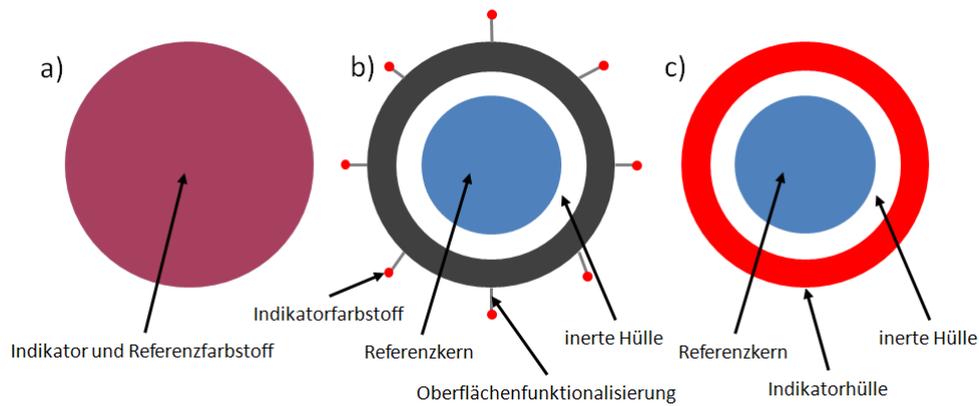


Abbildung 3-4: Aufbaumöglichkeiten eines Nanosensors: (a) homogene Verteilung von Indikator- und Referenzfarbstoff in einem Partikel, (b) Referenzkern umgeben von inerte Hülle und aminofunktionalisierter Oberfläche zur Anbindung des Indikators, (c) Referenzkern mit inerte Hülle und Indikatoraußenschicht.

Homogene Verteilungen in einem Partikel werden durch Copolymerisation der Farbstoffe und des Monomers erreicht, bei der die Farbstoffe kovalent eingebunden werden. Auch bei Bewegung des Partikels aus der Fokusebene ist durch ein konstantes Intensitätsverhältnis eine Bestimmung des pH-Werts möglich [4, 55].

Ein schichtweiser Aufbau des Sensors ist ebenfalls möglich. Hierbei wird der Referenzfarbstoff in die Partikelbasis aus Zeolith eingelagert. Dieser Zeolith wird mit Tetraethoxysilan überschichtet, worauf ein silylierter Indikatorfarbstoff aufpolymerisiert wird [4, 53, 55]. Stattdessen kann der Indikatorfarbstoff auch kovalent angebunden werden. Die Schicht Tetraethoxysilan wird hierfür aminofunktionalisiert und der Indikatorfarbstoff dort angebunden wird [4, 55]. Vielfältige Synthese- und Einbringungsmethoden sind in der Literatur beschrieben [56-61].

Nanosensoren unterliegen den gleichen Problemen wie andere optische Messverfahren. Der dynamische Messbereich lässt sich durch die Kombination mehrerer Farbstoffe erweitern. Voraussetzung für die Umsetzbarkeit ist eine übereinstimmende Anregungswellenlänge für die Fluoreszenzmaxima und ein unterschiedlicher pK_a der Farbstoffe [4, 62]. Durch Kombination lässt sich der Messbereich im Optimalfall verdoppeln [4, 63].

Bestens geeignet sind Nanosensoren für die flächige Bestimmung des pH-Werts u.a. in der Geweberegeneration, da diese Messmethode keinen direkten Kontakt zwischen Messmedium und Indikatorfarbstoff voraussetzt [4, 55]. Durch das Zusammenspiel von Stabilität und Funktion von Proteinen mit dem pH-Wert [4, 64], können pH-Nanosensoren beim Verständnis von Stoffwechselprozessen helfen [4, 63].

3.1.4. Weitere Messmethoden

Neben den häufig verwendeten Messprinzipien der Potentiometrie, den sehr geläufigen optischen Messverfahren und der bereits erwähnten, aber selten verwendeten amperometrischen Sensoren existieren weitere Messmethoden, die in der Folge näher betrachtet werden sollen.

3.1.4.1. FETs

In der Forschung weitverbreitet sind die ISFETs (Ionenselektiver Feldeffekttransistor) [4, 65, 66]. Einer breiteren Verwendung steht die Voraussetzung einer *on chip* realisierbaren Referenzelektrode im Weg [4, 67].

Protonensensitive FETs sind die pHFETs. Sie bestehen aus einer ionenselektiven Membran und einem Messverstärker. Zwischen zwei Halbleiterelektroden (DRAIN und SOURCE) wird der Strom geregelt und der pH-Wert bestimmt. Die Elektroden sind auf einem Substrat aufgebracht, während die dritte Elektrode (GATE) durch Siliciumoxid elektronisch von ihnen isoliert zwischen ihnen positioniert ist. Durch das elektrostatische Feld der GATE-Elektrode wird der Stromfluss zwischen den anderen Elektroden beeinflusst. Ist die GATE-Elektrode aus protonensensitivem Material gefertigt, lässt sich daraus der pH-Wert bestimmen. Auch eine Referenzierung ist bei der Verwendung von pHFETs notwendig [9]. Eine schematische Darstellung eines pHFETs ist in Abbildung 3-5 zu sehen.

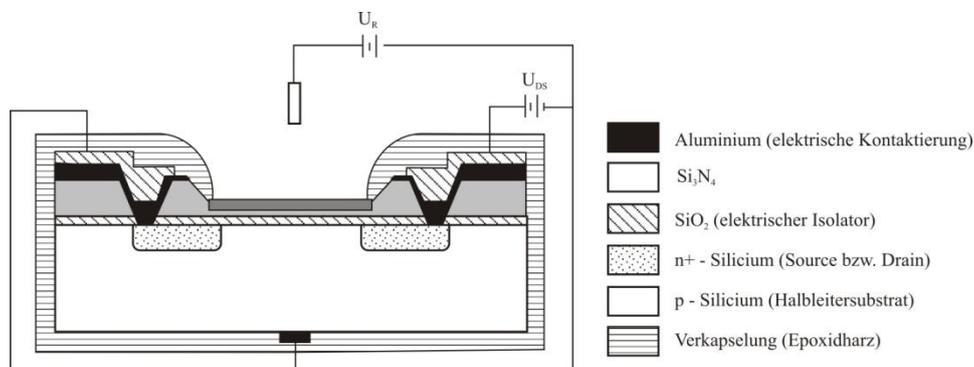


Abbildung 3-5: Schematische Darstellung eines pHFETs [4].

Temperatur- und Lichtempfindlichkeit, Verschmutzungsneigung und Unverträglichkeit mit hohen pH-Werten machen den Einsatz von pHFETs problematisch. [4, 68]. Dem stehen gute Miniaturisierbarkeit und gutes Ansprechverhalten gegenüber [4, 9]. Kompatible Referenzelektroden wurden von Bergveld [65] und Janata [69] beschrieben. Um die Lichtempfindlichkeit zu reduzieren, können Gemische aus Ta₂O₅ und Al₂O₃ eingesetzt werden [4, 70].

pHFETs werden häufig als Basis-Transducer für andere Sensoren eingesetzt [71-75].

3.1.4.2. Elektrische Leitfähigkeit

In starken Säuren oder Basen sind Messergebnisse oft nur begrenzt reproduzierbar, da in diesen Bereichen viele Messprinzipien an die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit stoßen. Auch für farbige Lösungen, die eine colorimetrische Herangehensweise nicht erlauben, bietet Bestimmung des pH-Wertes über die elektrische Leitfähigkeit eine Alternative. Vor einer Messung müssen jedoch mit synthetischen Vergleichslösungen Kalibrierkurven aufgenommen werden. Neutrale Salze beeinflussen die Messung nur wenig [4, 10, 76].

3.1.4.3. Katalyse

Wird eine Reaktion mit bekannter Kinetik von Protonen katalysiert, so lässt sich auch auf diesem Weg der pH-Wert bestimmen. Beispielhafte Reaktionen sind hierfür die von Rohrzucker zu Glucose und Fructose oder die Zersetzung des Diazoessigesters. Während bei der Inversion die Änderung der optischen Polarisation zur pH-Bestimmung herangezogen wird, wird bei der Zersetzung das entstehende Gasvolumen verwendet. Der pH-Wert berechnet sich über die bekannten Geschwindigkeitsgesetze [4, 10].

3.1.4.4. pH-Email

Für Extrembedingungen in industriellen Prozessen sind pH-sensitive Emailsichten, die eine große chemische und mechanische Beständigkeit aufweisen, geeignet. Auf einem chemisch inerten Stahlträger ist eine emaillierte Metallphase aufgebracht, welche der Potentialableitung dient. Auf der Metallphase ist eine pH-sensitive Emailsicht aufgebracht, die ähnlich einer Glaselektrode eine Auslaugschicht ausbildet und als Ionenleiter fungiert [4, 77]. Durch die Auslaugschicht wird die Email schrittweise abgebaut, wodurch die Lebensdauer von der Membrandicke abhängig wird. Bei milden Bedingungen liegt diese bei über 100 Jahren, erhöhte Temperaturen verkürzen diese [4, 77, 78].

Diese Art der Elektroden kann in Lösemitteln, Öl, fetthaltigen und kaum wasserhaltigen Medien eingesetzt werden. Zudem können sie unbegrenzte Zeit trocken stehen und eine Demontage während der Reinigung einer Anlage ist nicht notwendig. Durch CIP-Prozesse wird die Quellschicht zerstört, Heißdampfsterilisationen im Rahmen der SIP stellen diese jedoch wieder her. Bei Temperaturschwankungen weisen pH-Emailsensoren ein hysteresefreies Einstellverhalten auf [4, 77].

Lediglich die Email-Membran unterliegt einer Alterung und bestimmt somit die Lebensdauer des Sensors. Unter Annahme einer starken Abnutzung von 0,1 mm/a, beträgt die Standzeit etwa 5-8 Jahre [77].

3.1.4.5. Hydrogele

Wichtige Anwendung in Biotechnologie und Medizin finden die Hydrogele, die einer Polymerklasse angehören, die auf externe Stimulierung mit einer Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften reagiert. Im Falle der pH-Hydrogele ist der pH-Wert der externe Reiz. Um die Zustandsänderung zu detektieren, werden Hydrogele mit piezoresistiven oder kapazitiven Druckumwandlern gekoppelt. Die hierfür benötigten Bauteile lassen sich leicht miniaturisieren und kostengünstig in großen Stückzahlen fertigen. Die räumliche Trennung zwischen Messlösung und -elektronik ermöglicht zudem den Einsatz als Einwegsensoren [4, 79].

Arbeitsbereich und Sensitivität des Hydrogels lassen sich über die Dicke und das Monomerenverhältnis einstellen. Die Ansprechzeit wird über das Verhältnis Volumen zu Oberfläche bestimmt [4, 79]. Ein vielversprechendes Einsatzgebiet könnte in Zukunft die Bestimmung des Blut-pH sein [4, 80]. Die Beugungsplatte lässt sich durch chemische Behandlung den Bedingungen anpassen [4, 81].

3.1.4.6. NMR

Die kernmagnetische Resonanz (NMR) führt bei der pH-Wert Bestimmung ein Nischendasein. Mittels ^1H -NMR kann unter Zuhilfenahme von Indikator-molekülen in hochbasischen Medien gemessen werden. [4, 82]. In Muskelgeweben lässt sich der pH-Wert über die ^{31}P -NMR bestimmen. Grundlage für diese Technik ist die chemische Verschiebung des anorganischen Phosphors [4, 83].

Für den Einsatz in Einwegbioreaktorsystem werden entsprechende Einwegsensoren benötigt. Im Folgenden wird ein Einblick in die Einwegtechnologie gegeben.

3.2. Einwegbioreaktorsysteme und ihre Überwachung

Eine häufig auftretende Fragestellung ist die Frage nach der Besonderheit von Bioreaktoren im Vergleich zu normalen chemischen Reaktoren. Generell handelt es sich bei einem Reaktor laut Duden um eine „*Vorrichtung, in der eine physikalische oder chemische Reaktion*“ abläuft [84]. Bei einem Bioreaktor hingegen handelt es sich nach der Definition Chmiel um ein geschlossenes System, in welchem ein Organismus ein gewünschtes Produkt unter garantierten Bedingungen exprimiert. Dabei kommt es zum Einsatz von Mischvorrichtungen zur Homogenisierung des Nährmediums [85]. Im Fall von Einwegbioreaktoren handelt es sich dabei nicht um die klassischen Reaktoren aus Edelstahl oder Glas, sondern vielmehr bestehen diese Reaktoren aus einem von der FDA zugelassenen Kunststoff wie PE, PS, PTFE, PP oder EVA. Diese Reaktoren kommen mit

Kleinstvolumina ohne Instrumentierung aber auch mit größeren Volumina mit konventionell gebräuchlichen wie auch mit *single-use* Sensoren zum Einsatz [86].

3.2.1. Geschichtliche Entwicklung der Einwegreaktortechnik

Die ersten Entwicklungen im Bereich der Einwegreaktortechnik reichen in die 1950er und 60er Jahre zurück. So kamen im Jahr 1953 die ersten Blutbeutel der Firma Fenwal Laboratories auf den Markt. Um in großangelegten Screeningprogrammen den Personalaufwand, welcher allein für das Reinigen der Schüttelkolben notwendig ist, zu reduzieren, formulierten Falch und Heden in den 1960ern die Idee Kolben für ein einmaligen Gebrauch zu konstruieren. In ihrem Labor stellten sie aus PP-Folie ihre ersten Versuchsmuster in platzsparender Tetraederform her. Im gleichen Jahrzehnt fanden schließlich Kunststoffflaschen, -kolben, -petrischalen und 96-Wellplatten ihren Weg auf den Markt, wo sie schrittweise den Glasanaloga den Rang abliefen [87-89].

In den kommenden Jahrzehnten folgten schrittweise weitere Technologien, welche den Weg für Einwegreaktoren öffneten. Ein nächster Schritt bestand in der Entwicklung von Hohlfaserreaktoren in den 1970ern [90]. In den 80ern hielten *multi-tray* Zellkultursysteme [91] und später in den 90ern Doppelkammer-Dialysemembran-Bioreaktoren, in denen die Zellen durch eine Dialysemembran vom Medium getrennt vorliegen, Einzug in die Laboratorien [92]. Ebenfalls Ende der 90er Jahre kamen pneumatisch betriebene Einwegreaktoren ähnlich den Blasensäulenreaktoren auf den Markt [93]. Die ersten marktreifen Beutelsysteme zur Lagerung und zum Transport von Puffern und Medien führte Anfang des Jahres 2000 die Firma Hyclone ein [87].

Durch die Marktverfügbarkeit dieses ersten *wave*-Beutelreaktor beeinflusst, kam es im Bereich der Einwegbioreaktoren zu einer großen Vielfalt an Entwicklungen. Ein Hauptunterscheidungsmerkmal ist dabei die Art des angewandten Mischsystems. Neben unterschiedlichen Arten der mechanischen Mischung (horizontal (*wave*) oder vertikal oszillierend, gerührt, Horizontalschüttler) existieren am Markt pneumatische Systeme sowie Hybrid-Systeme [86].

Die heute eingesetzten Reaktorsysteme basieren auf unterschiedlichen Kunststoffmaterialien wie PA, PC, PE, PEST, PP, PTFE, PVC, CA oder EVA, welche nach dem Gebrauch entsorgt werden. Mit Hilfe der marktverfügbaren Einwegkomponenten ist es heute möglich den kompletten *upstream* einer Kultivierung abzubilden. *Im downstream processing* hingegen hat die Einwegtechnologie bisher nicht den Stellenwert einnehmen können, den sie in den anderen Bereichen besitzt. Dies bezieht sich besonders auf den Bereich der großvolumigen Kultivierungen. Die Hauptlimitierungen im *Downstream* liegen hier im Bereich von Prozessparametern wie Durchflussraten und Zentrifugalkraft, die bisher nur mit begrenzten Volumina realisierbar sind (Beispielsweise Single-Use Chromato-

graphiesäulen bis zu einem Volumen von 20 L). Im Bereich von Klein- und Mittelvolumina haben Einwegkomponenten hingegen auch ihre Einsatzbereiche gefunden [87].

In der Praxis werden häufig hybride Produktionsanlagen betrieben, was eine Kombination aus Einwegtechnologie und konventionellem Glas/Edelstahl-Laborgerät bedeutet. Planungen, die erste komplett in Einwegtechnologie realisierte Produktionsanlagen beschreiben, sind bekannt. Marktführend auf dem Bereich der Einwegreakorteknik sind aktuell die Firmen GE Healthcare, Merck Millipore und Sartorius Stedim Biotech [87].

3.2.2. Einwegsensortechnik

Verglichen mit traditioneller Reaktortechnik ist das Angebot an Sensortechnologien bis zum heutigen Tag noch eingeschränkt [75]. Auch im Bereich der Einwegsensortechnik ist die Möglichkeit von *in situ* und *ex situ* Messungen gegeben. Eine wichtige Bedingung an die *in situ* Sensorik ist dabei die Sterilisierbarkeit, welche für *ex situ* Sensoren nicht gegeben sein muss, da dort kein Kontakt zum Messmedium besteht [87].

Die Marktverfügbarkeit von Sensoren ist in Abhängigkeit vom gemessenen Prozessparameter unterschiedlich. Eine gute Marktsituation für den Anwender, bedingt durch eine Vielzahl an Anbietern, besteht im Bereich der Druck-, Temperatur-, Gelöstsauerstoff-, Kohlenstoffdioxid und pH-Sensoren. Für andere Sensoren existieren oftmals nur wenige Anbieter und es ist (bisher) keine Integration dieser Sensoren in Einwegreaktorsysteme möglich. Tabelle 3-4 zeigt Sensorsysteme, welche direkt in Einwegreaktoren integriert werden können, aufgeführt nach ihrem jeweiligen Messprinzip.

Tabelle 3-4: Auswahl integrierbarer Einwegsensorsysteme, sortiert nach ihrem Messprinzip; nach [87].

Messprinzip	Prozessgröße
optisch	Strömung, Gelöstsauerstoff (DO), pH
potentiometrisch	pH
amperometrisch	Glucose, Lactat, Glutamat
physikalisch	Druck
mechanisch	Druck
elektrisch	Temperatur
Impedanz	Leitfähigkeit

Oft steht der Anwendung im Einwegreaktorsystem noch der Aufwand für den Einsatz im Weg. Auch zu große Spezifität, ein nicht ausreichender Messbereich oder unzureichende Genauigkeit verhindern

häufig die Marktreife der Sensoren. Die Auflistung in Tabelle 3-4 zeigt, dass die üblichen Prozessparameter z.T. über mehrere Messprinzipien greifbar sind. In der Regel werden diese Sensoren auch von mehreren Anbietern vertrieben. Prozessgrößen wie Durchfluss und elektrische Leitfähigkeit sind nur beschränkt marktverfügbar. Es stehen nur wenige Systeme von einzelnen Herstellern zur Verfügung. Auch die Bestimmung von Substraten und Metaboliten stellt nachwievor ein Problem dar. Diese lassen sich jedoch stets *ex situ* bestimmen, sei es mit Einweg- oder konventionellen Sensoren [87].

Da keine Standardports in Einwegreaktorsystemen vorhanden sind, wird die Anbindung von *ex situ* Sensorik an diesen Reaktortyp erschwert. Zudem ist der Wechsel auf einen anderen Sensorik-Anbieter meist nicht umsetzbar. Es gibt Bestrebungen dies durch die Einführung eines Standardports zu ändern [87].

Tabelle 3-5 zeigt eine Auswahl marktverfügbarer Sensoren, die zur Prozessüberwachung eingesetzt werden können.

Tabelle 3-5: Auswahl marktverfügbarer Sensoren für die Prozessüberwachung.

Prozessgröße	Messprinzip	Einweg? Sterilisierbarkeit?	Anbieter Ort	Literatur
<i>in situ</i> Sensoren				
Biomasse	Impedanz	Nein Ja	Aber Instruments Aberystwyth, UK	[94]
Biomasse	Impedanz	Nein Ja	Fogale Biotech San Francisco, USA	[95]
CO ₂	optisch	Ja, modular vorsterilisiert	PreSens Precision Sensing Regensburg, D	[96]
Druck	physikalisch	Ja vorsterilisiert	Finesse Solutions Santa Clara, USA	[97]
Druck	physikalisch	Ja vorsterilisiert	PendoTECH Princeton, USA	[98]
Druck	physikalisch	Ja Ja	SciLog Madison, USA	[99]
Durchfluss	Coriolis	Nein Ja	PendoTECH Princeton, USA	[100]
Gelöstsauerstoff	amperometrisch	Nein Ja	Hamilton Bonaduz AG Bonaduz, CH	[101]
Gelöstsauerstoff	optisch	Ja vorsterilisiert	Finesse Solutions Santa Clara, USA	[102]
Gelöstsauerstoff	optisch	Nein Ja	Finesse Solutions Santa Clara, USA	[103]
Gelöstsauerstoff	optisch	Nein Ja	Hamilton Bonaduz AG Bonaduz, CH	[104]
Gelöstsauerstoff	optisch	Ja, modular vorsterilisiert	Ocean Optics Dunedin, USA	[105]
Gelöstsauerstoff	optisch	Ja, modular vorsterilisiert	PreSens Precision Sensing Regensburg, D	[106]
Gelöstsauerstoff	polarographisch	Nein Ja	Finesse Solutions Santa Clara, USA	[107]

Prozessgröße	Messprinzip	Einweg? Sterilisierbarkeit?	Anbieter Ort	Literatur
Glucose	enzymatisch	Ja vorsterilisiert	C-CIT AG Wädenswil, CH	[108]
Glutamat	enzymatisch	Ja vorsterilisiert	C-CIT AG Wädenswil, CH	[108]
Laktat	enzymatisch	Ja vorsterilisiert	C-CIT AG Wädenswil, CH	[108]
Leitfähigkeit	elektrisch	Nein Ja	Hamilton Bonaduz AG Bonaduz, CH	[109]
Leitfähigkeit	elektrisch	Ja vorsterilisiert	PendoTECH Princeton, USA	[110]
Leitfähigkeit	elektrisch	Ja Ja	SciLog Madison, USA	[111]
pH	optisch	Ja vorsterilisiert	Finesse Solutions Santa Clara, USA	[112]
pH	optisch	Ja, modular vorsterilisiert	Ocean Optics Dunedin, USA	[113]
pH	optisch	Ja, modular vorsterilisiert	PreSens Precision Sensing Regensburg, D	[114]
pH	potentiometrisch	Nein Ja	Finesse Solutions Santa Clara, USA	[115]
pH	potentiometrisch	Nein Ja	Hamilton Bonaduz AG Bonaduz, CH	[116]
Temperatur	elektrisch	Ja vorsterilisiert	PendoTECH Princeton, USA	[117]
Temperatur	elektrisch	Ja Ja	SciLog Madison, USA	[118]
UV-Absorption	optisch	Ja vorsterilisiert	PendoTECH Princeton, USA	[119]
Zelldichte	optisch	Nein Ja	Finesse Solutions Santa Clara, USA	[120]
<i>ex situ</i> Sensoren				
Ethanol	enzymatisch	Ja Nein	Jobst Technologies Freiburg, D	[121]
Ethanol	enzymatisch	Ja Nein	TRACE Analytics Braunschweig, D	[122]
Glucose	enzymatisch	Ja Nein	Jobst Technologies Freiburg, D	[121]
Glucose	enzymatisch	Ja Nein	TRACE Analytics Braunschweig, D	[122]
Glutamin	enzymatisch	Ja Nein	Jobst Technologies Freiburg, D	[121]
Laktat	enzymatisch	Ja Nein	Jobst Technologies Freiburg, D	[121]
Laktat	enzymatisch	Ja Nein	TRACE Analytics Braunschweig, D	[122]
Methanol	enzymatisch	Ja Nein	Jobst Technologies Freiburg, D	[121]
Methanol	enzymatisch	Ja Nein	TRACE Analytics Braunschweig, D	[122]
Saccharose	enzymatisch	Ja Nein	TRACE Analytics Braunschweig, D	[122]
Wasserstoffperoxid	enzymatisch	Ja Nein	Jobst Technologies Freiburg, D	[121]

3.2.3. Anwendungsbereiche von Einwegreaktorsystemen

Ein im Bereich der Einwegbioreaktorsysteme bedeutsamer Anwendungsbereich ist die Produktion von Biotherapeutika. Diese werden sowohl aus körpereigenen als auch körperfremden humanen Stammzellen oder T-Zellen gewonnen. Seit den frühen 1990er Jahren fanden diese, auch Zelltherapeutika genannt, ihren Weg auf den Markt der personenspezifischen und regenerativen Medizin. Neben Haut, Knorpel und Knochen wird auf diesem Weg auch das erste personenspezifische Sipuleucel-T (Einsatz gegen Prostatakrebs) gewonnen [87, 123]. Eine Vielzahl von Zelltherapeutika durchläuft momentan die klinische Erprobungsphase [124]. Im Gegensatz zu etablierten Prozesswegen ist die Zelltherapie noch sehr jung und bedarf, um einen kommerziellen Erfolg darzustellen, neuer und innovativer Technologien im Bereich der Einwegreaktortechnik [87].

Hergestellt werden Zelltherapeutika momentan in Einwegbioreaktoren mit einem Volumen von 1 - 30 L [125]. Da beim Einsatz einiger Stammzelltypen Adhärenz gewährleistet werden muss, drängen in diesem Bereich Perfusions- und Microcarriertechnologien wieder in den Vordergrund. Auch müssen Kultursysteme entwickelt werden, die eine Stammzellvermehrung ohne den Verlust der Differenzierbarkeit ermöglichen. Hier fehlen insbesondere im Bereich des *downstream processing* Lösungen aus der Einwegtechnologie. Die verwendeten Systeme stammen aus der Blutaufarbeitung und sind nur eingeschränkt für die benötigten Kulturvolumina geeignet. Auch die Bereiche der Abfüllung inklusive Automatisierung und der Kryokonservierung bedürfen Alternativen, welche in diesen Maßstäben arbeiten können [87].

Auch im Bereich der Herstellung mikrobieller Nischenprodukte, Produktionsverfahren mit Algen sowie pflanzlichen Suspensionszellen, Wurzelkulturen und auf mesenchymalen Geweben basierenden Produkten für Bereiche der Pharma-, Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie können Einwegbioreaktoren eingesetzt werden [87].

Zurzeit wird die Einwegtechnologie in erster Linie als Screeningplattform im mL-Volumen für mikrobielle Produkte verwendet. 96-Wellplatten, Deepwellplatten und Falcontubes kommen hier zum Einsatz. Der Verwendung in größerem Maßstab steht aber der Kostenfaktor bei der Anschaffung der Kultivierungseinheiten im Weg. Etabliert hat sich die Einwegreaktortechnologie bisher nur in Bereichen der mikrobiellen Zellkultivierung, in der Sicherheitsanforderungen eine besondere Rolle spielen. Dies ist bei der Produktion von Pathogenen für inaktivierte Vakzine der Fall. Ein anderer Bereich, in dem sich die Einwegreaktortechnologie bei der Herstellung mikrobieller Produkte durchgesetzt hat, ist die Produktion kleiner bzw. mittlerer Volumina hochpreisiger Produkte (bis zu 250 L) [87]. Probleme verursacht besonders der limitierte Sauerstoffübergang in wellendurchmischten Beutelsystemen [126]. Trotz aller Beschränkungen wurden Einwegbioreaktoren

bereits für fakultative Anaerobier eingesetzt [127, 128]. Mit Hilfe speziell angepasster Einwegreaktorsysteme sind diese ohne größere Einschränkungen für mikrobielle Kultivierungen einsetzbar [87].

Ohne weitere Modifikationen lassen sich Einwegbioreaktoren für die Kultivierung von heterotropher Algen einsetzen. Untersuchungen zeigten, dass die Einwegbioreaktoren in diesem Bereich Vorteile bei der Entwicklung von Hochzelllichtprozessen mit sich bringen. Bedingt ist dies durch den hohen Salzgehalt der Kultivierungsmedien mariner Mikroorganismen, welche in konventionellen Edelstahlreaktoren zur Korrosion führen. Spezialbeschichtungen, die den Einsatz eines solchen Mediums erlauben würden, sind in gerührten Systemen nur mit hohem Aufwand realisierbar. Kunststoffreaktoren weisen diese Empfindlichkeit gegenüber den Salzgehalten des Mediums nicht auf. Durch Entwicklungen auf dem Gebiet der Photodioden bietet sich für Einwegreaktorsysteme auch die Perspektive für den Einsatz mit phototrophen Kulturen. So werden bereits Einwegreaktoren mit LED-Beleuchtung auf dem Markt angeboten. Auch für die Kultivierung von Mikroalgen eignen sich bestimmte Typen von Einwegreaktoren [87].

Zell- und Gewebekulturen von Pflanzen werden als potente Produktionskulturen im Bereich der Pharma-, Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie eingesetzt. Zielprodukte sind hierbei Sekundärmetabolite und Glykoproteine bei deren Expression Einwegbioreaktoren bereits seit längerer Zeit eingesetzt werden [129]. Die Zahl der verwendeten Systeme hat sich bis heute deutlich vermehrt. Verwendung finden unter anderem wellendurchmischte [130, 131] und gerührte Systeme [129], pneumatisch angetriebene Blasensäulen [132-134], Bettbioreaktoren [135] und hybride Systeme [136] mit bis zu 400 L Volumen. Doch auch hier fehlen an die Produktionsorganismen angepasste Einwegreaktoren [87].

Der folgende Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Konstruktion eines Multisensorsystems zum Einsatz in Einwegbioreaktoren, beginnend bei der Auswahl und Testung der einzelnen Sensorkomponenten über die Konstruktion eines Prototypen bis hin zu dessen Erprobung.

4. Experimenteller Teil

In einem ersten Schritt wurden die Einzelkomponenten des geplanten Multisensors sowie einige weitere potentielle Sensoren getestet. Ziel hierbei war es die Verlässlichkeit der erhaltenen Messdaten ebenso zu untersuchen, wie eine mögliche Verwendbarkeit in einem gewippten Beutelreaktor. Nach diesen Tests erfolgte die Konstruktion eines Multisensorproto-typen und dessen Erprobung.

4.1. Einzeltests an den pH-Patches

Vor Beginn der eigentlichen Tests musste der Markt auf verfügbare Sensortechnologien zur pH-Messung sondiert werden. Während Einwegreaktoren wie der Hyclone SUB (Thermo Scientific) und der Xcellerex XDR (Xcellerex) gängige Sensoren verwenden, wird im Bereich der Einwegbioreaktoren auch verstärkt auf optische Sensoren zurückgegriffen [137]. Ein Vorteil der konventionellen Sensoren ist dabei der deutlich größere Messbereich. Allerdings bedürfen sie eines größeren Aufwandes bei der Integration in einen Einwegbioreaktor, da auch Einweg-Glaselektroden nicht trocken gelagert werden können. Gängige Einwegsensoren zur pH-Messung sind in Tabelle 4-1 aufgeführt.

Tabelle 4-1: Gängige Einwegsensoren zur pH-Messung.

Anbieter	Produktname	Messbereich	Messprinzip	Literatur
Finesse Solutions, LLC, Santa Clara	TruFluor pH	5,5 - 8,5	Echtzeit Phasenfluorimetrie	[112]
Fluorometrix Corp., Baltimore	Cellphase pH	5,5 - 8,5	Fluoreszenzintensität	[138]
Presens GmbH, Regensburg	Non-Invasive pH sensor	5,5 - 8,5	Fluoreszenzlebenszeit	[139]
Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen	Single Use Glass Electrode	0 - 11	Potentiometrisch	[140]
	Sensolux pH	5,5 - 8,5	Fluoreszenzintensität	[141, 142]

Die kompliziertere Handhabung der Einweg-Glaselektroden führte bei der Auswahl der Sensortechnologie dazu, dass die Wahl auf die fluoreszenzbasierten Methoden fiel. Neben einer guten Sterilisierbarkeit und dem kultivierungstypischen pH-Messbereichs zwischen pH 5 und 9, war die einfache Möglichkeit einer Entkopplung zwischen Sensorkopf und Messgerät eine weitere Anforderung an das ausgewählte Sensorsystem. Hier unterscheiden sich die fluoreszenzbasierten nur wenig voneinander, so dass aus Gründen der Verfügbarkeit letztlich die Fluoreszenzpatches aus der Sensolux Reihe der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen für die weiteren Versuche ausgewählt wurden. Das Material dieser Patches besteht aus einem Polyethylenglycol-(PEG)-Hydrogel in dem Dihydroxypyrensulfonsäure (Abbildung 4-1) als pH-sensitiver Farbstoff immobilisiert und kovalent eingebunden vorliegt. Zur besseren Stabilisierung ist der Membran Cellulose zugesetzt.

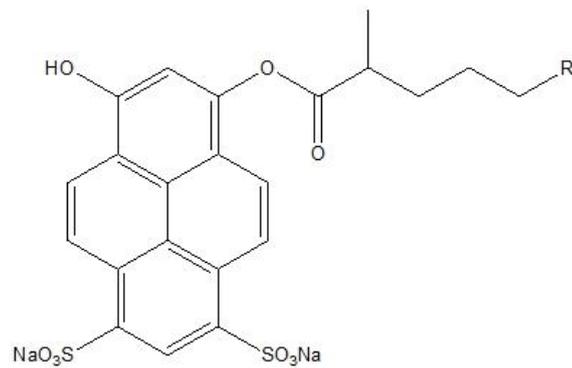


Abbildung 4-1: Natriumsalz der Dihydroxypyrenedisulfonsäure; R ist ein beliebiges PEG-Substituent.

Abbildung 4-2 zeigt den grundlegenden Aufbau und den Strahlengang bei der pH-Detektion im verwendeten System. Das Patchmaterial (SP) wurde zur Verwendung aus einem Bogen des Materials ausgestanzt und auf ein optisches Fenster (OF) verklebt, welches in der Reaktorwandung (RW) eingelassen wurde. Dabei wies die fluoreszenzaktive Seite des Patches stets zum Fenster hin, so dass die Anregung wie die Detektion durch das Fenster erfolgen konnte. Dies wird durch den Einsatz von Lichtleitern (LWL) ermöglicht, wobei die Länge des Lichtleiters individuell einstellbar ist. Die gesamte Steuerung übernahm dabei eine Sensolux-Steuereinheit (DSP), wie sie in bereits bestehenden Schüttelkolbensystem eingesetzt wird.

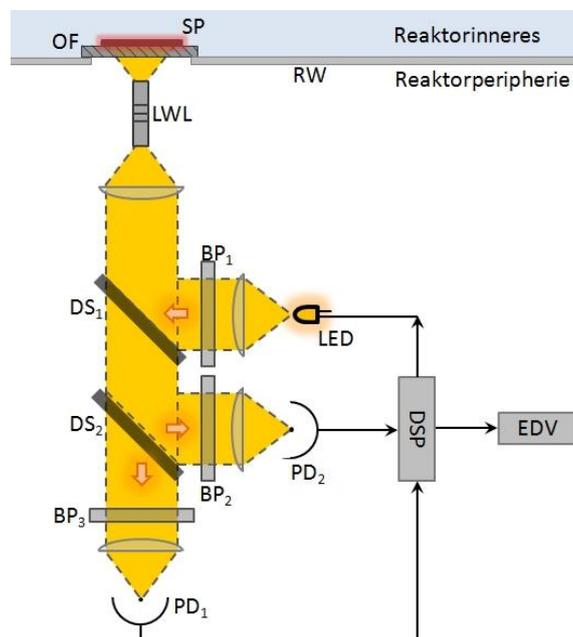


Abbildung 4-2: Strahlengang des Sensoluxsystems bei der pH-Detektion nach [143].

Das Anregungslicht wird durch eine LED bereitgestellt, deren Licht nach dem Passieren einer Linse und eines Bandpassfilters (BP) von einem dichroitischen Spiegel (DS) auf eine weitere Linse umgeleitet wird, welche das Licht bündelt und in den Lichtwellenleiter einspeist. Der Lichtwellenleiter lenkt das Anregungslicht, wie bereits beschrieben, auf den Sensorpatch. Dort wird

eine vom pH-Wert abhängige Fluoreszenz induziert, deren Fluoreszenzemission durch den Lichtwellenleiter zurückgeleitet wird. Der erste dichroitische Spiegel wird von dem Emissionslicht passiert, während es am zweiten aufgespalten wird. Dies ist notwendig, da es sich bei dem eingesetzten Messverfahren um die *single excitation dual emission* Methode handelt, was auch in Kapitel 4.1.2 noch einmal verdeutlicht wird.

Das aufgespaltene Licht passiert im Folgenden einen Bandpassfilter (BP), welcher jeweils auf die Wellenlänge eines der Fluoreszenzmaxima angepasst ist. Nach dem Bandpassfilter folgt eine weitere Linse, die das Emissionslicht auf eine Photodiode fokussiert, welche schließlich ihr Signal an den Digital Signal Processor (DSP) weiterleitet. Von dort gelangen die Daten zur weiteren Verarbeitung im Programm Sensolux control V 1.0.12.0 (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) in der EDV.

4.1.1. Quellverhalten

Hydrogele absorbieren bei Kontakt mit wässrigen Lösungen Wasser, was ein Aufquellen des Hydrogels zur Folge hat. Um in folgenden Experimenten einen Einfluss dieses Quellvorgangs auf die Messung ausschließen zu können, wurde das Quellverhalten der verwendeten Sensorpatches untersucht. Dabei wurden mehrere Patches auf einem Objektträger verklebt und mit Hilfe einer Mikrometerschraube die Dicke der einzelnen Kombinationen vermessen. Die Quellung erfolgte bei 37 °C in einem Phosphat-Puffer (pH 7,1; Ionenstärke (IS) 150 mM; Tabelle 8-3). In diesen wurden die Patches verbracht. Zur Messung wurden sie entnommen und erneut mit der Mikrometerschraube vermessen.

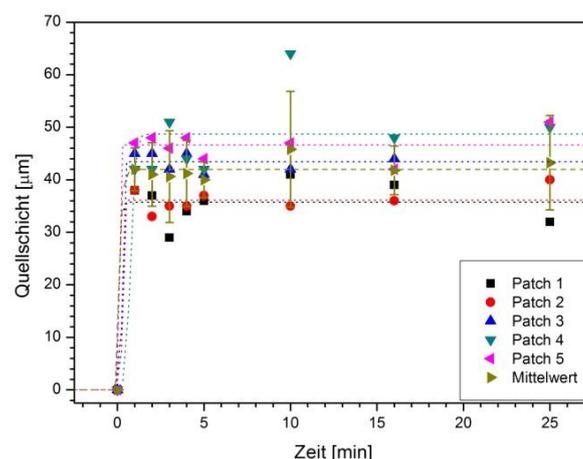


Abbildung 4-3: Zeitlicher Verlauf der Quellung des Patchmaterials.

Abbildung 4-3 zeigt die ermittelte Dicke der Quellschicht der einzelnen Patches, eine genäherte Wachstumsfunktion und den ermittelten Mittelwert. Die Dicke des trockenen Sensorpatches wurde

dabei als Startwert gleich null gesetzt, sodass sämtliche weiteren Werte als Dicke der Quellschicht angesehen werden können. Diese wurden dabei gegen die fortschreitende Quellzeit aufgetragen. Als Startparameter für die Näherungsfunktion wurde der Startwert festgesetzt. Es ist zu erkennen, dass der Quellvorgang äußerst schnell abläuft. Bereits nach einer Minute ist dieser abgeschlossen. Die Näherungsfunktionen können nur eine qualitative Aussage über den Quellungsverlauf geben, da es auf Grund des Messaufbaus nicht ohne weiteres möglich ist eine Aussage über den realen Verlauf der Quellung innerhalb der ersten Minute zu treffen. Im Mittel quellen die Patches $41,96 \pm 5,96 \mu\text{m}$. Dies entspricht einer Standardabweichung von 14,2 %. Die einzelnen Patches weisen hierbei keine gleichmäßige Quellung auf, jedoch kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass bei einer Quellzeit von 15 min garantiert werden kann, dass Quelleffekte bei den Messungen keine Rolle spielen.

4.1.2. Fluoreszenzeigenschaften des Patchmaterials

Um die Fluoreszenzeigenschaften des Patchmaterials darzustellen, wurde ein Stück des Materials auf einen Probenträger verklebt. Dieser wurde diagonal in einem Quarzglas-Küvette eingebracht. Mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers F-4500 (Hitachi High Technologies, Tokio) erfolgte im Anschluss die Aufnahme des Fluoreszenzspektrums. Ein Beispielspektrum ist in Abbildung 4-4 dargestellt. Dem Spektrum können Fluoreszenzmaxima bei den Wellenlängen Ex 405 nm / Em 440 nm und Ex 405 nm / Em 505 nm entnommen werden. Dabei lässt sich erkennen, dass der Peak bei der längeren Emissionswellenlänge eine deutlich höhere Intensität aufweist, als bei der kürzerwelligen.

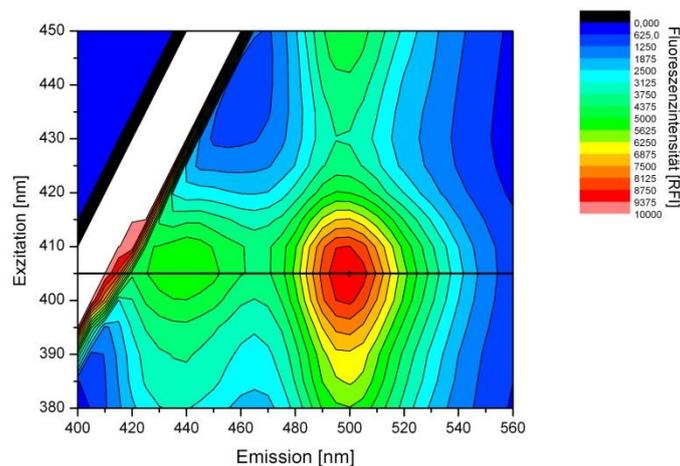


Abbildung 4-4: 2D-Fluoreszenzspektrum eines pH-Patches bei pH 7.

Abbildung 4-5 zeigt eine Zusammenstellung von Emissionsspektren mit variierendem pH-Wert bei einer Exzitationswellenlänge von 405 nm. Da es sich bei der Fluoreszenz um eine relative Messgröße handelt, wird die Fluoreszenz hierbei auf den jeweiligen Maximalwert normiert. Es erfolgt hierdurch

eine Normierung auf das längerwellige Emissionsmaximum. Das Maximum bei kürzerer Emissionswellenlänge zeigt jedoch eine Abhängigkeit vom pH-Wert. So nimmt die Fluoreszenzintensität mit steigendem pH-Wert ab. Dieser Umstand lässt sich für eine ratiometrische Intensitätsmessung ausnutzen, bei der ein Peak, in diesem Fall das langwelligere Emissionsmaximum, als interne Referenz dient.

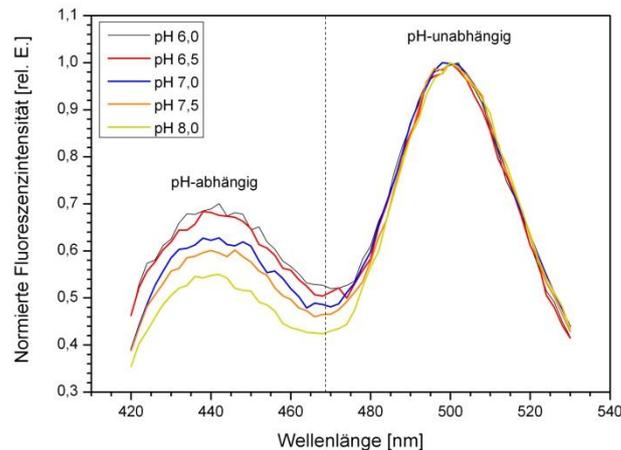


Abbildung 4-5: Fluoreszenzantwort der Sensormaterials bei einer Anregung von 405 nm.

4.1.3. Etablierung eines Kalibrationsmodells

Auf Basis der Erkenntnisse aus Abbildung 4-5 wurde ein Kalibrationsmodell erstellt. Aus den bei der Messung anfallenden Intensitätsverhältnissen sollte hierbei eine Funktion abgeleitet werden, aus der sich der pH-Wert berechnen lässt. Hierfür wurde mit Hilfe verschiedener Puffer (siehe Anhang, Kapitel 8.1.4) mit einer Ionenstärke von 150 mM bei 37 °C eine Kalibrationsreihe aufgenommen. Vor der Messung wurde dabei eine Äquilibrationszeit von 15 min eingehalten, um dem Patch ausreichend Zeit zur Ausbildung einer Quellschicht zu geben, was nach den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.1 mehr als ausreichend ist. Anschließend wurden die Patches jeweils fünfmal vermessen und aus den erhaltenen Intensitätsverhältnissen ein Mittelwert gebildet. Zusätzlich erfolgte die pH-Messung mit einer Referenzelektrode (HI 211, Hanna Instruments, Ann Arbor). Zur Minimierung der bei der Messung auftretenden Fehler wurde die Kalibration dreimal durchgeführt und die erhaltenen Näherungsfunktionen wurden gemittelt. Abbildung 4-6 zeigt das erhaltene Kalibrationsmodell. Es ist zu erkennen, dass das Kalibrationsmodell einer sigmoiden Boltzmann-Funktion entspricht. Im Bereich von pH 5,3 - 6,5 haben bereits recht kleine Änderungen des Intensitätsverhältnisses eine große Änderung des pH-Wertes zur Folge. Im anschließenden steileren Kurvenverlauf ist eine bessere Auflösung des pH-Wertes möglich, da es für eine kleine pH-Änderung zu großen Änderungen des Intensitätsverhältnisses kommen muss. Dieser Bereich wird auch als dynamischer Messbereich

bezeichnet. Mit steigendem pH-Wert flacht die Kurve wieder etwas ab. Außerhalb des dynamischen Messbereiches ist die Bestimmung des pH-Werts mit großen Fehlern behaftet.

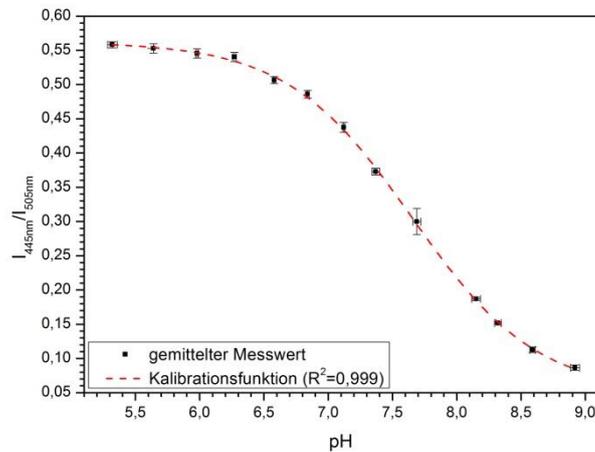


Abbildung 4-6: Kalibration der pH-Patches bei 37 °C und einer Ionenstärke von 150 mM.

4.1.4. Kalibration mit unterschiedlichen Ionenstärken

Häufig weisen Fluoreszenzfarbstoffe eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von verschiedenen Parametern auf. Als erster Parameter soll im Folgenden die Abhängigkeit des verwendeten Patchmaterials von der Ionenstärke des eingesetzten Mediums untersucht werden. Um hier eine Abhängigkeit zu überprüfen, wurden analog zur Kalibration in Kapitel 4.1.3 weitere Kalibrationen mit den Ionenstärken 250 mM und 500 mM (Puffermedien siehe Anhang, Kapitel 8.1.4) durchgeführt. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde für jede der Kalibrationsreihen ein neuer Fluoreszenzpatch verklebt.

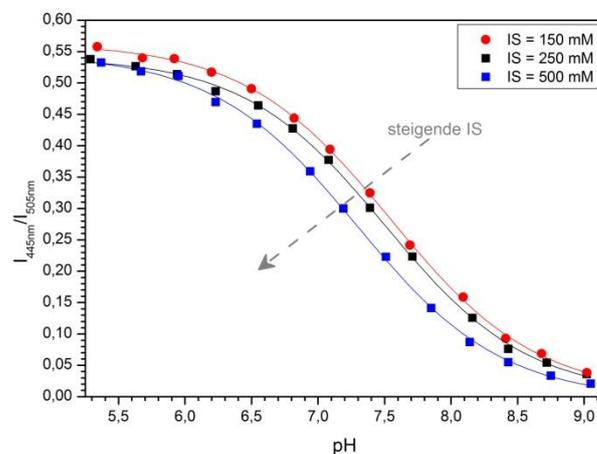


Abbildung 4-7: Auftragung der Ratio gegen den pH bei verschiedenen Ionenstärken.

Abbildung 4-7 zeigt, wie sich die Kalibrationsmodelle für steigende Ionenstärken in Richtung des Ursprungs des Graphen verschieben. Bei gleichbleibendem pH-Wert sinkt das Intensitätsverhältnis bei zunehmender Ionenstärke, bei gleichbleibendem Intensitätsverhältnis sinkt ebenfalls der pH-Wert. Aus diesem Grund ist es notwendig die Ionenstärke des Mediums zu kennen, da es sonst bei der Messung zu nicht vernachlässigbaren Fehlern kommt. Für definierte Medien mit bekannten Salzkonzentrationen stellt dies ein geringeres Problem dar als für Komplexmedien, in denen Extrakte mit nicht genauer definierten Salzkonzentrationen und -zusammensetzungen eingesetzt werden.

4.1.5. Temperatureinfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Patches

Nach der Bestimmung des Einflusses der Ionenstärke wurde das Augenmerk nun auf den Einfluss der Temperatur auf den Sensorpatch gelegt. Auch hierfür wurde für jede der Kalibrationsreihen ein neuer Fluoreszenzpatch verwendet. Die pH-Werte der Puffer wurden bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. Die Ionenstärke der bei dieser Messreihe verwendeten Pufferlösungen betrug 150 mM. Aufgenommen werden die Kalibrationsreihen bei 33 °C, 37 °C und 50 °C, wie sie in Abbildung 4-8 dargestellt sind. Zu erkennen ist, dass die Temperatur keinen eindeutigen Einfluss auf das Intensitätsverhältnis aufweist. Anzunehmen wäre eine Zunahme der Fluoreszenzintensität mit abnehmender Temperatur auf Grund von weniger desaktivierenden Stößen mit den, sich bei niedriger Temperatur im Medium langsamer bewegenden, Ionen.

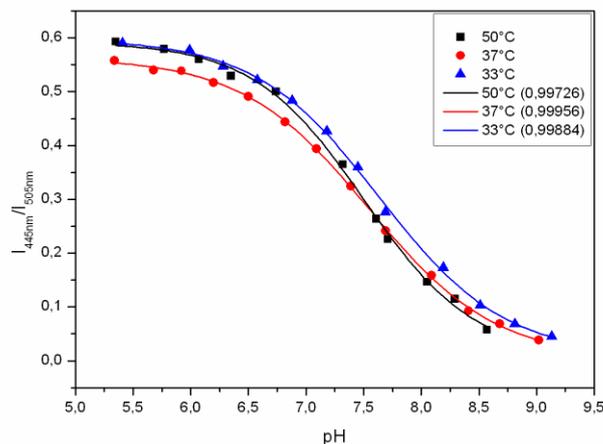


Abbildung 4-8: Auftragung der Ratio gegen den pH in Abhängigkeit von der Temperatur.

Unvorhergesehen verhält sich die Kalibrationsreihe bei 50 °C, die aufgrund der genannten Tatsache unterhalb der 37 °C Kalibration verlaufen sollte. Zudem sollte der Kurvenverlauf nach den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.4 ebenfalls unter der 37 °C Kalibration zu finden sein. Grund hierfür ist die zunehmende Eigendissoziation des Wassers. Um die Ionenstärke eines Puffers bei höherer Temperatur konstant zu halten ist eine geringer Zusatz von Salz notwendig. Die Pufferlösungen

müssen zur Bestimmung des Temperatureinflusses osmolar sein, um eine Überlagerung mit Ionenstärke-Effekten ausschließen zu können. Ein Temperatur-Effekt sollte sich insbesondere bei Puffern abzeichnen, die bei unterschiedlichen Temperaturen die gleiche Osmolarität aufweisen. Dies trifft auf den Acetatpuffer zu ($\text{pH}_{50^\circ\text{C}} = \text{pH}_{37^\circ\text{C}} = 5,5$; notwendiger Salzzusatz 3 mg Natriumchlorid auf 1 L Puffer). Hier zeigen die Werte, dass die 50 °C Kalibration aus genannten Gründen wenig zuverlässig ist. Ein eindeutiger Einfluss der Temperatur auf den pH-Fluoreszenzpatch konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden.

4.1.6. Photobleaching

Neben Faktoren, die durch das Medium in die Messvorrichtung eingebracht werden, existieren weitere Faktoren, welche die Genauigkeit eines Farbstoffpatches beeinflussen können. Die Farbstoffe können durch die fortwährende Bestrahlung der Patches im Laufe der Prozessüberwachung ausbleichen, d.h. ihre Fluoreszenzintensität nimmt im Laufe der Kultivierung ab. Dieser als Photobleaching bezeichnete Effekt führt so zu einer Änderung des Intensitätsverhältnisses und damit zu einer Abweichung des gemessenen pH vom realen Wert. Um den Effekt für den Verlauf eines Prozess abschätzen zu können, wurde ein Puffermedium (150 mM, pH 7,4) vorgelegt und auf 37 °C temperiert. Als Messintervall wurden 3 s gewählt. Parallel dazu erfolgte die pH-Bestimmung mit Hilfe einer Referenzelektrode (HI 221, Hanna Instruments, Ann Arbour).

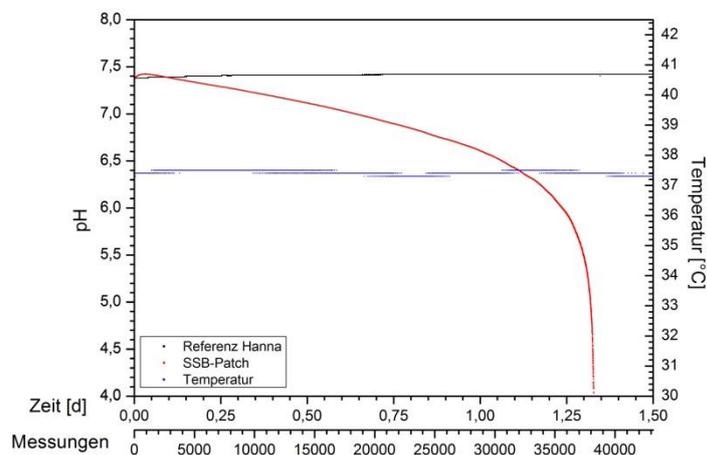


Abbildung 4-9: Verlauf der unterschiedlichen gemessenen Intensitäten zur Beobachtung des Photobleaching.

Abbildung 4-9 verdeutlicht den Effekt des Photobleachings, wobei hier neben der Temperatur, der Referenz-pH-Wert und der pH-Wert nach dem Kalibriermodell aufgetragen sind. Während der ersten 5.000 Messungen ist die Abweichung zwischen den Messsystemen minimal. Etwa im Bereich zwischen Messung 5.000 und 30.000 nimmt der pH-Wert fast linear ab. Im Folgenden steigt das Intensitätsverhältnis drastisch an, als Folge dessen sinkt der berechnete pH-Wert rasch ab.

Da die Kalibration, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, auf dem Intensitätsverhältnis zweier Fluoreszenzmaxima basiert, wirft der Verlauf der Messkurve des Patchmaterials die Frage nach den Gründen für das auftretende Bleaching auf. Aus diesem Grund wird ein Blick auf den Messkurvenverlauf der einzelnen Intensitäten geworfen (Abbildung 4-10). Es zeigt sich hierbei, dass beide Intensitätsmaxima nicht gleichförmig abnehmen. Vielmehr steigt die Intensität des längerwelligeren Maximums kurzfristig an, bevor sie dann mit der fortschreitenden Messung deutlich abfällt. Das kürzerwelligere Maximum hingegen bleibt in der Anfangsphase des Versuches stabil, bevor auch hier die Intensität abnimmt. Für das Intensitätsverhältnis hat dies die Folge einer kurzzeitigen Abnahme, bevor der Verlauf in eine nahezu lineare Form übergeht. Die lineare Anpassung ($R^2 = 0,99954$) weist in diesem Bereich einen Anstieg des Intensitätsverhältnisses von $0,0062 \text{ h}^{-1}$ auf. Könnte der Startpunkt dieser linearen Phase automatisch festgestellt werden, so ließe sich das Photobleaching durch einen entsprechenden Faktor in der Software herausrechnen, was die Nutzbarkeit des pH-Patches für Langzeitmessungen mit kurzen Messintervallen noch einmal deutlich erhöhen könnte.

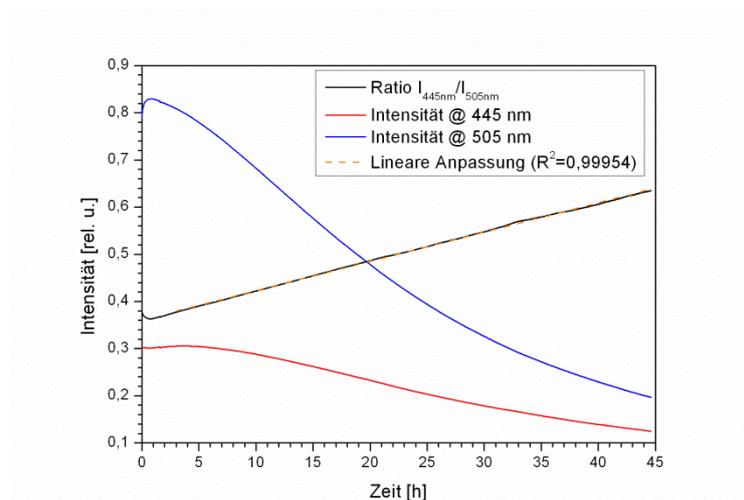


Abbildung 4-10: Verlauf der Rohdaten während des Photobleachings.

Doch auch ohne diese Softwarelösung ist der Patch zur Anwendung in Langzeitmessungen nutzbar. In Abbildung 4-11 ist die Entwicklung der Differenz des pH-Werts zwischen Referenzelektrode und Sensorpatch in Abhängigkeit von der Messdauer und dem Messintervall dargestellt. Es ist dabei zu erkennen, dass im Verlauf der Illumination des pH-Patches erst zu einer positiven Abweichung verglichen mit der Referenz kommt. Nach diesem Anstieg folgt ein allmähliches Abfallen. Deutlich erkennbar ist die Bedeutsamkeit die die Wahl des Messintervalls für die Messgenauigkeit hat. Für lang andauernde Prozesse sollten längere Intervalle gewählt werden, um eine höhere Präzision zu gewährleisten. Kürzere Intervalle liefern bei kurzen und mittleren Prozesslaufzeiten noch gute Ergebnisse. Da während einer Kultivierung trotz aller *online* Analytik zusätzlich Proben zur *offline*

Analyse, wie z.B. zur Bestimmung der Zellviabilität, entnommen werden, empfiehlt der Hersteller eine tägliche Rekalibrierung, so dass die tatsächliche Präzision weiter erhöht werden kann.

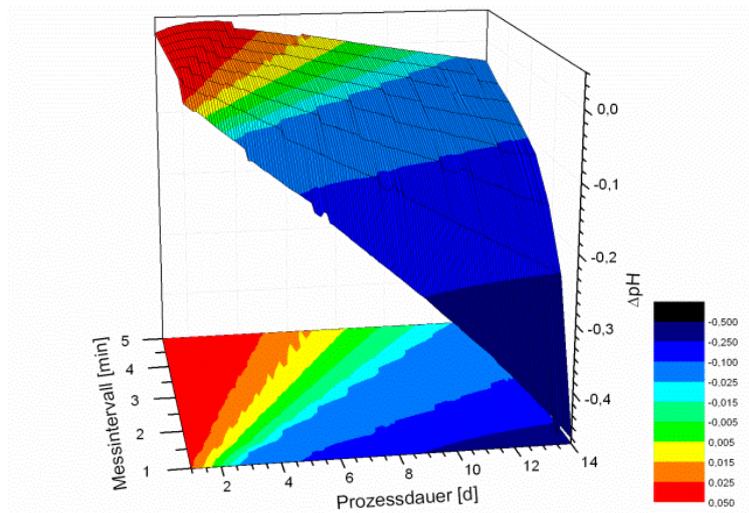


Abbildung 4-11: Differenz zwischen Referenzelektrode und Sensorpatch in Abhängigkeit von Prozessdauer und Messintervall.

4.1.7. Ansprechverhalten des pH-Patches

In einem dynamischen System ist es stets notwendig Veränderungen innerhalb möglichst kurzer Zeit zu detektieren. Änderungen des pH-Wertes in einem Kultivierungsprozess erfolgen in der Regel relativ langsam. Schnelle Änderungen können hierbei eher bei der Regulierung des pH-Wertes durch Zugabe von Base oder Säure auftreten. In diesem Fall ist eine deutlich kürzere Ansprechzeit des pH-Patches notwendig als im Verlauf der Kultivierung, um so eine möglichst schnelle und akkurate Einstellung des pH-Werts zu gewährleisten.

Da sich durch die Zugabe von Säuren oder Basen nicht nur der pH-Wert sondern auch die Ionenstärke eines Mediums ändert, wurde der pH-Sprung in diesem Versuch auf andere Weise simuliert. Statt der Zugabe weiterer Reagenzien erfolgte ein schneller Austausch des vorliegenden Puffers. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, dass die Austauschdauer im Vergleich zur Ansprechzeit des Patches vernachlässigbar klein ist. Hierfür wurde das Messsystem in einen Klimaschrank verbracht. Die Puffer wurden auf 37 °C vortemperiert, um eine einheitliche Temperatur zu gewährleisten und der Sensorpatch auf der Innenseite eines Becherglases verklebt, während der Lichtleiter an der Außenseite über eine Halterung fixiert wurde.

Während der Vortemperierung wurde die Messung im geschlossenen Klimaschrank gestartet, um eine konstante Basislinie zu erhalten. Zum Wechseln des Puffers wurde die Tür des Klimaschranks kurzzeitig geöffnet, was den Einfall von Streulicht ermöglichte. Dies ist auch im Verlauf der Beispielmessung in Abbildung 4-12 zu erkennen. Diese Zeit ist in der Grafik durch eine schraffierte

Hinterlegung kenntlich gemacht. Der Austauschzeitpunkt wird durch eine vertikale rote Linie gekennzeichnet. Der Zugabezeitpunkt des neuen Puffers wurde gleichzeitig als Nullpunkt der Zeitskala gewählt und mit einer vertikalen, gestrichelten Linie (rot) markiert. Schon zwischen dem Zeitpunkt des Pufferwechsels und dem Schließen der Tür des Klimaschranks ist ein Abfallen des gemessenen pH-Wertes zu erkennen. Der Wechselzeitraum, in welchem die Tür des Klimaschranks zum Pufferaustausch geöffnet war, ist in Abbildung 4-12 durch eine schraffierte Hinterlegung kenntlich gemacht. Diese ist sinnvoll, um zu zeigen, dass das leicht erhöhte Messrauschen welches in diesem Zeitraum durch das einfallende Umgebungslicht zu beobachten war keinen Einfluss auf die Messung hat. Für den Startbereich ist das arithmetische Mittel der Werte bis zum ersten Öffnen des Klimaschranks als horizontale, gestrichelte Linie (blau) dargestellt. Zudem wurde der Abfall des pH-Werts mit einer exponentiellen Funktion genähert, um so einen festen Wert für das Ende der abfallenden Kurve zu erhalten. Aus den Werten für Start-pH und End-pH wird anschließend die Ansprechzeit t_{98} bestimmt. Die t_{98} ist dabei die Zeit, die ein Sensor benötigt um bei einer sprunghaften Änderung einer Prozessvariablen 98 % des Endwertes zu erreichen.

Die Anwendbarkeit der exponentiellen Abnahme für das Ansprechverhalten verdeutlicht sich in dem Bestimmtheitsmaß von 0,99732. Im vorliegenden Beispiel liegt der Startwert bei $\text{pH } 7,57 \pm 0,00$, der Endwert liegt entsprechend der Näherungsfunktion bei $\text{pH } 6,84 \pm 0,00$. Entsprechend dieser Werte ist die t_{98} bei einem pH-Werts von 6,98 erreicht. Dies ist in vorliegendem Fall nach 159 s der Fall.

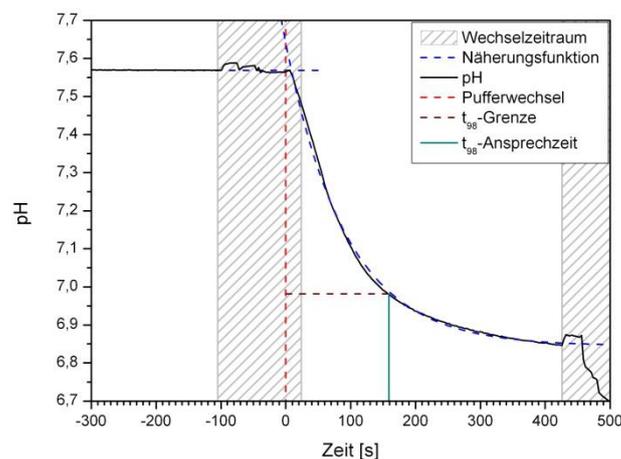


Abbildung 4-12: Test zur Bestimmung der Ansprechzeit der pH-Patches.

Tabelle 4-2 zeigt eine Zusammenstellung der experimentellen Daten der einzelnen Testläufe zur Bestimmung der Ansprechzeit des pH-Patchmaterials, wobei die Läufe Nr. 1-4 und Nr. 5-8 mit dem jeweils gleichen Patch durchgeführt wurden. Trotz durchweg sehr guter Werte des Bestimmtheitsmaßes für den pH-Sprung, weisen die Ansprechzeiten jedoch eine recht breite

Streuung auf. Der Mittelwert der bestimmten t_{98} -Zeiten liegt bei $131,5 \pm 61,1$ s. Der Hersteller gibt die Ansprechzeit mit 3 min an [142]. Für das den Konkurrenzsensor Fibox pH (Presens, Regensburg) wird eine t_{90} von <120 s angegeben [114]. Bei dieser Betrachtung der Ansprechzeit wird jedoch nicht berücksichtigt, dass der pH-Skala keine linearer Konzentrationsverlauf zugrunde liegt. Dies sollte bei der Betrachtung der Ansprechzeit beachtet werden, um so eine Aussage über die Güte der erhaltenen Daten treffen zu können.

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Testläufe mit Start- und End-pH, t_{98} und R^2 der Näherungsfunktion.

Lauf Nr.	Start-pH	End-pH	t_{98} [s]	R^2 für die Näherung des Sprungs
1	7,57	6,84	159	0,9973
2	6,84	7,53	162	0,9974
3	7,53	7,13	174	0,9982
4	7,13	7,48	33	0,9938
5	7,58	6,84	184	0,9938
6	6,84	7,53	142	0,9938
7	7,53	7,15	162	0,9997
8	7,15	7,48	36	0,9997

Um den Aspekt des nichtlinearen Bezugssystems in die Betrachtung einzubeziehen, werden die pH-Werte in die Konzentration der Hydroxonium-Ionen umgerechnet. Aus diesen Konzentrationen kann nun die Sprunghöhe ermittelt werden, wodurch die logarithmische Natur der pH-Wertskala kompensiert werden kann. Zur Betrachtung wird der Quotient aus der Ansprechzeit t_{98} und der Sprungkonzentration gebildet.

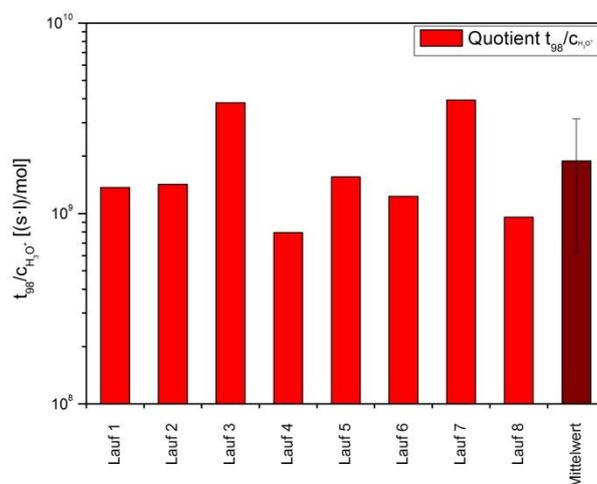


Abbildung 4-13: Gegenüberstellung des Quotienten $t_{98}/c(\text{H}_3\text{O}^+)$ für die einzelnen Versuche und den Mittelwert.

In Abbildung 4-13 sind die Quotienten der einzelnen Läufe gemeinsam mit dem Mittelwert aufgetragen. Auch wird deutlich, dass auch der Streubereich der Quotienten sehr groß ist, was in einem Mittelwert von $1,88 \cdot 10^9 \pm 1,25 \cdot 10^9$ (s·l)/mol resultiert. Durch den großen Fehler zeigt sich, dass hier ein weiterer Faktor als nur die Sprungkonzentration die Ansprechzeit beeinflusst.

Auch die Sprungrichtung könnte einen Einfluss auf die Ansprechzeit haben, da in den vorliegenden Versuchen die pH-Sprünge im Wechsel in basischer (aufwärts) und saurer Richtung (abwärts) durchgeführt wurden. Daher werden die Ansprechzeiten gegen die Sprungkonzentration noch einmal aufgeteilt nach der Sprungrichtung aufgetragen (Abbildung 4-14). Bei genauerer Betrachtung fällt hierbei auf, dass bei pH-Sprüngen in saurer Richtung die Ansprechzeit des Patches mit der Konzentration ansteigt. Bei pH-Sprüngen in alkalischer Richtung hingegen bleibt die Ansprechzeit konstant. Die in der Abbildung gezeigten Tendenzen zeigen nur einen generellen Trend, keine Näherungsfunktion.

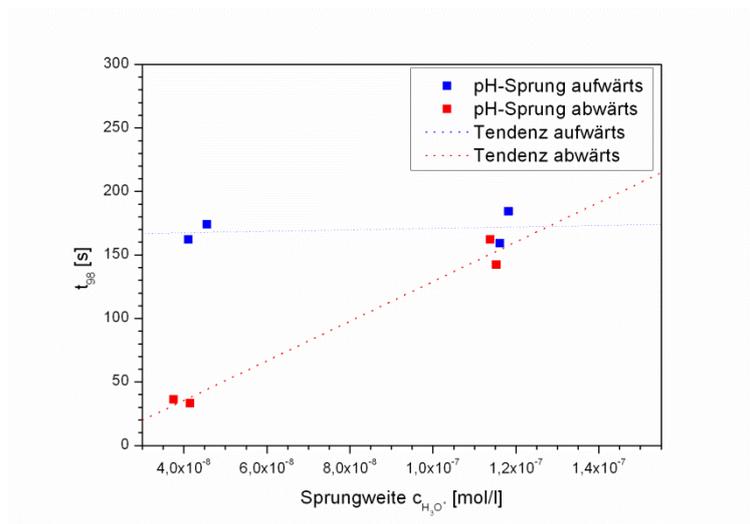


Abbildung 4-14: Ansprechzeit t_{98} gegen die Sprungweite, aufgeteilt nach Sprungrichtung.

In der Darstellung in Abbildung 4-14 zeigen die Einzelmessungen bei ähnlicher Sprungweite in Abhängigkeit von der Sprungrichtung eine gute Übereinstimmung in der Ansprechzeit. Auffällig ist der Verlauf bei fallenden pH-Werten. Die Wahrscheinlichkeit eines Messfehlers ist durch die Doppelbestimmung mit unterschiedlichen Fluoreszenzpatches ist gering. Generell ist verständlich, dass bei kleinen pH-Sprüngen eine schnellere Ansprechzeit zu beobachten ist, da hier eine geringere Anzahl von Protonierungen am Fluoreszenzfarbstoff erfolgen muss und somit weniger Protonen durch die Membran diffundieren müssen. Die Deprotonierung erfolgt im Gegenzug dazu deutlich langsamer. Hier ist zu vermuten, dass die größeren Hydroxid-Ionen schlechter durch die Membran diffundieren können als die kleinen Protonen, was die Ansprechzeit erhöht.

Insgesamt liegt die Ansprechzeit in einem Bereich, der einen Einsatz in der Biotechnologie erlaubt, da hier ohnehin keine schlagartigen pH-Änderungen zu erwarten sind. Bei der Regelung des pH-Wertes durch Zugabe von Säuren oder Basen muss dabei auf eine entsprechend langsame Zugabe geachtet werden.

Die Ergebnisse der Tests zeigen, dass das Patchmaterial zur pH-Bestimmung generell eingesetzt werden kann. Kleinere Probleme können in erster Linie bei der Wahl eines zum Kultivierungsprozess unpassenden Messintervalls auftreten. Ein größeres Problem kann die Nutzung des pH-Sensors bei unbekanntem Ionenstärken verursachen.

4.2. Einzeltests an den DO-Patches

Neben dem pH ist der Gelöstsauerstoff in der Biotechnologie ein äußerst wichtiger Prozessparameter. Hierbei wird zwischen dem Sauerstoffgehalt in mg/L und dem Gelöstsauerstoff oder Dissolved Oxygen (DO) in %-sat unterschieden. Beide hängen mit dem Sauerstoffpartialdruck über der Flüssigkeit zusammen.

Da bereits für die pH-Messung ein fluoreszenzbasiertes Messprinzip ausgewählt wurde, lag es auch hier nah auf ein solches System zur Gelöstsauerstoffbestimmung zurückzugreifen. Tabelle 4-3 zeigt eine Auflistung am Markt verfügbarer Einweg-Fluoreszenzsensoren.

Tabelle 4-3: Gängige Sensoren zur DO-Messung.

Anbieter Ort	Produktname	Messbereich	Messprinzip	Literatur
Finesse Solutions Santa Clara, USA	TruFluor DO	0 - 250 %-sat	Phasenverschobene Fluoreszenz	[102]
Fluorometrix Corp. Baltimore, USA	Cellphase DO	0 - 100 %-sat	Fluoreszenzlebenszeit	[138]
Presens GmbH Regensburg, D	PSt3	0 - 100 %-sat	Fluoreszenzlebenszeit	[106]
Sartorius Stedim Biotech Göttingen, D	Sensolux DO	0 - 100 %-sat	Fluoreszenzlebenszeit	[141]

In diesem Fall bot es sich erneut an auf das Produkt von Sartorius Stedim Biotech, Göttingen zurückzugreifen, da für das Sensoluxsystem ein duales Messsystem existiert, welches für die Messungen zum Einsatz kommt, sodass kein zweites Sensorsystem notwendig wurde. Von den Leistungsdaten unterscheiden sich die Fluoreszenzsensoren kaum. Lediglich das TruFluor System weist einen vergrößerten Messbereich auf, welcher in vorliegendem Fall jedoch keinen Vorteil bietet, da die Messungen im Folgenden nicht bei Überdruck erfolgen.

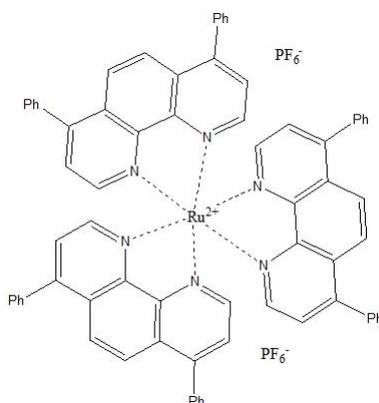


Abbildung 4-15: Ruthenium-tris-diphenylphenanthrolin Dihexafluorid.

Die verwendeten Patches basieren auf dem Farbstoff Ruthenium-tris-diphenyl-phenanthrolin (RudPP; Abbildung 4-15), welcher in Silicapartikel eingeschlossen vorliegt. Diese Partikel werden auf

einer Schicht aus Silikon immobilisiert. Die Fluoreszenz dieser Patches wird bei Anwesenheit von Sauerstoff gequencht, so dass durch das RudPP eine mit dem Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigkeit korrespondierende Fluoreszenzantwort erhalten wird. Die Anregung erfolgt bei 480 nm, die Emission wird bei 620 nm detektiert.

Zur Anregung wurde der zweite Kanal des Sensolux-Systems verwendet, welches bereits bei der Bestimmung des pH-Wertes zum Einsatz kam. Im Gegensatz zum dort vorliegenden Detektionsverfahren, wird bei der Gelöstsauerstoffbestimmung die Emission nur bei einer Wellenlänge detektiert. Entsprechend kann der Strahlengang in Abbildung 4-2 um eine Detektionseinheit, bestehend aus dichroitischem Spiegel, Bandpassfilter, Linse und Photodiode verkleinert werden. Der verbleibende Aufbau ist in Abbildung 4-16 dargestellt. Das von der LED abgestrahlte Licht passiert eine Linse und einen Bandpassfilter (BP_1), bevor sie auf einen dichroitischen Spiegel (DS_1) fällt und auf eine weiter Linse geleitet wird, die das Licht in einen Lichtwellenleiter (LWL) mit flexibler Länge leitet. Aus dem Lichtwellenleiter fällt das Exzitationslicht auf den, auf einem optischen Fenster (OF) in der Reaktorwandung (RW) verklebten, Sensorpatch (SP). Das Fluoreszenzlicht fällt über den Lichtwellenleiter zurück durch die Linse auf den dichroitischen Spiegel, welcher das Licht passieren lässt. Nach dem Passieren von Bandpassfilter (BP_2) und einer weiteren Linse fällt das Emissionslicht auf die Photodiode (PD_1), die das Signal an den *Digital Signal Processor* (DSP) weiterleitet. Zur endgültigen Auswertung werden die gewonnenen Daten an die EDV gesendet, wo sie mit Hilfe des Programms Sensolux control V 1.0.12.0 von Sartorius Stedim Biotech, Göttingen weiterverarbeitet wurden.

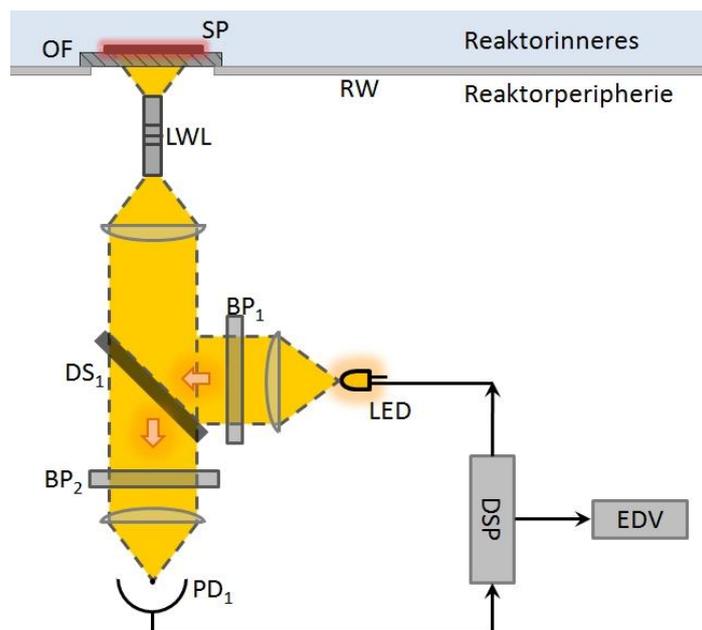


Abbildung 4-16: Strahlengang des Sensoluxsystems bei der Bestimmung des Gelöstsauerstoffs nach [143].

4.2.1. Fluoreszenzeigenschaften des Patchmaterials

Vor Beginn der Versuche mit dem Gelöstsauerstoffpatchmaterial wurden in einem Phosphat-Puffer (pH 7; IS 150 mM; Anhang, Kapitel 8.1.4) mit dem Fluoreszenzspektrometer F-7000 FL (Hitachi High-Technologies, Tokio) Fluoreszenzspektren aufgenommen. Hierfür wurde auf einer Scheibe eines fluoreszenz-inaktiven Kunststoffes, welche diagonal in eine Quarzküvette eingebracht wurde, ein Patch verklebt. Die Küvette selbst wird schließlich so in den Strahlengang eingebracht, dass die Fluoreszenz im rechten Winkel zum Exzitationslicht detektiert werden kann. Abbildung 4-17 zeigt ein Fluoreszenzspektrum bei vollständiger Sauerstoffsättigung. Im Emissionsbereich von 600 nm ist ein Emissionsmaximum deutlich zu erkennen. Auffällig ist jedoch, dass sich das Wertepaar aus Exzitations- und Emissionswellenlänge, welches zur Detektion der Fluoreszenzlebenszeit herangezogen wird, sich lediglich auf der Schulter des Maximums befindet.

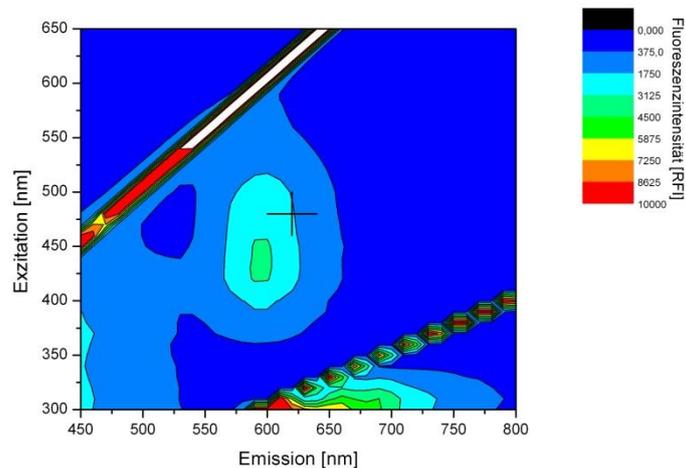


Abbildung 4-17: Fluoreszenzspektrum des Gelöstsauerstoffpatches bei eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 100%-sat.

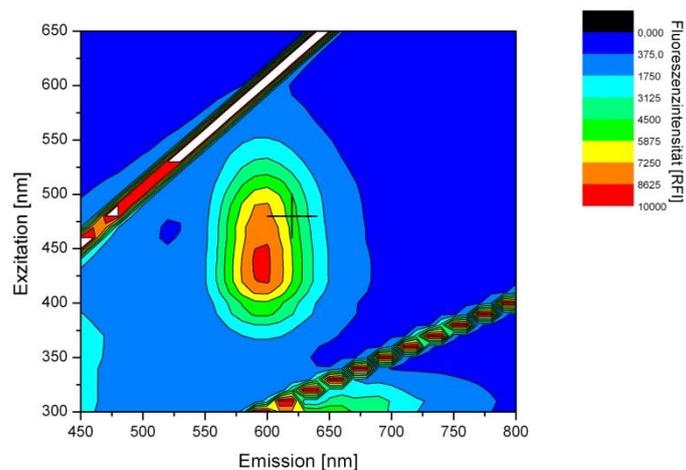


Abbildung 4-18: Fluoreszenzspektrum des Gelöstsauerstoffpatches bei eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 0%-sat.

Um die Lage des Fluoreszenzmaximums auch bei niedrigen Gelöstsauerstoffkonzentrationen zu überprüfen, wird der Lösung durch die Zugabe von Natriumsulfit der Sauerstoff entzogen. In Abbildung 4-18 ist zu sehen, dass die Fluoreszenzaktivität mit dem Entzug des Sauerstoffes stark zunimmt. Auch liegt das Fluoreszenzmaximum unverändert im Emissionsbereich von 600 nm. In der Literatur wird das Emissionsmaximum für den in Silicabeads immobilisierten Farbstoff mit Ex 468 nm/Em 608 nm angegeben [144], in 0,1 M Phosphat-Puffer bei pH 7 liegt das Maximum bei Ex 455 nm/Em 615 nm [145].

Die Versuche zeigen im Vergleich mit den Literaturwerten eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu Ex 430 nm/Em 600 nm. Diese hypsochrome Verschiebung lässt sich aus dem Zusammenspiel von Anion und Immobilisierungsmatrix erklären.

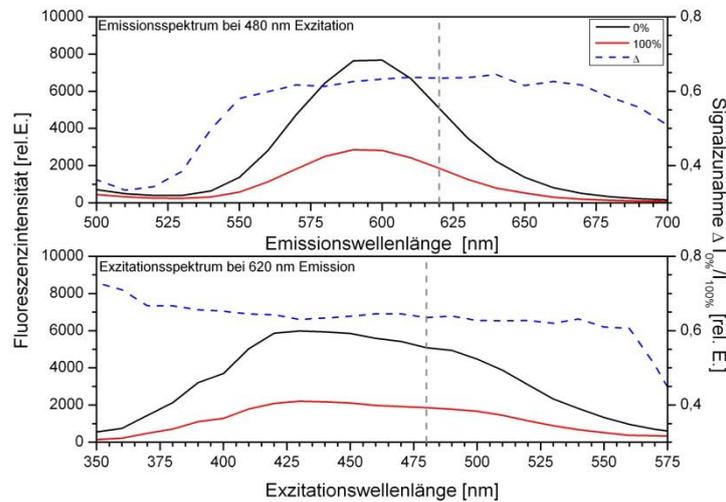


Abbildung 4-19: Exzitations- und Emissionsspektrum des DO-Patches bei den Detektionswellenlängen.

In Abbildung 4-19 sind das Emissionsspektrum des Patches bei 480 nm Exzitationswellenlänge sowie das Emissionsspektrum des Patches bei 620 nm Emissionswellenlänge bei 0% und 100% Gelöstsauerstoffsättigung dargestellt. Zusätzlich ist die prozentuale Signalzunahme im Lauf der Sauerstoffsättigung dargestellt. Als vertikale Linie ist in den Spektren jeweils die Detektionswellenlänge dargestellt, wodurch hier erneut deutlich wird, dass die Messung nicht am Maximum erfolgt. Bei Betrachtung der prozentualen Änderung Δ wird jedoch deutlich, dass die Signalzunahme im Verlauf des Messbereichs am Punkt der Detektion höher ist als am Fluoreszenzmaximum. Die Detektion an diesem Punkt ermöglicht folglich eine bessere Auflösung des Messsignals als am Peakmaximum. Im Fußbereich des Peaks wäre die prozentuale Signalzunahme zwar noch einmal ein wenig größer, die Detektion an diesem Punkt ist jedoch nicht sinnvoll, da der Vorteil der höheren Signalzunahme durch das niedrigere Grundsignal nivelliert wird.

Zur besseren Veranschaulichung zeigt Abbildung 4-20 die prozentuale Signalzunahme des Fluoreszenzspektrums im Bereich von 0%-sat bis 100%-sat Gelöstsauerstoff. Der Punkt der Detektion ist mit ein Kreuz gekennzeichnet. Im Vergleich zu den Fluoreszenzspektren in Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18 ist der Peakbereich hier zum Detektionspunkt hin verschoben. Das Spektrum zeigt zwar Bereiche mit einer größeren prozentualen Änderung, jedoch ist hier die Signalintensität generell geringer, so dass in diesen Bereichen keine zuverlässige Messung erfolgen kann. Der Messbereich des Sensolux-Systems stellt somit einen guten Kompromiss aus Fluoreszenzintensität und prozentualer Änderung im Messbereich dar.

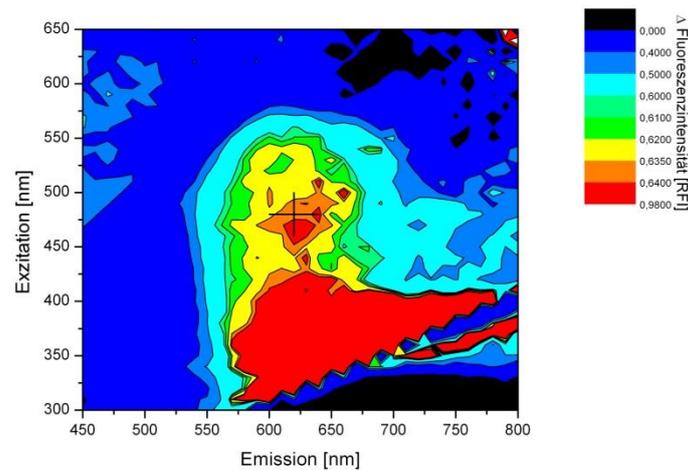


Abbildung 4-20: Darstellung des prozentualen Differenzfluoreszenzspektrums des DO-Patches.

4.2.2. Kalibration

Vor der Verwendung der Sauerstoffpatches musste eine Kalibrationsroutine etabliert werden. Hierfür wurde in einem Phosphatpuffer mit pH 7,1 und der Ionenstärke 150 mM (siehe Anhang, Kapitel 8.1.4) ein Stufenprofil der Sauerstoffsättigung durchfahren. Die unterschiedlichen Sättigungen wurden durch Begasung mit entsprechenden Gaszusammensetzungen realisiert. Diese Zusammensetzung wiederum wurde mit Hilfe eines Gasmischers des Typ E-7000 der Firma Bronkhorst High-Tech, Ruurlo geregelt. Zur schnellen Einstellung des gewünschten Sauerstoffgehalts wurde auf eine Edelstahlfritte zurückgegriffen, um die Bildung möglichst feiner Bläschen zu gewährleisten. Das System wurde bei der Messung lediglich durch das einströmende Gas durchmischt. Auf einen weiteren Rührer wurde verzichtet, um einen zusätzlichen Sauerstoffeintrag aus der Umgebung zu vermeiden. Die Lösung wurde während der Kalibration auf 37 °C temperiert. Neben dem Sensorpatch zur Detektion des Gelöstsauerstoffs wurde eine optische Referenzelektrode (Visiform DO, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz) verwendet. Abbildung 4-21 zeigt den schematischen Aufbau zur Aufnahme der Kalibrationsfunktion.

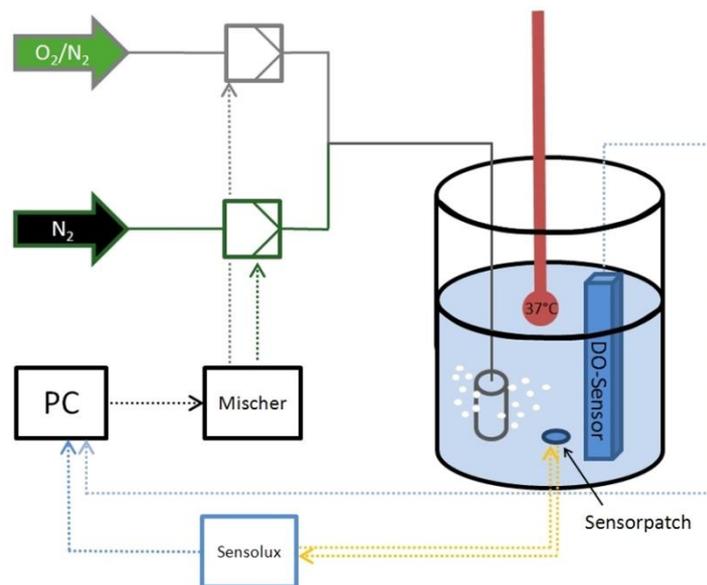


Abbildung 4-21: Versuchsaufbau zur Kalibration der Sauerstoffpatches.

Abbildung 4-22 zeigt die beim Durchfahren eines Stufenprofils erhaltenen Verläufe. Es ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzlebenszeit mit einer abnehmenden Konzentration des Quenchers Sauerstoff zunimmt. Es lässt sich der Abbildung auch entnehmen, dass die Stufenhöhe der Fluoreszenzlebenszeit des Patches nicht gleichmäßig ist, sondern mit abnehmender Sauerstoffkonzentration zunimmt. Dies hat eine ungleichmäßige Empfindlichkeit des Patches im Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentrationskala zur Folge. Vor der letzten Konzentrationsstufe ist ein

kurzzeitiger Anstieg der Konzentration zu beobachten, der im Einrühren des Natriumsulfits zur letzten Entfernung des Sauerstoffs aus der Lösung begründet ist.

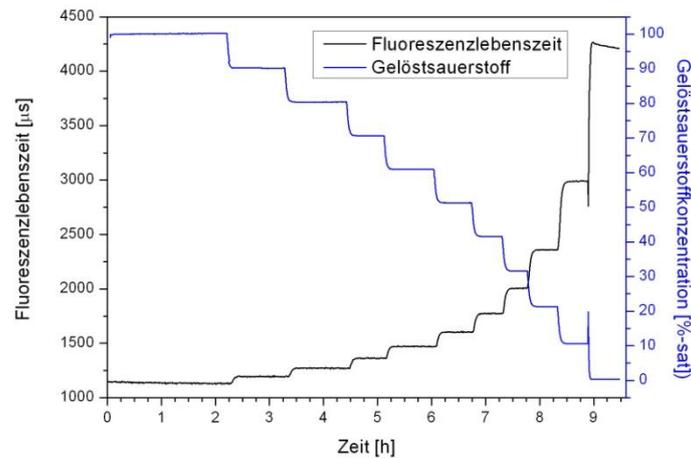


Abbildung 4-22: Stufenprofil zur Kalibration des Gelöstsauerstoffpatches.

Die aus dem Durchfahren des Stufenprofils erhaltenen Daten wurden zur Bestimmung einer Kalibrationsfunktion nachbearbeitet. Dabei wurde die Fluoreszenzlebenszeit über die Dauer einer Stufe gemittelt. Zur Auftragung der Lebenszeiten gegen den Gelöstsauerstoffanteil wurden die Lebenszeiten τ durch die Lebenszeit in Abwesenheit des Quenchers Sauerstoff τ_0 geteilt, wodurch eine Normierung erreicht wird.

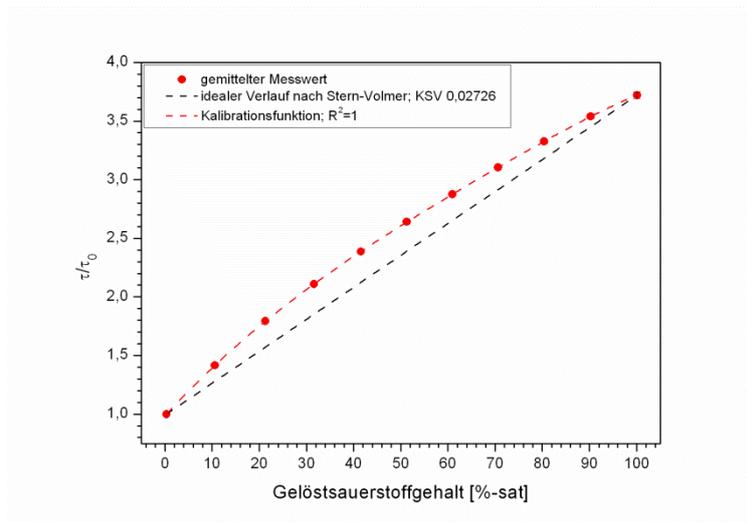


Abbildung 4-23: Kalibrationsfunktion des Gelöstsauerstoffpatches.

Aus der Auftragung in Abbildung 4-23 lässt sich erkennen, dass bei der Kalibration eine Abweichung vom idealen Stern-Volmer-Gesetz vorliegt. Dieses hat die Form

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

wobei τ_0 die Fluoreszenzlebenszeit bei der Konzentration des Quenchers Q $[Q] = 0$, τ die Fluoreszenzlebenszeit und K_{SV} die Stern-Volmer-Konstante sind. Statt des erwarteten linearen Zusammenhangs liegt eine polynomiale Funktion 6. Grades vor. Aus dieser lässt sich über die das Verhältnis τ/τ_0 die Fluoreszenzlebenszeit und letztlich der Gelöstsauerstoffanteil berechnen. Die Abweichung vom Stern-Volmer-Gesetz entspricht für den vorliegenden Farbstoff Erfahrungen aus der Literatur [145]. Die Darstellung in Abbildung 4-23 zeigt, dass es notwendig ist die Umrechnung in den prozentualen Gelöstsauerstoffgehalt mit Hilfe der polynominalen Funktion durchzuführen und nicht auf den vereinfachten, linearen Stern-Volmer Term zurückzugreifen.

4.2.3. pH-Abhängigkeit des Patchmaterials

Der pH-Wert ist nicht nur in der Biotechnologie die bedeutendste Prozessgröße. Aus diesem Grund ist es notwendig den Einfluss des pH-Wertes auf den eingesetzten Fluoreszenzpatch zu betrachten.

Zur Untersuchung des pH-Einflusses auf den Gelöstsauerstoffpatch wurde die Kalibration noch einmal in Lösungen unterschiedlicher pH-Werte durchgeführt. Ausgewählt wurden hierfür die pH-Werte 5,3, 7,0 und 8,9 mit einer konstanten Ionenstärke von 150 mM (siehe Anhang, Kapitel 8.1.4). Erneut wurde das Stufenprofil durchfahren und die so erhaltenen Rohdaten wurden mit der zuvor etablierten Kalibrationsroutine in den prozentualen Sauerstoffgehalt umgerechnet.

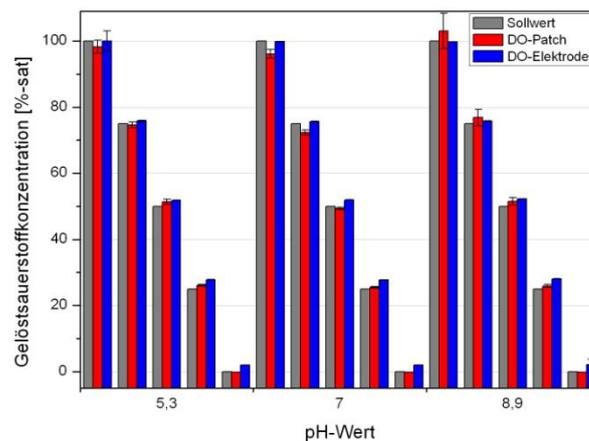


Abbildung 4-24: Einfluss des pH-Wertes auf den Sauerstoffpatch.

Abbildung 4-24 zeigt die Gegenüberstellung der auf diese Weise für den eingesetzten DO-Einwegsensor und die Referenzelektrode erhaltenen Messwerte in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die verwendeten Messwerte sind dabei die zeitlichen Mittelwerte über eine Stufe des Stufenprofils. Die dargestellten Fehler sind die in dieser Zeitspanne auftretenden Standardabweichungen. Zusätzlich ist der Sollwert des Sauerstoffgehalts dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der pH-Wert keinen Einfluss auf das erhaltene Messsignal hat. Zwar weichen beide Werte oftmals vom Sollwert ab, dies lässt sich jedoch mit der Ungenauigkeit der Massedurchflussregler sowie deren Ansteuerung erklären. Insgesamt zeigen Referenzelektrode und Sauerstoffpatch eine gute und zufriedenstellende Übereinstimmung bei der Bestimmung des Sauerstoffgehaltes bei unterschiedlichen pH-Werten.

Abbildung 4-25 zeigt eine Zusammenstellung der gemittelten Abweichungen von Farbstoffpatch und DO-Elektrode über den gesamten Messbereich bei den unterschiedlichen pH-Werten. Durch die Fehlerbalken wird die Standardabweichung der Abweichung zum Sollwert veranschaulicht. Es lässt sich dabei entnehmen, dass die Abweichungen der verschiedenen Messmethoden im gleichen Bereich liegen. Im Mittel über die pH-Werte weicht der Patch um $1,35 \pm 0,33$ %-sat vom Sollwert der Gelöstsauerstoffkonzentration ab. Mit $1,55 \pm 0,10$ %-sat weist die Elektrode hierbei eine geringfügig höhere Abweichung auf, jedoch zeigt die geringere Standardabweichung eine größere Verlässlichkeit dieser Abweichung.

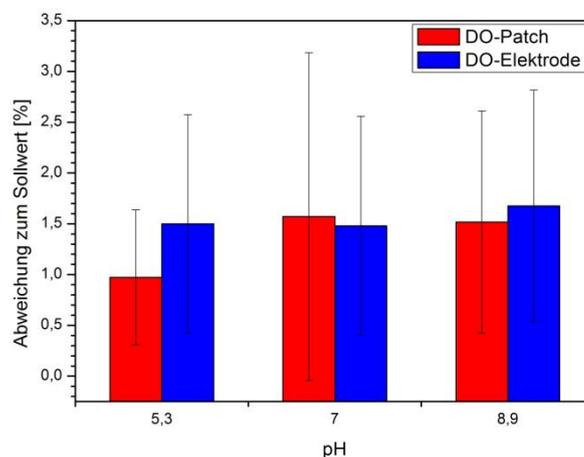


Abbildung 4-25: Abweichung von DO-Patch und DO-Elektrode zum Sollwert in Abhängigkeit vom pH-Wert.

4.2.4. Ionenstärkeabhängigkeit des Patchmaterials

Da bei den Fluoreszenzpatches zur Bestimmung des pH-Wertes eine Ionenstärkeabhängigkeit festgestellt wurde, erscheint eine Untersuchung bezüglich des Einflusses der Ionenstärke auf den Farbstoffpatch zur Gelöstsauerstoffdetektion sinnvoll.

Hierfür wurden erneut Stufenprofile durchfahren, wobei in diesem Fall die Ionenstärke variiert wurde. Zur Betrachtung wurden dabei die Ionenstärken 150 mM, 250 mM und 500 mM bei einem konstanten pH-Wert von 7 (siehe Anhang, Kapitel 8.1.4) ausgewählt. Nach dem Durchfahren des Stufenprofils mit der jeweiligen Ionenstärke wurden die erhaltenen Werte für die Fluoreszenzlebenszeit über die entwickelte Kalibrationsroutine in die Gelöstsauerstoffkonzentration umgerechnet. In Abbildung 4-26 sind die Messdaten für den DO-Einwegpatch und die DO-Elektrode gemeinsam mit dem Sollwert gegen die Ionenstärke aufgetragen. Auch in diesem Versuch ist eine schwankende Abweichung vom Sollwert zu beobachten, so dass keine eindeutige Tendenz des Einflusses der Ionenstärke zu erkennen ist.

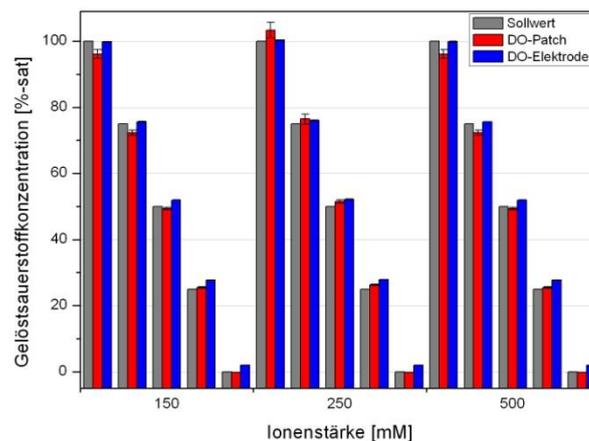


Abbildung 4-26: Einfluss der Ionenstärke auf den Sauerstoffpatch.

In Abbildung 4-27 sind die gemittelten Abweichungen des Farbstoffpatches und der DO-Elektrode im Verlauf des Messbereichs in Abhängigkeit der Ionenstärke dargestellt. Die Fehlerbalken verdeutlichen die Standardabweichung der Abweichung zum Sollwert. Unabhängig von der Ionenstärke des verwendeten Mediums liegt die Abweichung im Mittel bei etwa 1,5 %. Dabei ist es auch nicht von Belang, ob die Messung mit dem Sensorpatch oder mit der Elektrode durchgeführt wurde. Vielmehr ist die gemessene Abweichung sehr stabil und liegt im gleichen Bereich, wie er bereits in Kapitel 4.2.3 gefunden wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen 1,5 % Abweichung zum Sollwert um einen systematischen Fehler, welcher durch die eingesetzten Massedurchflussregler verursacht wurde. Es lässt sich anhand dieser Daten sagen, dass bei der

Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration mit Hilfe des Farbstoffpatches keine Abhängigkeit des Messsignals von der Ionenstärke vorliegt.

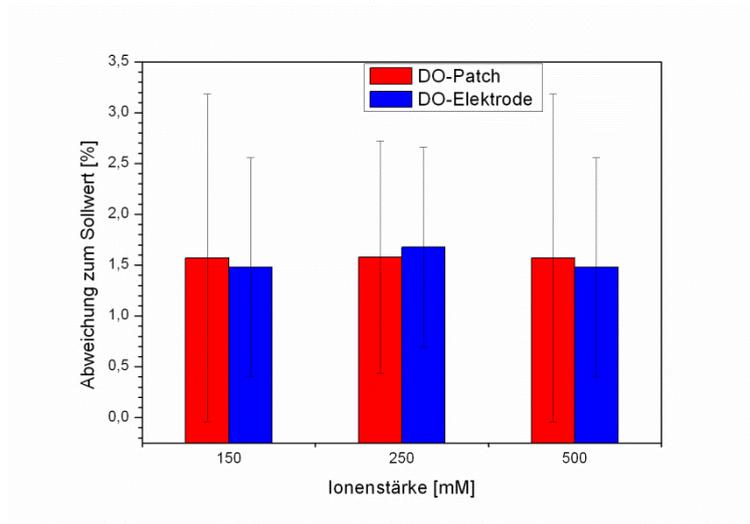


Abbildung 4-27: Abweichung von DO-Patch und DO-Elektrode zum Sollwert in Abhängigkeit von der Ionenstärke.

4.2.5. Einfluss der Temperatur auf das Patchmaterial

Auf eine Untersuchung des Temperatureinflusses auf den Gelöstsauerstoffpatch wurde verzichtet, da eine größere Verschiebung der Temperatur eine Verschiebung der gelösten Stoffmenge an Sauerstoff in wässrigen Medien bedeutet. Dies hat zur Folge, dass bei einer größeren Änderung der Temperatur generell eine andere Kalibrationsfunktion zugrunde gelegt werden muss. Die wäre nicht der Fall, wenn statt der prozentualen Sättigung die gelöste Stoffmenge detektiert werden.

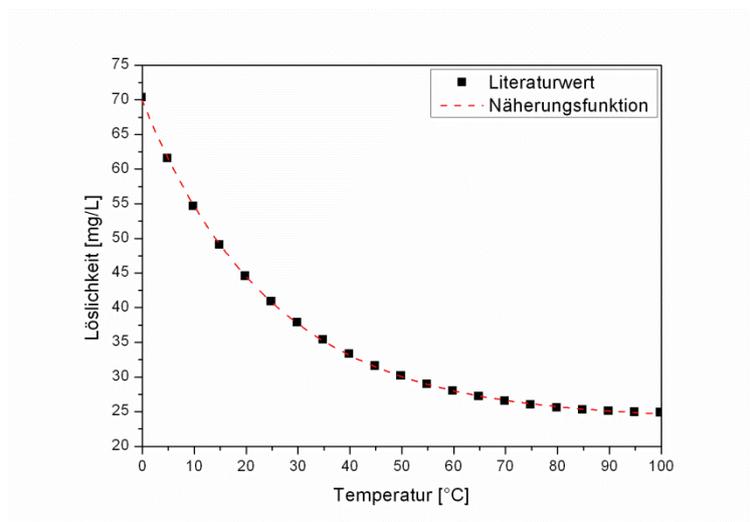


Abbildung 4-28: Sauerstofflöslichkeit in Wasser bei 1 atm p_{O_2} in Abhängigkeit von der Temperatur; nach [146].

Abbildung 4-28 zeigt die Abhängigkeit der Sauerstofflöslichkeit in mg/l in Abhängigkeit der Temperatur bei einem Sauerstoffpartialdruck von 1 atm [146]. Während sich bei 0 °C 70,4 mg(O₂)/L löslich sind, hat sich diese Menge bei 35 °C bereits in etwa halbiert. Bei den dargestellten Werten muss beachtet werden, dass es sich um die Löslichkeit bei einem Sauerstoffpartialdruck von 1 atm handelt. Entsprechend liegt die Löslichkeit gegen die normale Umgebungsluft bei etwa 20,95 % der aufgeführten Löslichkeit.

4.2.6. Langzeittest – Photobleaching

Wie der pH-Patch unterliegt auch der Farbstoff des DO-Patchmaterials dem Bleachingeffekt. Durch wiederholte Bestrahlung verblassen dabei die Farbstoffe, wodurch das während der Messung erhaltene Signal von dem Signal bei Messungsstart abweicht. Zur Untersuchung dieses Effektes wurde der DO-Patch gemeinsam mit der Referenzelektrode in einen auf 37°C temperierten Phosphatpuffer (pH 7; IS 150 mM; siehe Anhang, Kapitel 8.1.4) verbracht. Um möglichst schnell einen Effekt auf den Patch beobachten zu können und Leaching-Effekte, d.h. das Diffundieren des Farbstoffes aus der Matrix, möglichst ausschließen zu können, wurde das Messintervall auf 3 s festgelegt. Durch die häufigere Bestrahlung wird auch ein schnelleres Ausbleichen des Farbstoffes gewährleistet. Zusätzlich wurde der temperierte Puffer ständig mit einer 1:1 (v/v) Mischung aus Stickstoff und Druckluft begast. Der Volumenstrom wurde dabei klein gehalten, um so die Verdunstung des Puffers zu minimieren und ein starkes Abkühlen des Puffers durch nicht vorgewärmtes Gas auszuschließen. Die Laufzeit eines solchen Versuches betrug dabei mehrere Tage.

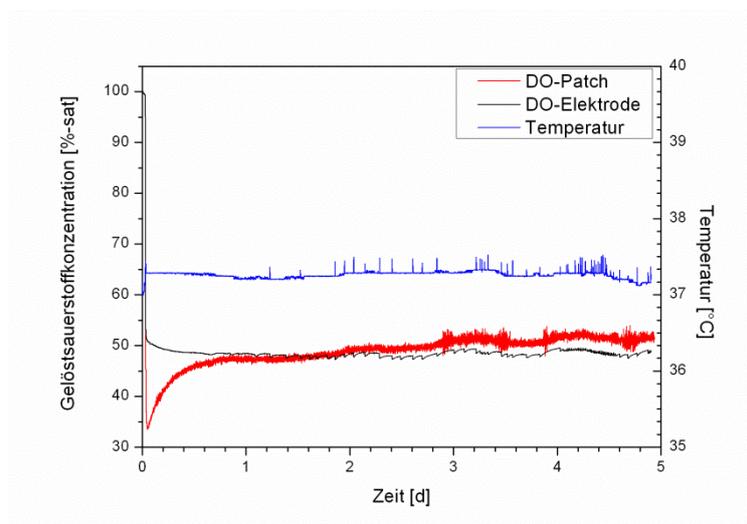


Abbildung 4-29: Verlauf eines Langzeittests mit dem Gelöstsauerstoffpatch.

Abbildung 4-29 zeigt den Verlauf eines solchen Langzeittests. Die Messwerte des Patches wurden in dieser Darstellung zur Reduktion des Rauschen mit Hilfe eines Savitzky-Golay Filters (75 Punkte Fensterbreite; 6. Ordnung) gefiltert. Während die verwendete Elektrode sich bereits kurz nach

Einstellung auf eine Gelöstsauerstoffkonzentration von etwa 50 %-sat einpendelt und auch in diesem Bereich stabil bleibt, weist der Messverlauf des Fluoreszenzpatches einige Abweichungen auf. Auffällig hierbei ist der deutliche Abfall der gemessenen Gelöstsauerstoffkonzentration in der Anfangsphase der Messung, in der der Patch eine Abweichung von bis zu 15 % von der Referenzelektrode zeigt. Nach etwa einem halben Tag hat sich der Patch einer Abweichung von etwa 5 % angenähert und der Verlauf der Messwerte verflacht zusehends und zeigt eine lineare Zunahme des Messsignals bei konstantem Gelöstsauerstoffgehalt. Ein Ausschnitt der Anfangsphase der Langzeitphase ist zur besseren Veranschaulichung in Abbildung 4-30 dargestellt.

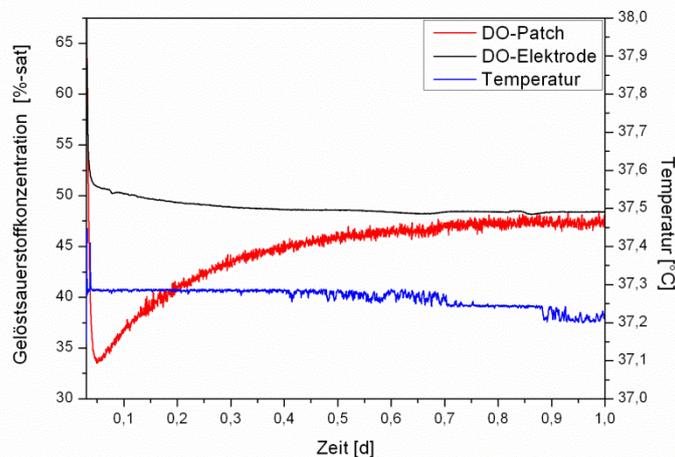


Abbildung 4-30: Ausschnitt aus dem Langzeittest; Tag 1.

Das Phänomen einer langsameren Annäherung an einen konstant eingestellten Wert ließ sich in kleinerem, nicht so stark ausgeprägtem Maße während der Kalibration in Kapitel 4.2.2 beobachten. Bei den sinkenden Gelöstsauerstoffkonzentrationen lässt sich hier im Vergleich zwischen Referenz und Patch ein etwas runderer Verlauf der Messkurve beobachten (Abbildung 4-22). Der Abfall deutlich unter das erwartete Messsignal wurde hier jedoch nicht beobachtet. Dies liegt möglicherweise an den kleineren Konzentrationssprüngen während der Kalibration. Eine weitere Möglichkeit für das Verhalten ist die Gleichgewichtseinstellung in dem, lediglich durch das einströmende Gas durchmischten, System. Bei der Umstellung von 100 % Sauerstoffbegasung auf eine 1:1 (v/v)-Mischung konnte beobachtet werden, dass der Massedurchflussregler kurzzeitig über die eingestellten 50 % Stickstoff hinaus mehr Gas passieren ließ. Zudem wurde bei der Umstellung der Gasstrom minimiert. Die so verminderte Durchmischung kann auch einen geringeren konvektiven Stofftransport zur Membran des Sensorpatches zur Folge haben. Die geringere Begasungsrate war für diesen Versuch notwendig, da eine höhere Durchflussrate des Gases eine erhöhte Verdunstung und eine damit einhergehende Aufsatzung des Mediums zur Folge hätte. Gerade dies sollte durch die geringere Begasungsrate verhindert werden, um so den pH-Wert und die Ionenstärke des Mediums

auf einem konstanten Niveau zu halten. Das Verhalten des Sensorpatches scheint hier ein Zusammenspiel beider beschriebenen Effekte zu sein, da dieses Verhalten in mehreren Durchläufen dieses Versuches beobachtet wurde. Die Tatsache der guten Übereinstimmung vor der Umstellung der Gasmischung und im späteren Verlauf des Tests spricht für diese These. Eine Erhöhung der Begasungsrate würde den Effekt dann wie im Verlauf der Kalibration minimieren, jedoch ließe die Messung sich in diesem Fall nicht über den gewünschten Zeitraum durchführen.

Unter der Annahme eines durch den Versuchsaufbau verursachten systematischen Fehler in der Anfangsphase des Langzeitversuchs zeigt der Sauerstoffpatch nur ein geringes Photobleaching. Nach der Einstellphase verläuft die Zunahme des Messsignals näherungsweise linear. Die in Abbildung 4-31 dargestellte Näherungsfunktion weist eine Zunahme des Messsignals 1,24 %-sat/d auf. Bei einem Messintervall von 3 s entspricht dies 28.800 Illuminationen des Patches pro Tag oder $4,29 \cdot 10^{-5}$ %-sat/Illumination. Bezogen auf die im Diagramm dargestellten, gefilterten Werte liegt die maximale Abweichung dieser Werte bei $\pm 3,39$ %-sat im Vergleich zur Näherungsfunktion. Im arithmetischen Mittel weichen die Werte um $0,03 \pm 0,71$ %-sat von dieser Funktion ab.

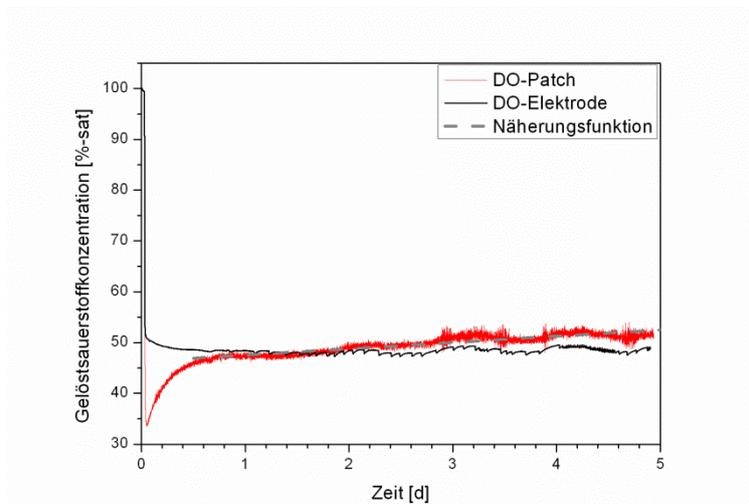


Abbildung 4-31: Lineare Näherung des Bleaching-Effektes.

Diese Werte zeigen, dass die Näherungsfunktion den Verlauf des Patches während des Versuches sehr gut beschreibt. Daher wird diese Näherungsfunktion herangezogen, um die Differenz zur Referenzelektrode zu bilden. Diese Differenz ist in Abbildung 4-32 dargestellt. Hier zeigt sich, dass die Abweichung zur Referenzelektrode im Verlauf der Messung auf bis zu 4 %-sat ansteigt. Auch diese Differenz wird durch eine lineare Näherungsfunktion vereinfacht. Diese Näherungsfunktion zeigt bei einem Bestimmtheitsmaß von 0,91 eine Zunahme der Messdifferenz um 1,11 %-sat/d oder $3,84 \cdot 10^{-5}$ %-sat/Illumination.

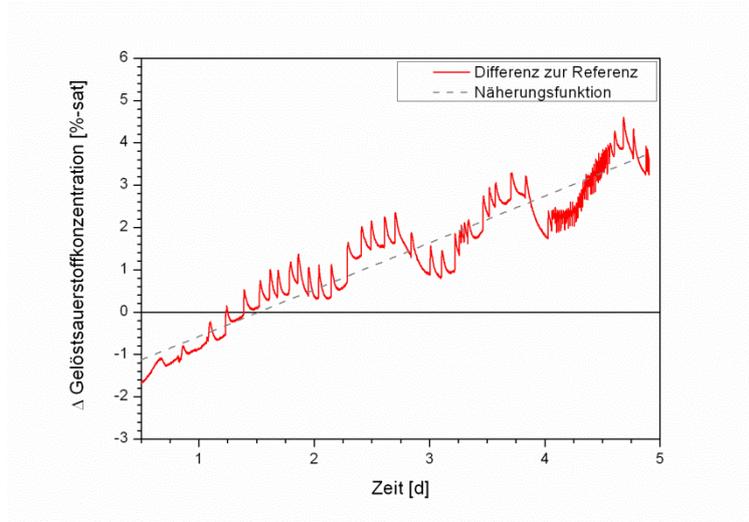


Abbildung 4-32: Abweichung zwischen genähertem Bleaching und der Referenzelektrode.

Insgesamt kann gesagt werden, dass der Fluoreszenzpatch zur Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration einem näherungsweise linearen Photobleaching unterliegt, dieser Effekt jedoch nur sehr kleinen Einfluss auf den Messwert hat, solange ein zur Dauer des Prozesses sinnvolles Messintervall gewählt wird.

4.2.7. Ansprechverhalten des Patches

Um das Ansprechverhalten der Sauerstoffpatches zu untersuchen, wurde ein Phoshat-Puffer mit pH 7,1 und einer Ionenstärke von 150 mM (siehe Anhang, Kapitel 8.1.4) vorgelegt. Die Temperatur wurde mittels Thermostat auf 37 °C eingestellt und konstant gehalten. Mit Hilfe von Durchströmung mit Druckluft wurde eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 100 %-sat eingestellt. Auf diesem Konzentrationsniveau wurde bei der Messung mit einer gewissen Vorlaufzeit gemessen. Die sprunghafte Änderung des Gelöstsauerstoffanteils wurde durch Zugabe einer vortemperierten, gesättigten Natriumsulfitlösung erreicht. Die Zugabe einer solchen Lösung verursacht eine nahezu sofortige Desoxygenierung der Lösung.

Abbildung 4-33 zeigt beispielhaft den Verlauf eines solchen Versuchs. In der vorgeschalteten Phase zur konstanten Einstellung einer an Sauerstoff gesättigten Lösung zeigen die Messwerte des Patches große Schwankungen. Bis zur Zugabe der Sulfitlösung lag die gemessene Sauerstoffkonzentration in dieser Beispielmessung bei $98,9 \pm 5,1$ %-sat. Die erste vertikale Linie verdeutlicht die Zugabe der Sulfitlösung. Die Ansprechzeit t_{98} , definiert als die Zeit in der 98 % des Endwertes erreicht werden, liegt in diesem Fall entsprechend des anfänglichen Sauerstoffgehaltes bei 2 %-sat. Die zweite vertikale Linie markiert das Ende eben dieser Ansprechzeit. In vorliegendem Fall betrug die Ansprechzeit für einen Konzentrationssprung von 100 %-sat auf 0 %-sat 1,45 min. Bei Messungsende

lag die Gelöstsauerstoffkonzentration bei $0,1 \pm 0,3$ %-sat. Das Rauschen nimmt bei den niedrigen Sauerstoffkonzentrationen deutlich ab.

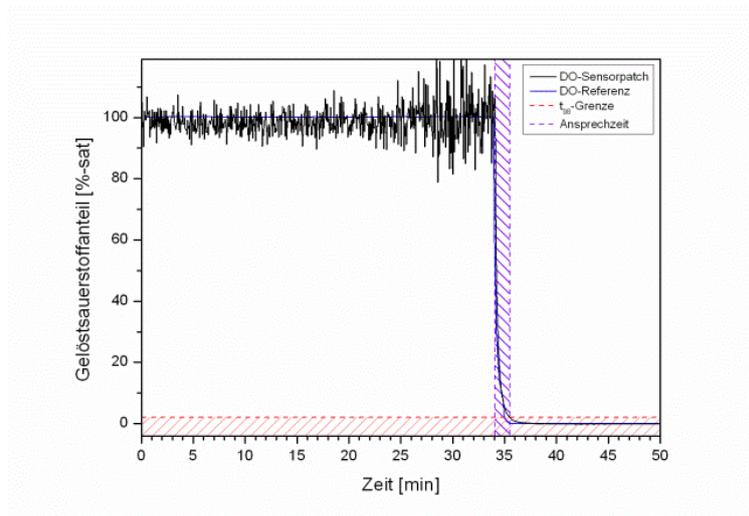


Abbildung 4-33: Ansprechverhalten des Sauerstoffpatches bei einer sprunghaften Änderung des Sauerstoffanteils von 100 %-sat auf 0 %-sat..

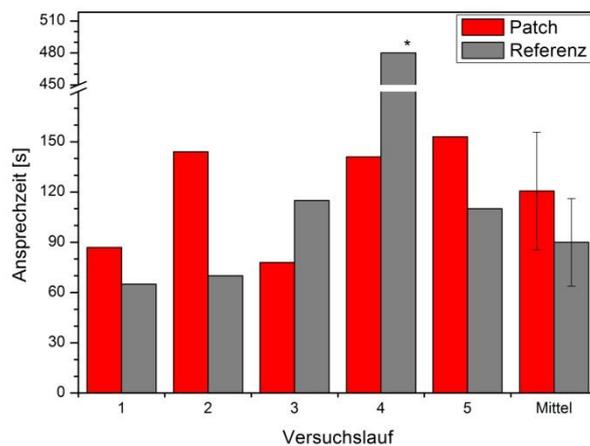


Abbildung 4-34: t_{98} -Ansprechzeiten bei einem Konzentrationssprung von 100 %-sat auf 0 %-sat Gelöstsauerstoff.

Die in Abbildung 4-34 zusammengestellten Messwerte zeigen, dass die t_{98} -Ansprechzeiten sowohl von Referenz als auch Patch eine gewisse Schwankungsbreite aufweisen. Diese beeinträchtigt den Anwendungsfall in der Biotechnologie jedoch nicht, da hier keine Konzentrationssprünge um 100 % innerhalb von wenigen Minuten zu erwarten sind. Auffällig ist dabei die deutlich verlängerte Ansprechzeit der Referenz in Versuchslauf 4. Eine Betrachtung der Rohmessdaten zeigt hierbei, dass die Gelöstsauerstoffkonzentration an der Elektrode etwa 6 min konstant knapp oberhalb der 2 % Marke, deren Unterschreitung für die t_{98} maßgeblich ist, stagniert. Grund hierfür ist vermutlich eine Gasblase, die sich während der Messung an der Membran der Elektrode festgesetzt hatte. Für die Ermittlung des Mittelwertes und der dazugehörigen Standardabweichung wird bei der Referenz-

elektrode der Versuchslauf 4 nicht herangezogen. Im Mittel lag die t_{98} des Fluoreszenzpatches für die Sauerstoffentsättigung bei $2,01 \pm 0,59$ min, während die optische Referenzelektrode mit $1,50 \pm 0,44$ min geringfügig unter der den Ansprechzeiten des Patches lag. Beide Ansprechzeiten liegen in einem für die Biotechnologie geeigneten Bereich. Amperometrische Gelöstsauerstoffsensoren, wie sie häufig in biotechnologischen Prozessen verwendet werden, weisen bei 25 °C in der Regel eine t_{98} von 30 - 60 s für einen Wechsel von Sauerstoff zu Stickstoff auf und liegen damit im Bereich der optischen Sensoren [147, 148]. Insbesondere gilt dies in Anbetracht der in den Produktspezifikationen für die verwendete optische Referenzelektrode angegebene t_{98} von <30 s [149].

4.2.8. Test in einem Modellsystems

Nachdem der Farbstoffpatch zur Gelöstsauerstoffdetektion ausführlich in statischen Systemen getestet wurde, erfolgte ein Test in einem dynamischen System, um einen Eindruck über die Leistungsfähigkeit des Systems in einem dynamischen System treffen zu können. Als Modellsystem wurde dabei der Abbau von Glucose durch das Enzym Glucoseoxidase (GOD) in einem gepufferten Medium ausgewählt.

Dieses Enzym katalysiert in Anwesenheit von Sauerstoff die Reduktion von Glucose zu Gluconsäure. Der Mechanismus dieser Reaktion ist in Abbildung 4-35 dargestellt. Die eingesetzte Glucose wird dabei mit Hilfe der GOD und dem vorhandenen Sauerstoff zu Gluconolacton reduziert und durch Wasser zu Gluconsäure hydrolysiert. Das eigentlich aktive Zentrum während der Katalyse ist dabei das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), welches zum $FADH_2$ reduziert wird. Die Wiederherstellung des Katalysators erfolgt durch den Sauerstoff, welcher das Dinukleotid wieder oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid frei wird [150].

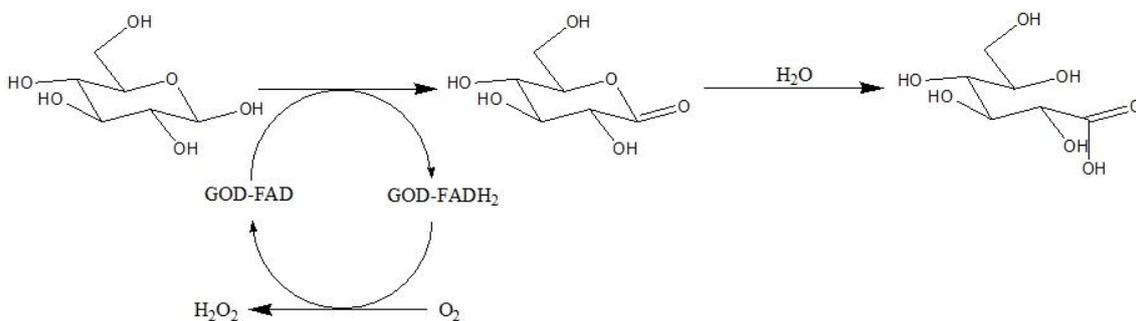


Abbildung 4-35: Reaktionsmechanismus beim Abbau von GOD.

Eine Bestimmung der Glucosekonzentration mit Hilfe des YSI ist auf Grund des freiwerdenden Wasserstoffperoxids nicht möglich, da die gleiche Reaktion in diesem Messgerät zur Konzentrationsbestimmung ausgenutzt wird und somit eine erhöhte Konzentration detektiert

werden würde. Ein Zusatz von Katalase könnte eine indirekte Überwachung des Gelöstsauerstoffgehalts über die Glucosekonzentration ermöglichen, da dieses Enzym einen Abbau von Wasserstoffperoxid bewirkt. Hierauf wurde in vorliegendem Fall allerdings verzichtet, da zum einen die Referenzelektrode weder durch die Edukte und Produkte noch durch die Zwischenprodukte beeinflusst wird, zum anderen eine solche indirekte Überwachung ohnehin nur eine grobe Näherung darstellt, da aus der Umgebung auch ohne direkte Begasung Sauerstoff eingetragen wird und sich der Glucoseverbrauch somit nur bedingt mit dem Sauerstoffverbrauch in Verbindung bringen lässt.

Vor Beginn der Messung wurde eine Glucoselösung (50 g/L) im Verhältnis 3:1 mit einem Phosphat-Puffer (50 mM, IS 150 mM, siehe Anhang, Kapitel 8.1.4) vermischt und auf 37 °C vortemperiert. Während dieser Temperierung erfolgte eine Begasung mit Druckluft über eine Edelstahlfritte um die Lösung mit Sauerstoff zu sättigen.

Dieser Lösung wurden basierend auf dem Volumen des Phosphat-Puffers 250 ppm einer GOD-Lösung (2,5 g/L) zugesetzt. Um den Sauerstoffeintrag aus der Umgebung zu minimieren, wurde während der Messung auf den Einsatz eines Rührers verzichtet. Stattdessen wurde die Lösung noch einmal kurz über die Edelstahlfritte mit Sauerstoff durchmischt. Anschließend wurde die Sauerstoffzufuhr abgestellt.

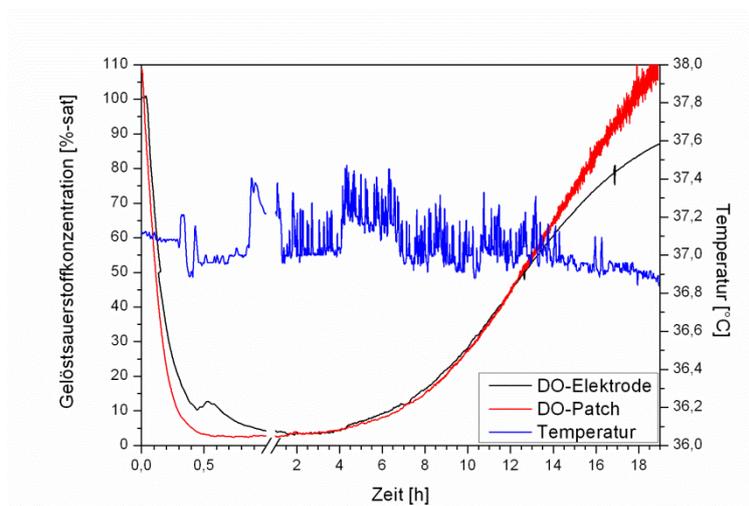


Abbildung 4-36: Verlauf eines Tests des Sensorpatches für Gelöstsauerstoff in einem Modellsystem.

In Abbildung 4-36 ist der Verlauf der Messung gegen die Zeit aufgetragen, wobei die Messwerte mit einem Savitzki-Golay Filter geglättet wurden. Zusätzlich ist der Temperaturverlauf während des Versuchs dargestellt. Bereits nach kurzer Zeit ist eine schnelle Abnahme der Gelöstsauerstoffkonzentration zu beobachten. In der steilen Anfangsphase verlaufen die Messkurven von Patch und Elektrode ein wenig zeitversetzt. Im Bereich der niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ist zu erkennen, dass an der Elektrode die Entsättigung langsamer verläuft. Dies ist durch die Anlagerung

kleiner Sauerstoffblasen an der Membran zu erklären. Die langsame Annäherung der Kurve an die des Patches spricht hierbei für den Übergang des Sauerstoffs in die Lösung. Nach etwa 4 h beginnt der Sauerstoffeintrag aus der Umgebung den Verbrauch durch das Enzym zu überschreiten. Hierbei verlaufen sowohl die Messkurven der Elektrode als auch des Patches bis zur zwölften Stunde des Versuchs nahezu deckungsgleich. Anschließend laufen die Messkurven beider Detektionssysteme auseinander. Dieses lässt sich mit den Erkenntnissen aus den Kapiteln 4.2.6 und 4.2.7 erklären. Zwar wurde in Kapitel 4.2.6 nur ein geringer Einfluss durch das Photobleaching beobachtet, jedoch ist in Abbildung 4-33 zu erkennen, dass die Schwankungen der Messung um die Sauerstoffsättigung und die damit einhergehende Messabweichung sehr groß sind. Auch in weiteren Messungen konnte ein Auseinanderlaufen der Kurven beobachtet werden, so dass hier die Vermutung naheliegt, dass dies durch einen, dem System inherenten Fehler, wie das Bleaching hervorgerufen wird.

Insgesamt lässt sich sagen, dass der DO-Patch über alle Versuche eine zufriedenstellende Leistung zeigt. Als problematisch stellte sich eine während der Versuche verändernde Kalibrationsroutine heraus. Dies resultiert daher, dass für die verschiedenen Versuche Sensorpatches aus mehreren Bögen des Materials herausgestanzt wurden. Auch wenn die gleichen Bögen verwendet wurden, zeigte sich hierbei, sowohl zwischen unterschiedlichen Bögen als auch auf einem Bogen, kleinere und größere Inhomogenitäten, aus denen ebenso Abweichungen in der Kalibrationsroutine resultieren, wie aus der Alterung des Patches. Diese Alterung ist durch die Lagerung bis zum Gebrauch, sowie durch Einstrahlung von Umgebungslicht beim Fertigen des Sensorpatches bedingt. Lagen die Messungen mehrere Wochen auseinander, so mussten neue Kalibrationen erfolgen, um die Veränderungen des Patchmaterials auszugleichen. Für die letztliche Anwendung beim kommerziellen Anwender stellen diese Faktoren jedoch keine Einschränkungen der Einsetzbarkeit dar, da die Patches hier vorkalibriert geliefert werden und nur ein geringer zeitlicher Versatz zwischen Anschaffung und Anwendung liegt.

4.3. Einzeltests am Leitfähigkeitsmodul

Zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit wurde eine Vier-Elektroden Anordnung aus Dickschichtelektroden der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen verwendet. Diese sind bereits in einem für die Verwendung vorgesehenen Gehäuse aus *High-Density-Polyethylen* eingebaut. Abbildung 4-37 zeigt eine Aufsicht, eine seitliche Ansicht sowie eine schematische Darstellung des Leitfähigkeitsrohmoduls. Zu erkennen ist dabei die ausladende Sensorgrundplatte auf der die Sensorik unter der Sensorkappe eingelassen ist. Die Verbreiterung der Grundplatte ist notwendig, um eine ausreichende Fläche für die Verschweißung mit dem Einwegreaktor zu bieten. Dabei wird das Sensormodul so in den Einwegreaktor eingebracht, dass die Sensorkappe in das Innere des Reaktors weist. An der unteren Seite sind die Konnektoren für die Messelektronik positioniert. Dieses Leitfähigkeitsmodul soll als Ausgangsplattform für den Multisensor dienen. Die Messung der Leitfähigkeit dient in der Bioprozesstechnik zur indirekten Bestimmung der Biomasse [151].

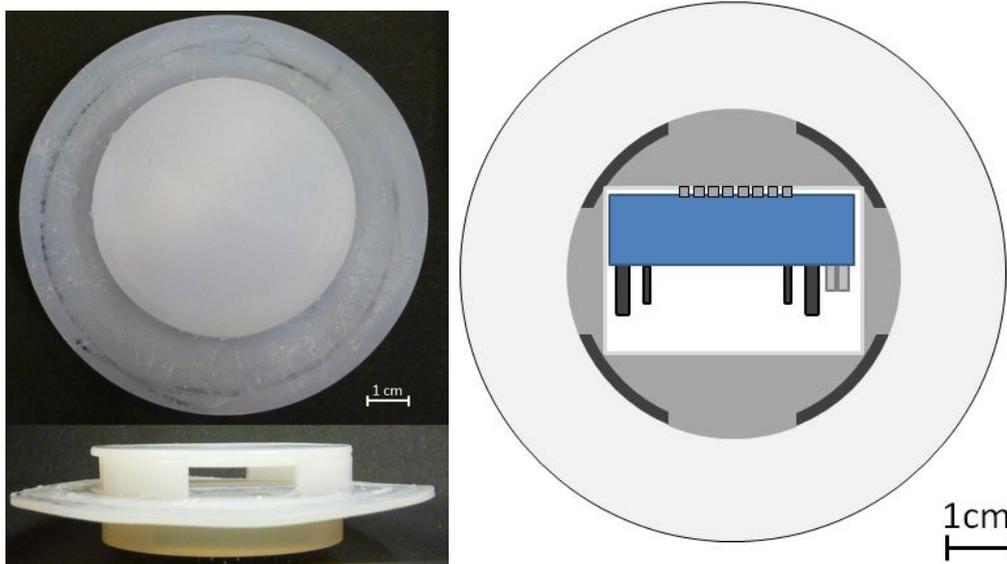


Abbildung 4-37: Aufsicht (oben links) und seitliche Ansicht (links unten) auf das Leitfähigkeitsmodul; schematische Darstellung (rechts)

4.3.1. Einfluss der Füllhöhe auf die Zellkonstante

Ein wichtiger Faktor für die Messung der elektrischen Leitfähigkeit ist die Zellkonstante des Messmoduls. Diese Zellkonstante entspricht bei der Leitfähigkeitsmessung eines Elektrolyten dem geometrischen Faktor, der bei einem elektrischen Leiter zur Bestimmung des elektrischen Widerstandes aus dem spezifischen Widerstand erforderlich ist.

Da der zu konstruierende Messadapter für ein bewegtes System vorgesehen ist, muss diesem Umstand Rechnung getragen werden, indem der Einfluss der Füllhöhe über dem Sensor, sowie der durch Medium ausgefüllte Durchmesser um den Sensor herum untersucht werden. Der hierfür

verwendete Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-38 dargestellt. Unterschiedliche Füllhöhen können durch das Ablassen von Testmedium aus dem Gefäß realisiert werden. Zur Simulation der Reaktorumgebung wurden Einsätze fünf unterschiedlicher Größen verwendet.



Abbildung 4-38: Versuchsaufbau zur Simulation unterschiedlicher Füllhöhen und Reaktordurchmesser.

Abbildung 4-39 zeigt eine schematische Aufsicht auf den verwendeten Aufbau mit maßstabsgetreuer Darstellung der Einsätze. Der Sensor ist dabei stets mittig im Reaktor positioniert, so dass ein gleichmäßiger Flüssigkeitsspiegel in der Umgebung gewährleistet ist.

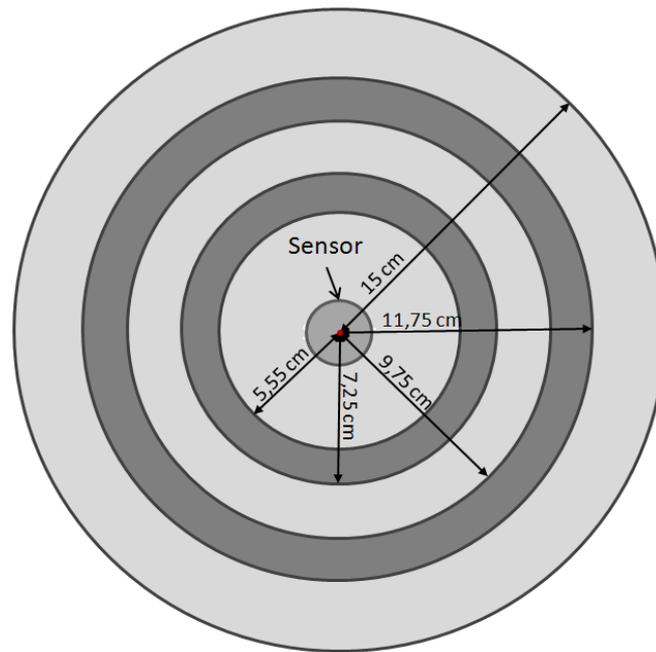


Abbildung 4-39: Schematische Aufsicht auf den Versuchsaufbau zum Einsatz unterschiedlicher Reaktorradien.

Zur Bestimmung der Zellkonstante wurden die fünf Radieneinsätze nacheinander untersucht. Die Füllhöhe wurde dabei über den Auslass reguliert. Die Zellkonstante wurde durch den Abgleich mit einer kalibrierten Leitfähigkeitselektrode (WTW, Weilheim) so eingestellt, dass sowohl kalibrierte Elektrode als auch Leitfähigkeitsmodul (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) einen übereinstimmenden Wert liefern. Die Messung erfolgte ohne Temperaturkompensation, da die Leitfähigkeit von beiden Sonden im gleichen Medium gemessen wird und Temperatureffekte somit keinen Einfluss auf die Messung ausüben konnten. Für jeden Einsatz wurden dabei drei Durchläufe aufgezeichnet. An diese Messdaten wurde im Anschluss eine exponentielle Kurve angepasst.

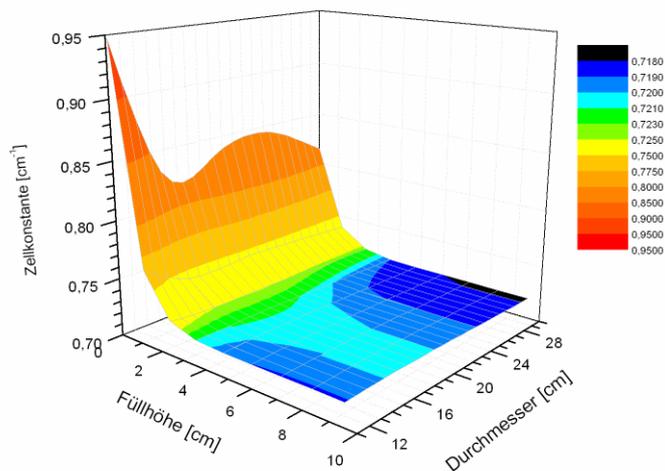


Abbildung 4-40: Entwicklung der Zellkonstante bei Variation von Reaktordurchmesser und Füllhöhe.

In Abbildung 4-40 sind diese exponentiellen Kurven in Abhängigkeit von Durchmesser und Füllhöhe aufgetragen. Die Zwischenräume wurden durch den Renka-Cline Algorithmus mit Hilfe der Software OriginPro 8G extrapoliert. Es wird dabei deutlich, dass die Zellkonstante oberhalb eines Füllstandes von 5 cm nur kleineren Schwankungen unterliegt. Unterhalb dieser Füllhöhe steigt die Zellkonstante rapide an. Dies ist damit zu erklären, dass das Magnetfeld des Sensormoduls zu größeren Anteilen aus dem Medium ragt, welches den elektrischen Strom besser leitet als die Raumluft. Da der Versuch so ausgelegt ist, dass die elektrische Leitfähigkeit des Moduls stets an die kalibrierte Elektrode angepasst wird, muss die Konstante nach der Definition

$$U = \frac{C}{\sigma_{spez}} \cdot I$$

steigen. Hierbei ist U die elektrische Leitfähigkeit, C die Zellkonstante, I die Stromstärke und σ_{spez} die spezifische Leitfähigkeit. Durch die Variation des Füllstandes werden U und I nicht geändert, während σ_{spez} durch den sinkenden Anteil des gutleitenden Mediums kleiner wird. Um die Gleichung zu erfüllen muss im Umkehrschluss die Zellkonstante C steigen.

Zur Festlegung einer Zellkonstante wird nun der Bereich höherer Füllstände betrachtet bei denen die Zellkonstante einen fixen Wert erreicht. Tabelle 4-4 zeigt die konstanten Werte der Zellkonstanten der fünf Durchmesser. Auffällig ist die recht hohe Standardabweichung für den 30 cm Einsatz. Dieser resultiert aus hohen Schwankungen, die bei der Bestimmung der Zellkonstante auftraten und eine neunfach Bestimmung notwendig machten. Ebenfalls zu sehen sind der Median und das arithmetische Mittel der Werte. Es ist zu erkennen, dass beide Werte sich nicht signifikant unterscheiden. Im weiteren Verlauf der Versuche wird auf den Mittelwert zurückgegriffen.

Tabelle 4-4: Wertetabelle der ermittelten Zellkonstanten in Abhängigkeit des Einsatzdurchmessers.

Wert	Zellkonstante [cm ⁻¹]	Standardabweichung [cm ⁻¹]
Durchmesser 11,1 cm	0,7189	0,0012
Durchmesser 14,5 cm	0,7200	0,0004
Durchmesser 19,5 cm	0,7187	0,0017
Durchmesser 23,5	0,7190	0,0008
Durchmesser 30 cm	0,7178	0,0031
Median	0,7189	
Mittelwert	0,7183	

Inwieweit eine weitere Nutzung des Mittelwertes als Zellkonstante für das Messmodul sinnvoll ist, lässt sich überprüfen, indem die Abweichung der gemessenen Zellkonstanten zum ermittelten Mittelwert betrachtet wird. Abbildung 4-41 ist zu entnehmen, dass sich die Schwankungen oberhalb

von etwa 4 cm Füllhöhe stets unterhalb von 1% bewegen. Der Fehler, welcher durch die Annahme des Mittelwertes als Zellkonstante gemacht wird, ist also äußerst klein. Der Mittelwert kann somit als Zellkonstante gewählt werden. Die Verwendung des Medians würde keine nennenswerten Abweichungen ergeben.

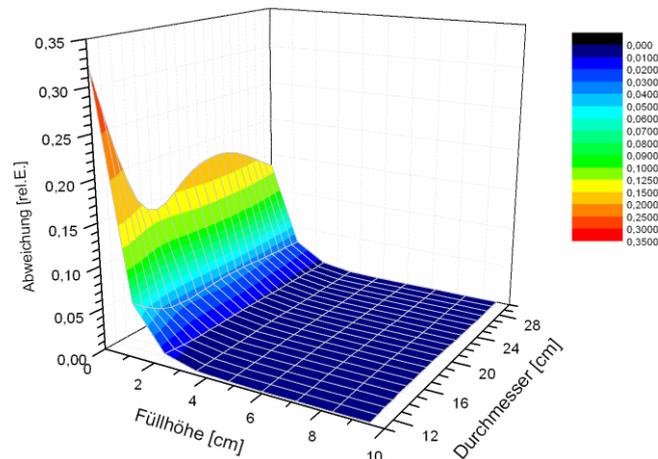


Abbildung 4-41: Relative Abweichung der ermittelten Zellkonstanten vom Mittelwert.

In der Folge wurde der Versuchsablauf in der Form modifiziert, dass der Füllstand mit dem Mittelwert als festeingestellter Zellkonstante variiert wurde. Parallel dazu wurde mit der kalibrierten Elektrode die elektrische Leitfähigkeit gemessen. Die Messung erfolgte auch hier ohne Temperaturkompensation, da mögliche Unterschiede bei der Temperaturmessung nicht beachtet werden sollten, sondern lediglich die Anwendbarkeit des Mittelwerts als Zellkonstante überprüft werden sollte.

Abbildung 4-42 zeigt den beobachteten Zusammenhang zwischen der Abweichung bei fest gewählter Zellkonstante, der Füllhöhe und dem Reaktordurchmesser. Bis zu einer Füllhöhe von 2,5 cm überschreitet die Differenz beider Leitfähigkeitsmesser die 1 %-Marke nicht. Es ist zudem ersichtlich, dass ein größerer Radius einen kleineren Füllstand ermöglicht. Insgesamt lässt sich das Leitfähigkeitsmodul gut und reproduzierbar einsetzen, solange ein ausreichender Füllstand über dem Sensor gewährleistet ist.

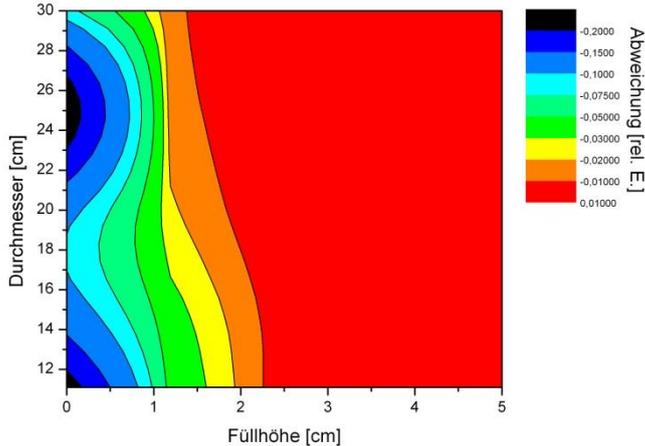


Abbildung 4-42: Relative Abweichung der elektrischen Leitfähigkeit zwischen Modul und Referenzelektrode.

4.3.2. Einfluss der Orientierung der Sensorkappe auf die Messung

Ein möglicher Einflussfaktor auf die Form und Ausdehnung des elektrischen Feldes und damit auf die Zellkonstante kann die Orientierung der Sensorkappe sein, welche das Messfeld begrenzt. In der Standardversion des Sensors befinden sich Öffnungen in der Sensorkappe bei Aufsicht auf das Modul horizontal und vertikal zum Sensorarrangement. Zur Konstruktion eines Alternativsensors wurde die Sensorkappe am Ansatz abgetrennt, um 45° gedreht und mit Klebstoff fixiert, so dass die Öffnungen Diagonalen über den Messelektroden bildeten. Die beiden Anordnungen der Sensorkappe sind in Abbildung 4-43 schematisch dargestellt.

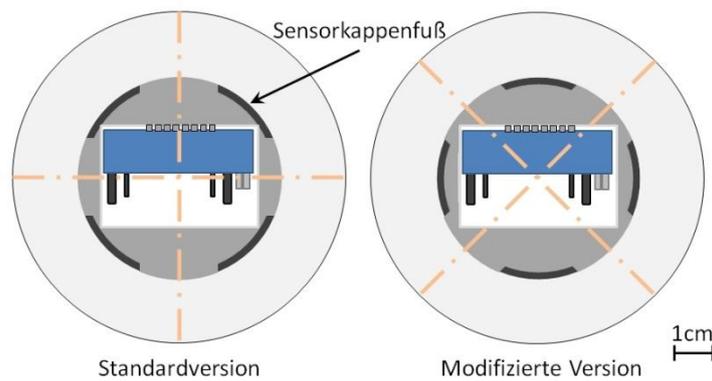


Abbildung 4-43: Orientierung der Sensorkappenöffnungen; links: horizontal/vertikal; rechts: diagonal.

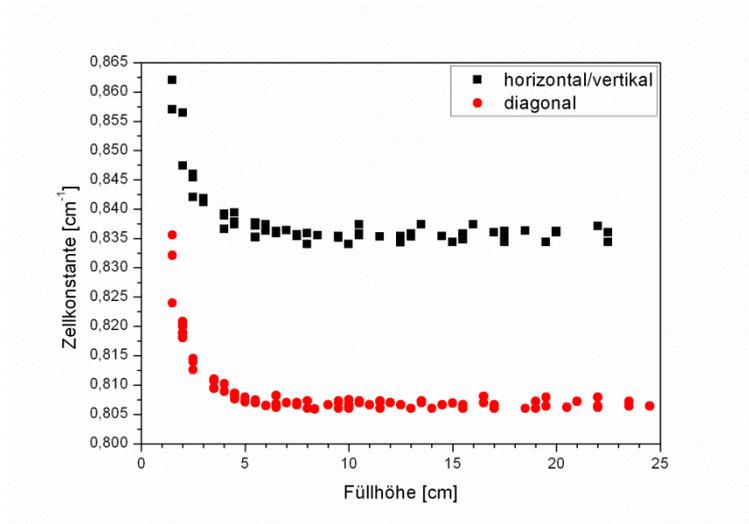


Abbildung 4-44: Einfluss der Orientierung der Sensorkappe auf die Zellkonstante in Abhängigkeit vom Füllstand.

Um den Einfluss der Sensorkappenposition zu überprüfen, wurde der Versuch aus Kapitel 4.3.1 mit der veränderten Sensorkappe erneut durchgeführt. In Abbildung 4-44 ist der Verlauf der Zellkonstante in Abhängigkeit von der Füllhöhe für die Standardausführung des Leitfähigkeitsmoduls und die um 45° rotierte Version bei einem Einsatzdurchmesser von 11,1 cm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass beide Kurven generell parallel verlaufen. Auch bei Verwendung der übrigen Einsätze

zeigte sich, dass die Version mit der rotierten Sensorkappe eine niedrigere Zellkonstante, aber einen parallelen Verlauf aufweist. Basierend auf einem exponentiellen Kurvenverlauf ist die Zellkonstante der diagonalen Sensorkappenanordnung gegenüber der Standardausführung um $3,47 \pm 0,04 \%$ verringert.

Um den ersten Eindruck eines parallelen Verlaufs zu überprüfen, wurde der Quotient aus der Zellkonstante C am Punkt i und der, im statischen Bereich des Versuchs durch Mittelwertbildung ermittelten, Zellkonstanten C_{stat} gebildet. Bei Auftragung des Quotienten gegen die Füllhöhe ergibt sich ein Bild, wie es in Abbildung 4-45 zu sehen ist. Die Vermutung eines parallelen Verlaufs wird durch das Ergebnis bestätigt. Der Füllstand hat auf die Zellkonstante unabhängig von der Orientierung der Sensorkappe den gleichen Effekt. Dies wirft die Frage auf, warum die Zellkonstante durch Drehung der Sensorkappe erniedrigt wird.

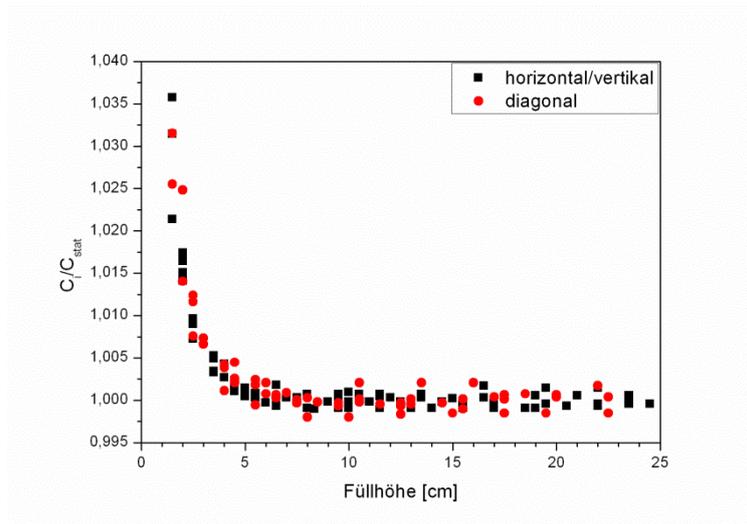


Abbildung 4-45: Verhältnis C_i/C_{stat} in Abhängigkeit von Sensorkappenorientierung und Füllstand.

Da sämtliche Parameter des Leitfähigkeitsmoduls mit Ausnahme der Position der Sensorkappenfüße während der Messungen gleich blieben, muss die Rotation um 45° einen Einfluss auf das Messsystem haben. Naheliegender wäre es hierbei anzunehmen, dass die Positionsänderung der Sensorkappenfüße einen Einfluss auf das von den Elektroden generierte elektrische Feld hat. Um diese Idee zu verfolgen, wird die Form des elektrischen Feldes zwischen zwei gegensätzlichen Ladungen betrachtet [152]. Auf Basis dieser theoretischen Grundlage werden die elektrischen Feldlinien schematisch in die Risszeichnungen des Sensors übertragen. In Abbildung 4-46 ist der potentielle Verlauf der Feldlinien bei unterschiedlichen Orientierungen des Sensorkappenfußes dargestellt. Es wird deutlich, dass sich das elektrische Feld in der Standardorientierung der Sensorkappe ungehindert ausbreiten kann, während es bei Rotation der Sensorkappe zu einer Schwächung des

elektrischen Feldes durch den vorliegenden Isolator (Sensorkappenfuß) kommt. Dies hat Einfluss auf den Formfaktor der Messzelle, wodurch das Absinken der Zellkonstante vermutlich begründet ist.

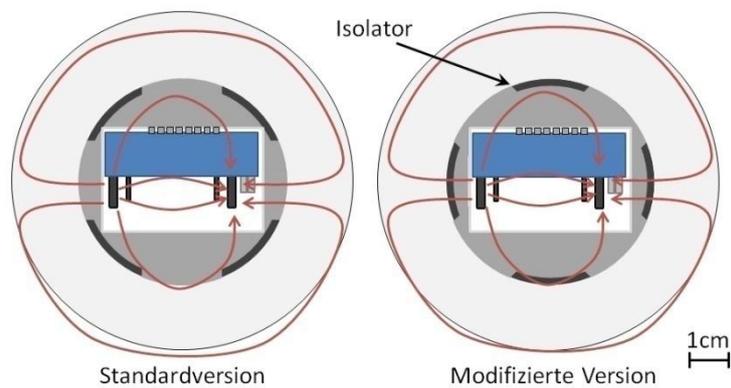


Abbildung 4-46: Schematische Darstellung der angenommenen Feldlinien der Messanordnung.

Der Effekt der Absenkung der Zellkonstante ist, wie in Abbildung 4-47 zu sehen, bei sämtlichen Einsatzdurchmessern zu beobachten. Während die Zellkonstante in der Standardausführung des Leitfähigkeitsmoduls nahezu stabil bleibt, ist bei der Rotation der Sensorkappe ein verstärktes Abnehmen der Zellkonstante zu beobachten. Hierbei kommt der gleiche Effekt zum Tragen wie bei der Zunahme der Zellkonstante unterhalb einer Füllhöhe von 5 cm. Dadurch, dass ein größerer Teil des elektrischen Feldes mit Elektrolyt gefüllt ist, nimmt die Zellkonstante mit steigendem Einsatzdurchmesser ab. Die verstärkte Abnahme der Zellkonstante lässt sich letztlich wiederum dadurch erklären, dass ein kleinerer Anteil des ohnehin kleineren bzw. schwächeren elektrischen Feldes außerhalb des gut leitenden Messmediums liegt.

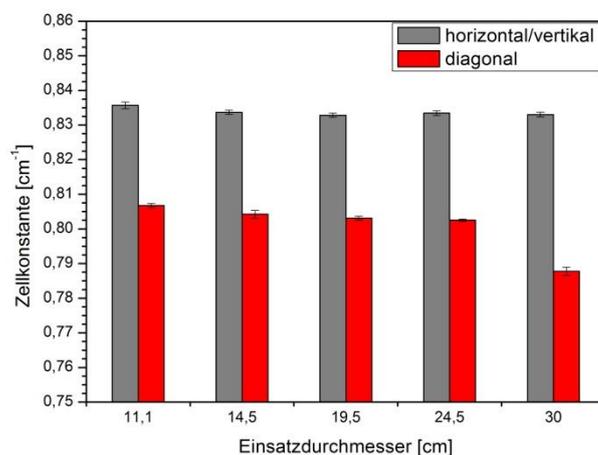


Abbildung 4-47: Zellkonstanten in Abhängigkeit von Sensorkappenorientierung und Einsatzdurchmesser.

4.3.3. Simulation realer Einsatzbedingungen bei unterschiedlichen Füllständen

In realen Rocker-Systemen wird die Durchmischung des Kultivierungsmediums durch Wellenbewegungen induziert. Hierbei sehen diese Systeme Neigungen von bis zu 10° vor. Zur Simulation solcher realer Einsatzbedingungen wurde der Versuchsaufbau mit Hilfe von Stützen definierter Länge gekippt. Dies erfolgte bis zu einem Winkel von 20° in Schritten von jeweils 1° . Höhere Winkel wurden durch den Einsatz einer Hebebühne und manuelle Winkelmessung realisiert, wobei nur die Winkel 25° , 30° , 34° und 39° ausgewählt wurden. Höhere Winkel ließen sich aus statischen Gründen des Versuchsaufbaus (Abbildung 4-48) nicht realisieren. Da das Leitfähigkeitsmodul für den Einsatz in Beutelreaktoren gedacht ist, wurde dieser Versuch auf den Einsatz mit dem größten Durchmesser von 30 cm beschränkt, zumal hier der Flüssigkeit auch größerer Spielraum gegeben wird sich vom Sensor zu entfernen, womit etwaige auftretende Effekte bei den Beschränkungen durch die Einsatzradien hier die größten Auswirkungen haben. Die Winkeleinstellungen wurden weit über die bereits genannten üblichen Neigungen hinaus gewählt, um die Tendenz im bewegten System deutlicher herauszuarbeiten.

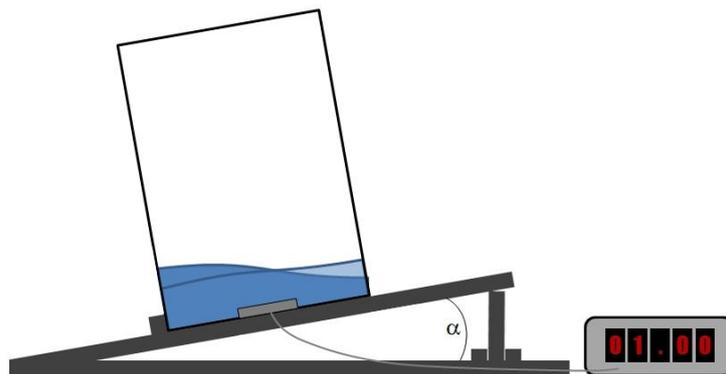


Abbildung 4-48: Versuchsaufbau zur Simulation verschiedener Anstellwinkel.

Zur Simulation wurde der Aufbau in die Ausgangslage, d.h. eine Neigung von 0° , gebracht, und mit einer Kaliumchloridlösung bis zu einer definierten Füllhöhe gefüllt. Neben der Messung mit dem Sensormodul (Sartorius AG, Göttingen) erfolgte eine Referenzmessung mit einer kalibrierten Leitfähigkeitselektrode (WTW, Weilheim). Die Zellkonstante des Leitfähigkeitsmoduls wurde dabei für jeden Anstellwinkel so verändert, dass die gemessene elektrische Leitfähigkeit der kalibrierten Elektrode entsprach. Ein prozentualer Vergleich mit der in Kapitel 4.3.1 ermittelten mittleren Zellkonstante ist in Abbildung 4-49 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass selbst bei einer Füllhöhe von 0,5 cm und dem realen Anstellwinkel von 10° die Abweichung kaum ins Gewicht fällt. Erst bei höheren Anstellwinkeln wird die Abweichung relevant, wobei sie auch hier mit steigenden Füllhöhen weniger stark ausgeprägt ist.

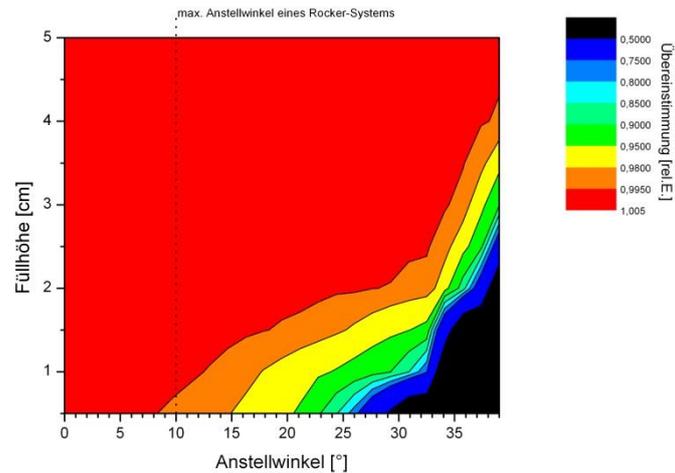


Abbildung 4-49: Prozentuale Übereinstimmung mit der bestimmten mittleren Zellkonstante.

Parallel dazu wurde die Abweichung der gemessenen elektrischen Leitfähigkeit bei fest eingestellter Zellkonstante gegen die Referenz gemessen. Hierbei wurden die elektrischen Leitfähigkeiten beider Messsonden für den jeweiligen Anstellwinkel miteinander verglichen. Abbildung 4-50 zeigt dabei den Zusammenhang zwischen Anstellwinkel und Füllhöhe. Bei geringen Füllhöhen ist hier bereits in der Ausgangslage eine Abweichung zur Referenz zu verzeichnen, die mit Erhöhung des Anstellwinkels weiter zunimmt. Die extremen Abweichungen im Bereich hoher Winkel resultieren aus dem vollständigen Trockenlaufen des Sensormoduls bei den entsprechenden Füllständen. In dem für Rocker-Systeme vorgesehenen Bereich bis zu 10° lassen sich bereits bei Füllständen von 1 cm nur noch geringe Abweichungen feststellen, womit der Sensor für diese Systeme geeignet erscheint, solange eine ausreichende Flüssigkeitsmenge über dem Sensor vorliegt.

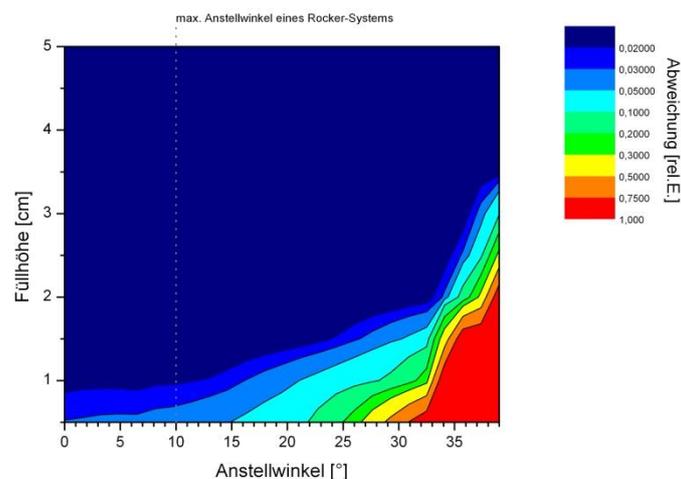


Abbildung 4-50: Prozentuale Abweichung des Messwerts von der Referenz bei voreingestellter Zellkonstante.

4.3.4. Überprüfung der Ergebnisse in einem wippenden System

Die im vorhergehenden Abschnitt ermittelten Daten geben einen ersten Eindruck davon, wie sich der Sensor in einem bewegten System verhalten könnte. Wie in Abbildung 4-51 gezeigt, ändert sich während des Wippens der Flüssigkeitsspiegel senkrecht über dem Leitfähigkeitssensor, was die gemessene Leitfähigkeit beeinflussen könnte. Um diese Erwartung zu untermauern, wurde der Testreaktor auf einem handelsüblichen Waver (BIOSTAT CultiBag RM, Sartorius AG, Göttingen) in eine wippende Bewegung gebracht. Das System wurde in Bezug auf den Winkel mit 10° auf dem Maximum betrieben. Als Betriebsgeschwindigkeit wurde mit 30 Zyklen pro Minute eine gebräuchliche Frequenz gewählt.

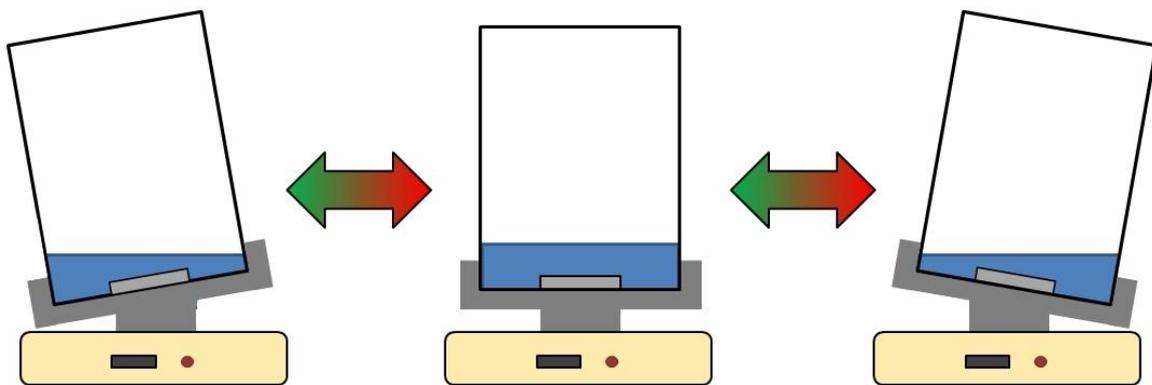


Abbildung 4-51: Änderung des Flüssigkeitsspiegels in einem wippenden System.

Für einen ersten Lauf wurde bei waagerechter Orientierung des Reaktors eine Kaliumchloridlösung eingefüllt bis ein Füllstand von 4 cm über dem Sensor erreicht war. Zur Referenzierung wurde in Neigungsrichtung eine Leitfähigkeitssonde als Referenz angebracht. Auch in deren Umgebung änderte sich der Flüssigkeitsspiegel, jedoch weist die Sonde eine geschlossene Referenzmesszelle auf, sodass hier keine Auswirkungen der Bewegung des Flüssigkeitsspiegels zu bemerken sein sollte, solange sich Elektrolytlösung zwischen den Elektroden befindet. Unter maximalem Neigungswinkel wurde nun die Messung mit einer Wippfrequenz von 30 Zyklen gestartet.

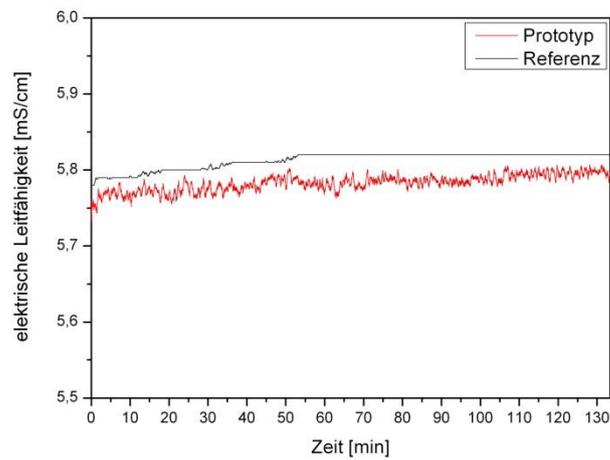


Abbildung 4-52: Langzeitmessung der elektrischen Leitfähigkeit auf einem Waver bei einem Füllstand von 4 cm.

Abbildung 4-52 zeigt den Verlauf einer Langzeitmessung des mit Salzlösung gefüllten Testreaktors auf dem Waver. Über die Rohmesswerte wurde zur besseren Darstellbarkeit ein Mittelwertfilter mit einer Fensterbreite von 25 Messwerten gelegt. Die Referenzelektrode zeigt hierbei ein überaus stabiles Signal, welches aber auch aus dem längeren Messintervall von 5 s resultiert, sodass innerhalb dieser Zeit fünfmal der gleiche Wert aufgezeichnet wurde, während für den Prototyp fünf Werte erfasst wurden. Über den gesamten Verlauf betrachtet ist auch das Messsignal des Prototypen sehr stabil, weist jedoch ein kontinuierliches Rauschen auf, welches bei dieser Betrachtung möglicherweise auf die Bewegung des Wavers zurückzuführen sein könnte. Um dies näher zu beleuchten, wird ein Ausschnitt der Rohdaten betrachtet.

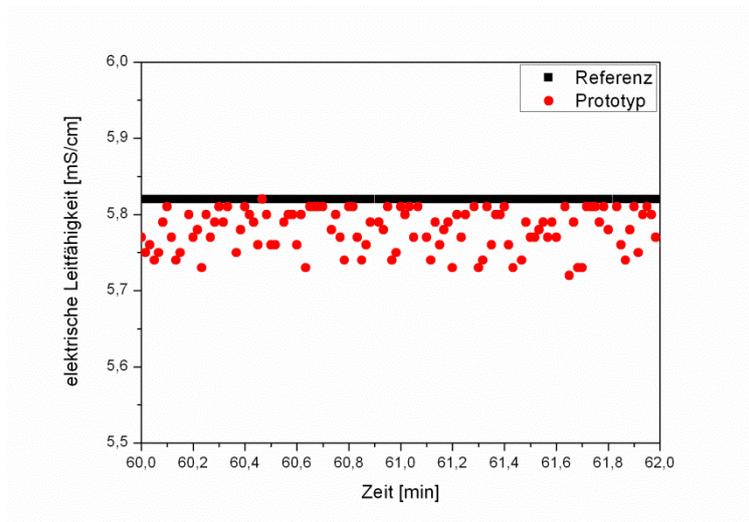


Abbildung 4-53: Ausschnitt aus einer Messung der elektrischen Leitfähigkeit bei 4 cm Füllstand.

In der Darstellung in Abbildung 4-53 wurden die Rohdaten verwendet. Auch hier ist das stabile Signal der Referenz und das Messrauschen des Prototyps deutlich. Im Verlauf der Messung lassen sich

jedoch nicht 30 Zyklusbewegungen erkennen, wie es anhand der Bewegung des Wavers zu erwarten gewesen wäre. Vielmehr ist das Signal zwischen Minute 60 und 62 mit einem Mittelwert von $5,779 \pm 0,027$ mS/cm, was einer Schwankung von 0,46 % entspricht, äußerst stabil. Große Schwankungen wären nach den Ergebnissen aus 0 bei einer maximalen Auslenkung von 10° nicht zu erwarten. Um einen genaueren Blick auf den Einfluss des wippenden Systems zu werfen, wurde in einem folgenden Versuch der Füllstand auf 2 cm Elektrolytlösung über dem Sensor reduziert.

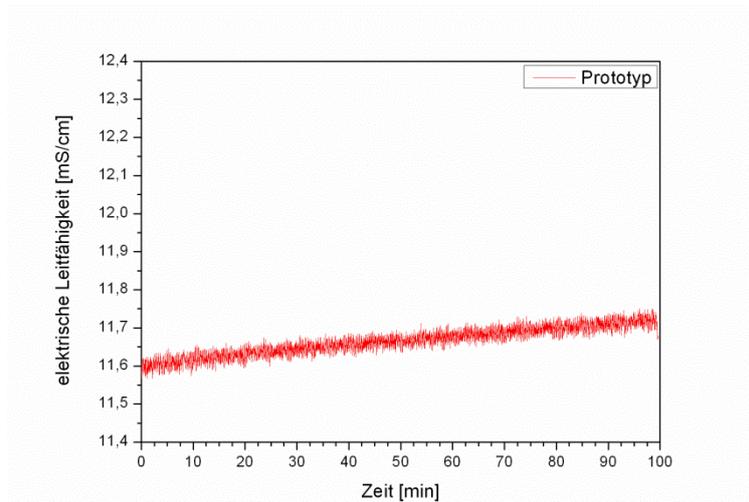


Abbildung 4-54: Langzeitmessung der elektrischen Leitfähigkeit auf einem Waver bei einem Füllstand von 2 cm.

Abbildung 4-54 zeigt den Verlauf der Leitfähigkeitsmessung bei einem Füllstand von 2 cm. Eine parallele Datenerfassung mit der Referenzelektrode konnte nicht durchgeführt werden, da die Messzelle bei einem solch niedrigen Füllstand nicht vollständig von Elektrolyt umspült worden wäre. Die Filterung der Messdaten erfolgte wie im ersten Versuchsteil mit einem Mittelwertfilter. Ein Rauschen während der Messung, ähnlich wie bei dem vorhergehenden Versuch mit 4 cm Füllstand, ist zu erkennen. Aus diesem Grund wird auch für diese Messung ein Zoom betrachtet.

Abbildung 4-55 zeigt einen Ausschnitt aus der Messung mit 2 cm Füllstand. Im Gegensatz zur anderen Messung sind in diesem Fall klare Wellenbewegungen des Leitfähigkeitssignals zu erkennen. Zwar ist auch hier nicht die Zahl der Waverzyklen im Messsignal erkennbar, dies kann allerdings auch in einer Diskrepanz zwischen Messintervall und Waverzyklus begründet sein. Doch trotz der Wellenbewegung ist nicht außer Acht zu lassen, dass eine Füllhöhe von nur 2 cm über dem Sensor nicht den realen Bedingungen in einem Einwegbioreaktor entspricht, sodass insgesamt davon ausgegangen werden sollte, dass das hier auftretende Phänomen keinen Einfluss auf die Verwendbarkeit des Prototypen in der Biotechnologie hat. Zudem ist die Schwankungsbreite sehr gering. Im betrachteten Ausschnitt liegt der durchschnittliche Messwert bei $11,657 \pm 0,044$ mS/cm, die Standardabweichung beträgt folglich 0,38 %.

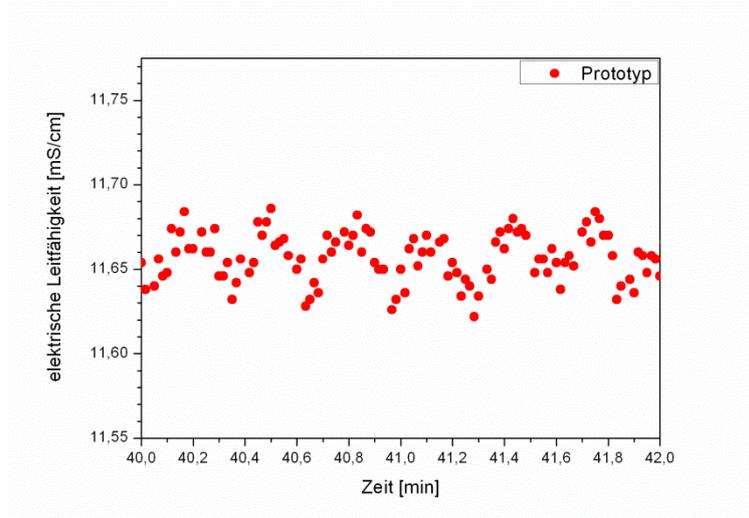


Abbildung 4-55: Ausschnitt aus einer Messung der elektrischen Leitfähigkeit bei 2 cm Füllstand.

4.3.5. Ansprechzeit des Leitfähigkeitssensors

Als weiteres wichtiges Leistungsmerkmal ist die Ansprechzeit bei sprunghaften Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit zu messen. Hierfür wurden im Reaktormodell 2 L demineralisiertes Wasser vorgelegt und die elektrische Leitfähigkeit für etwa zwei Minuten bei einer Rührgeschwindigkeit von 800 rpm gemessen, bevor 1 mL 1 M Kaliumchloridlösung zugegeben wurde. Mit dem Erreichen eines konstanten Leitfähigkeitswertes erfolgte erneut eine etwa zweiminütige Messung der Leitfähigkeit.

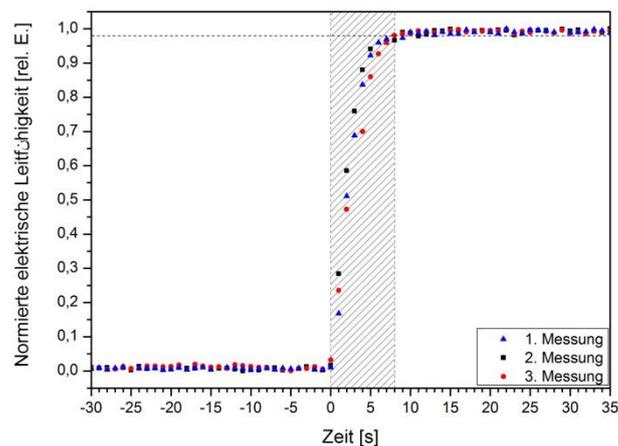


Abbildung 4-56: Normierte Darstellung der Ansprechzeit des Sensormoduls, Darstellung der Einstellzeit schraffiert.

Abbildung 4-56 zeigt exemplarisch den Verlauf dreier Sprungversuche. Dabei wurde der Zeitpunkt der Salzzugabe als Startpunkt der Zeitskala festgelegt. Die Leitfähigkeit wurde normiert, um die Messungen übereinander legen zu können. Der Verlauf zeigt deutlich, dass es im Vorlauf der Salzzugabe kaum zu Schwankungen der elektrischen Leitfähigkeit kommt. Auch im Nachlauf ist dies nicht der Fall. Der Verlauf des Sprunges aller drei dargestellten Messungen ist nahezu identisch. Nach

einem steilen Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit erfolgt ein rasches Abflachen in ein konstantes Messsignal. Die Einstellzeit der Messungen liegt im Bereich von 7,5 – 9,5 s. Die in der Grafik dargestellte Einstellzeit beträgt 8 s. Da der Startpunkt mit der Zugabe der Salzlösung festgelegt ist, muss der Endzeitpunkt noch definiert werden. Hierfür wird wieder auf die t_{98} zurückgegriffen, sodass das Erreichen eines Wertes von 0,98 die Einstellzeit markiert. Dieser Wert ist in der Abbildung durch die horizontale Linie visualisiert.

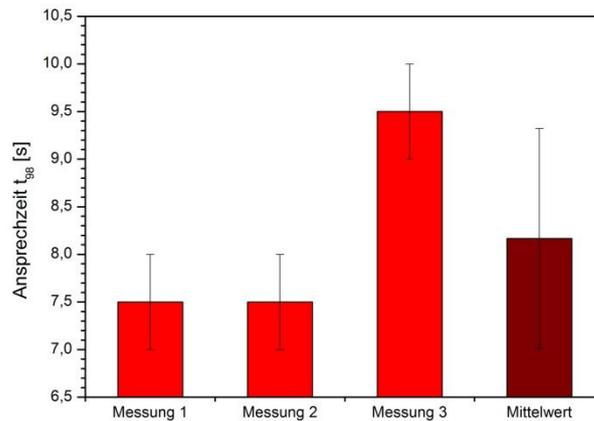


Abbildung 4-57: Ansprechzeiten t_{98} bei einem Leitfähigkeitsprung.

Abbildung 4-57 zeigt die ermittelten Ansprechzeiten in einer Gegenüberstellung. Die Ansprechzeit wurde dabei so gewählt, dass sie zwischen die Aufnahmezeitpunkte des ersten Messwertes $>0,98$ und des letzten Messwertes $<0,98$ liegt. Durch das Messintervall von 1 s resultiert für jede Messung eine Ungenauigkeit von $\pm 0,5$ s. Der Mittelwert der Ansprechzeiten liegt bei $8,2 \pm 1,2$ s. Auf Grund des großen Messintervalls der Referenzelektrode, welches minimal auf 5 s einstellbar ist, wurde auf einen Vergleich mit der Referenzsensorik verzichtet. Herstellerangaben sprechen von Ansprechzeiten t_{90} von <3 s [153]. Diese Ansprechzeit liegt für den Prototyp im Bereich von 4,5 - 6,5 s. Durch Verzögerungen bei der Durchmischung und bei der Eingabe der Salzlösung, kann davon ausgegangen werden, dass die Ansprechzeit des Leitfähigkeitsprototypen im Bereich marktfähiger Leitfähigkeitsmessgeräte liegt.

4.3.6. Test der Langzeitstabilität

Um die Langzeitstabilität des Leitfähigkeitsmoduls zu überprüfen, wurden das Modul und die kalibrierte Elektrode in den Reaktor eingebracht. Die Messung erfolgte hier mit linearer Temperaturkompensation mit einem Koeffizienten von 2 %/K. Die Temperatur wurde durch die Verwendung eines Thermostaten konstant bei 20 °C gehalten. Zur besseren Durchmischung wurde das Probemedium mit Hilfe eines Rührers durchmischt. Das Medium wurde zudem im Kreis gepumpt,

sowohl um die weitere Durchmischung zu fördern, als auch um die Temperaturkonstanz zu gewährleisten.

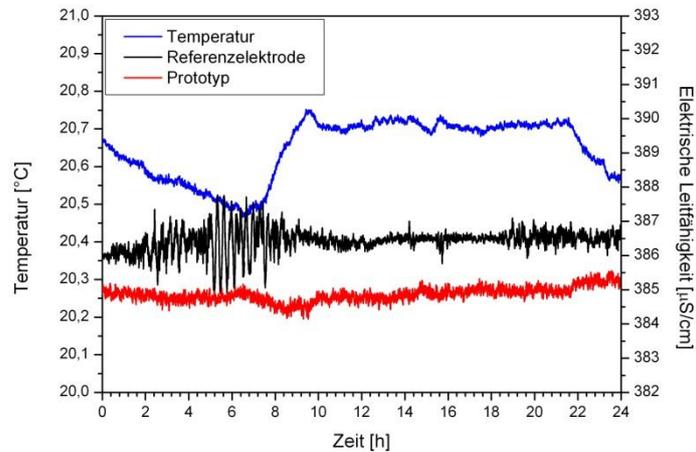


Abbildung 4-58: Verlauf der Langzeitmessung mit Auftragung von elektrischer Leitfähigkeit und Temperatur.

Abbildung 4-58 zeigt den Verlauf eines Langzeittests. Aufgetragen sind die Temperatur des Systems sowie die elektrischen Leitfähigkeiten von Referenzelektrode und Prototypen. Beide Leitfähigkeits-sensoren messen über den Versuchszeitraum in einem konstanten Leitfähigkeitsbereich. Auch die Temperatur schwankte in dieser Zeit lediglich um etwa 0,2 °C. Der Verlauf der beiden Leitfähigkeitskurven ist nahezu parallel, was sich damit erklären lässt, dass die in Kapitel 4.3.1 bestimmte Zellkonstante keinesfalls exakte Gültigkeit hat. Die Abweichung zwischen beiden Messgeräten beträgt allerdings unter 1 % und kann somit toleriert werden.

Auch die Ergebnisse der Langzeittests zeigen die Eignung des Leitfähigkeitsmoduls für die Verwendung in Einwegreaktoren. Folglich kann auch das Kunststoffsensorgehäuse als Basis für den Sensorkörper für einen Multisensorprototypen verwendet werden.

4.4. Einzeltests mit verschiedenen Temperatursensoren

Viele Prozessgrößen sind von der Temperatur abhängig. Diese Abhängigkeit ist mehr oder weniger stark ausgeprägt, so dass eine zuverlässige Messung der Temperatur des Kultivierungsmediums notwendig ist. Daher wurden Tests an dem im Messmodul integrierten Pt1000 durchgeführt. Abbildung 4-59 zeigt die Anordnung der Sensorik unter der Kappe des Messmoduls. Der integrierte Pt1000 ist dabei seitlich neben den Dickschicht-Elektroden positioniert.

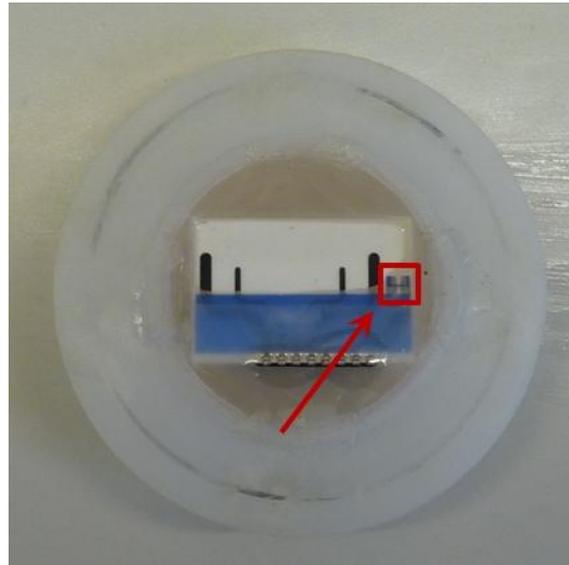


Abbildung 4-59: Position des Pt1000 im Messmodul.

Zusätzlich zu diesem Sensor wurden drei NTC (*Negative Temperature Coefficient*) Thermistoren (Epcos AG, München) getestet, die sich durch einen mit steigender Temperatur sinkenden Eigenwiderstand auszeichnen.

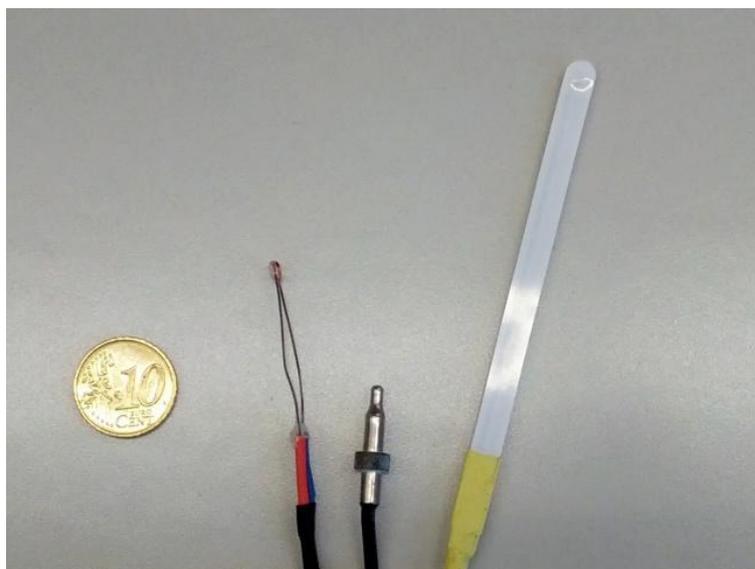


Abbildung 4-60: Getestete NTC-Sensoren; von links nach rechts: Glasverkapselt, Vollmetallkörper und Foliensensor.

In Abbildung 4-60 sind die NTCs im Größenvergleich dargestellt. Es handelt sich um einen Einweg-Foliensensor, einen glasverkapselten Sensor sowie eine Vollmetallsensoreinheit. Damit verhält sich der elektrische Widerstand dieser Thermistoren genau entgegengesetzt zu einem Pt1000.

4.4.1. Test der Langzeitstabilität

Für den Einsatz in Kultivierungen ist es notwendig, dass ein Sensor über einen längeren Zeitraum verlässlich eingesetzt werden kann. Um dies für die vorliegenden Temperatursensoren zu testen, wurden sowohl der Temperatursensor des Prototyps als auch die NTC-Sensoren gemeinsam mit einem Referenzelement (Pt100) in ein Wasserbad eingebracht, welches durch ein Thermostat auf Temperatur gehalten wurde. Die Messung wurde bei einer konstant gewählten Einlauftemperatur von 37 °C durchgeführt. Abbildung 4-61 zeigt beispielhaft 6 h aus diesem Langzeittest.

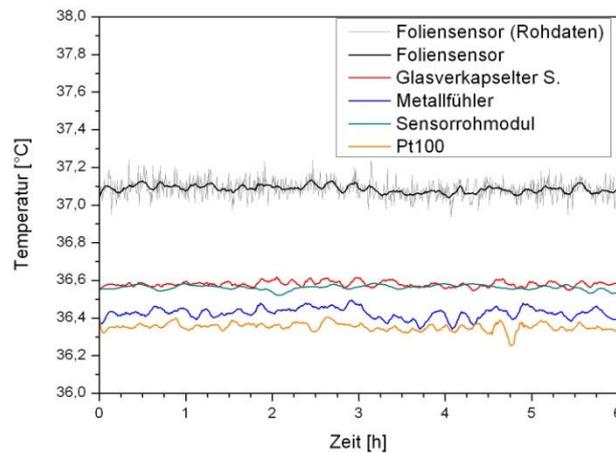


Abbildung 4-61: Langzeitstabilitätstest der NTC-Sensoren.

Die einzelnen Messwertkurven wurden zur Minimierung des Messrauschens und der besseren Darstellbarkeit mit einem Savitzki-Golay-Filter der 5. Ordnung und einer Fensterbreite von 41 Messwerten gefiltert. Zur Veranschaulichung des Filtervorgangs wurden für den Foliensensor auch die Rohdaten in die Abbildung übernommen. Es ist deutlich zu erkennen, dass eben dieser Sensor mit etwa 0,4 °C am weitesten von den übrigen Sensoren abweicht. Sämtliche andere Sensoren befinden sich in einem Bereich von 0,3 °C. Die Abweichung des Foliensensors beruht dabei vermutlich auf seiner Bauweise, die im Gegensatz zu den übrigen Sensoren weniger robust erscheint. Es handelt sich hierbei um zwei gegeneinander verklebte Folien, zwischen denen der eigentliche NTC platziert ist. Die Abweichung der gemessenen Temperatur und der Einlauftemperatur von 37 °C lässt sich durch den offenen Charakter des Modellreaktors erklären, welcher aufgrund der Bauweise des Sensorrohmoduls verwendet werden musste.

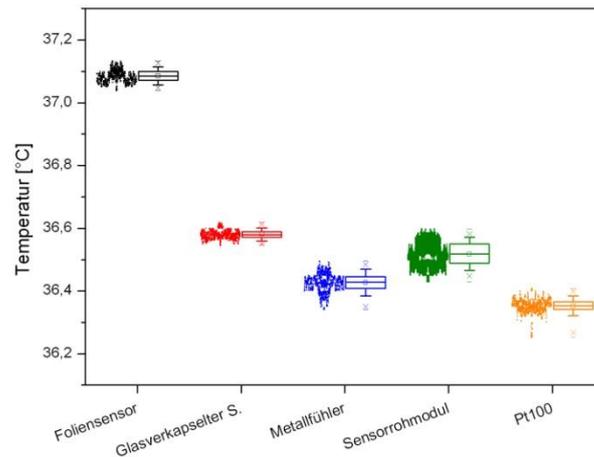


Abbildung 4-62: Box-Diagramm zum Langzeitversuch bei konstanter Temperatur.

Abbildung 4-62 zeigt ein Box-Diagramm der Messwerte des Versuches. Die Box selbst markiert dabei die Perzentile zwischen dem 25. und 75. Die horizontale Linie in der Box visualisiert den Median, während das unausgefüllte Kästchen das arithmetische Mittel darstellt. Die Whisker markieren die Standardabweichung und die Kreuze letztlich das 1. bzw. 99. Perzentil. Die abschließenden Linien zeigen den Maximal- bzw. den Minimalwert. Diese Darstellung verdeutlicht, dass sowohl der Foliensensor, als auch der glasverkapselte Sensor und der Pt100 eine äußerst kleine Schwankungsbreite aufweisen. Die des Metallfühlers ist etwas größer, was in den Abmessungen des Metallkörpers begründet liegen mag. Die recht breite Verteilung des Sensorrohrmoduls ist vermutlich durch die oberseitige Abdeckung zu begründen, die möglicherweise in einem statischen System eine ausreichende Umströmung mit dem frisch zugeführten Wasser behindert. Abgesehen vom Foliensensor liegen die Messdaten sämtlicher Sensoren in einem Bereich von $36,45 \pm 0,15$ °C. Für die Abweichungen können die bereits genannten Faktoren verantwortlich sein. Sämtliche Sensoren könnten mit guter Präzision in einem Sensormodul eingesetzt werden. Auch der Foliensensor wäre mit Abstrichen verwendbar, sollte die Genauigkeit im geforderten Anwendungsbereich nicht zu groß sein. Durch die Bauform könnten sich jedoch auch andere Anwendungsbereiche ergeben. Änderungen bei der Art der Folie und der Verklebung könnten zudem die Genauigkeit des Sensors verbessern.

4.4.2. Einfluss der Temperaturdifferenz zwischen Medium und Umgebung auf die gemessene Temperatur

Während sich die im vorhergehenden Abschnitt verwendeten NTCs bei der Messung in der Lösung befanden, erfolgte die Messung über den Pt1000 des Rohmoduls an der Wandung des Reaktors. Damit besteht die Möglichkeit, dass bei schlechter Isolierung zur äußeren Umgebung eine, von der

tatsächlichen Medientemperatur abweichende Temperatur gemessen wird. Um dies zu untersuchen, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, wie er in Abbildung 4-63 dargestellt ist. Hierfür wurde Testreaktor in einen Wasserkreislauf mit einem Thermostat eingebaut. Zudem wurde ein Ventilator (Typ 612L 12V 0,7W, EBM Papst, St. Georgen) unter dem Sensorrohrmodul angebracht, um so neben der passiven Kühlung durch die kühlere Umgebungsluft eine zusätzliche aktive Kühlung zu erreichen. Eine Aufsicht auf den Ventilator im Versuchsaufbau ist in Abbildung 4-64 zu sehen.

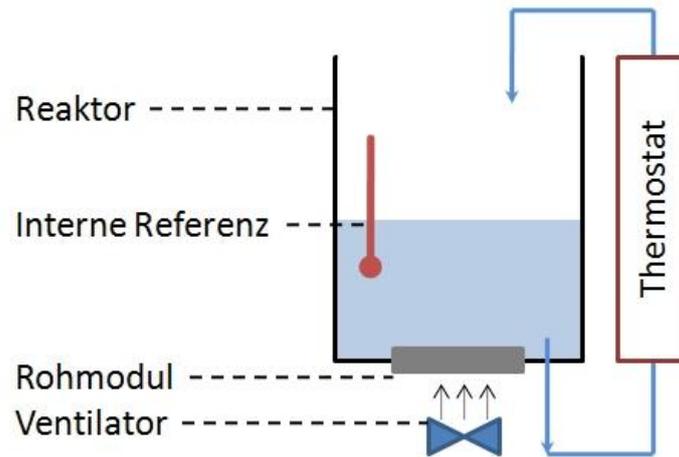


Abbildung 4-63: Schematischer Versuchsaufbau zu Bestimmung der Temperaturdifferenz zwischen Medium und Umgebung.

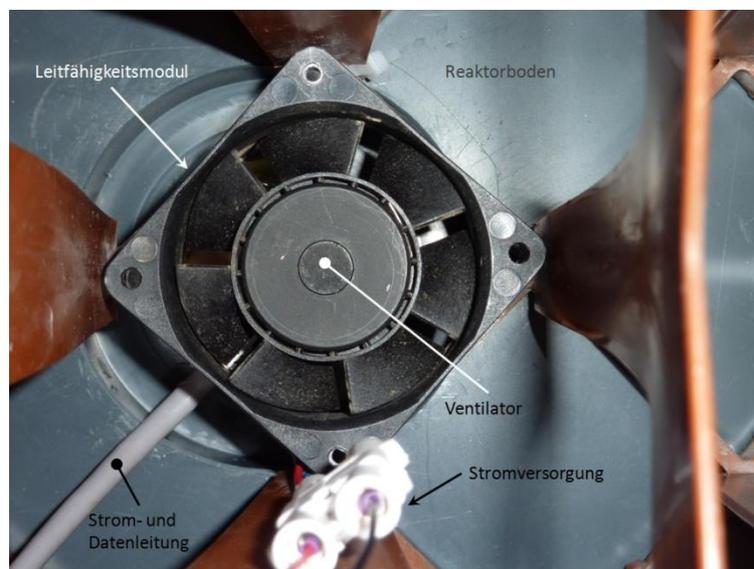


Abbildung 4-64: Sicht von unten auf den Ventilator und das Leitfähigkeitsmodul.

Um in einem ersten Versuch zu testen, ob generell eine Beeinflussung durch die Außentemperatur vorherrscht, wurde ein Temperatursprung von 50 °C auf 80 °C durchgeführt. Die Messlösung wurde hierfür vortemperiert und der Kreislauf kurz vor dem Erreichen der 50 °C angeschlossen. Nach einer

Stunde erfolgte schließlich die Umstellung der Temperatur auf 80 °C. Vor Beginn der Messung wurden in diesem Versuch die Temperatursensoren nicht abgeglichen. Abbildung 4-65 zeigt den Verlauf des Temperatursprungs gegen die Zeit. Da bei Beginn der Messung kein Temperaturabgleich der Sensoren durchgeführt wurde, ist zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen den Graphen die Temperaturdifferenz der beiden Sensoren in das Diagramm aufgenommen worden. In der Frühphase des Versuchs steigt die Temperatur des Referenzthermometers stark an, was mit der noch ungenügenden Füllmenge im Reaktor begründet ist. Die Betrachtung der Temperaturdifferenz zeigt, dass die Sensoren eine konstante Differenz aufweisen, die lediglich bei Temperaturschwankungen kurz aus der Ruhelage gebracht wird; wobei das Sensormodul etwas Zeit benötigt, um wieder die erwartete Temperatur anzunehmen. Dies zeigt, dass eine lediglich passive Kühlung durch die Umgebungsluft nicht ausreicht, um den Temperatursensor zu stören. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen auf einen Ventilator zurückgegriffen.

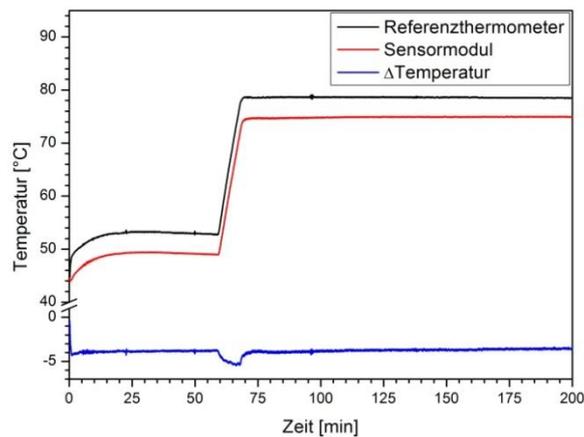


Abbildung 4-65: Verlauf eines Temperatursprungs von 50 °C auf 80 °C.

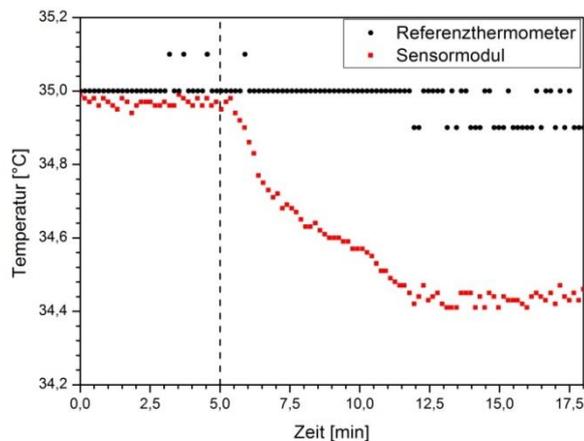


Abbildung 4-66: Reaktion des Temperatursensors auf aktive Kühlung durch einen Ventilator.

Im nächsten Schritt wurde das Thermostat auf eine Temperatur von 35 °C eingestellt und die Temperatursensoren wurden aufeinander abgestimmt. In Abbildung 4-66 ist der zeitliche Verlauf der Temperaturkurven dargestellt. Während der Messung zeigte das Referenzthermometer keine nennenswerten Schwankungen. Dies ist allerdings auch durch die Auflösung des Sensors von lediglich 0,1 °C bedingt. Nach 5 min wurde der Ventilator zugeschaltet. Mit leichter Verzögerung ist ein Abfall der Temperatur am Sensormodul zu beobachten, bis die Temperatur sich auf einen konstanten Wert eingependelt hat. Durch den Ventilator wurde eine Temperaturdifferenz von 0,6 °C verursacht. Ziel des nächsten Schrittes war es die Temperaturabhängigkeit der Temperaturdifferenz zu untersuchen.

Um dies zu realisieren, wurde ein Stufenprofil durchfahren. Vor dem Start der Messung wurden dabei die Temperatur beider Sensoren aufeinander eingestellt und anschließend der Ventilator eingeschaltet. Wie in Abbildung 4-67 gezeigt, fiel die Temperatur am Sensormodul gleich in der Anfangsphase. Zur Verdeutlichung der Temperaturdifferenz ist die Differenz zwischen Referenzthermometer und Sensormodul zusätzlich gegen die Zeit aufgetragen. Hierbei wird deutlich, dass die Temperaturdifferenz bei aktiver Luftkühlung mit steigender Medientemperatur stetig zunahm, bis sie schließlich bei einer Temperatur von 64,5 °C bei etwa 2,5 °C lag. Bei erneuter Abkühlung des Messmediums pendelte sich auch die Temperaturdifferenz wieder auf dem zuvor beobachteten Wert ein.

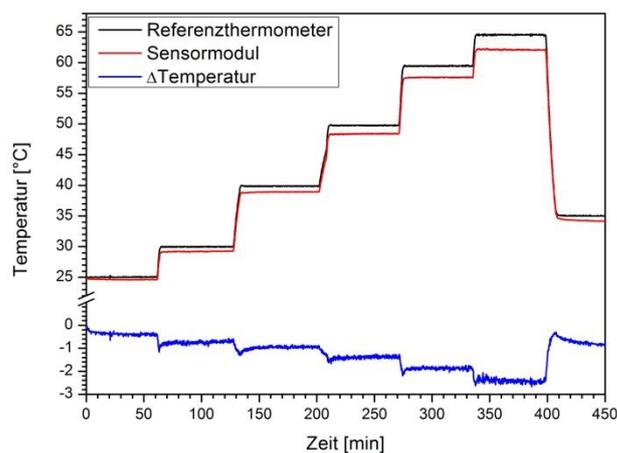


Abbildung 4-67: Temperatur-Stufenprofil des aktiv luftgekühlten Sensormoduls gegen die Referenz.

Der erste Eindruck legt die Vermutung nahe, dass die Zunahme der Differenz linear erfolgt. Dies soll durch eine andere Art der Auftragung überprüft werden. Hierfür werden die Temperaturen von Referenz und Sensor über den Verlauf der Stufen gemittelt. Anschließend wird die gemittelte Sensortemperatur gegen die gemittelte Referenztemperatur aufgetragen. Dies ist in Abbildung 4-68 dargestellt. Zusätzlich ist der optimale Verlauf dargestellt, der zu erwarten ist, wenn die

Umgebungstemperatur keinen Einfluss auf die am Sensor gemessenen Temperaturen hätte. Der lineare Zusammenhang zwischen Referenztemperatur und Sensortemperatur ist, wie erwartet, zu erkennen. Eine lineare Näherung des Kurvenverlaufes ergibt ein Bestimmtheitsmaß von 0,99993. Die Zunahme der Temperaturdifferenz zum gemittelten Verlauf beträgt 0,045 K/K.

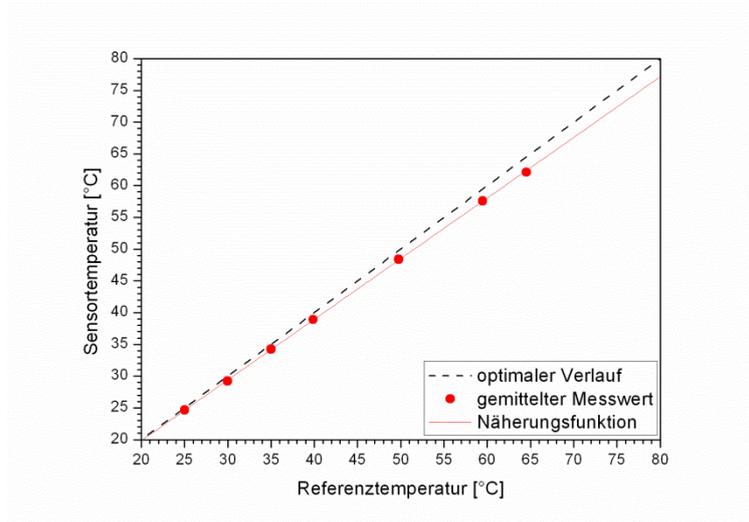


Abbildung 4-68: Auftragung der Sensortemperatur gegen die Referenztemperatur bei aktiver Luftkühlung.

Da die Temperatur auf sehr viele prozesstechnische Größen, wie z.B. den Gelöstsauerstoffgehalt oder den pH-Wert Einfluss hat, wurden nach den Ergebnissen des Sensors im Multisensorrohrmodul durch die Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen Änderungen an der Isolation zur Umgebungsluft vorgenommen. Dabei wurde die Kunststoffschicht verdickt, um den thermischen Ausgleich zwischen der Umgebung und des Messmediums herabzusetzen. Zur Überprüfung des Erfolges dieser Maßnahme wurden weitere Versuche durchgeführt.

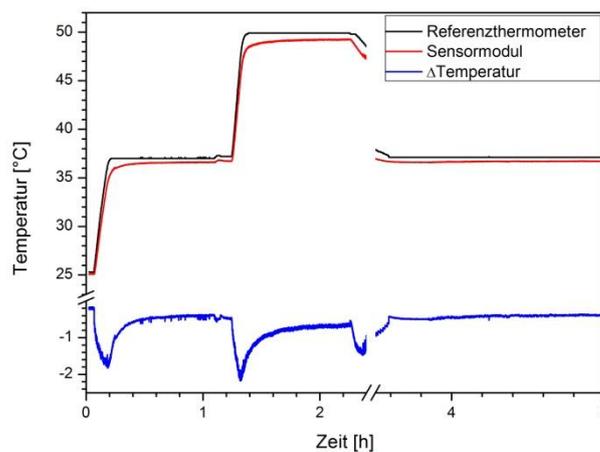


Abbildung 4-69: Zeitlicher Verlauf eines Temperatur-Stufenprofils nach Modifizierung des Sensormoduls.

Um den Temperatureinfluss nach der Modifizierung der thermischen Isolierung zu evaluieren, wurde erneut ein Stufenprofil durchfahren. Nach den Erfahrungen aus dem ersten Versuch, in dem die Messwerte eine sehr gute Linearität aufwiesen, wurde die Zahl der Stufen im Stufenprofil reduziert. Abbildung 4-69 zeigt den zeitlichen Verlauf des Stufenprofils von Referenzthermometer und Sensormodul. Zusätzlich ist wieder die Temperaturdifferenz zwischen beiden Thermometern gegen die Zeit aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass das Sensormodul stets eine etwas längere Einstellzeit benötigt als das Referenzthermometer. Als Ursache hierfür wird wieder die Hinderung der Strömung durch die Sensorkappe angesehen.

Zur besseren Veranschaulichung wurde in der Abbildung der Verlauf der Abkühlung ausgespart, da diese keine weiteren Informationen für die Auswertung des Versuchs liefert. Analog zu den Versuchen mit dem ursprünglichen Sensormodul wurde die Temperatur über die jeweilige Stufe gemittelt und die so erhaltenen Messwertepaare gegeneinander aufgetragen.

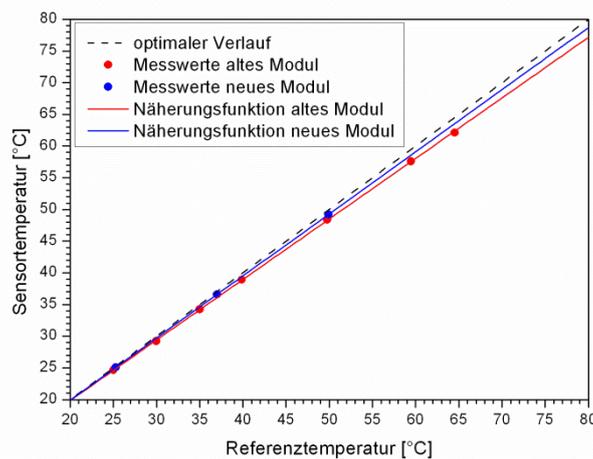


Abbildung 4-70: Auftragung der Sensortemperatur von altem und neuem Sensormodul gegen die Referenztemperatur bei aktiver Luftkühlung

In Abbildung 4-70 sind neben den gemittelten Messwertepaaren die sich aus ihnen ergebenden linearen Näherungsfunktionen dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass der Verlauf der Näherungsfunktion für das neue Sensormodul ein wenig steiler und damit näher am Optimum verläuft als das alte Sensormodul. Dies schlägt sich auch in den Steigungswerten der Näherungsfunktionen nieder. Durch die Modifikationen an der thermischen Isolation konnte die Abweichung vom optimalen Verlauf auf 0,2 K/K verringert werden. Bei Betrachtung des Messdaten fällt ebenso ins Auge, dass durch die Modifikationen nicht nur die temperaturabhängige Abweichung, sondern auch das Messrauschen verringert werden konnte. So betrug während der Messung mit dem alten Sensormodul die gemittelte Standardabweichung über sämtliche Stufen 0,047 K, nach der

Modifikation betrug sie lediglich noch 0,034 K, was einer Reduzierung des Rauschens um 27,9 % entspricht.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Modifikation der thermischen Isolation zur Umgebungsluft die Temperaturabweichung nicht komplett kompensieren konnte, sie jedoch, genauso wie das Messrauschen, reduziert. Im Bereich typischer Kultivierungstemperaturen liegen die Temperaturen für beide Sensorvarianten nahe des optimalen Verlauf, so dass keine nennenswerten Schwierigkeiten durch die Verwendung der Sensormodule zu erwarten sind. Insgesamt zeigt sich, dass die Modifikation erfolgreich war. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen das modifizierte Modul verwendet.

4.4.3. Ansprechzeit des Temperatursensors

In einem weiteren Schritt wurde das Ansprechverhalten der Temperatursensoren getestet. Im ersten Versuchsteil stand dabei das Sensorrohmodul im Fokus, welches gegen den Temperaturfühler der Leitfähigkeitselektrode TetraCon 325 von WTW, Weilheim getestet wurde. Die Temperatursensoren wurden in ein vortemperiertes Medium verbracht, welches durch Zugabe von wenig Trockeneis unter starkem Rühren möglichst schnell um einige Grad abgekühlt wurde. Hierbei wurde angenommen, dass die Abkühlung im Vergleich zur Reaktion der Temperatursensoren schnell erfolgt.

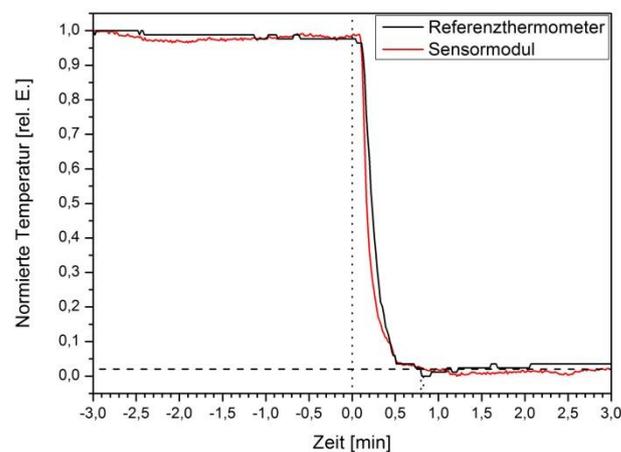


Abbildung 4-71: Beispielhafter Verlauf der Ansprechzeitbestimmung von Referenzthermometer und Sensormodul.

Da die Abkühlung des Messmediums durch die Zugabe von Trockeneis nicht auf einen konstanten Endwert hinausläuft, erfolgte eine Normierung des Temperaturverlaufs. Abbildung 4-71 zeigt den Verlauf einer beispielhaften Messung. Beide Temperatursensoren wurden vor Zugabe des Trockeneises einige Minuten bei einer konstanten Temperatur gehalten. Diese liegt durch die Normierung bei bzw. nahe bei 1 rel. E.. Als Parameter für die Ansprechzeit wird auch hier wieder die

t_{98} gewählt. Die Grenze dieser Ansprechzeit verläuft bei 0,02 rel. E. und ist in der Abbildung durch eine horizontale, gestrichelte Linie gekennzeichnet. Fällt die Messkurve unter diese Linie, so ist die Ansprechzeit erreicht. Der Zugabezeitpunkt des Trockeneises wurde auf der Zeitskala als Nullpunkt definiert und durch die erste vertikale, gepunktete Linie dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Sensormodul und Referenzthermometer nahezu gleich auf den Temperaturabfall reagieren. Die Annäherung an den konstanten Endwert ist bei dem Sensormodul jedoch ein wenig langsamer. Die zweite (Referenzthermometer) bzw. dritte (Sensormodul) vertikale, gepunktete Linie verdeutlichen das Erreichen der Ansprechzeit. Aus dieser visuellen Darstellung wird deutlich, wie nah die Ansprechzeiten aneinander liegen.

Auch wiederholte Versuche zeigten hierbei eine gute Übereinstimmung, sowohl zwischen den Einzelmessungen, als auch zwischen den einzelnen Temperatursensoren. Dies ist Abbildung 4-72 zu entnehmen. Auffällig ist hierbei der Wert der Ansprechzeit des ersten Laufes für das Sensormodul. Durch die hohe Abweichung im Vergleich zu den übrigen Messungen ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen Messfehler bzw. einen Ausreißer handelt. Dies wird durch einen Blick auf den Temperaturverlauf dieser Messung bestätigt, bei der sich der Sensor der tatsächlichen Temperatur im letzten Drittel des Kurvenverlaufs sehr flach annähert. Die weiteren Läufe des Sensormoduls zeigten eine gute Reproduzierbarkeit. Der Mittelwert der Ansprechzeit beträgt unter Vernachlässigung von Lauf 1 $0,99 \pm 0,14$ min. Die Ansprechzeiten des Referenzthermometers sind durchweg gut reproduzierbar und weisen mit $\pm 0,08$ min bei einer Ansprechzeit von 0,69 min eine äußerst kleine Standardabweichung auf.

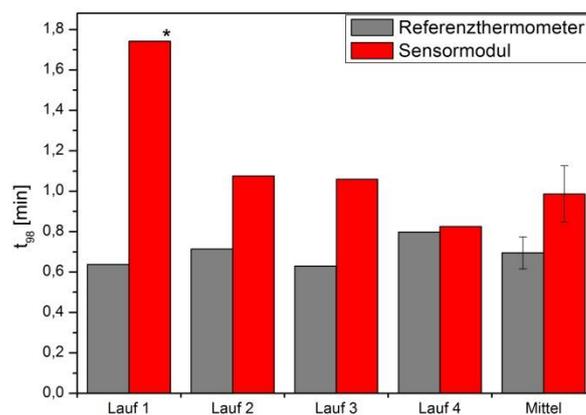


Abbildung 4-72: Ansprechzeiten t_{98} von Sensormodul und Referenzthermometer.

Auch mit den NTCs wurde ein Test zur Bestimmung der Ansprechzeit durchgeführt. Der Versuchsaufbau wurde dabei analog zum ersten Versuchsteil gewählt. Die Messung erfolgte dabei

mit allen drei NTC-Thermistoren parallel. Ein beispielhafter Kurvenverlauf zur Bestimmung der Ansprechzeit t_{98} ist in Abbildung 4-73 dargestellt. Hierbei wurde der Temperaturverlauf gegen die Zeit aufgetragen. Die vertikale Linie markiert den Start des Temperaturabfalls. Die farbigen gestrichelten Linien verdeutlichen die Temperaturgrenze (horizontal) und die Ansprechzeit (vertikal) der einzelnen Temperatursensoren. Bei der Betrachtung der Kurvenverläufe fällt ins Auge, dass sich die Messkurven deutlich voneinander unterscheiden. Während der Foliensensor sehr schnell, sehr steil abfällt, verläuft die Einstellung des neuen Temperaturgleichgewichtes beim glasverkapselten Sensor ein wenig langsamer. Dadurch erreicht der Foliensensor zwar schneller die 98 %-Schwelle der Temperatur, jedoch fällt die Temperatur auch kurzzeitig über den konstanten Endwert hinaus ab. Dieses Verhalten ist beim glasverkapselten Sensor nicht zu beobachten. Noch viel deutlicher sind die Abweichungen des Metallfühlers. Während der ersten Phase der Temperatureinstellung verläuft die hier gemessene Temperatur nahezu parallel mit den beiden anderen NTCs. Ab etwa 50 % des Temperatursprunges flacht der Kurvenverlauf allerdings deutlich ab, so dass die Ansprechzeit letztendlich mehr als das Vierfache der anderen NTCs beträgt. Die bereits in Kapitel 4.4.1 beobachtete Abweichung der am Foliensensor gemessenen Temperatur findet sich auch in diesem Versuch wieder.

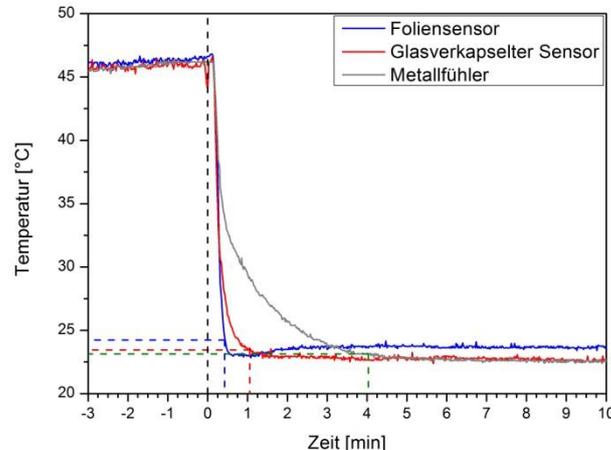


Abbildung 4-73: Verlauf einer Ansprechzeitkurve der getesteten NTCs.

Da die NTCs ein solches unterschiedliches Ansprechverhalten aufweisen, wurde der Temperatursprung auch in umgekehrter Richtung, d.h. mit Sprüngen zu höheren Temperaturen durchgeführt. Hierfür wurde möglichst schnell heißes Wasser in den Messbehälter gegeben, während weiterhin kräftig gerührt wurde. Bei diesen Messungen zeigte sich, dass die Ansprechzeiten mit steigenden Temperaturen deutlich kürzer waren. Abbildung 4-74 zeigt eine Zusammenstellung der Ansprechzeiten der NTCs für sinkende Temperaturen (abwärts) und steigende Temperatur (aufwärts). Auf Grund der z.T. großen Schwankungen wurde auf die Darstellung der

Standardabweichung verzichtet, sie wurden stattdessen in Tabelle 4-5 aufgenommen. Während die Sensoren bei sinkenden Temperaturen in ihren Ansprechzeiten stark voneinander abweichen, zeigen sie bei steigenden Temperaturen nahezu identische Ansprechzeiten.

Im Vergleich mit dem Sensormodul und dem Referenzthermometer zeigt sich, dass diese Sensoren in ihrem Ansprechverhalten stark dem glasverkapselten Sensor ähneln. Der Foliensensor weist das beste Ansprechverhalten mit den kürzesten Ansprechzeiten auf, während der Metallfühler mit Abstand die langsamste Reaktion auf eine Temperaturänderung zeigt.

Tabelle 4-5: Mittelwerte der Ansprechzeiten t_{98} der einzelnen NTCs mit ihrer Standardabweichung.

Sensor	t_{98} [s]	Standardabweichung [s]
<i>pH-Sprung aufwärts</i>		
Foliensensor	23,2	8,7
Glasverkapselter Sensor	44,8	18,0
Metallfühler	145,7	87,7
<i>pH-Sprung abwärts</i>		
Foliensensor	5,2	7,1
Glasverkapselter Sensor	4,0	1,4
Metallfühler	5,5	0,0

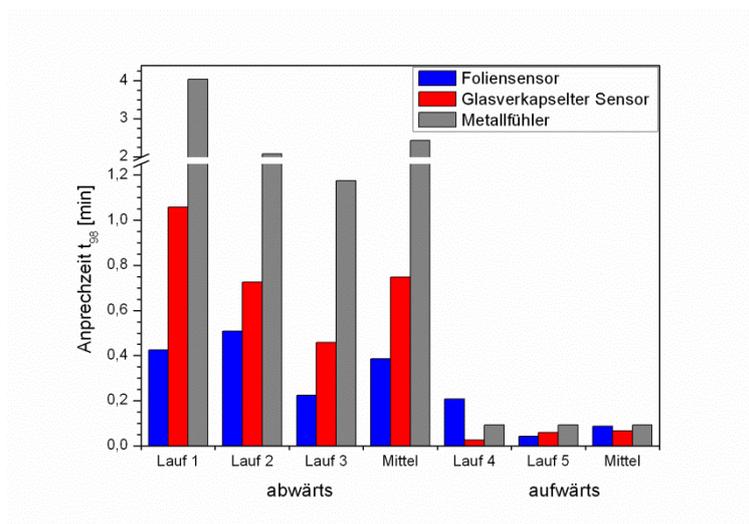


Abbildung 4-74: Ansprechzeiten der NTCs für Temperatursprünge aufwärts und abwärts die Temperaturskala.

4.5. Verwendbarkeit von Enzymsiebdruckelektroden zur Online-überwachung wichtiger Prozessparameter

Weitere wichtige Parameter, die neben pH, Gelöstsauerstoffgehalt, elektrischer Leitfähigkeit und Temperatur bei einer Kultivierung von Interesse sein können, sind Nährstoffe und Zwischenprodukte, welche bei einer Kultivierung auftreten. Die Kenntnis der Konzentrationen dieser Stoffe sind von essentieller Bedeutung für das Verständnis von Stoffwechselprozessen und das Zusammenwirken verschiedenster Effekte während einer Kultivierung. Tabelle 3-5 zeigt eine Auswahl an marktverfügbaren Sensoren für die Prozessüberwachung in Einwegsystemen.

Ein auf dem Markt verfügbares System zur Bestimmung der Metabolite Glucose, Laktat und Glutamat sind die Siebdruckelektroden CITSens Bio der Firma C-CIT, Wädenswil. Abbildung 4-75 zeigt die Elektroden vor dem Einsatz im Größenvergleich. Der Sensor basiert auf einer Siebdruckelektrode, deren Oberfläche mit einem immobilisierten Enzym beschichtet ist. Standardmäßig werden die Sensoren steril in die Deckel gängiger Zellkulturreaktoren eingebaut geliefert. Die Testung erfolgte daher separat von den übrigen Sensoren [154].

Generell sollten diese Sensoren für den Einsatz in der Kultivierung einige Vorteile bieten. Neben der nicht-invasiven online Datenerfassung, bieten diese Sensoren dem Benutzer eine graphische Echtzeitdarstellung der ermittelten Messwerte. Ein besonderer Vorteil der Sensoren ist die drahtlose Erfassung der Daten mit Hilfe eines anhängenden Funksenders, so dass auch eine Messung in einem geschlossenen Brutschrank möglich ist. Jeder Funkempfänger kann dabei bis zu 1.000 Sensoren auslesen. Eine Einsatzbarkeit der Sensoren würde für sehr viele Anwendungen einen großen Gewinn darstellen [154].



Abbildung 4-75: Siebdruckelektroden im Größenvergleich.

4.5.1. Performancetest anhand von Standardreihen

Die enzymbasierenden Siebdruckelektroden wurden durch den Einsatz in einer Standardreihe getestet. Hierfür wurden 19,8 mg Glucose Monohydrat, 9,9 mg Lithium-L-Lactat und 18,71 mg Mononatrium-L-glutamat Monohydrat eingewogen und in 100 mL deionisiertem Wasser und 10 mL Phosphatpuffer (0,05 M; pH 7,4; IS 150 mM) gelöst. In diesem Startmedium wurden die Sensoren mit dem Funkmodul verbunden über Nacht bei 37°C konditioniert. Anschließend erfolgte die Kalibration auf die Startwerte von 0,16 g/L Glucose, 0,08 g/L Laktat und 0,13 g/L Glutamat.

Zusätzlich wurden 1,79 g Glucose Monohydrat, 0,86 g Lithium-L-Lactat und 1,6 g Mononatrium-L-Glutamat in 1 mL des Phosphatpuffers und 9 mL deionisiertem Wasser gelöst. Nach Abschluss der Kalibration wurden im Wechsel 500 µL Probe entnommen und 500 µL dieser zweiten Lösung zugegeben, um so die Konzentration zu erhöhen. Um die Messergebnisse des Sensors einschätzen zu können, wurden die entnommenen Proben mittels HPLC (siehe Anhang, Kapitel 8.2.5) und YSI (siehe Anhang, Kapitel 8.2.3) auf ihren Glucose- bzw. Lactosegehalt sowie mittels HPLC auf den Glutamatgehalt untersucht.

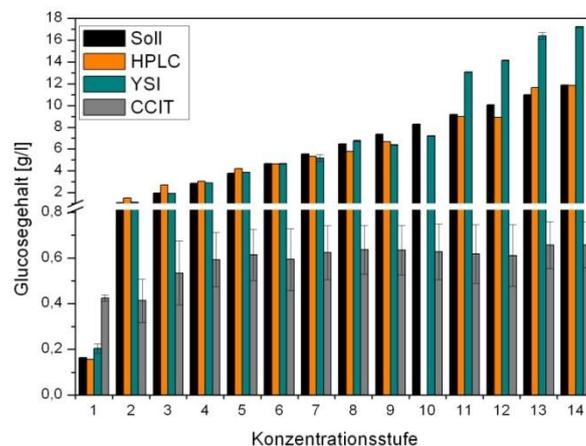


Abbildung 4-76: Messergebnisse der Glucose Konzentrationsreihe.

Der Verlauf des Glucosegehaltes in Abbildung 4-76 zeigt eine tendenzielle Übereinstimmung zwischen den über HPLC bestimmten und den berechneten Sollkonzentrationen. Im Mittel weicht die über HPLC bestimmte Konzentration um 11,8 % ab, wobei insbesondere die großen Abweichungen in Konzentrationsstufe 2 und 3 zu Buche schlagen. Auch die ersten zehn Konzentrationsstufen, die über YSI bestimmt wurden finden sich in einem tendenziell zu erwartenden Bereich. Mit der elften Konzentrationsstufe kommt es hier zu einer größeren Abweichung, die möglicherweise durch Verdünnungsfehler bei der Probenmessung verursacht worden ist. Die Abweichung zum Sollwert beträgt hier im Mittel 17,8 %, wobei dieser Wert zum großen Teil von den letzten

Konzentrationsstufen getragen wird. Die Messwerte der Siebdruckelektrode hingegen liefern zu keinem Zeitpunkt verlässliche Werte. Ab der fünften Konzentrationsstufe stagniert die gemessene Glucosekonzentration statt weiter anzusteigen. Da in diesem Versuchsaufbau lediglich Glucose zugegeben wurde und kein Abhängen des Sensors vom Sender erfolgte, ist nicht klar, warum der Sensor hier nicht die Tendenz nachvollziehen lässt. Die Abweichung zum Sollwert beträgt im Mittel 91,58 %.

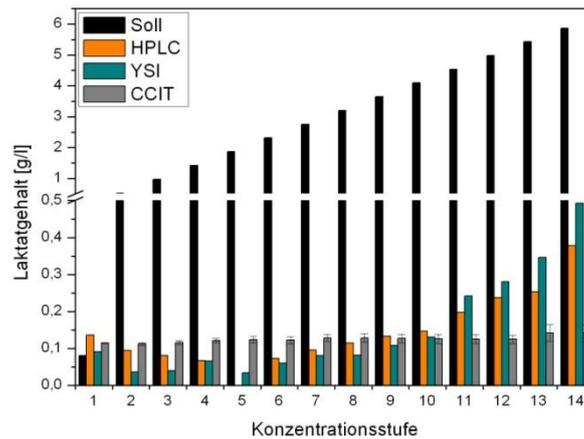


Abbildung 4-77: Messergebnisse der Laktat Konzentrationsreihe.

Abbildung 4-77 zeigt die ermittelten Messwerte für den Laktatgehalt im Verlauf der Konzentrationsreihe. Dabei wurden neben dem Sollwert die Analysedaten aus HPLC-Analyse (Durchführung siehe Anhang, Kapitel 8.2.5), YSI (Durchführung siehe Anhang, Kapitel 8.2.3) und Siebdruckelektrode aufgetragen. Im Vergleich zur Glucose-Bestimmungen zeigen die dargestellten Messwerte ein etwas anderes Bild. Sämtliche Messwerte weichen nach der ersten Konzentrationsstufe gravierend vom Sollwert ab. Bis zur zehnten Konzentrationsstufe pendeln sämtliche Analysewerte im gleichen Bereich, wobei bei der Siebdruckelektrode keine nennenswerten Änderung des Laktatgehaltes festzustellen ist, vielmehr bleibt der gemessene Gehalt nahezu konstant bei der in der Kalibration vorgegebenen Konzentration. Die über das YSI bestimmte Laktatkonzentration schwankt bis zu Konzentrationsstufe 10 und steigt anschließend kontinuierlich an. Gleiches gilt über die über HPLC bestimmten Konzentrationen.

Der Verlauf der ermittelten Konzentrationen macht die Auswertung nur bedingt sinnvoll. In Anbetracht der konstanten Werte, die mit der Siebdruckelektrode bestimmt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass beim Ansetzen der Aufkonzentrationslösung ein Fehler gemacht wurde. Dies lässt sich aber durch das Ansteigen der bestimmten Konzentrationen ab Konzentrationsstufe 11 ausschließen, da die Zugabe stets mit der gleichen Lösung erfolgte. Auch ein möglicher Zerfall des

Laktats in der Lösung entspricht nicht dem beobachteten Konzentrationsverlauf. Eine Wiederholung des Versuchs konnte aufgrund der kurzen Dauer in der das System zur Verfügung stand nicht durchgeführt werden.

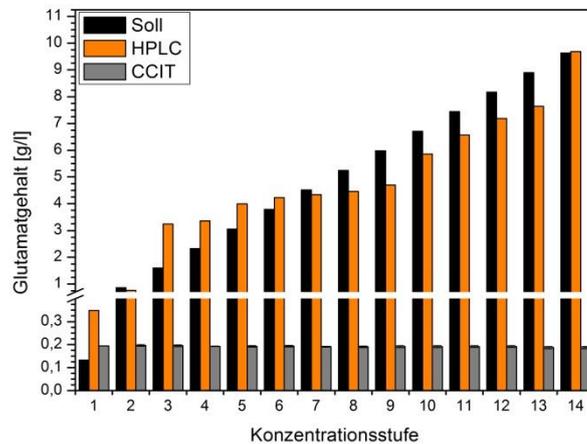


Abbildung 4-78: Messergebnisse der Glutamat Konzentrationsreihe.

Abbildung 4-78 zeigt die Gegenüberstellung der berechneten Sollkonzentration gegen die mittels Siebdruckelektrode und HPLC bestimmten Glutamat-Konzentrationen. Hier zeigt sich, dass die über HPLC ermittelte Konzentration des Glutamats tendenziell der Sollkonzentration folgt, auch wenn es zu unterschiedlich ausgeprägten Abweichungen vom Erwartungswert kommt. Die Siebdruckelektrode hingegen verweilt auf dem Kalibrationsniveau. Auch hier wird der etablierten Analyseverfahren das Vertrauen geschenkt, zumal diese tendenziell den Erwartungswerten entspricht.

Insgesamt lässt sich für diesen Versuch resümieren, dass das Testergebnis der Siebdruckelektroden nicht zufriedenstellend ist. Lediglich bei der Bestimmung des Glucosegehaltes konnte eine Änderung des Messsignals beobachtet werden. Die Sensoren für Laktat und Glutamat wiesen nach der Kalibrationsphase keine Änderung des Signals auf. Alle denkbaren Fehler bei der Präparation der Lösung zur Konzentrationserhöhung, hätten eine Signaländerung zur Folge. Bei zu niedriger Einwaage wäre eine Verdünnung zu beobachten, bei nicht vorhandenem Reagenz ebenfalls. Eine Überdosierung würde nur in einem stärkeren Anstieg der Konzentration resultieren. Um eine konstante Konzentration zu erreichen, müsste die zugegebene Stoffmenge, der entnommenen entsprechen. Allein würde sich dies auch in den Messwerten der übrigen Analysemethoden widerspiegeln. Die Siebdruckelektroden wurden während der Versuchsdurchführung nicht entnommen und nicht neu kalibriert, sodass nach erfolgter Kalibration eine Änderung des Messwertes zu erwarten gewesen wäre. Da die Sensoren jedoch eine längere Zeit zur Äquilibration

und Kalibration benötigen, liegt die Vermutung nahe, dass die Siebdruckelektroden für diese Form der schnellen Konzentrationserhöhung nicht geeignet sind. Aus diesem Grund erfolgte ein Test in einer Kultivierung, da hier langsame Konzentrationsänderungen zu erwarten sind.

4.5.2. In-situ Test

Zum Test der Siebdruckelektroden wurden diese in einer Kultivierung von *Hybridom*-Zellen zur online Erfassung der Prozessgrößen Glucose, Laktat und Glutamat eingesetzt. Um eine Aussage über die Verwendbarkeit der Elektroden treffen zu können, erfolgte parallel zur online Detektion eine offline Probennahme mit anschließender Konzentrationsbestimmung via HPLC.

Die Kultivierung erfolgte in einem Schüttelkolben mit fest eingebauten Siebdruckelektroden. Diese wurden vor dem Animpfen über Nacht zum Equilibrieren in 50 mL DMEM (Zusatz von 10 % Vol. FKS, 1 % Vol. P/S, 4 mM Glutamin) im Inkubationsschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Begasung, maximaler Luftfeuchtigkeit und 110 rpm konditioniert und anschließend auf die bekannten, im Medium vorliegenden, Anfangskonzentrationen der Analyten kalibriert. Am folgenden Tag wurde der Schüttelkolben dem Inkubationsschrank entnommen. Um den Kolben zu inokulieren, musste der Deckel unter der Sterilarbeitsbank kurz geöffnet werden. Hierfür mussten die Sensoren kurzzeitig von den Funksendern getrennt werden. Nach der Inokulation wurde der Deckel wieder auf den Kolben geschraubt, die Sensoren wieder mit den Funkmodulen verbunden und der Kolben wieder in den Inkubationsschrank verbracht. Dieser Vorgang wiederholte zur parallelen offline-Analyse bei jeder Probenentnahme. Das Vorgehen zur Probenentnahme ist im Anhang, Kapitel 8.2.1 beschrieben. Die Methodik zur Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität sind Anhang, Kapitel 8.2.2 zu entnehmen.

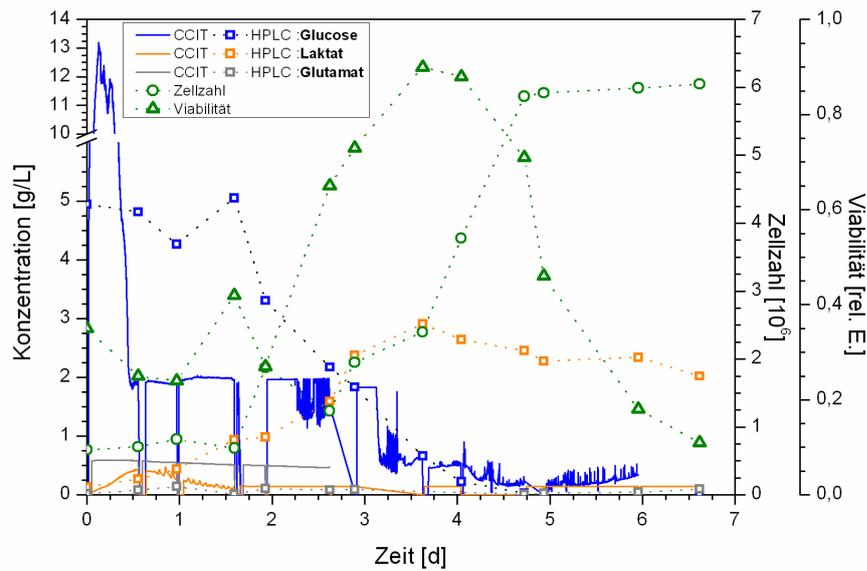


Abbildung 4-79: Zusammenstellung der Kultivierungsdaten der Hybridom-Zellen.

Abbildung 4-79 zeigt eine Zusammenstellung der im Laufe des Prozesses erhaltenen Messdaten. Hier ist zu erkennen, dass die Kultivierung mit einer Gesamtzellzahl von etwa $0,7 \cdot 10^6$ Zellen und einer Zellviabilität von ungefähr 35 % startete. Im Laufe des ersten Tages fiel die Zellviabilität ein wenig ab, während sich die Zellzahl langsam erhöht. Am zweiten Tag stieg die Viabilität sprunghaft an. Die Zellzahl folgte dieser Entwicklung mit etwas Verzögerung. Die exponentielle Wachstumsphase wurde im Laufe des vierten Tages erreicht. Ab dem fünften Tag begannen die Zellen bereits wieder zu sterben, die Viabilität sank in dieser Zeit, während die Gesamtzellzahl ziemlich konstant verlief.

Werden die Analysendaten der HPLC betrachtet, so zeigt sich, dass der Gehalt an Glucose mit steigender Viabilität nach zwei Tagen deutlich abzunehmen beginnt. In der gleichen Zeit zeigte die Siebdruckelektrode eine Zunahme der Glucosekonzentration. Da während des Zellwachstums keine Glucose gebildet wird, fällt hier bereits eine Schwäche der Einwegsensoren ins Auge: Nach der zuvor lang andauernden Kalibrierung, beginnen die Werte nach dem ersten Handling stark abzudriften. Nach dem Anstieg der Konzentration nach dem Animpfen, fällt sie noch vor der nächsten Probenahme auf etwa 2 g/L Glucose ab. Da dieser Abfall vor der Probenahme für die offline-Analyse erfolgt, ist eine Beeinflussung durch diese auszuschließen. Nach der Probenentnahme bleibt das Messsignal, abgesehen von gelegentlichen Ausreißern, konstant. Bei der sechsten Probenentnahme lieferte der Sensor einen negativen Wert. Hier erfolgte eine sofortige Kontrolle mittels YSI. Anschließend wurde der Sensor auf diesen Wert (1,762 g/L Glucose) kalibriert. Im Anschluss folgt die Siebdruckelektrode zumindest scheinbar den Daten der HPLC-Analyse.

Werden die Analysenwerte des Laktatsensors in Augenschein genommen, so fällt hier eine gute Übereinstimmung bis zur dritten Probennahme auf. Anschließend fällt das Messsignal ab und verbleibt auf einem niedrigen Niveau. Im Gegensatz dazu zeigen die HPLC-Analysen eine weitere Zunahme des Laktatgehalts. Dies wird durch den, bei der Glucosebestimmung nach der sechsten Probennahme erhaltenen, Laktatmesswert untermauert. Dieser (1,93 g/L Laktat) entspricht dem mittels HPLC ermittelten Wert.

Durch die Zugabe des Glutamins ist eine Startkonzentration von 0,58 g/L zu erwarten. Auf diese wurde der Einwegsensoren kalibriert. Dieser Kalibrationswert wird von dem Sensor übernommen und zeigt bis zum Abreißen des Signals nach nicht ganz drei Tagen eine leichte, konstante Abnahme der Konzentration. Die HPLC-Analysen hingegen liegen um eine Größenordnung niedriger. Dies kann durch den zeitlichen Versatz der Analyse begründet werden. Die Glutamatanalyse stellt in der Auswertung jedoch ein größeres Problem dar. Während die Siebdruckelektrode nur bis zu ihrem Ausfall auf dem Kalibrationswert verharrt, zeigt die HPLC-Analyse keine nennenswerten Glutamatgehalte in der Lösung. Dies könnte durch den Zerfall von Glutamat in wässriger Lösung und der zeitversetzten Analyse begründet sein.

Generell zeigten die Elektroden im Verlauf dieses Tests eine große Anfälligkeit. Während sich die Messwerte für Laktat in der Anfangsphase durch die HPLC-Analysen gut abbilden lassen, ist deutlich zu erkennen, dass nach einem Tag im Kultivierungsverlauf etwas an der Siebdruckelektrode vorgefallen sein muss. Der Abfall des Messsignals erfolgte nach der Probenentnahme, womit zu vermuten steht, dass die Kalibration auf den vorherigen Wert nicht richtig übernommen wurde. Auch die Messkurve des Glutamatssensors bricht mit der Probennahme ab. Hier scheint der vorgegebene Wert gar nicht mehr übernommen worden zu sein. Besonders problematisch scheint der Verlauf des Glucosesensors. Dieser zeigt große Sprünge, auch zwischen den Messungen. Zudem lässt sich der generelle Verlauf nicht durch die HPLC-Analysen verifizieren.

Im Zuge der weiteren Fehleranalyse wurden die Siebdruckelektroden nach der Kultivierung betrachtet. Abbildung 4-80 zeigt die Elektroden nach dem Einsatz in der Kultivierung. Zu erkennen sind rötliche Verfärbungen, welche durch den Farbstoff im eingesetzten Medium verursacht wurden. Bei näherer Betrachtung der Leiterbahnen scheint es auch, als seien diese im Laufe der Kultivierung in Mitleidenschaft gezogen worden.



Abbildung 4-80: Siebdruckelektroden nach Einsatz in der Kultivierung.

Möglicherweise ist der Ausfall von Glutamat- und Laktatsensor auch auf mechanische Schädigungen zurückzuführen. Auch der Glucosesensor könnte mechanisch geschädigt worden sein, so dass nur noch ein konstanter Fehlerstrom zu messen war, was in einem konstanten Messsignal resultierte. Die Aussetzer der Sensors könnten z.B. durch einen Wackelkontakt verursacht worden sein, der durch die Bewegung des Schüttelkolbens verursacht sein könnte.

4.5.3. Resultat des Tests

Generell ist die Möglichkeit der *in situ* Bestimmung von Metaboliten sinnvoll und nutzbringend. Bei der Arbeit mit den Sensoren stellte es sich aber als problematisch heraus, dass lediglich die Metabolite durch die fest im Reaktordeckel verklebten Siebdruckelektroden erfasst werden, nicht aber auch weitere Prozessparameter wie z.B. der pH-Wert. Zwar besteht die Möglichkeit weitere *online* Sensorik zu applizieren, dies wird aber durch den festen Einbau im Deckel erschwert. Ein Problem bei der Verwendung der Sensoren im *in situ* Bereich ergab sich im Test immer dann, wenn Proben zur *offline* Bestimmung, z.B. von optischer Dichte oder Viabilität genommen werden mussten. Die Handhabung mit den Sendemodulen unter sterilen Bedingungen erschwert hier die Probennahme enorm, insbesondere wenn mehrere Module gehandhabt werden müssen. Zudem muss sich nach dem Abkoppeln des Sensors von der Sendeeinheit erst wieder ein stabiles Signal eingestellt haben, bevor die Messung fortgeführt werden kann. Dies ist in einer laufenden Kultivierung natürlich unerwünscht, da hier das Zellwachstum und damit einhergehend die Konzentration der Metabolite einer stetigen Änderung unterliegt. Sind die Kultivierung, die zeitlichen Verläufe der einzelnen Metabolite und der Zellzahl bekannt, könnten die Sensoren im Rahmen von PAT eingesetzt werden. Für eine parallele *offline* Probenahme erscheinen sie in der getesteten Form jedoch wenig geeignet. Parallele Ansätze der gleichen Kultivierung für die unterschiedlichen Parameter scheinen auch wenig sinnvoll, da hier keine eindeutigen Schlüsse auf die Verknüpfungen der Parameter gezogen werden können. Für einen weitgefächerten Einsatz dieser Sensoren bedarf es einer überarbeiteten Version des Datenübertragungssystems (z.Z. leichter, kleiner Sensor und großer, schwerer Sender). Zudem wäre es ratsam die filigranen Leiterbahnen zu verkapseln, um so eine Beschädigung zu vermeiden. Das Konzept der drahtlosen Datenübertragung stellt eine große Stärke dar, da auf diese Weise eine dezentrale Datenstation die Überwachung der Kultivierungen ermöglicht. Nichtsdestotrotz wäre es vorteilhaft eine alternative Möglichkeit anzubieten.

Neben der wiederholten Kalibration verursachte auch die Software einige Probleme. Nach jeder Kalibration wurde eine neue Messdatei gestartet. Es bestand keine Möglichkeit die Messwerte vor der Abkopplung vom Sensor zu speichern, um sie direkt für die Kalibration zu verwenden. Auch die Menüführung der aktiven Sensoren erschien unübersichtlich. Diese Probleme stellen aber im Vergleich zu den Handhabungsproblemen ein eher untergeordnetes Problem dar, da sie sich vergleichsweise einfach abstellbar wären.

Für die Verwendung in Single-Use Bioreaktoren ist die Verwendung solcher enzymbasierender Siebdruckelektroden, trotz der negativen Erfahrungen während der Tests, trotzdem durchaus interessant. Allein schon die Tatsache, dass in solchen Reaktoren keine offline Probennahme

vorgesehen ist bzw. diese durch einen separaten Port erfolgt, eliminiert das Problem der komplizierten Handhabung. Die Verwendung einer drahtlosen Sendeeinheit erscheint zwar interessant, ist aber für eine Verwendung am Reaktor wenig zielführend, solange die übrigen Sensoren verkabelt sind. Als problematisch könnte es sich aber erweisen die Enzymelektroden den gängigen industriellen Sterilisationsverfahren zu zuführen. Ein späterer Einbau scheint hingegen wirtschaftlich wenig sinnvoll und für die Sterilität des Reaktors nachteilig. Auch müssen mögliche Querempfindlichkeiten mit dem zu kultivierenden Organismus bedacht werden.

Auf Grund all dieser Schwierigkeiten wurde auf eine Integration der Sensoren in den Prototypen verzichtet.

4.6. Konstruktion eines Multisensorprototypen

Bei der Konstruktion eines Prototypen zur Messung der elektrischen Leitfähigkeit, der Temperatur, des gelösten Sauerstoffanteils und des pH-Wertes müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. In einem ersten Schritt wurde dabei die räumliche Anordnung der optischen Fenster im Sensorrohmodul festgelegt. Auf Grund der Größenverhältnisse des Messmodulrohrlings waren dabei prinzipiell zwei Anordnungen denkbar. Dies war zum einen die parallele Anordnung der optischen Fenster der Fluoreszenzsensoren in Bezug zu den Elektroden des Leitfähigkeitsmessmoduls, zum anderen die antiparallele. Abbildung 4-81 zeigt die theoretischen Anordnungsmöglichkeiten der Sensoren in einer schematischen Zeichnung.

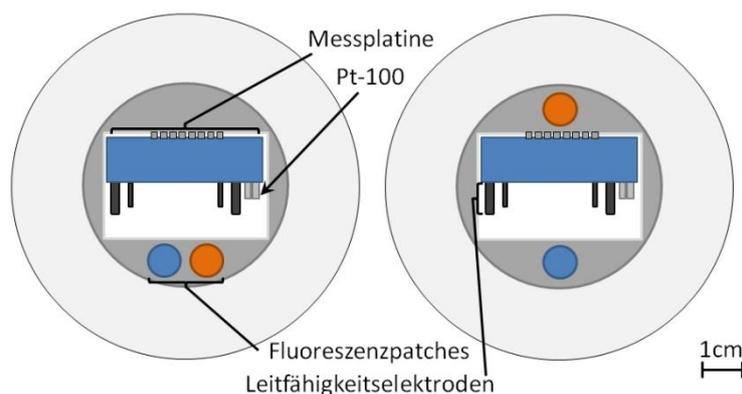


Abbildung 4-81: Parallele (links) und antiparallele Anordnung (rechts).

Auf Grund der Positionierung der Messelektronik ist eine antiparallele Anordnung in dieser Form von Messrohling allerdings ausgeschlossen, so dass einzig die parallele Anordnung umsetzbar ist. Hierfür wurde der Rohling mit zwei Bohrungen versehen, in welche zwei Konnektoren für die Glasfasern eingebracht wurden. Die Konnektoren wurden zuvor medienseitig mit optischen Fenstern abgeschlossen. Die optischen Fasern wurden mit einem konischen Metallbauteil versehen, welches sich in den Konnektor einkoppeln lässt. Die auf der Faser verklebten und die in den Messadapter

eingelassenen Konnektoren sind in Abbildung 4-82 zu sehen. Rechts ist die Glasfaser verbunden mit dem konischen Metallaufsatz zu sehen. Auf der linken Seite ist der Konnektor abgebildet. Die Faser wird dabei von der oberen Seite in den Konnektor eingeführt, während das optische Fenster auf der unteren Seite aufgeklebt wird. Die im Bild erkennbare Auskrümmung wurde vor dem Einbau entfernt. Durch diesen Konnektor wurde eine Anschlussstelle für die Glasfaser geschaffen, die einen gleichbleibenden Abstand zwischen Faser und Patch garantiert.

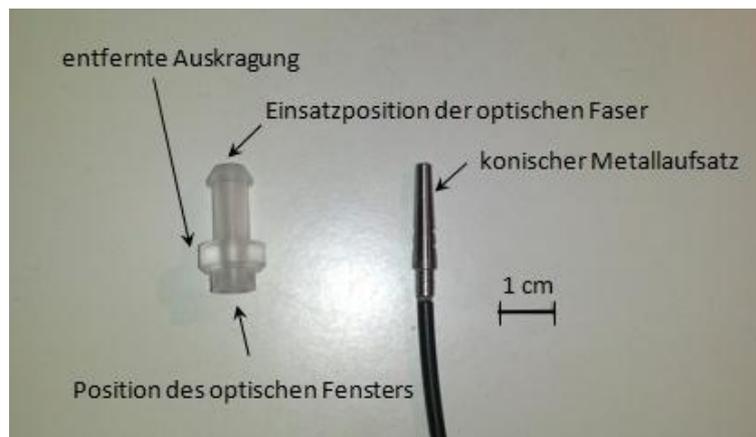


Abbildung 4-82: Konnektor an der Glasfaser (links) und eingelassener Adapter (rechts).

Nach erfolgter Bohrung des Messmoduls wurde der Konnektors mechanisch in das Messadapterrohmodul eingeführt und sowohl medienseitig als auch zur Umgebung mit UV-härtendem Kleber (Loctite, Henkel Loctite, München) verklebt und abgedichtet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die optischen Fenster möglichst eben mit dem Sensormodul abschließen. Abbildung 4-83 zeigt den fertigen Prototypen des Multisensoradapters.



Abbildung 4-83: Prototyp des Sensormoduls.

4.7. Test des Prototypen

Der in Kapitel 4.6 konstruierte Multisensor wurde im folgenden Abschnitt auf seine Funktionsfähigkeit getestet. Hierfür wurde der gesamte Multisensor in den Testreaktor integriert. Im

Anschluss erfolgte eine Kultivierung. Als Organismus fiel die Wahl dabei aufgrund der einfachen Handhabung und der Robustheit auf *Escherichia coli* K 12. Als Medium wird TB-Medium verwendet. Durch die Eigenschaften des Reaktors mit Einsätzen unterschiedlichen Durchmessers kann der Reaktor temperiert werden. Die eigentliche Kultivierung erfolgte dabei im inneren Teil des Reaktors, der durch den kleinsten Einsatz begrenzt wird. Zusätzlich wurde der äußere Einsatz in den Reaktor eingesetzt. Durch zwei Bohrungen wurde in den Zwischenraum der Einsätze Wasser eingefüllt, so dass eine Integration in einen Wärmekreislauf möglich war, wie es im schematischen Aufbau in Abbildung 4-84 dargestellt ist.

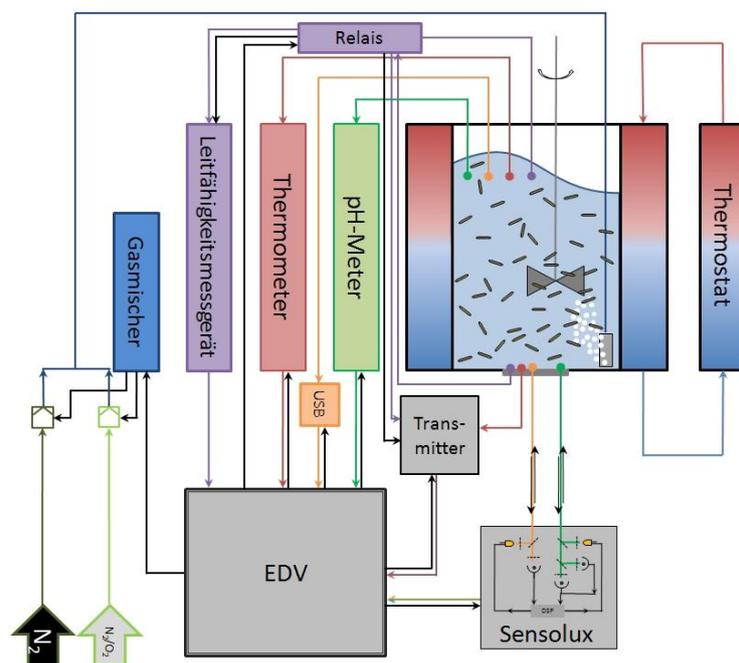


Abbildung 4-84: Schematischer Versuchsaufbau zum Test des Prototypen.

Über die Oberseite des Reaktors wurden neben der Referenzsensorik ein mechanisches Rührwerk und eine Edelstahlfritte zur Begasung eingebracht. Die Referenzsensorik wurde über die EDV ausgelesen, wobei das Ablesintervall variabel wählbar war. Thermometer und pH-Meter wurden über ihre stand-alone Systeme ausgelesen, die Kopplung der Gelöstsauerstoffelektrode erfolgte über einen Konverter direkt über USB. Zwischen die Leitfähigkeitselektrode und das zugehörige Messgerät wurde ein Relais geschaltet, welches eine abwechselnde Leitfähigkeitsmessung beider in der Lösung befindlichen Leitfähigkeitssonden erlaubt. Das zur Begasung vorgesehene Gasgemisch wurde über einen Gasmischer mit gekoppelten Massedurchflussreglern gemischt. Die Mischung und die Durchflussmengen lassen sich über die EDV einstellen. Die Fluorophorpatches zur Bestimmung des pH-Wertes und des Gelöstsauerstoffgehaltes wurden über Glasfasern an das Sensolux-System angekoppelt. Zum Auslesen von elektrischer Leitfähigkeit und Temperatur wurde ein Transmitter verwendet. Sowohl Sensolux als auch Transmitter lieferten ihre Daten an die EDV.

Eine Autoklavierung des Gesamtsystems war aufgrund der verwendeten Sensorik nicht möglich. Generell spielten für einen Test der Funktionalität der Sensorik Kontaminierungen nur eine untergeordnete Rolle, um sie aber trotzdem weitestgehend zu vermeiden wurden sowohl Reaktor als auch die wiederverwendbare Sensorik vor dem Einsatz gründlich mit deionisiertem Wasser und Isopropanol gereinigt. Nachdem sich das Isopropanol verflüchtigt hatte, wurde der Wärmekreislauf angeschlossen, gestartet und der Reaktor mit etwa 2 L TB-Medium befüllt. In dieser Phase befand sich das Rührwerk schon in Betrieb, um eine schnellere Einstellung der Temperatur zu erreichen. Die Lösung wurde währenddessen über eine Edelstahlfritte mit einem Gasgemisch Druckluft/Stickstoff 1:1 (v/v) begast, sodass sich eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 50 %-sat einstellte.

Da bei vorhergehenden Tests eine starke Schaumbildung zu beobachten war, wurde dem Medium ein kleines Volumen Antischaummittel (TEGO Antifoam KS 911, Evonik Goldschmidt GmbH, Essen) zugegeben. Bei Erreichen einer Temperatur von etwa 33 °C wurde das Medium unter Verwendung einer Kryokultur mit *Escherichia coli* K 12 inokuliert. Während sämtliche Sensoren ihre Messwerte *online* aufzeichneten, wurde zur Bestimmung der optischen Dichte viertelstündlich eine Probe von 1 mL entnommen. Das Vorgehen zur Bestimmung der optischen Dichte ist in Anhang, Kapitel 8.2.6 beschrieben. Am Ende der Kultivierung wurde eine mikroskopische Aufnahme der Kulturbrühe aufgenommen (siehe Anhang, Kapitel 8.2.7).

Im Folgenden werden die einzelnen Sensoren gemeinsam mit ihrer Referenzelektrode gegen die Zeit aufgetragen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird neben der optischen Dichte nur jeweils ein weiterer Prozessparameter aufgetragen. Die optische Dichte wird dabei als konstante Prozessgröße stets verwendet, um einen Vergleich mit dem Status der Kultivierung zu erhalten.

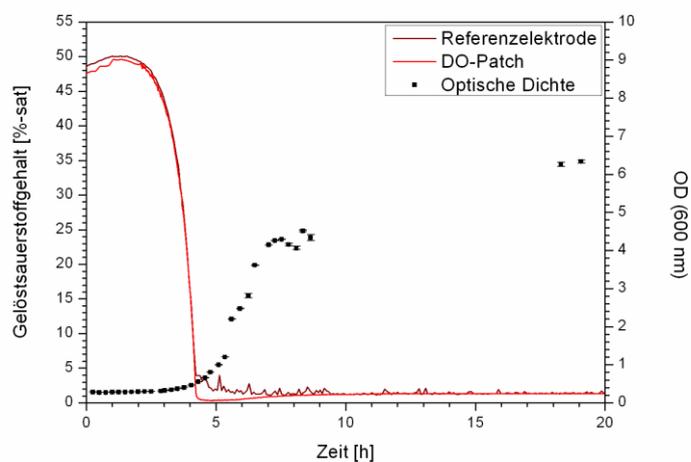


Abbildung 4-85: Zeitlicher Verlauf des Gelöstsauerstoffanteils der Testkultivierung.

Abbildung 4-85 zeigt neben der optischen Dichte den zeitlichen Verlauf der Gelöstsauerstoffsensoren. Beide Messsysteme zeigen in der Anfangsphase ein synchrones Verhalten, bei dem der Sauerstoffgehalt von etwa 47 %-sat langsam auf 50 %-sat ansteigt. Betrachtet man zusätzlich die optische Dichte, so zeigt sich, dass in dieser Phase kein merkliches Wachstum der Bakterien zu beobachten war. Mit Beginn der Wachstumsphase fällt die Sauerstoffkonzentration rapide, sodass bereits nach etwa 4 h dem Medium der komplette Sauerstoff entzogen war.

Hier verläuft die Referenzelektrode ein wenig versetzt zum DO-Patch. Dies lässt sich mit der Positionierung der Sensoren im Reaktor begründen. Während der Fluoreszenzpatch seine Messwerte am Reaktorboden aufzeichnete, erfolgte dies bei der Referenzelektrode im Reaktorkopf. Zusätzlich besteht hier die Möglichkeit der Ansammlung eines kleinen Gasvolumens unter der Elektrodenmembran. Nach etwa 7 h ist der am Patch detektierte Sauerstoffgehalt soweit angestiegen, dass ab diesem Punkt der Messverlauf beider Sensorsysteme wieder nahezu deckungsgleich erfolgt. Ab diesem Zeitpunkt verläuft der Sauerstoffgehalt linear bei etwa 2 %-sat. In diesem Bereich geht die Kultivierung wieder in einen linearen Wachstumsprozess über. Insgesamt zeigen beide Sauerstoffsensoren eine sehr gute Übereinstimmung.

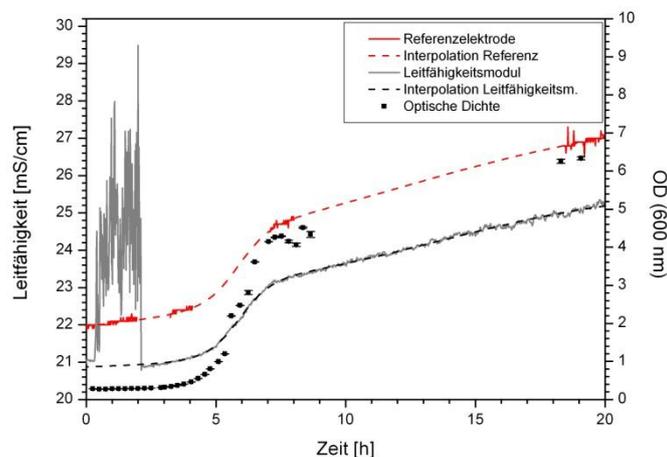


Abbildung 4-86: Zeitlicher Verlauf der Leitfähigkeitsmessung der Testkultivierung.

In Abbildung 4-86 ist der Verlauf der Leitfähigkeitsmessung während der Kultivierung dargestellt. Ins Auge sticht das große Messrauschen, welches innerhalb der ersten 2 h auftrat. Dieses ist auf einen Wackelkontakt an einem Widerstand des Messwertumwandlers zurückzuführen. Der Bereich in dem die Schwankungen auftreten, wurde bei der Berechnung der Näherungsfunktion ausgespart. Als Näherungsfunktion wurde eine doppelte Boltzmannfunktion (BiDoseResp) gewählt und mit Hilfe des Programmes OriginPro 8G angepasst. Näheres zur Zusammensetzung der Funktion und ihrer Berechnung ist der Literatur zu entnehmen [155]. Auf diese Gleichungsart musste zurückgegriffen

werden, da eine einfache Boltzmann-Funktion die lineare Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit nach der kurzen exponentiellen Zunahme nicht abzubilden vermag. Das Bestimmtheitsmaß von 0,9985 bestätigt hierbei die rein optisch wahrgenommene gute Übereinstimmung. Auch mit der optischen Dichte korreliert die elektrische Leitfähigkeit hierbei sehr gut.

Die Messung der Referenzelektrode erfolgte auf Grund einer Fehlfunktion nicht kontinuierlich, sondern ähnelt eher einer offline-Analyse. Nichtsdestotrotz verhalten sich auch die auf diesem Wege ermittelten Werte für die elektrische Leitfähigkeit analog der online ermittelten Leitfähigkeit. Die Näherungsfunktion weicht im Vergleich mit der des Leitfähigkeitsmoduls ein wenig ab. Dies ist aber insbesondere der großen dritten Messlücke geschuldet. Doch auch hier folgt die elektrische Leitfähigkeit ebenfalls der optischen Dichte. Die Abweichung der Leitfähigkeitssensoren untereinander lässt sich auf die nicht erfolgte Abgleichung der Leitfähigkeitssensoren vor Beginn der Messung zurückführen.

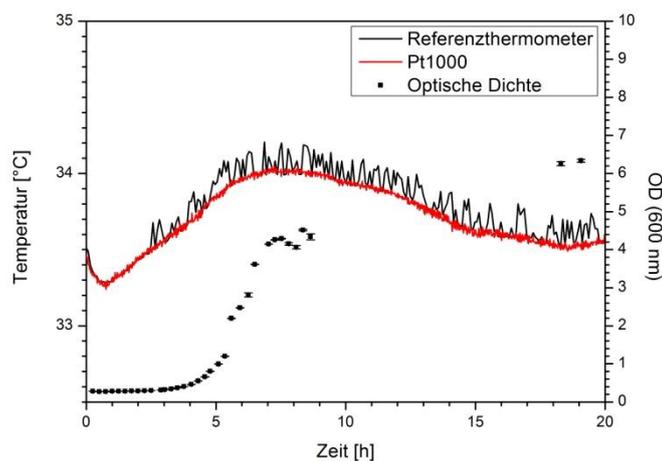


Abbildung 4-87: Zeitlicher Verlauf der Temperaturmessung während der Testkultivierung.

Abbildung 4-87 zeigt den zeitlichen Verlauf der Temperaturmessung während der Testkultivierung. Neben der optischen Dichte sind die Messkurven des Pt1000 des Sensormoduls und des Referenzthermoelements (in diesem Fall T-Sensor der Gelöstsauerstoffelektrode). Es ist zu erkennen, dass die Temperatur im Testreaktor nur in begrenztem Maße konstant gehalten werden kann. In Anbetracht der Konstruktion des Reaktors ist eine Temperaturkonstanz von $\pm 0,4$ °C um das Fenstermittel 33,6 °C jedoch ein zufriedenstellender Wert. Auffallend ist das geringe Messrauschen des Pt1000 des Sensormoduls. Dieser Platinthermistor folgt dabei mit sehr guter Korrelation der Referenz. Diese weist ein größeres Messrauschen auf, welches sich ähnlich der Bestimmung des Gelöstsauerstoffanteils durch die Positionierung des Sensors begründen lässt.

Insgesamt lässt sich auch für diesen Sensor sagen, dass er für den Einsatz in einem Multisensoradapter geeignet ist.

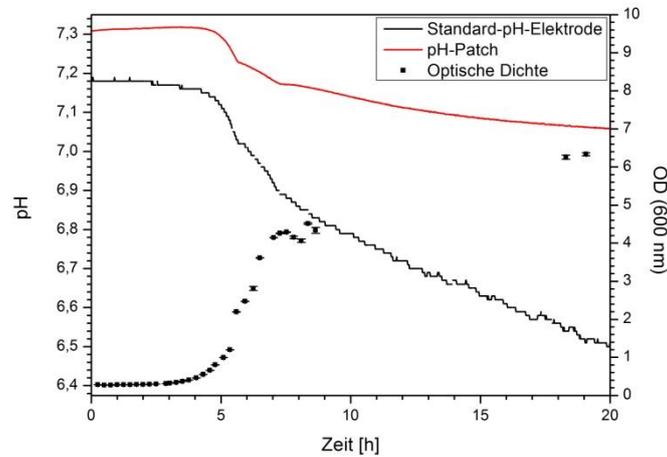


Abbildung 4-88: : Zeitlicher Verlauf des pH-Wert während der Testkultivierung .

In Abbildung 4-88 ist der Verlauf des pH-Wertes während der Kultivierung gezeigt. Aufgetragen sind die pH-Werte von Sensorpatch und pH-Referenz. Zu erkennen ist dabei, dass bereits bei Beginn der Messung eine Differenz von mehr als 0,1 pH-Einheiten besteht. Trotz der Differenz der beiden Sensoren sind in beiden Messkurven die gleichen Phasen erkennbar. Während in der Anfangsphase der pH-Wert weitestgehend konstant bleibt, nimmt er mit Beginn der exponentiellen Phase des Zellwachstums stark ab. Etwa mit Erreichen des maximalen Zellwachstums (d.h. dem Wendepunkt der exponentiellen Phase) nimmt die pH-Änderung ein wenig ab. Im Übergangsbereich zwischen exponentiellem und linearem Wachstum nimmt auch der pH-Wert konstant ab. Beide Messkurven laufen dabei immer weiter auseinander, so dass sie nach 20 h um mehr als 0,5 pH-Einheiten differieren. Trotz dieser zunehmenden Differenz ist grundsätzlich ein ähnliches Verhalten zu erkennen.

Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen den pH-Sensoren wurde bereits in Kapitel 4.1.4 besprochen. Die Kalibrationsroutine, die zur Berechnung des pH-Wertes aus den Rohdaten des Sensorpatches verwendet wurde, basiert auf einer Kalibrationsreihe, welche bei einer Ionenstärke von 150 mM aufgenommen wurde. Die Ionenstärke des TB-Mediums hingegen weicht stark von diesem ab. Bereits durch den im Medium enthaltenen Puffer ist die berechnete Ionenstärke höher als besagte 150 mM. Hinzukommen in großen Mengen Salze, welche Bestandteil des Hefeextraktes und des Tryptons sind. Da diese Bestandteile nicht in exakten Zusammensetzungen angegeben werden, konnte die Ionenstärke nicht berechnet werden. Hierbei wäre auch zu beachten, dass es sich bei der Berechnung der Ionenstärke ohnehin nur um eine Näherung handelt. Um in einem

Komplexmedium mit Hilfe des pH-Patches zuverlässige Messungen durchführen zu können, muss eine Kalibration bei der entsprechenden Ionenstärke des Mediums durchgeführt werden, um die tatsächliche Leistungsfähigkeit des pH-Patches beurteilen zu können.

Unter der Annahme einer vollständigen Dissoziation der im Puffer vorliegenden Salze wird hierfür eine Ionenstärke von 2,33 M berechnet. Der Puffer selbst besitzt eine Pufferstärke von 1 M. Durch Zugabe von Natriumchlorid wurde der Puffer auf 3 M eingestellt. Im Anhang, Kapitel 8.1.4 sind die zur erneuten Kalibration verwendeten Puffer tabellarisch aufgeführt. Die Kalibration selbst erfolgte wie zuvor in Kapitel 4.1.3 beschrieben. Hierfür wurde der Puffer aus der Standardrezeptur des TB-Mediums durch die „Simulationspuffer“ substituiert und anschließend die Kalibration durchgeführt.

Aus den erhaltenen Werten der Kalibration wird eine Kalibrationsfunktion gebildet, welches wiederum auf die Rohdaten der Kultivierung angewendet wird. Abbildung 4-89 zeigt wie die Abweichung zwischen pH-Elektrode und pH-Patch bei der Anwendung der neuen Kalibration deutlich zunimmt. Der Kurvenverlauf wird dabei zu niedrigeren pH-Werten verschoben und flacht ein wenig ab.

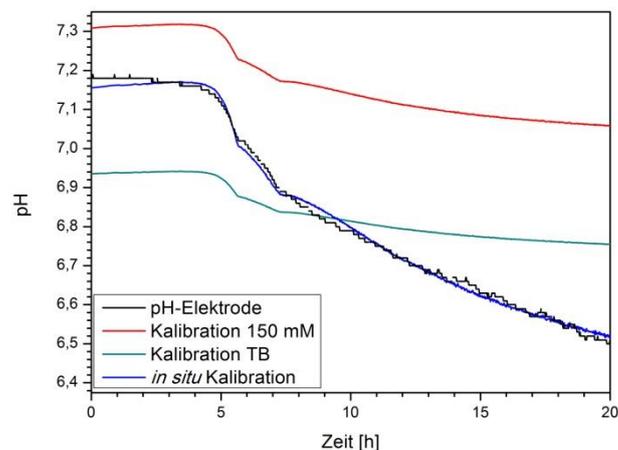


Abbildung 4-89: pH-Wert während der Kultivierung auf Grundlage unterschiedlicher Modelle.

Ursächlich hierfür kann zum einen der für die Kalibration verwendete Patch sein, da die Neukalibration zeitlich versetzt zur Kultivierung erfolgte. Hierbei kann es zu Veränderungen am Material kommen. Beachtet werden muss auch, dass die Berechnung von hohen Ionenstärken stets nur eine Näherung darstellt, wodurch diese in diesem Fall keine exakten Ionenstärken liefert. Zudem ist es möglich, dass die Kalibrationsfunktion im Bereich hoher Ionenstärken eine andere Form annimmt. Um dies zu überprüfen, wurde eine *in situ* Kalibration durchgeführt, bei der die Rohdaten den pH-Werten der Elektrode zugeordnet wurden und hieraus eine Kalibrationsfunktion gebildet wurde. Die durch diese Kalibration rückgerechneten Werte sind ebenfalls in Abbildung 4-89

dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass diese *in situ* Kalibration auch durch eine sigmoide Funktion beschrieben werden kann.

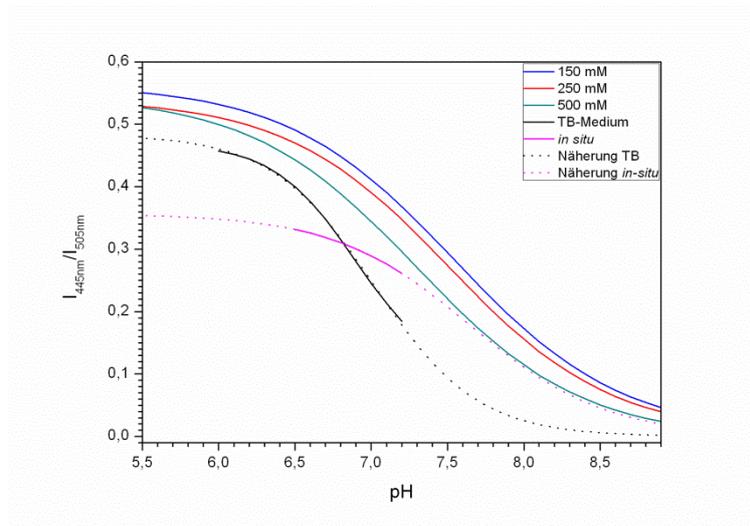


Abbildung 4-90: Darstellung der unterschiedlichen Kalibrationen der pH-Patchmaterials.

Abbildung 4-90 zeigt eine Zusammenstellung der für das Patchmaterial erhaltenen Kalibrationsfunktionen. Neben den bereits gezeigten Kalibrationen für die Ionenstärken 150 mM, 250 mM und 500 mM sind die Kalibrationen in TB-Medium sowie die *in situ* Kalibration dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass die Kalibrationen in TB-Medium und *in situ* lediglich in einem kleineren Bereich dargestellt sind, in dem die Kalibration auch tatsächlich erfolgte. Die Fortführungen der Kalibrationsfunktionen sind gepunktet dargestellt.

Bereits in den ersten Kalibrationen in Kapitel 4.2.4 deutete sich an, dass die Kalibrationskurve zunehmend abflacht. Dies geht mit einer Verkleinerung des dynamischen Messbereiches einher. Auch in den beiden anderen Kalibrationen lässt sich die Tendenz der Absenkung des Startwertes erkennen. Diese Verkleinerung des Messfensters ist bei Kultivierungen zu beachten. Bei der Anpassung der Messwerte mit Hilfe einer Kalibrationsfunktion zeigte sich, dass im Bereich dieser Ionenstärken mit Hilfe einer Boltzmann-Funktion keine sinnvollen Daten erhalten werden. Vielmehr stellte sich eine andere sigmoide Funktion, die sigmoide logistische Funktion, als passend heraus. Grund hierfür ist, dass bei Anpassungen mit der sigmoiden Boltzmannfunktion negative Intensitätsverhältnisse erhalten wurden, die physikalisch nicht der Realität entsprechen können. Dabei ist zu beachten, dass die Funktionen durch Messungen in den entsprechenden gepunkteten Bereichen validiert werden müssten.

Während dieses Testlaufes stellte sich heraus, dass die Sensoren für die Bestimmung von Gelöstsauerstoffgehalt, Leitfähigkeitsmodul und Temperatursensor ohne weitere Probleme in einer Kultivierung eingesetzt werden können. Der Einsatz des pH-Patches hingegen ist mit einigen

Schwierigkeiten verbunden. Hier muss an der Ionenstärke-Abhängigkeit des Fluoreszenzpatches gearbeitet werden. Eine Möglichkeit für den Endanwender wäre auch die Angabe einer Kalibrationsfunktion für unterschiedliche Medien von Seiten des Herstellers. Die Angabe einer einzelnen Kalibrationsfunktion kann, wie gezeigt, nicht ohne eine gleichzeitige Messung der Ionenstärke zum Ziel führen.

Sehr gute Ergebnisse wurden beim Einsatz des Gelöstsauerstoffsensors erhalten. Die maximale Abweichung während der Messung betrug 3,62 %-sat, im Mittel über die gesamte Kultivierung lag sie bei 0,37 %-sat. Damit kann die Messung auch mit dem Einwegsensoren mit hoher Präzision durchgeführt werden. Auch für den Temperatursensor ergeben sich sehr zufriedenstellende Werte. Die maximale Abweichung betrug hier 0,5 °C, die mittlere Abweichung 0,05 °C. Bezogen auf die mittlere Temperatur des Referenzthermoelements von 33,75 °C ergibt dies im Maximum 1,48 % und im Mittel 0,13 %.

Durch den bei Messungsstart nicht erfolgten Abgleich zwischen den Leitfähigkeitssensoren ist die Messabweichung hier größer. Im Mittel weichen die Werte hier um 0,57 mS/cm, im Maximum um 2,31 mS/cm voneinander ab. Aufgrund der Zunahme des Signals um 25 % im Laufe der Messung ist die prozentuale Angabe der Messabweichungen in diesem Fall nicht sinnvoll.

Die Problematik des pH-Sensors wurde bereits ausführlich beschrieben.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Erprobung verschiedener Einwegsensorsysteme für die Nutzung in Einwegbioreaktoren. Hierfür wurde insbesondere der Einfluss verschiedener Parameter auf Fluoreszenzsensoren zur Detektion des pH-Werts und des gelösten Sauerstoffanteils getestet. Der pH-Sensor erwies sich dabei als anfälliger, insbesondere in Bezug auf die Ionenstärke des Mediums. Insgesamt zeigten die Tests für diese Sensoren aber zufriedenstellende Ergebnisse.

Wichtiger Bestandteil für den zu konstruierenden Multisensor war das Leitfähigkeitsmodul, dessen Grundplatte die Ausgangsbasis für die zu implementierenden Sensoren darstellen sollte. Dieser Sensor wurde im Verlauf der Arbeit auf die Umgebungsbedingungen in einem gewippten Beutelreaktorsystem getestet, d.h. auf den Einfluss von Füllstand und Reaktorgröße. Hierbei wurde auch die Einsetzbarkeit in einem gewippten System, sowohl in einem statischen als auch in einem dynamischen Test, simuliert. Hierbei stellte der Sensor im Ergebnis seine Eignung für den Einwegbioreaktor unter Beweis.

Weiter wurde der im Leitfähigkeitsmodul integrierte Pt1000 Temperatursensor gemeinsam mit mehreren NTCs für den Einweinsatz getestet. Versuche zeigten dabei ebenfalls eine generelle Eignung aller getesteten Temperatursensoren. Im Fall des Pt1000 führten Testmessungen zudem zu einer Änderung an der thermischen Isolation des Leitfähigkeitsmoduls, was zu einer Verbesserung der Temperaturstabilität bei einer zwischen Medium und Umgebung vorliegenden Temperaturdifferenz führte.

Zusätzlich wurden Siebdruckelektroden untersucht, welche zur Bestimmung der Gehalte an Glucose, Laktat und Glutamat eingesetzt werden können. Diese Sensoren konnten in den vorgenommenen Testmessungen weder in einem statischen noch in einem dynamischen System überzeugen, so dass sie nicht für eine Integration in den Multisensordapter in Betracht gezogen wurden.

Nach der Auswahl der Einwegsensoren folgte die Konstruktion eines Prototypen, wobei in das Leitfähigkeitsmodul optische Fenster und Halterungen für die Fluoreszenzsensoren bzw. die zur Detektion notwendigen Glasfasern integriert wurden.

Der konstruierte Prototyp wurde abschließend in einem gerührten Testreaktor in einer Kultivierung von *Escherichia coli* getestet. Hierbei konnte die Einsetzbarkeit der Sensoren zur Bestimmung des gelösten Sauerstoffgehaltes, der Leitfähigkeit und der Temperatur nachgewiesen werden. Der pH-Sensor konnte in diesem Test aufgrund der starken Ionenstärkeabhängigkeit des Messsignals nicht überzeugen, denn hierfür ist eine verlässliche Kalibration in einem Medium mit entsprechender Ionenstärke erforderlich.

Die Abhängigkeit von der Ionenstärke des pH-Patchmaterials ist dabei ein Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten. Würde es gelingen, diese Abhängigkeit zu eliminieren, könnte der Sensor ohne weitere Probleme in jeglichen Medien eingesetzt werden. In der aktuellen Situation muss jedoch die Ionenstärke des Mediums bekannt sein, um eine passende Kalibration anzuwenden. Auch aus Marketingaspekten wäre eine universelle Anwendbarkeit des Sensors von immensem Wert. Allerdings muss dabei auch in Betracht gezogen werden, dass der Anbieter Sartorius Stedim Biotech, Göttingen in seinem Portfolio ebenfalls über elektrochemische Alternativen zur pH-Messung im Einwegbereich verfügt [156], bei deren Verwendung auf Grund anderer Messprinzipien dieses Problem folglich bereits umgangen werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kompensation des Ionenstärke-Einflusses durch den Einsatz eines Osmolaritätssensors, so dass die Ionenstärke in die Berechnung der Kalibrationsfunktion miteinbezogen werden kann.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Integration des Multisensorprototyps in einen Beutelreaktor. Dies war nach Rücksprache mit Sartorius Stedim Biotech, Göttingen nicht möglich, da nur begrenzte Produktionskapazitäten bestanden und der Einbau der Sensoren manuell erfolgt [157]. Hierbei ist allerdings festzustellen, dass bei der Anwendbarkeit des Multisensoradapters keine weiteren Probleme zu erwarten sind. Zum einen handelt es sich bei den Fluoreszenzpatches um bereits in solchen Systemen verwendete Technologien, zum anderen wurde der Leitfähigkeitssensor im Rahmen dieser Arbeit in einem wippenden System getestet. Effekte, die durch die Bewegungen des Reaktors hervorgerufen werden können, wären dabei nur die in Abschnitt 4.3.4 beobachteten periodischen Schwankungen des Messsignals. Für den Pt1000 ist nur dann eine Beeinflussung der Messung zu erwarten, wenn der Sensor nicht mehr ausreichend von Messmedium umspült wird.

Von informationstechnologischer Seite müsste zudem eine Vereinheitlichung der Software erfolgen, um diese anwenderfreundlicher zu gestalten. Im Laufe dieser Arbeit wurde auf eine bestehende Software zur Detektion der Fluoreszenzsignale sowie eine am Institut entwickelte Software zur Erfassung von elektrischer Leitfähigkeit und Temperatur zurückgegriffen. Hierbei ist für den Anwender, wie auch in den Bereichen des alltäglichen Lebens eine intuitive Benutzeroberfläche genauso unumgänglich, wie eine übersichtliche Darstellung der aktuellen Prozessparameter mit gleichzeitiger Möglichkeit die Parameter einzelner, parallel laufender Kultivierungen graphisch darstellen zu lassen.

Wie bereits aufgezeigt befinden sich Einwegreaktoren auf dem Vormarsch. Dies gilt insbesondere in Bereichen, in denen eine hohe Reinheit des Produktes und des Prozesses gewährleistet sein muss, wie beispielsweise der pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie. Werden Produkte lediglich in technischer Reinheit benötigt, werden sich aufgrund hoher laufender Kosten Einwegreaktoren in

diesem Bereich nicht durchsetzen können. Ein bedeutender Faktor für den weiteren Erfolg von Einwegreaktoren wird die fortschreitende Entwicklung im Bereich der Sensortechnologie sein. Hier sind sowohl Anwender als auch Anbieter gefordert gemeinsam Anforderungen an zukünftige Reaktorsysteme zu formulieren.

6. Literaturverzeichnis

1. TetraPak International (2013), Historie. abgerufen am: 17.04.2013.
2. biotechnologie.de (2012), Die deutsche Biotechnologie-Branche 2012. Bundesministerium für Bildung und Forschung (Hrsg.): Berlin.
3. G. Locher, B. Sonnleitner, et al. (1992), Online Measurement in Biotechnology - Techniques. *Journal of Biotechnology*. 25(1-2): S.23-53.
4. S. Henkel, S. Beutel (2013), Determination of pH Value in Biotechnology. *Chemie Ingenieur Technik*. 85(6): S.872-885.
5. G.K. McMillan, R.A. Cameron (2005), Advanced pH Measurement and Control, 3. Auflage. ISA, the Instrumentation, Systems and Automation Society: Research Triangle Park, NC.
6. S. Beutel, S. Henkel (2011), In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(6): S.1493-1505.
7. W. Schelter, W. Gumbrecht, et al. (1992), Combination of Amperometric and Potentiometric Sensor Principles for Online Blood Monitoring. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 6(1-3): S.91-95.
8. Jiří Janata (2009), Principles of Chemical Sensors, 2. Auflage. Springer-Verlag: New York.
9. Ralf Degner (2009), pH-Messung: Der Leitfaden für Praktiker. Wiley-VCH: Weinheim.
10. Kurt Schwabe (1976), pH-Messtechnik, 4. Auflage. Steinkopff: Dresden.
11. F. G. K. Baucke (1994), THE MODERN UNDERSTANDING OF THE GLASS-ELECTRODE RESPONSE. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 349(8-9): S.582-596.
12. H. Kahlert (2010), Reference Electrodes, in *Electroanalytical Methods*. (F. Scholz, Hrsg.). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg.
13. Sartorius (2013), Handbuch der Elektroanalytik Teil 1. Sartorius: Göttingen.
14. Emerson Process Management GmbH & Co OHG (2011), pH-/Redox-Sensoren für den breiteren Anwendungsbereich. *CITplus*. 5(14): S.19.
15. W. Simon, D. Ammann, et al. (1984), Ion-Selective Electrodes and Their Clinical-Application in the Continuous Ion Monitoring. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 428(Jun): S.279-285.
16. W. Vonau (2010), Electrochemical pH Sensors for Special Applications. *Tm-Technisches Messen*. 77(3): S.162-172.
17. G. Schaller, W. R. Fischer (1981), The Application of Antimony Electrodes for Soil-pH Measurements. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*. 144(2): S.197-204.
18. W. D. Huang, H. Cao, et al. (2011), A flexible pH sensor based on the iridium oxide sensing film. *Sensors and Actuators a-Physical*. 169(1): S.1-11.
19. Y. S. Chiu, C. T. Lee (2011), pH Sensor Investigation of Various-Length Photoelectrochemical Passivated ZnO Nanorod Arrays. *Journal of the Electrochemical Society*. 158(9): S.J282-J285.
20. J. D. Vitiello, D. Pistone, et al. (1996), A problem associated with the use of a calomel reference electrode in an ISE analytical system. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 56:165-171.
21. K. M. Monzambe, H. P. Naveau, et al. (1988), PROBLEMATICS AND STABILITY OF ONLINE PH MEASUREMENTS IN ANAEROBIC ENVIRONMENTS - THE JELLIED COMBINED ELECTRODE. *Biotechnology and Bioengineering*. 31(7): S.659-665.
22. H. Kaden, W. Vonau (1998), Reference electrodes for electrochemical measurements. *Journal Fur Praktische Chemie-Chemiker-Zeitung*. 340(8): S.710-721.
23. H. Kahlert, T. Steinhardt, et al. (2004), A new calibration free pH-probe for in situ measurements of soil pH. *Electroanalysis*. 16(24): S.2058-2064.
24. H. Dussel, S. Komorskylovric, et al. (1995), A SOLID COMPOSITE PH SENSOR-BASED ON QUINHYDRONE. *Electroanalysis*. 7(9): S.889-894.
25. G. J. Hills, D. J. G. Ives (1951), THE HYDROGEN-CALOMEL CELL .2. THE CALOMEL ELECTRODE. *Journal of the Chemical Society*. 311-318.

26. K. Schwabe, S. Ziegenbalg (1958), Über Die Kette - Pt,H₂ (1 Atm)-HCl,Hg₂Cl₂ (S)-Hg in Organischen Lösungsmitteln Und Ihren Gemischen Mit Wasser .1. Pt, H₂(1atm)-HCl(M), CH₃OH(X),H₂O(1-X),Hg₂Cl₂(S)-Hg. *Zeitschrift Fur Elektrochemie*. 62(2): S.172-178.
27. H. Galster (1990), pH-Messung. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim.
28. M. Y. Gorina, E. P. Glagoleva (1976), Amalgamless Thallium Chloride Reference Electrode. *Soviet Electrochemistry*. 12(6): S.879-880.
29. H.W. Bühler, R. Bucher (1987), Sterilisierbare pH-Meßkette zur Überwachung mikrobiologischer Prozesse. Chemical Abstracts. DE3702501A1.
30. S. D. Collins (1993), Practical Limits for Solid-State Reference Electrodes. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 10(3): S.169-178.
31. L. F. J. Durselen, U. Oesterle, et al. (1990), New Solid-State Contact for Ion-Selective Liquid Membrane Electrodes. *Chimia*. 44(6): S.214-215.
32. J. W. Severinghaus, P. B. Astrup (1987), HISTORY OF BLOOD-GAS ANALYSIS. *International Anesthesiology Clinics*. 25(4): S.1-214.
33. L. C. Clark (1956), MONITOR AND CONTROL OF BLOOD AND TISSUE OXYGEN TENSIONS. *Transactions American Society for Artificial Internal Organs*. 2:41.
34. P. Schuler (1987), Oxi-Fibel - Einführung in die Gelöstsauerstoff-Meßtechnik. WTW: Weilheim.
35. P. Lindner, C. Endres, et al. (2011), Disposable Sensor Systems, in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (R. Eibl und D. Eibl, Hrsg.). John Wiley & Sons Inc.: New Jersey. S.68-81.
36. G. G. Wildgoose, M. Pandurangappa, et al. (2003), Anthraquinone-derivatised carbon powder: reagentless voltammetric pH electrodes. *Talanta*. 60(5): S.887-893.
37. M. Pandurangappa, N. S. Lawrence, et al. (2003), Physical adsorption of N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine onto carbon particles: Application to the detection of sulfide. *Analyt.* 128(5): S.473-479.
38. I. Streeter, H. C. Leventis, et al. (2004), A sensitive reagentless pH probe with a ca. 120 mV/pH unit response. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 8(10): S.718-721.
39. H. C. Leventis, I. Streeter, et al. (2004), Derivatised carbon powder electrodes: reagentless pH sensors. *Talanta*. 63(4): S.1039-1051.
40. N. S. Lawrence, M. Pagels, et al. (2007), Triple component carbon epoxy pH probe. *Electroanalysis*. 19(4): S.424-428.
41. Emanuel Merck (1963), Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration mit Indikatoren, 6th Auflage. Merck: Darmstadt.
42. H. Yamazaki, R. P. Sperline, et al. (1992), Spectrophotometric Determination of Ph and Its Application to Determination of Thermodynamic-Equilibrium Constants. *Analytical Chemistry*. 64(22): S.2720-2725.
43. P. Blakemore (1987), Spectrophotometry & Spectrofluorimetry: A practical Approach. (D.A. Harris und C.L. Bashford, Hrsg.). IRL Press: Oxford.
44. B. Weidgans (2008), New fluorescent optical pH sensors with minimal effects of ionic strength: theory, synthesis & application. VDM Verlag Dr. Müller: Saarbrücken.
45. B. A. A. Dremel, R. D. Schmid (1992), Optical Sensors for Bioprocess Control. *Chemie Ingenieur Technik*. 64(6): S.510-517.
46. L. A. Saari, W. R. Seitz (1982), Ph Sensor Based on Immobilized Fluoresceinamine. *Analytical Chemistry*. 54(4): S.821-823.
47. Z. Zhujun, W. R. Seitz (1984), A Fluorescence Sensor for Quantifying Ph in the Range from 6.5 to 8.5. *Analytica Chimica Acta*. 160(Jun): S.47-55.
48. A. J. Amali, N. H. Awwad, et al. (2011), Nanoparticle assembled microcapsules for application as pH and ammonia sensor. *Analytica Chimica Acta*. 708(1-2): S.75-83.
49. O. S. Wolfbeis, N. V. Rodriguez, et al. (1992), Led-Compatible Fluorosensor for Measurement of near-Neural Ph Values. *Mikrochimica Acta*. 108(3-6): S.133-141.

50. A. Lapresta-Fernandez, T. Doussineau, *et al.* (2011), Magnetic and fluorescent core-shell nanoparticles for ratiometric pH sensing. *Nanotechnology*. 22(41): Art.Nr. 415501.
51. A. Schulz, S. Hornig, *et al.* (2009), Evaluation of fluorescent polysaccharide nanoparticles for pH-sensing. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 7(9): S.1884-1889.
52. W. Z. Jin, L. X. Wu, *et al.* (2011), Continuous Intra-Arterial Blood pH Monitoring by a Fiber-Optic Fluorosensor. *Ieee Transactions on Biomedical Engineering*. 58(5): S.1232-1238.
53. T. Doussineau, M. Smaïhi, *et al.* (2009), Two-Dye Core/Shell Zeolite Nanoparticles: A New Tool for Ratiometric pH Measurements. *Advanced Functional Materials*. 19(1): S.117-122.
54. J. P. Sumner, N. M. Westerberg, *et al.* (2006), Cu⁺- and Cu²⁺-sensitive PEBBLE fluorescent nanosensors using DsRed as the recognition element. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 113(2): S.760-767.
55. G. J. Mohr, S. Trupp, *et al.* (2010), Nanosensors for Biotechnological and Medical Research. *Tm-Technisches Messen*. 77(3): S.194-199.
56. H. A. Clark, M. Hoyer, *et al.* (1999), Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 1. Fabrication, characterization, and methods for intracellular delivery of PEBBLE sensors. *Analytical Chemistry*. 71(21): S.4831-4836.
57. H. A. Clark, R. Kopelman, *et al.* (1999), Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 2. Sensors for pH and calcium and the intracellular application of PEBBLE sensors. *Analytical Chemistry*. 71(21): S.4837-4843.
58. T. Doussineau, S. Trupp, *et al.* (2009), Ratiometric pH-nanosensors based on rhodamine-doped silica nanoparticles functionalized with a naphthalimide derivative. *Journal of Colloid and Interface Science*. 339(1): S.266-270.
59. S. Hornig, C. Biskup, *et al.* (2008), Biocompatible fluorescent nanoparticles for pH-sensing. *Soft Matter*. 4(6): S.1169-1172.
60. A. Schulz, J. Wotschadlo, *et al.* (2010), Fluorescent nanoparticles for ratiometric pH-monitoring in the neutral range. *Journal of Materials Chemistry*. 20(8): S.1475-1482.
61. S. M. Buck, H. Xu, *et al.* (2004), Nanoscale probes encapsulated by biologically localized embedding (PEBBLEs) for ion sensing and imaging in live cells. *Talanta*. 63(1): S.41-59.
62. H. H. Sun, K. Almdal, *et al.* (2011), Expanding the dynamic measurement range for polymeric nanoparticle pH sensors. *Chemical Communications*. 47(18): S.5268-5270.
63. R. V. Benjaminsen, H. H. Sun, *et al.* (2011), Evaluating Nanoparticle Sensor Design for Intracellular pH Measurements. *Acs Nano*. 5(7): S.5864-5873.
64. S. T. Whitten, B. Garcia-Moreno, *et al.* (2005), Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(12): S.4282-4287.
65. P. Bergveld (1981), The Operation of an Isfet as an Electronic Device. *Sensors and Actuators*. 1(1): S.17-29.
66. W. Oelssner, H. Kaden (1991), ON THE APPLICATION OF ION SENSITIVE FIELD-EFFECT TRANSISTORS FOR THE INVESTIGATION OF CORROSION PHENOMENA. *Werkstoffe Und Korrosion-Materials and Corrosion*. 42(7): S.356-362.
67. F. Lisdat, W. Moritz, *et al.* (1990), Reference Electrodes for Aqueous and Molten Systems. *Zeitschrift Fur Chemie*. 30(12): S.427-433.
68. M. Kremer (2003), Methoden zur pH-Messung. *Industriebedarf*. 7/8:22-23.
69. J. Janata (1985), in *Solid State Chemical Sensors*. (J. Janata und R. Huber, Hrsg.). Academic Press Inc.: Orlando, USA.
70. W. Oelssner, J. Zosel, *et al.* (2005), Encapsulation of ISFET sensor chips. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 105(1): S.104-117.
71. F. Sevilla, T. Kullick, *et al.* (1994), A Bio-Fet Sensor for Lactose Based on Co-Immobilized Beta-Galactosidase Glucose-Dehydrogenase. *Biosensors & Bioelectronics*. 9(4-5): S.275-281.

72. R. Köneke, C. Menzel, *et al.* (1996), Reversible coupling of glucoenzymes on fluoride-sensitive FET biosensors based on lectin-glycoprotein binding. *Biosensors & Bioelectronics*. 11(12): S.1229-1236.
73. R. Ulber, T. Scheper (1998), Enzyme biosensors based on ISFETs, in *Enzyme and Microbial Biosensors*. (A. Mulchandani und K.R. Rogers, Hrsg.). Humana: New Jersey. S.35-50.
74. T. Scheper, B. Hitzmann, *et al.* (1999), Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses. *Analytica Chimica Acta*. 400(SI): S.121-134.
75. A. Glindkamp, D. Riechers, *et al.* (2009), Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends. *Disposable Bioreactors*. 115:145-169.
76. Kurt Schwabe (1957), Elektrometrische pH-Messungen unter extremen Bedingungen. I. Messung der Wasserstoffionen-Konzentration in stark sauren und alkalischen Lösungen. *Chemie Ingenieur Technik*. 29(10): S.656-660.
77. R. Trampert (2010), Enamel-Ceramic pH Sensors in a Steel-Compound. *Tm-Technisches Messen*. 77(3): S.173-178.
78. F. G. K. Baucke (1974), Investigation of Surface-Layers, Formed on Glass-Electrode Membranes in Aqueous-Solutions, by Means of an Ion Sputtering Method. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 14(Jan): S.13-31.
79. V. Schulz, G. Gerlach, *et al.* (2010), Piezoresistive pH Microsensors Based on Stimuli-Sensitive Polyelectrolyte Hydrogels. *Tm-Technisches Messen*. 77(3): S.179-186.
80. G. Lin, S. Chang, *et al.* (2009), Free swelling and confined smart hydrogels for applications in chemomechanical sensors for physiological monitoring. *Sensors and Actuators B-Chemical*. 136(1): S.186-195.
81. P.L.P. Hoa (2005), Uncertainty in measurement of piezoresistive sensors. w.e.b. Universitätsverlag: Dresden.
82. G. Orgovan, B. Noszal (2011), Electrodeless, accurate pH determination in highly basic media using a new set of ¹H NMR pH indicators. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54(5): S.958-964.
83. M. J. Kushmerick, R. A. Meyer (1985), CHEMICAL-CHANGES IN RAT LEG MUSCLE BY PHOSPHORUS NUCLEAR MAGNETIC-RESONANCE. *American Journal of Physiology*. 248(5): S.C542-C549.
84. Duden (2013), Reaktor. abgerufen am: 22.02.2013.
85. H. Chmiel (2011), Bioprozesstechnik, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
86. R. Eibl, S. Kaiser, *et al.* (2010), Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86(1): S.41-49.
87. Dechema (2012), Statuspapier des Temporären Arbeitskreises: "Single-Use-Technologie in der biopharmazeutischen Produktion". Dechema - Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (Hrsg.): Frankfurt am Main.
88. E. A. Falch, C. G. Heden (1963), DISPOSABLE SHAKER FLASKS. *Biotechnology and Bioengineering*. 5(3): S.211-220.
89. P. Codner, M. Chat (2005), Massive transfusion for trauma is appropriate. *The International Trauma Anesthesia and Critical Care Society*. 148-152.
90. R. A. Knazek, P. O. Kohler, *et al.* (1972), CELL-CULTURE ON ARTIFICIAL CAPILLARIES - APPROACH TO TISSUE GROWTH IN-VITRO. *Science*. 178(4056): S.65-67.
91. J. Hopkinson (1985), HOLLOW FIBER CELL-CULTURE SYSTEMS FOR ECONOMICAL CELL-PRODUCT MANUFACTURING. *Bio-Technology*. 3(3): S.225-230.
92. F. W. Falkenberg (1998), Production of monoclonal antibodies in the miniPERM (TM) bioreactor: comparison with other hybridoma culture methods. *Research in Immunology*. 149(6): S.560-570.
93. M. Ziv, G. Ronen, *et al.* (1998), Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 34(2): S.152-158.

94. Aber Instruments (2013), The Biomass Monitor 220. (Hrsg.): Aberystwyth.
95. Fogale (2013), ibiomass 465. Fogale Biotech (Hrsg.): San Francisco.
96. Presens (2011), CO2 Sensors. Presens Precision Sensing (Hrsg.): Regensburg.
97. Finesse (2013), TruTorr. Finesse Solutions (Hrsg.): Santa Clara.
98. PendoTECH (2013), PendoTECH Single Use Pressure Sensors. PendoTECH (Hrsg.): Princeton.
99. SciLog (2013), SciPres. SciLog (Hrsg.): Madison.
100. PendoTECH (2013), PendoTECH Coriolis Flowmeter. PendoTECH (Hrsg.): Princeton.
101. Hamilton (2012), OxyFerm FDA Arc 425. Hamilton Bonaduz (Hrsg.): Bonaduz.
102. Finesse (2013), TruFluor DO. Finesse Solutions (Hrsg.): Santa Clara.
103. Finesse (2013), TruDO Optical. Finesse Solutions (Hrsg.): Santa Clara.
104. Hamilton (2011), VisiFerm DO B 425. Hamilton Bonaduz (Hrsg.): Bonaduz.
105. Ocean Optics (2013), RedEye Optical Oxygen Sensors. Ocean Optics (Hrsg.): Dunedin.
106. Presens (2011), Non-Invasive Oxygen Sensors. Presens Precision Sensing (Hrsg.): Regensburg.
107. Finesse (2013), TruDO. Finesse Solutions (Hrsg.): Santa Clara.
108. C-CIT (2013), Product information "CITSens Bio". C-CIT (Hrsg.): Wädenswil.
109. Hamilton (2012), Conducell 4USF Arc 425. Hamilton Bonaduz (Hrsg.): Bonaduz.
110. PendoTECH (2013), Single Use Conductivity Sensors. PendoTECH (Hrsg.): Princeton.
111. SciLog (2013), SciCon. SciLog (Hrsg.): Madison.
112. Finesse (2013), TruFluor pH. Finesse Solutions (Hrsg.): Santa Clara.
113. Ocean Optics (2013), Non-Intrusive Reflexive pH Sensors. abgerufen am: 16.04.2013.
114. Presens (2011), Non-Invasive pH Sensors. Presens Precision Sensing (Hrsg.): Regensburg.
115. Finesse (2013), TrupH. Finesse Solutions (Hrsg.): Santa Clara.
116. Hamilton (2012), EasyFerm Plus K8 120. Hamilton Bonaduz (Hrsg.): Bonaduz.
117. PendoTECH (2013), PendoTECH Single Use Temperature Sensors. PendoTECH (Hrsg.): Princeton.
118. SciLog (2013), SciTemp. SciLog (Hrsg.): Madison.
119. PendoTECH (2013), PendoTECH Single Use UV Flow Cell. PendoTECH (Hrsg.): Princeton.
120. Finesse (2013), TruCell2. Finesse Solutions (Hrsg.): Santa Clara.
121. Jobst Technologies (2013), Sensors. abgerufen am: 16.04.2013.
122. Trace Analytics (2013), ProcessTRACE. abgerufen am: 16.04.2013.
123. R.L. Buckler (2011), Opportunities in Regenerative Medicine - The Global Industry and Market Trends. *BioProcess International*. 9(S1): S.14-19.
124. R. Shaw (2011), Stem-cell-based therapies: What's in development, implications for bioprocessing. *BioProcess International*. 9(S1): S.20-25.
125. M. Rios (2011), Technologies on the cutting edge: Perspectives on making cell therapies work. *BioProcess International*. 9(S1): S.26-29.
126. M. Mikola, J. Seto, et al. (2007), Evaluation of a novel Wave Bioreactor (R) cellbag for aerobic yeast cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 30(4): S.231-241.
127. R. Eibl, D. Eibl (2009), Application of Disposable Bag Bioreactors in Tissue Engineering and for the Production of Therapeutic Agents, in *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. (C. Kasper, M. VanGriensven, und R. Portner, Hrsg.). Springer-Verlag Berlin: Berlin. S.183-207.
128. P. Jonczyk, A. Schmidt, et al. Strictly Anaerobic Batch Cultivation of *Eubacterium ramulus* in a Novel Disposable Bag Reactor System. *Chemie Ingenieur Technik*. 83(12): S.2147-2152.
129. R. Eibl, C. Löffelholz, et al. (2011), Single-use bioreactor - An overview, in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (R. Eibl und D. Eibl, Hrsg.). John Wiley & Sons Inc.: New Jersey. S.33-51.
130. R. Eibl, D. Eibl (2006), Design and use of the Wave bioreactor for plant cell culture, in *Plant tissue culture engineering*. (S. Dutta und Y. Baraki, Hrsg.). Springer: Dordrecht. S.203-227.
131. S. Werner, M. Kraume, et al. (2011), Bag mixing systems for single-use, in *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. (R. Eibl und D. Eibl, Hrsg.). John Wiley & Sons Inc.: New Jersey. S.21-32.

132. M. Ziv (2005), Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 81(3): S.277-285.
133. Y. Shaaltiel, D. Bartfeld, *et al.* (2007), Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal*. 5(5): S.579-590.
134. B. Terrier, D. Courtois, *et al.* (2007), Two new disposable bioreactors for plant cell culture: The wave and undertow bioreactor and the slug bubble bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 96(5): S.914-923.
135. G. Sivakumar, C. Z. Liu, *et al.* (2010), Biomass Production of Hairy Roots of *Artemisia annua* and *Arachis hypogaea* in a Scaled-Up Mist Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 107(5): S.802-813.
136. J. P. Ducos, B. Terrier, *et al.* (2009), Disposable Bioreactors for Plant Micropropagation and Mass Plant Cell Culture, in *Disposable Bioreactors*. (R. Eibl und D. Eibl, Hrsg.). Springer-Verlag Berlin: Berlin. S.89-115.
137. M.D. Selker, B.A. Paldus (2008), Single-use systems: optical sensors and bioreactors. *BTi*. September 2008): S.17-20.
138. ske (2013), Cellphase. ske (Hrsg.): Mailand.
139. Presens (2011), Products 2011/12. Presens (Hrsg.): Regensburg.
140. F. Bernard, E. Chevalier, *et al.* (2009), Disposable pH Sensors. *BioProcess International*. 7(S1): S.32-36.
141. Sartorius (2013), Sensolux Tablar, Stand Alone Version DCS09. abgerufen am: 12.04.2013.
142. Sartorius (2011), UniVessel SU, Sartorius, Editor: Göttingen.
143. D. Riechers (2010), Optical Sensors in Disposable Bioreactors - Status quo - Personal Communication.
144. A. S. Kocincova, S. M. Borisov, *et al.* (2007), Fiber-optic microsensors for simultaneous sensing of oxygen and pH, and of oxygen and temperature. *Analytical Chemistry*. 79(22): S.8486-8493.
145. Sigma-Aldrich (2013), Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride complex. abgerufen am: 08.01.2013.
146. D. Tromans (1998), Temperature and pressure dependent solubility of oxygen in water: a thermodynamic analysis. *Hydrometallurgy*. 48(3): S.327-342.
147. Hamilton (2012), OxyFerm 120 - Specification Sheet. Hamilton Bonaduz (Hrsg.): Bonaduz.
148. Hamilton (2012), OxyFerm 225 - Specification Sheet. Hamilton Bonaduz (Hrsg.): Bonaduz.
149. Hamilton (2012), VisiFerm DO 120 - Specification Sheet. Hamilton Bonaduz (Hrsg.): Bonaduz.
150. S. Witt, G. Wohlfahrt, *et al.* (2000), Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of beta-D-glucose. *Biochemical Journal*. 347(Pt2): S.553-559.
151. B. Sonnleitner, G. Locher, *et al.* (1992), Biomass Determination. *Journal of Biotechnology*. 25(1-2): S.5-22.
152. Alfred Böge, Jürgen Eichler (2008), Physik für technische Berufe. Vieweg: Wiesbaden.
153. Krohne (2007), ACM 500/ACM 510 - Technisches Datenblatt. Krohne (Hrsg.): Duisburg.
154. C-CIT (2013), Biosensor für Echtzeitmessungen in Bioreaktoren: Glukose, Glutamat, Laktat. abgerufen am: 19.02.2013.
155. OriginLab (2012), BiDoseResp. abgerufen am: 11.03.2013.
156. Sartorius (2008) <http://www.businesswire.com/news/home/20080425005415/de>. in BusinessWire.com: San Francisco / New York.
157. D. Riechers (2012), Persönlicher Schriftwechsel, S. Henkel, Editor.
158. R. Beynon (1996), Buffers for pH control. abgerufen am: 01.07.2011.
159. YellowSpringInstruments (2010), Firmenwebsite. abgerufen am: 06.04.2010.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	-	Grad Celsius
%-sat	-	Sättigungsprozent
a	-	<i>anno</i> , Jahr
aq	-	<i>aqua</i> , wässrige Lösung
atm	-	physikalische Atmosphäre; 1 atm = 101,325 kPa
BP	-	Bandpassfilter
bzw.	-	beziehungsweise
c	-	Konzentration
C_i	-	Zellkonstante am Punkt i
C_{stat}	-	Zellkonstante im statischen Bereich
CA	-	Celluloseacetat
CIP	-	<i>cleaning in place</i> , automatisiertes Reinigungsverfahren
d	-	<i>day</i> , Tag
d.h.	-	das heißt
DMEM	-	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DO	-	<i>Dissolved Oxygen</i> , Gelöstsauerstoff
DS	-	Dichroitischer Spiegel
DSP	-	<i>Digital Signal Processor</i>
EDV	-	Elektronische Datenverarbeitung
Em	-	Emission
et al.	-	<i>et alii</i> , und andere
Ex	-	Exzitation
EVA	-	Ethylenvinylacetat
FAD	-	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH2	-	reduzierte Form des Flavin-Adenin-Dinukleotid
FET	-	Feldeffekttransistor
FKS	-	Fötales Kälberserum
g	-	<i>gaseous</i> , gasförmig
g	-	Gramm
GOD	-	Glucoseoxidase
h	-	Stunde
HPLC	-	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
i.d.R.	-	in der Regel
IS	-	Ionenstärke

ISFET	-	Ionenselektiver Feldeffekttransistor
K	-	Kelvin
kPa	-	Kilopascal
l	-	<i>liquid</i> , flüssig
L	-	Liter
LED	-	<i>Light Emitting Diode</i> , Leuchtdiode
LWL	-	Lichtwellenleiter
M	-	molar [mol/L]
MCE	-	Mercaptoethanol
MES	-	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mg	-	Milligramm
min	-	Minute
mm	-	Millimeter
mM	-	millimolar [mmol/L]
mL	-	Milliliter
μL	-	Mikroliter
mmol	-	Millimol
mol	-	Mol
n.Chr.	-	nach Christus
nm	-	Nanometer
NMR	-	nuclear magnetic resonance spectroscopy, Kernspinresonanzspektroskopie
NTC	-	<i>Negative Temperature Coefficient Thermistor</i> , Heißleiter
Ω	-	Ohm
OF	-	Optisches Fenster
OPA	-	Ortho-Phtaldialdehyd
P/S	-	Penicillin/Streptomycin
p. A.	-	<i>pro analysi</i> , analysenrein
PA	-	Polyamid
PAT	-	<i>Process Analytical Technology</i>
PC	-	<i>Personal Computer</i>
PC	-	Polycarbonat
PD	-	Photodiode
PE	-	Polyethylen
PEG	-	Polyethylenglycol
PESU	-	Polyethersulfon

pHFET	-	Protonensensitiver Feldeffekttransistor
pK _a	-	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstanten
pO ₂	-	Sauerstoffpartialdruck
PP	-	Polypropylen
ppm	-	<i>parts per million</i>
PS	-	Polystyrol
Pt1000	-	genormter Pt-Temperaturfühler mit R(0°C) = 1000 Ω
PTFE	-	Polytetrafluorethylen
PVC	-	Polyvinylchlorid
R	-	elektrischer Widerstand
R ²	-	Bestimmtheitsmaß
rel. E.	-	relative Einheit(en)
RFI	-	relative Fluoreszenzintensität
rpm	-	<i>revolution per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RudPP	-	Ruthenium-tris-diphenyl-phenanthrolin
RW	-	Reaktorwand
s	-	<i>solid</i> , fest
s	-	Sekunde
σ	-	Standardabweichung
SIP	-	<i>sterilization in place</i> , Sterilisationsmethode großtechnischer Anlagen
SP	-	Sensorpatch
t ₉₀	-	Ansprechzeit bei der 90% einer sprunghaften Änderung erreicht sind
t ₉₈	-	Ansprechzeit bei der 98% einer sprunghaften Änderung erreicht sind
TB	-	<i>Terrific Broth</i>
THF	-	Tetrahydrofuran
TRIS	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USB	-	<i>Universal Serial Bus</i>
V	-	Volt
(v/v)	-	<i>Volume to Volume</i>
Vol.	-	Volumen
YSI	-	YSI 2700 Select - Glucose- und Lactatanalysator
z.B.	-	zum Beispiel
z.T.	-	zum Teil
z.Z.	-	zur Zeit

8. Anhang

8.1. Material

8.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Autosampler HPLC, Triathlon	Spark Holland, Emmen
Degasser HPLC, 3-Kanal-Degasser	Synkam, Fürstenfeldbruck
DO-Messgerät, Visiferm DO	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Flowbench, MSC-Advantage	Thermo Scientific, Waltham
Fluoreszenzdetektor, RF-10AxL	Shimadzu, Duisburg
Fluoreszenzspektrometer, F-4500	Hitachi High-Technologies, Tokio
Fluoreszenzspektrometer, F-7000 FL	Hitachi High-Technologies, Tokio
Gasmischstation, E-7000	Bronkhorst High-Tech, Ruurlo
Inkubator, Heracell 240	Thermo Scientific, Waltham
Kamera, Camedia C-4040 Zoom	Olympus, Tokio
Leitfähigkeitsmessgerät, InoLab Cond 730	WTW GmbH, Weilheim
Leitfähigkeitsmessgerät, Stratos e2402 cond	Knick GmbH&Co. KG, Berlin
Leitfähigkeitssonde, TetraCon 325	WTW GmbH, Weilheim
Leitfähigkeitssonde, Prototyp	Sartorius AG, Göttingen
Lichtmikroskop, Olympus IX 50	Olympus, Tokio
Massedurchflussregler EL-FLOW	Bronkhorst High-Tech, Ruurlo
Minizentrifuge, Rotilabo	Carl Roth, Karlsruhe
NTC-Temperatursensor B57504K	Epcos AG, München
NTC-Temperatursensor B57565G1	Epcos AG, München
NTC-Temperatursensor T100/2,3k/±0,1K%	Epcos AG, München
pH-Messgerät HI221	Hanna Instruments Inc. Ann Arbor
Pipettierhelfer, accu-jet pro	Brand, Wertheim
Pumpe HPLC, Agilent 1200	Agilent Technologies, Santa Clara
RI-Detektor, LaChrom L-7490	Merck-Hitachi, Darmstadt
Säule HPLC, Aminex HPX-87H	Biorad, München
Säule HPLC, Waters Resolve C18	Waters GmbH, Eschborn
Säulenofen HPLC, Techlab T-1	Techlab GmbH, Erkerode
Thermostat, MGW Lauda M3	Lauda GmbH&Co. KG, Lauda-Königshofen

UV-Detektor, LaChrom L-7400	Merck-Hitachi, Darmstadt
UV/VIS-Spektrometer, Cary 50 Bio	Agilent Technologies, Santa Clara
Waage, ED2245	Sartorius AG, Göttingen
Waver, BIOSTAT CultiBag RM	Sartorius AG, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage, Arium 611	Sartorius AG, Göttingen
YSI 2700 Select	Yellow Springs Instruments, Yellow Springs
Zellzähler, TC10 Automated Cell Counter	Biorad, München

8.1.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
DO-Sensorpatches	Sartorius AG, Göttingen
Einweg-Erlenmeyerkolben	Corning, Corning
Einweg-Erlenmeyerkolben	VWR, Darmstadt
Einweg-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Glucose-Enzymelektrode, CCITSens Bio	C-CIT AG, Wädenswil
Glutamat-Enzymelektrode, CCIT Sens Bio	C-CIT AG, Wädenswil
Laktat-Enzymelektrode, CCIT Sens Bio	C-CIT AG Wädenswil
pH-Sensorpatches	Sartorius AG, Göttingen
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Silikonkleber, RS 692-542	RS Components, Mörfelden-Walldorf
Stripetten, Costar Stripette	Corning, Corning
UV-Kleber, Loctite	Henkel Loctite, München
Zählkammern, TC10 Counting Slides	Biorad, München

8.1.3. Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Ammoniumsulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure, H_3BO_3	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Calciumchlorid Dihydrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Riedel de Haën AG, Seelze
DMEM	Gibco, Karlsruhe
Eisensulfat Heptahydrat, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Essigsäure, CH_3COOH	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanolamin, $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Glucose Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid, KCl	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kaliumsulfat, K_2SO_4	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kupfersulfat Pentahydrat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Lithium-L-Lactat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Malzextrakt	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
MES, 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium-L-glutamat Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat Trihydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Hannover
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumsulfit, NaSO_3	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ortho-Phthaldialdehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Sojapepton	Biotechnica Internacional, Oaxaca.
TEGO Antifoam KS 911	Evonik Goldschmidt GmbH, Essen
Tetrahydrofuran	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
TRIS-Base	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trypton Plus	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

8.1.4. Medien und Puffer

Medien

TB-Medium

Als Kultivierungsmedium von *Escherichia coli* K12 wird auf TB-Medium zurückgegriffen. Für 1 L des Mediums werden 12 g Trypton Plus, 24 g Hefeextrakt und 4 mL Glycerin auf 900 mL demineralisiertes Wasser gegeben und anschließend autoklaviert. Zusätzlich werden 100 mL eines Kaliumphosphatpuffers aus 0,17 M Kaliumdihydrogenphosphat und 0,72 M Dikaliumhydrogenphosphat. Auch der Puffer wird autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden zum Medium 100 mL Puffer dazugegeben und der pH-Wert auf 6,9 eingestellt.

DMEM

In der Kultivierung wurde kommerzielles DMEM verwendet.

Puffer

Sämtliche hier aufgeführten Puffer werden bei Labortemperaturen von 22 °C hergestellt. Die Verwendung erfolgt anschließend bei 37 °C, wodurch es notwendig ist einen zum erwünschten pH-Wert abweichenden pH einzustellen. Die Berechnung des Puffers sowie der Komponenten erfolgt dabei über das Online Tool „Buffers for pH control“ von Rob Beynon [158]. Soweit nicht anders gekennzeichnet handelt es sich um 0,05 M Puffer.

Acetat-Puffer

Um Acetat-Puffer herzustellen, werden 2,859 mL Essigsäure in etwa 900 mL entmineralisiertem Wasser gelöst. Die gewünschte Ionenstärke wird nach Tabelle 8-1 eingestellt. Durch Titration mit verdünnter Salzsäure bzw. Natriumhydroxidlösung wird der gewünschte pH-Wert eingestellt und abschließend das Volumen mit entmineralisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Tabelle 8-1: Wertetabelle zur Herstellung definierter Acetat-Puffer.

pH_{soll} (37 °C)	pH_{ist} (22 °C)	IS [mM]	NaCl [g]
5,30	5,30	150	6,369
		250	12,206
		500	26,828
5,60	5,60	150	6,137
		250	11,984
		500	26,609

MES-Puffer

Zur Herstellung des MES-Puffers werden 10,663 g MES Monohydrat eingewogen und in etwa 900 mL demineralisiertem Wasser gelöst. Durch Zugabe von Natriumchlorid erfolgt die Einstellung der Ionenstärke. Anschließend wird mit Hilfe von Natriumhydroxidlösung bzw. verdünnter Salzsäure der erforderliche pH-Wert eingestellt und mit demineralisiertem Wasser auf 1 L. Die hierfür notwendigen Werte sind Tabelle 8-2 zu entnehmen.

Tabelle 8-2: Wertetabelle zur Herstellung definierter MES-Puffer.

pH_{soll} (37 °C)	pH_{ist} (22 °C)	IS [mM]	NaCl [g]
5,90	6,06	150	7,616
		250	13,449
		500	28,050
6,20	6,36	150	7,116
		250	12,948
		500	27,550
6,50	6,66	150	6,660
		250	12,496
		500	27,105

Phosphat-Puffer

Es werden 7,799 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat eingewogen und in etwa 900 mL entmineralisiertem Wasser gelöst. Zur Einstellung der gewünschten Ionenstärke werden die benötigte Natriumchlorid entsprechend der Werte in Tabelle 8-3 entnommen. Anschließend erfolgt durch Zugabe von Natriumhydroxidlösung bzw. verdünnter Salzsäure die Einstellung des erforderlichen pH-Wertes, bevor der Puffer mit entmineralisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt wird.

Tabelle 8-3: Wertetabelle zur Herstellung definierter Phosphat-Puffer.

pH_{soll} (37 °C)	pH_{ist} (22 °C)	IS [mM]	NaCl [g]
6,80	6,84	150	2,950
		250	8,668
		500	23,084
7,10	7,14	150	1,975
		250	7,709
		500	22,159
7,40	7,44	150	1,190
		250	6,959
		500	21,466
7,70	7,74	150	0,663
		250	6,465
		500	21,024

TRIS-Puffer

Es werden 6,057 g TRIS-Base eingewogen und in etwa 900 mL entmineralisiertem Wasser gelöst. Entsprechend Tabelle 8-4 wird Natriumchlorid zur Einstellung der Ionenstärke zugegeben. Mit Natriumhydroxidlösung oder verdünnter Salzsäure wird der vorgeschriebene pH-Wert eingestellt und anschließend mit entmineralisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Tabelle 8-4: Wertetabelle zur Herstellung definierter TRIS-Puffer.

$\text{pH}_{\text{soll}} (37^\circ \text{C})$	$\text{pH}_{\text{ist}} (22^\circ \text{C})$	IS [mM]	NaCl [g]
8,00	8,41	150	7,001
		250	12,835
		500	27,437
8,30	8,72	150	7,501
		250	13,333
		500	27,934
8,60	9,02	150	7,961
		250	13,797
		500	28,404

Ethanolamin-Puffer

2,998 mL Ethanolamin werden in etwa 900 mL entmineralisiertem Wasser gelöst und nach Tabelle 8-5 mit Natriumchlorid versetzt. Es folgt die Einstellung des pH-Wertes mit verdünnter Salzsäure oder Natriumhydroxidlösung. Abschließend wird der Puffer auf 1 L aufgefüllt.

Tabelle 8-5: Wertetabelle zur Herstellung definierter Ethanolamin-Puffer.

$\text{pH}_{\text{soll}} (37^\circ \text{C})$	$\text{pH}_{\text{ist}} (22^\circ \text{C})$	IS [mM]	NaCl [g]
8,90	9,33	150	6,313
		250	12,156
		500	26,775

Puffer zur Kalibration in TB-Medium

Zur Simulation der Ionenstärken im TB-Medium wurden 1 M Puffer mit Ionenstärke 3 M angesetzt. Tabelle 8-6 zeigt die hierfür eingesetzten Mengen der Salze für 100 mL Pufferlösung aufgeführt.

Tabelle 8-6: Phosphat-Puffer zur Kalibration in TB-Medium.

$\text{pH}_{\text{soll}} (37^\circ \text{C})$	NaH_2PO_4 [g]	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [g]	NaCl [g]
6,5	9,61	3,52	9,38
6,8	8,01	5,89	7,83
7,1	6,02	8,85	5,89
7,4	4,03	11,80	3,94
7,7	2,42	14,19	2,37
8,0	1,34	15,79	1,32

8.2. Methoden

8.2.1. Probenentnahme

Die Proben wurden unter nicht sterilen Bedingungen entnommen. Lediglich die Proben der steril durchgeführten Hybridom-Zellkultivierung wurden unter der Flow Bench entnommen.

8.2.2. Lebendzellzählung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl werden aus der Probe 20 μL der Probe entnommen, in 20 μL Trypanblau gegeben und durchmischt. Es ist dabei dabei darauf zu achten, dass die Zellen beim Abnehmen des Volumens nicht absetzen, da dies die Zellzählung verfälscht. Um den Fehler zu minimieren werden zwei Ansätze mit Trypanblau angesetzt. Zur Auszählung werden aus jedem Ansatz zwei Fenster einer Zählkammer (Typ TC10 Counting Slides; Biorad, München) befüllt. Die Auszählung erfolgt anschließend automatisch durch ein Zellzähler des Typs TC10 Automated Cell Counter (BIO-RAD, München).

8.2.3. Parallele Bestimmung von Glucose- und Laktatgehalt via YSI

Vor der Bestimmung des Glucose- und Laktatgehalts werden aus der Probe die Zellen abzentrifugiert. Anschließend wird der Zellüberstand abpipetiert. Die Analyse erfolgt mit dem YSI Glucose & Lactat Analyser 2700 Select (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs).

Die Messung von Glucose mit dem YSI 2700 Select erfolgt durch enzymatischen Abbau der Glucose. Dafür wird Glucoseoxidase zwischen zwei Membranschichten aus Polycarbonat und Acetylcellulose immobilisiert. Der Analyt wird bei Kontakt mit der Enzymmembran lactonisiert, wobei sich in stöchiometrischer Menge Wasserstoffperoxid bildet. Dieses vermag die zweite Membran aus Acetylcellulose zu durchdringen, wo es schließlich an einer Platinelektrode detektiert wird. Die Polycarbonatschicht ist notwendig um die Diffusion des Substrates zum Enzym zu verlangsamen um so eine Enzymhemmung zu verhindern [159].

8.2.4. Bestimmung des Glutamatgehalts via HPLC

Für diese Analyse werden zwei Eluenten benötigt. Für Eluent A werden 13,6 g Natriumacetat Trihydrat und 12,0 g Natriumdihydrogenphosphat in etwa 2 L entionisiertem Wasser gelöst und mit 5 mL 10 M Natriumhydroxidlösung versetzt. Anschließend erfolgt eine pH-Wert Einstellung mit Natriumhydroxidlösung auf pH 7. Die Lösung wird auf 2 L aufgefüllt. Es folgt eine Filtrierung und die Zugabe von jeweils 42 mL THF und Methanol. Für Eluent B werden 920 mL entmineralisiertes Wasser vorgelegt und 1080 mL Methanol zugegeben.

Zudem wird für die Analyse ein Derivatisierungsreagenz benötigt. Hierfür werden 270 mg Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) in 5 mL Ethanol p. A. gelöst. Anschließend werden 200 µL Mercaptoethanol zugefügt und mit 0,4 M Boratpuffer (pH9,5; 12,36 g Borsäure/500 mL) auf 50 mL aufgefüllt. Die Lösung wird 24 h vor der Analyse hergestellt, so dass ein Alterungsprozess ablaufen kann.

Wichtig für die Analyse ist es protein- und partikelfreie Proben zu verwenden. Zur Fixierung des Glutamins werden 80 µL eiskaltes Methanol vorgelegt. Von der abzentrifugierten Probe aus Abschnitt 8.2.3 werden 20 µL abgenommen und zum Methanol getropft. Zur späteren Analyse mittels HPLC wird die vorbereitete Probe eingefroren. Die Verdünnung der Proben erfolgt mit Boratpuffer, wobei eine Mindestverdünnung von 1:1 vorliegen muss, da der pH-Wert der Probe bei pH 10 liegen muss.

Die Proben werden in einem Autosampler (Triathlon, Spark Holland, Emmen) vorgelegt. Dieser nimmt vor der Probenaufgabe auch die Derivatisierung durch. Hierfür werden 15 µL der Probe mit 50 µL des OPA-Reagenzes versetzt und gemischt. Nach 1,5 min Reaktionszeit werden 10 µL der derivatisierten Probe auf die Säule (Waters Resolve C18, 5 µm, 3,9x150mm, Waters GmbH, Eschborn) aufgegeben. Während der Analyse verbleibt die Säule bei 30 °C in einem Säulenofen (Techlab T-1, Techlab, Erkerode). Als Pumpe wird eine Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara) mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Während der Analyse wird mit den entgasten (3-Kanal Degasser, Synkam, Fürstenfeldbruck) Eluenten ein Gradient durchfahren. Der Verlauf des Gradienten ist in Tabelle 8-7 dargestellt.

Tabelle 8-7: Gradient der Eluenten bei der HPLC-Bestimmung des Glutamingehaltes.

Zeit [min]	%A	%B
0	100	0
50	0	100
55	0	100
60	100	0
67	100	0

Die Detektion erfolgt mit einem Fluoreszenzdetektor (Shimadzu RF-10AxL, Shimadzu, Duisburg), die Datenaufnahme mit der Software Clarity 3.0 (DataApex Ltd., Prag).

8.2.5. Parallele Bestimmung von Glucose- und Laktatgehalt via HPLC

Der in 8.2.3 verbliebene Zellüberstand wird zur Analyse mittels HPLC herangezogen. Die Proben werden entsprechend der zu erwartenden Konzentration und des Detektionsbereichs der Detektoren verdünnt. Die Messung erfolgt mit einer entgasten (3-Kanal Degasser, Synkam, Fürstenfeldbruck)

0,005 M Schwefelsäure als Eluent bei einer Flussrate von 0,8 mL/min. Die eingesetzte Säule Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Biorad, München) wird durch den Säulenofen des Typs Techlab T-1 (Techlab, Erkerode) auf die Arbeitstemperatur von 65 °C gebracht. Die Proben werden über einen Autosampler des Typs Triathlon (Spark Holland, Emmen) der der Säule zugeführt und mit einer Pumpe (Agilent 1200, Agilent Technologies, Santa Clara) durch diese den Detektoren zugeführt (LaChrom L-7490 und LaChromL-7400, Merck-Hitachi). Die Datenaufnahme erfolgt mit der Software Clarity 3.0 (DataApex Ltd., Prag).

8.2.6. Bestimmung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde ein Probenvolumen mit einem Spektrometer (Cary 50 Bio, Agilent Technologies, Santa Clara) auf seine Extinktion untersucht. Der Nullpunkt wurde zuvor mit einer 0,9 %igen Natriumchloridlösung festgelegt. Das verwendete Probenvolumen wird für die Messung in eine Einwegküvette gegeben und direkt vor der Messung noch einmal gevortext. Um die Extinktion im linearen Bereich zu halten, wurde die Verdünnung der Probe so gewählt, dass die Extinktion unter 0,5 lag. Die optische Dichte ergibt sich aus dem Produkt zwischen Verdünnungsfaktor und der ermittelten Extinktion. Die Verdünnung erfolgte ebenfalls mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung.

8.2.7. Mikroskopische Aufnahme einer *Escherichia coli* K12 Kultur

Nach Abschluss der Kultivierung wurde eine Probe entnommen, um eine mikroskopische Aufnahme der Kulturbrühe zu machen. Hierfür wurde eine kleine Menge der Kulturbrühe auf einen Objektträger gegeben, mit dem Mikroskop betrachtet und ein Foto der Zellen aufgenommen. Dieses Aufnahme ist in Abbildung 8-1 zu sehen.

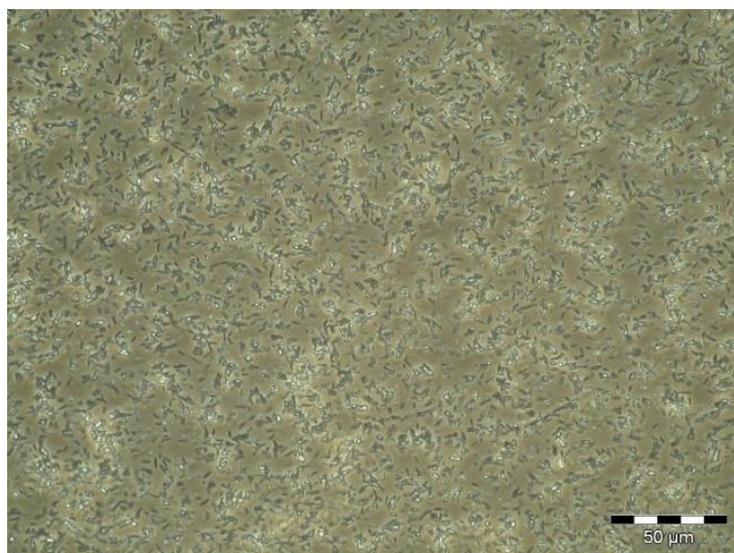


Abbildung 8-1: 40-fach vergrößerte Mikroskopaufnahme einer *Escherichia coli* K12 Probe.

8.3. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1 :	Medikamenten-Kandidaten deutscher Biotechnologie-Unternehmen [2].....	10
Abbildung 2-1 :	CultiBag; Sartorius Stedim Biotech, Göttingen.....	11
Abbildung 3-1 :	Schematische Darstellung einer Einstabmesskette [4].	15
Abbildung 3-2 :	Schematische Darstellung einer Clark-Elektrode.	21
Abbildung 3-3 :	Schematische Darstellung einer Optode und eines modularen pH-Sensors; nach [4].....	24
Abbildung 3-4 :	Aufbaumöglichkeiten eines Nanosensors : (a) homogene Verteilung von Indikator- und Referenzfarbstoff in einem Partikel, (b) Referenzkern umgeben von inerter Hülle und aminofunktionalisierter Oberfläche zur Anbindung des Indikators, (c) Referenzkern mit inerter Hülle und Indikatoraußenschicht.	26
Abbildung 3-5 :	Schematische Darstellung eines pHFETs [4].....	27
Abbildung 4-1 :	Natriumsalz der Dihydroxypyrendisulfonsäure; R ist ein beliebiger PEG- Substituent.	37
Abbildung 4-2 :	Strahlengang des Sensoluxsystems bei der pH-Detektion nach [143].	37
Abbildung 4-3 :	Zeitlicher Verlauf der Quellung des Patchmaterials.....	38
Abbildung 4-4 :	2D-Fluoreszenzspektrum eines pH-Patches bei pH 7.	39
Abbildung 4-5 :	Fluoreszenzantwort der Sensormaterials bei einer Anregung von 405 nm.....	40
Abbildung 4-6 :	Kalibration der pH-Patches bei 37 °C und einer Ionenstärke von 150 mM.....	41
Abbildung 4-7 :	Auftragung der Ratio gegen den pH bei verschiedenen Ionenstärken.	41
Abbildung 4-8 :	Auftragung der Ratio gegen den pH in Abhängigkeit von der Temperatur.	42
Abbildung 4-9 :	Verlauf der unterschiedlichen gemessenen Intensitäten zur Beobachtung des Photobleaching.....	43
Abbildung 4-10 :	Verlauf der Rohdaten während des Photobleachings.....	44
Abbildung 4-11 :	Differenz zwischen Referenzelektrode und Sensorpatch in Abhängigkeit von Prozessdauer und Messintervall.	45
Abbildung 4-12 :	Test zur Bestimmung der Ansprechzeit der pH-Patches.	46
Abbildung 4-13 :	Gegenüberstellung des Quotienten $t_{98}/c(\text{H}_3\text{O}^+)$ für die einzelnen Versuche und den Mittelwert.	47
Abbildung 4-14 :	Ansprechzeit t_{98} gegen die Sprungweite, aufgeteilt nach Sprungrichtung.	48
Abbildung 4-15 :	Ruthenium-tris-diphenylphenanthrolin Dihexafluorid.....	50
Abbildung 4-16 :	Strahlengang des Sensoluxsystems bei der Bestimmung des Gelöstsauerstoffs nach [143].....	51

Abbildung 4-17 :	Fluoreszenzspektrum des Gelöstsauerstoffpatches bei eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 100%-sat.....	52
Abbildung 4-18 :	Fluoreszenzspektrum des Gelöstsauerstoffpatches bei eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 0%-sat.....	52
Abbildung 4-19 :	Exizitations- und Emissionsspektrum des DO-Patches bei den Detektionswellenlängen.	53
Abbildung 4-20 :	Darstellung des prozentualen Differenzfluoreszenzspektrums des DO-Patches.	54
Abbildung 4-21 :	Versuchsaufbau zur Kalibration der Sauerstoffpatches.	55
Abbildung 4-22 :	Stufenprofil zur Kalibration des Gelöstsauerstoffpatches.	56
Abbildung 4-23 :	Kalibrationsfunktion des Gelöstsauerstoffpatches.	56
Abbildung 4-24 :	Einfluss des pH-Wertes auf den Sauerstoffpatch.....	57
Abbildung 4-25 :	Abweichung von DO-Patch und DO-Elektrode zum Sollwert in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	58
Abbildung 4-26 :	Einfluss der Ionenstärke auf den Sauerstoffpatch.	59
Abbildung 4-27 :	Abweichung von DO-Patch und DO-Elektrode zum Sollwert in Abhängigkeit von der Ionenstärke.....	60
Abbildung 4-28 :	Sauerstofflöslichkeit in Wasser bei 1 atm pO ₂ in Abhängigkeit von der Temperatur; nach [146].....	60
Abbildung 4-29 :	Verlauf eines Langzeittests mit dem Gelöstsauerstoffpatch.....	61
Abbildung 4-30 :	Ausschnitt aus dem Langzeittest; Tag 1.	62
Abbildung 4-31 :	Lineare Näherung des Bleaching-Effektes.....	63
Abbildung 4-32 :	Abweichung zwischen genähertem Bleaching und der Referenzelektrode.....	64
Abbildung 4-33 :	Ansprechverhalten des Sauerstoffpatches bei einer sprunghaften Änderung des Sauerstoffanteils von 100 %-sat auf 0 %-sat.....	65
Abbildung 4-34 :	t ₉₈ -Ansprechzeiten bei einem Konzentrationssprung von 100 %-sat auf 0 %-sat Gelöstsauerstoff.....	65
Abbildung 4-35 :	Reaktionsmechanismus beim Abbau von GOD.....	66
Abbildung 4-36 :	Verlauf eines Tests des Sensorpatches für Gelöstsauerstoff in einem Modellsystem.	67
Abbildung 4-37 :	Aufsicht (oben links) und seitliche Ansicht (links unten) auf das Leitfähigkeitsmodul; schematische Darstellung (rechts)	69
Abbildung 4-38 :	Versuchsaufbau zur Simulation unterschiedlicher Füllhöhen und Reaktordurchmesser.	70

Abbildung 4-39 : Schematische Aufsicht auf den Versuchsaufbau zum Einsatz unterschiedlicher Reaktorradien.....	71
Abbildung 4-40 : Entwicklung der Zellkonstante bei Variation von Reaktordurchmesser und Füllhöhe.....	71
Abbildung 4-41 : Relative Abweichung der ermittelten Zellkonstanten vom Mittelwert.....	73
Abbildung 4-42 : Relative Abweichung der elektrischen Leitfähigkeit zwischen Modul und Referenzelektrode.....	74
Abbildung 4-43 : Orientierung der Sensorkappenöffnungen; links : horizontal/vertikal; rechts : diagonal.....	75
Abbildung 4-44 : Einfluss der Orientierung der Sensorkappe auf die Zellkonstante in Abhängigkeit vom Füllstand.....	75
Abbildung 4-45 : Verhältnis C_i/C_{stat} in Abhängigkeit von Sensorkappenorientierung und Füllstand.....	76
Abbildung 4-46 : Schematische Darstellung der angenommenen Feldlinien der Messanordnung.....	77
Abbildung 4-47 : Zellkonstanten in Abhängigkeit von Sensorkappenorientierung und Einsatzdurchmesser.....	77
Abbildung 4-48 : Versuchsaufbau zur Simulation verschiedener Anstellwinkel.....	78
Abbildung 4-49 : Prozentuale Übereinstimmung mit der bestimmten mittleren Zellkonstante.....	79
Abbildung 4-50 : Prozentuale Abweichung des Messwerts von der Referenz bei voreingestellter Zellkonstante.....	79
Abbildung 4-51 : Änderung des Flüssigkeitsspiegels in einem wippenden System.....	80
Abbildung 4-52 : Langzeitmessung der elektrischen Leitfähigkeit auf einem Waver bei einem Füllstand von 4 cm.....	81
Abbildung 4-53 : Ausschnitt aus einer Messung der elektrischen Leitfähigkeit bei 4 cm Füllstand.....	81
Abbildung 4-54 : Langzeitmessung der elektrischen Leitfähigkeit auf einem Waver bei einem Füllstand von 2 cm.....	82
Abbildung 4-55 : Ausschnitt aus einer Messung der elektrischen Leitfähigkeit bei 2 cm Füllstand.....	83
Abbildung 4-56 : Normierte Darstellung der Ansprechzeit des Sensormoduls, Darstellung der Einstellzeit schraffiert.....	83
Abbildung 4-57 : Ansprechzeiten t_{98} bei einem Leitfähigkeitssprung.....	84
Abbildung 4-58 : Verlauf der Langzeitmessung mit Auftragung von elektrischer Leitfähigkeit und Temperatur.....	85

Abbildung 4-59 :	Position des Pt1000 im Messmodul.	86
Abbildung 4-60 :	Getestete NTC-Sensoren; von links nach rechts: Glasverkapselt , Vollmetallkörper und Foliensensor.....	86
Abbildung 4-61 :	Langzeitstabilitätstest der NTC-Sensoren.....	87
Abbildung 4-62 :	Box-Diagramm zum Langzeitversuch bei konstanter Temperatur.....	88
Abbildung 4-63 :	Schematischer Versuchsaufbau zu Bestimmung der Temperaturdifferenz zwischen Medium und Umgebung.....	89
Abbildung 4-64 :	Sicht von unten auf den Ventilator und das Leitfähigkeitsmodul.....	89
Abbildung 4-65 :	Verlauf eines Temperatursprungs von 50 °C auf 80 °C.	90
Abbildung 4-66 :	Reaktion des Temperatursensors auf aktive Kühlung durch einen Ventilator.	90
Abbildung 4-67 :	Temperatur-Stufenprofil des aktiv luftgekühlten Sensormoduls gegen die Referenz.....	91
Abbildung 4-68 :	Auftragung der Sensortemperatur gegen die Referenztemperatur bei aktiver Luftkühlung.....	92
Abbildung 4-69 :	Zeitlicher Verlauf eines Temperatur-Stufenprofils nach Modifizierung des Sensormoduls.	92
Abbildung 4-70 :	Auftragung der Sensortemperatur von altem und neuem Sensormodul gegen die Referenztemperatur bei aktiver Luftkühlung.....	93
Abbildung 4-71 :	Beispielhafter Verlauf der Ansprechzeitbestimmung von Referenzthermometer und Sensormodul.	94
Abbildung 4-72 :	Ansprechzeiten t_{98} von Sensormodul und Referenzthermometer.....	95
Abbildung 4-73 :	Verlauf einer Ansprechzeitkurve der getesteten NTCs.	96
Abbildung 4-74 :	Ansprechzeiten der NTCs für Temperatursprünge aufwärts und abwärts die Temperaturskala.....	97
Abbildung 4-75 :	Siebdruckelektroden im Größenvergleich.....	98
Abbildung 4-76 :	Messergebnisse der Glucose Konzentrationsreihe.	99
Abbildung 4-77 :	Messergebnisse der Laktat Konzentrationsreihe.	100
Abbildung 4-78 :	Messergebnisse der Glutamat Konzentrationsreihe.....	101
Abbildung 4-79 :	Zusammenstellung der Kultivierungsdaten der Hybridom-Zellen.	103
Abbildung 4-80 :	Siebdruckelektroden nach Einsatz in der Kultivierung.....	105
Abbildung 4-81 :	Parallele (links) und antiparallele Anordnung (rechts).....	107
Abbildung 4-82 :	Konnektor an der Glasfaser (links) und eingelassener Adapter (rechts).....	108
Abbildung 4-83 :	Prototyp des Sensormoduls.	108
Abbildung 4-84 :	Schematischer Versuchsaufbau zum Test des Prototypen.	109
Abbildung 4-85 :	Zeitlicher Verlauf des Gelöstsauerstoffanteil der Testkultivierung.....	110

Abbildung 4-86 :	Zeitlicher Verlauf der Leitfähigkeitsmessung der Testkultivierung.....	111
Abbildung 4-87 :	Zeitlicher Verlauf der Temperaturmessung während der Testkultivierung.....	112
Abbildung 4-88 :	Zeitlicher Verlauf des pH-Wert während der Testkultivierung	113
Abbildung 4-89 :	pH-Wert während der Kultivierung auf Grundlage unterschiedlicher Modelle...	114
Abbildung 4-90 :	Darstellung der unterschiedlichen Kalibrationen der pH-Patchmaterials.	115
Abbildung 8-1 :	40-fach vergrößerte Mikroskopaufnahme einer <i>Escherichia coli</i> K12 Probe.....	137

8.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Referenzelektroden für die pH-Messung.....	17
Tabelle 3-2:	Möglichkeiten der ratiometrischen Messung	25
Tabelle 3-3:	Für die Fluoreszenzmessung geeignete Farbstoffe [4].	25
Tabelle 3-4:	Auswahl integrierbarer Einwegsensoren, sortiert nach ihrem Messprinzip; nach [87].....	31
Tabelle 3-5:	Auswahl marktverfügbarer Sensoren für die Prozessüberwachung.....	32
Tabelle 4-1:	Gängige Einwegsensoren zur pH-Messung.	36
Tabelle 4-2:	Ergebnisse der Testläufe mit Start- und End-pH, t_{98} und R^2 der Näherungsfunktion. ...	47
Tabelle 4-3:	Gängige Sensoren zur DO-Messung.	50
Tabelle 4-4:	Wertetabelle der ermittelten Zellkonstanten in Abhängigkeit des Einsatzdurchmessers.....	72
Tabelle 4-5:	Mittelwerte der Ansprechzeiten t_{98} der einzelnen NTCs mit ihrer Standardabweichung.	97
Tabelle 8-1:	Wertetabelle zur Herstellung definierter Acetat-Puffer.	132
Tabelle 8-2:	Wertetabelle zur Herstellung definierter MES-Puffer.	133
Tabelle 8-3:	Wertetabelle zur Herstellung definierter Phosphat-Puffer.	133
Tabelle 8-4:	Wertetabelle zur Herstellung definierter TRIS-Puffer.....	134
Tabelle 8-5:	Wertetabelle zur Herstellung definierter Ethanolamin-Puffer.	134
Tabelle 8-6:	Phosphat-Puffer zur Kalibration in TB-Medium.	134
Tabelle 8-7:	Gradient der Eluenten bei der HPLC-Bestimmung des Glutamingehaltes.....	136

8.5. Mitarbeit an unterschiedlichen Versuchsteilen

In diesem Abschnitt werden Personen aufgeführt, die an der Durchführung dieser Arbeit Anteil hatten.

Kapitel 4.1.5:	Experimentelle Durchführung:	M.Sc. Shaobin Lu
Kapitel 4.1.7:	Experimentelle Durchführung:	M.Sc. Shaobin Lu
Kapitel 4.2.3:	Experimentelle Durchführung:	B. Sc. Tobias Finkel
Kapitel 4.2.4:	Experimentelle Durchführung:	B. Sc. Tobias Finkel
Kapitel 4.2.6:	Experimentelle Durchführung:	B. Sc. Tobias Finkel
Kapitel 4.2.7:	Experimentelle Durchführung:	B. Sc. Tobias Finkel
Kapitel 4.2.8:	Experimentelle Durchführung:	B. Sc. Tobias Finkel
Kapitel 4.5.2:	Gemeinsame experimentelle Durchführung mit Dr. Daniel Landgrebe	
Kapitel 4.7:	HPLC-Analysen und Auswertung durchgeführt von Martina Weiss	
	Mikroskopische Aufnahme:	Dipl.-Chem. Jörg Schmidt-Hager
Software:	Dipl.-Ing. (FH) Thorleif Hentrop	
Elektrische Installation:	Dipl.-Ing. (FH) Thorleif Hentrop und Burghard Probst	
Testreaktor:	Thorsten Stempel und Friedbert Gellermann	
Mechanische Anpassungen:	Thorsten Stempel, Friedbert Gellermann und Sandra Schiele	

8.6. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Steffen Henkel
Geburtsdatum: 16. Juli 1984
Geburtsort: Hildesheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

Juni 2010 - November 2012 Doktorarbeit an der Leibniz Universität Hannover
Institut für Technische Chemie
Arbeitskreis Prof. Scheper
Thema: Entwicklung eines Multisensoradapters zum Einsatz in
Disposable Bioreaktoren

Oktober 2009 - April 2010 Diplomarbeit an der Leibniz Universität Hannover
Institut für Technische Chemie
Arbeitskreis Prof. Scheper
Thema: Vergleichende Untersuchung zum TOC-Abbau in Reinst-
wasser mittels Ozon

Oktober 2004 - April 2010 Chemiestudium an der Leibniz Universität Hannover
Schwerpunkt: Technische Chemie
Abschluss: Diplom

1995 - 2004 Bischöfliches Gymnasium Josephinum, Hildesheim
Abschluss: Abitur

1991 - 1995 Grundschule Borsum, Borsum

BERUFSERFAHRUNG

- seit Januar 2013 Entwickler im Bereich Industriereiniger und Korrosionsschutz;
PetroFer Chemie H.R. Fischer GmbH + Co. KG, Hildesheim
- Juni 2010 - November 2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter;
Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover,
Arbeitskreis Prof. Scheper

PUBLIKATIONEN

- [1] Henkel S., Beutel S. 2013. Determination of pH Value in Biotechnology. Chemie Ingenieur Technik, 85(6):872-885.
- [2] Henkel S., Beutel S., Riechers D., Scheper T. 2012. Multisensorsysteme für Einwegbioreaktoren, 30. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen und ProzessNet-Jahrestagung 2012, 10. - 13. September 2012, Karlsruhe (Poster).
- [3] Henkel S., Beutel S., Endres C., Riechers D., Scheper T. 2011. Multisensorsysteme für Einwegbioreaktoren, in Gerlach G., Schütze A. (Hg.), Dresdner Beiträge zur Sensorik, Band 43, 10. Dresdener Sensor-Symposium, 305-309.
- [4] Henkel S., Beutel S., Endres C., Riechers D., Scheper T. 2011. Multisensorsysteme für Einwegbioreaktoren, 10. Dresdner Sensor-Symposium, 5. – 7. Dezember, Dresden (Poster)
- [5] Henkel S., Beutel S., Endres C., Riechers D., Scheper T. 2011. Multisensorsystems for Disposable Bioreactors., 8th European Congress of Chemical Engineering together with ProcessNet-Annual Meeting and 1st European Congress of Applied Biotechnology together with 29th DECHEMA's Biotechnology Annual Meeting, 26. – 29. September 2011, Berlin (Poster)
- [6] Beutel S, Henkel S. 2011. In situ techniques in modern bioprocess monitoring. Applied Microbiology and Biotechnology, 91:1493-1505.
- [7] Henkel S., Beutel S., Endres C., Riechers D., Scheper T. 2011. Multisensorsystems for Disposable Bioreactors, 10th workshop on biosensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis, 19. - 22. Juni, Weimar (Poster)

Anteil an den Publikationen:

- [2-5; 7]: Experimentelle Arbeiten, Text und Grafiken.
- [1, 6]: Text und z.T. Grafiken.